

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Vztah Leidenské mutace a rezistence na aktivovaný protein C

Diplomová práce

Bc. Vendula Zemanová

Školitel: Prim. MUDr. Ivan Vonke, MBA

České Budějovice 2017

Zemanová, V., 2017: Vztah Leidenské mutace a rezistence na aktivovaný protein C. [Relationship of Leiden mutation and activated protein C resistance. Mgr. Thesis, in Czech.] - 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation:

This thesis was about the relationship of the Factor V Leiden mutation and activated protein C resistance. I looked up patients with Leiden mutation and activated protein C resistance. I monitored the frequency of thromboembolism and miscarriages in the personal and family case history of patients. Subsequently, I looked up if other risk factors which affect clinical manifestations in patients with this mutation can be found.

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

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

V Českých Budějovicích 19. 4. 2017

.....

Bc. Vendula Zemanová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu primáři MUDr. Ivanu Vonke MBA za vedení mé práce, jeho rady, podněty a především ochotu a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat paní Mgr. Nadě Roučkové za seznámení s chodem laboratoře a prací v ní, především s koagulačními vyšetřeními nezbytných k vypracování této práce. A nemůžu zapomenout ani na moji rodinu, která mi umožnila dojít až sem. Její obrovskou podporu a pochopení ve chvílích zoufalství.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Hemostáza.....	2
2.1 Primární hemostáza.....	2
2.2 Koagulační kaskáda.....	5
2.2.1 Vnější cesta.....	6
2.2.2 Vnitřní cesta.....	7
2.3 Fibrinolytický systém.....	9
2.3.1 Plazminogen.....	9
2.3.2 Aktivátory plazminogenu.....	11
2.3.3 Přeměna plazminogenu na plazmin.....	12
2.3.4 Plazmin.....	12
2.3.5 Aktivace fibrinolýzy.....	13
3. Hyperkoagulace.....	14
3.1 Tromboembolická choroba, trombofilní stavy.....	14
4. Vrozené trombofilie.....	19
4.1 Leidenská mutace.....	19
4.1.1 Faktor V.....	19
4.1.2 Protein C.....	21
4.2 FV Leiden.....	24
4.2.1 Laboratorní diagnostika APCR spojené s faktorem V Leiden.....	26
4.2.2 D-dimery.....	28
4.3 Léčba.....	29
4.3.1 Heparin.....	30
4.3.2 Nízkomolekulární hepariny (LMWH).....	31
4.3.3 Kumarinová antikoagulancia.....	31
4.3.4 Nová antikoagulancia (NOACs – new oral anticoagulants).....	32

5. Cíl práce a hypotézy	34
5.1 Cíl práce	34
5.2 Hypotézy	34
6. Metody a postupy	35
6.1 Principy analýzy	35
6.1.1 Postup při zpracování vzorků pro koagulační vyšetření.....	35
6.1.2 Stanovení funkčně aktivního proteinu C	36
6.1.3 Stanovení rezistence na aktivovaný protein C.....	36
6.1.4 Stanovení aktivity koagulačního faktoru V	37
6.1.5 Stanovení protrombinového času podle Quicka.....	37
6.1.6 Stanovení aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT).....	37
6.1.7 Stanovení koncentrace funkčně aktivního fibrinogenu	38
7. Zpracování dat.....	39
8. Diskuze.....	47
9. Závěr.....	50
10. Seznam zkratk	51
11. Seznam použité literatury.....	53

1. Úvod

Krev je životně důležitá tekutina kolující v žilách a cévách. Zajišťuje přenos důležitých látek pro náš život. Aby měla správnou konzistenci, působí na ni několik mechanismů. Tyto mechanismy zajišťují, aby nebyla moc řídká nebo naopak moc hustá. Také zabraňují, ať už při lehkém či těžkém poranění, vykrvácení vytvořením sraženiny a zároveň zajišťují dohled, aby sraženina nedorostla život-ohrožujících rozměrů.

Tak jako i v jiných případech (nejen hematologických) se vyskytují jedinci, u nichž mechanismy nepůsobí tak, jak by měly. V tomto případě se to týká nedostatečné srážlivosti, způsobující krvácivé stavy, anebo naopak, nadměrné srážlivosti, způsobující tvorbu sraženin. Ty ucpávají cévy a žíly a mohou způsobit fatální následky.

Trombofilní stavy mohou být vrozené (primární) i získané (sekundární). Jsou to stavy se zvýšenou predispozicí k tvorbě trombu (sraženiny). Mezi tromboembolickou nemoc (TEN) patří hluboká žilní trombóza (HŽT) a plicní embolie (PE). Incidence tohoto stavu je 1/1 000 dospělých ročně a s věkem roste (Indrák 2014). U žen může také docházet k potratům.

Cílem mé práce je vztah Leidenské mutace a rezistence na aktivovaný protein C (APCR). Sledovat frekvenci TEN a potratů v osobní i rodinné anamnéze pacientů a zjistit, zda lze nalézt další rizikové faktory, které ovlivňují klinické projevy u pacientů s touto mutací.

2. Hemostáza

Hemostáza neboli srážení krve jsou složité, avšak nezbytné procesy v lidském organismu. „Hemostáza je řízená optimální souhrou endoteliální bariéry, trombocytů, aktivačních a inhibičních faktorů koagulační kaskády a fibrinolytického systému.“ Hlavní složky tvoří cévní stěna, tkáňová složka, krevní destičky, činitele plazmatického koagulačního systému (Pecka 2004).

Jedná se o vzájemné působení a ovlivňování několika procesů a mechanismů. Ty zajišťují správnou celistvost krve, aby mohla cévami dobře kolovat, a zároveň umožňují srážení krve, které je důležité nejen při poranění cévy, ale i při její obnově, růstu a metastázování nádorů apod.

Ke srážení může docházet i bez poranění cévy. V tomto případě se vytváří sraženina (trombus) uvnitř cévy, čímž dochází ke zpomalení průtoku krve. To může být příčinou vzniku ischemizace a nekrózy nebo venostázy v postižené tkáni či orgánu.

Poruchou cévní stěna ztrácí nesmáčivost a dochází k aktivaci systémů hemokoagulace. V tomto případě se sraženina nazývá koagulum. To zaceluje místo poškození a zabraňuje dalšímu úniku krve.

Cévní stěna aktivuje krevní srážení po ztrátě smáčivosti vnitřního povrchu, kdy dojde narušením k odhalení kolagenních receptorů bazální membrány. Ale také dojde ke změně propustnosti tromboplastických substancí z perivaskulární tkáně. Dále pak jsou cévní endotelie místem syntézy řady působků ovlivňujících krevní srážení a stav endotelového povrchu.

Rozdílné je také místo působení hemostatických mechanismů. (Pecka 2004; Indrák 2006)

2.1 Primární hemostáza

Primární hemostáza je proces, při kterém dochází k tvorbě primární hemostatické zátky, jejíž funkce je uzavření místa, kde došlo k narušení celistvosti cévní stěny a dochází tak k zastavení krvácení. Tohoto procesu se zúčastňují krevní destičky a cévní složka.

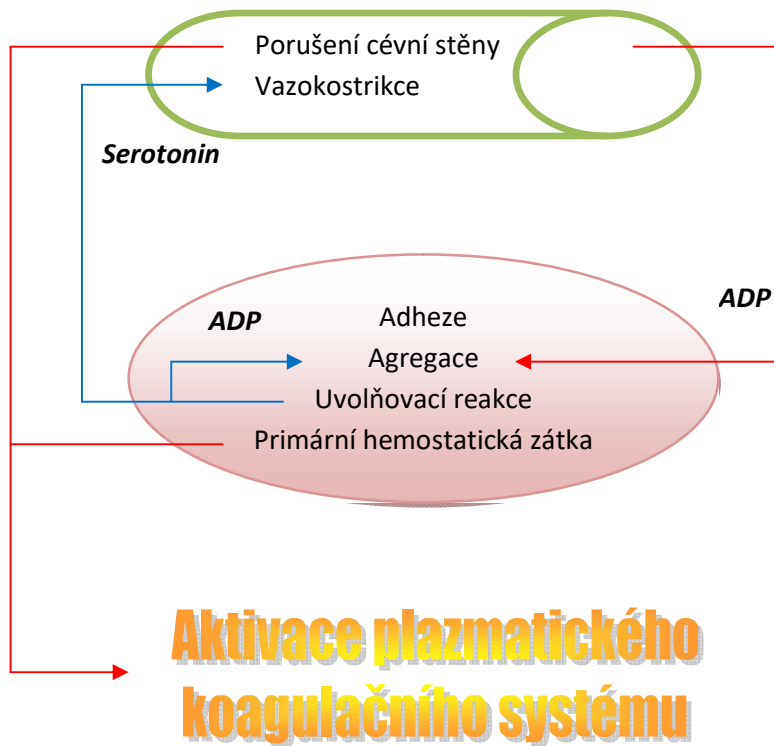
Neaktivní destičky, které cirkulují v oběhu a jsou volně smáčené krevním tokem, mají oválný diskoidní tvar. Na neporušenou či nezměněnou endotelovou výstelku cévní stěny nijak nereagují.

K narušení endotelové výstelky dochází při poranění, zánětlivých či degenerativních procesech. Při tomto narušení dojde k obnažení pojivové tkáně pod endotelem. V místě poškození cévní stěny dochází k adhezi. Při adhezi dochází k přichycení krevních destiček ke kolagenovým vláknům pomocí glykoproteinových receptorů (GP Ia/IIa/IIIb, GP Ib/V/IX). Toto spojení je umožněno bivalentními proteiny vWF či fibronectinem (Fb). Poté dochází k aktivaci krevních destiček, kdy je spuštěna kaskáda biochemických a metabolických pochodů. Tento proces je navíc doprovázen uvolňováním proagregačních a chemických působků, tzv. sekreční fáze. Pomocí mezibuněčných signálů dochází ke kontaktování dalších destiček. Po aktivaci mění destičky svůj tvar na kulovitý s výběžky, dochází ke změně struktury, k aktivaci a obnažení vazebných míst receptorů. To umožňuje agregaci - vzájemnou vazbu trombocytů pomocí bivalentních proteinů. Aktivací destiček proagregačními stimuly dochází k zesílení děje a to vede k postupné tvorbě bílého trombu – destičkové zátky.

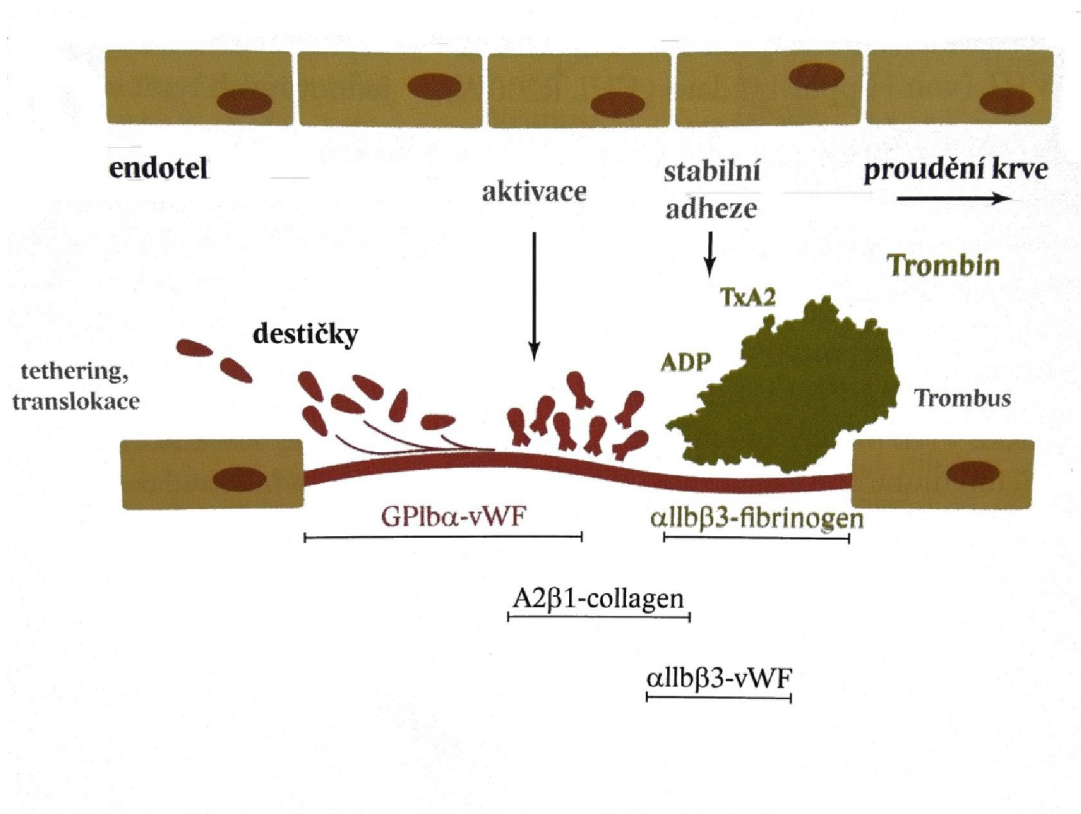
Vrcholem této fáze je přesun fosfolipidů do vnější membránové struktury destiček. Uvolnění fosfolipidů zesiluje polymeraci rozpustného fibrinogenu na fibrin. Následně dojde ke slepení destiček. „Destičkový trombus se zvětšuje a je hlavním hemostatickým mechanismem.“ Při tvorbě zátky se také uplatňuje tkáňový faktor z poškozených perivaskulárních tkání. Na povrchu aktivovaných krevních destiček se vytváří koagulačně aktivní komplexy. To umožňuje interakci povrchu destiček a koagulačních faktorů, což vede k vytvoření fibrinové zátky. Pomocí fibrinové sítě jsou vychytávány erytrocyty a leukocyty a postupně dochází k přeměně bílého trombu na červený.

Účast některých látek je důkazem propojenosti primární hemostázy a plazmatického koagulačního systému (Pecka 2004).

Na obrázku 1 je znázorněné schéma primární hemostázy a na obrázku 2 tvorba destičkové zátky a koagulace.



Obr. 1: Schéma primární hemostázy (Pecka 2004).



Obr. 2: Tvorba destičkové zátky a koagulace (Pospíšilová, Dvořáková, Mayer 2013).

2.2 Koagulační kaskáda

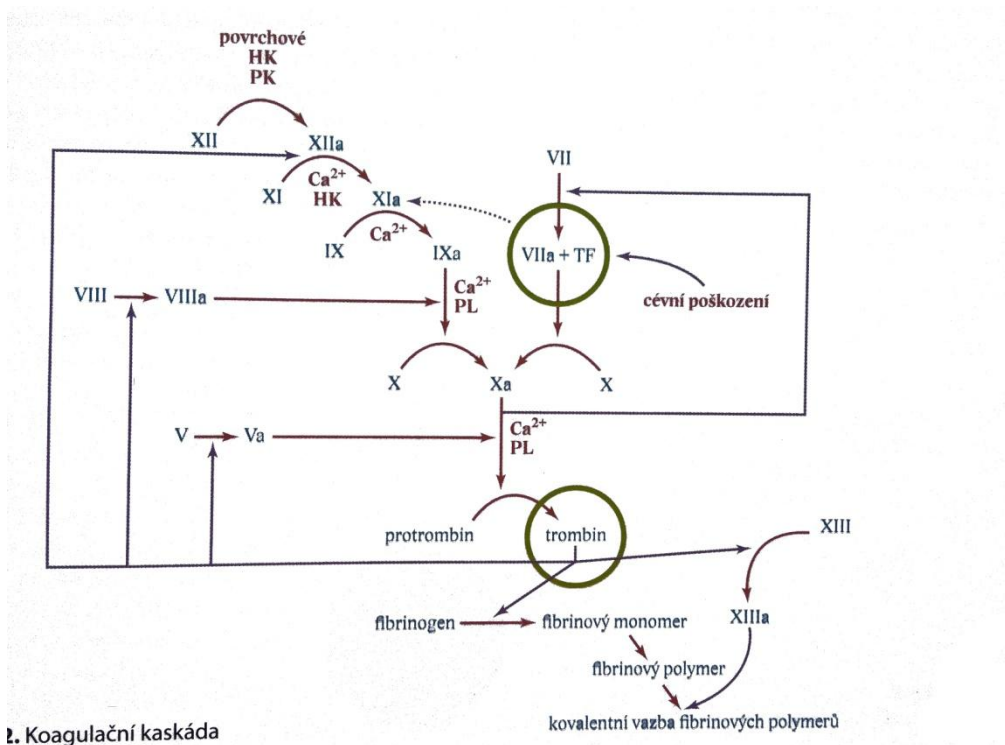
Koagulace krve je složitý enzymatický proces probíhající kaskádovitě, a na kterém se účastní téměř 20 různých plazmatických bílkovin. Tato kaskáda je znázorněna na obrázku 3. Většina těchto proteinů je v inaktivovaném stavu jako zymogeny. Na počátku koagulačních pochodů musí být aktivovány, zpravidla se tak děje proteolýzou. Tyto aktivované proteiny postupem kaskádou aktivují další inaktivované zymogeny a někdy i zpětně inhibují aktivaci a činnost některých zymogenů (Donner 1985).

Mechanismy, účastníci se hemokoagulace, lze rozdělit do několika skupin. Počet těchto skupin se v literatuře liší, ale vesměs jde vždy o totéž. Někdy je v jedné skupině zahrnuto více mechanismů zároveň. Donner 1985 rozděluje mechanismy do 5 fází:

- 1) Kontaktní fáze krevního srážení
- 2) Tvorba faktoru IXa
- 3) Tvorba faktoru Xa
- 4) Tvorba trombinu
- 5) Tvorba trombinu a jeho stabilizace

Všechny koagulační činitelé, výjimkou je fibrinogen a antitrombin III, jsou v plazmě obsaženy pouze v malém množství. Hemostatické minimum, poločas, místo tvorby a koncentrace v plazmě jednotlivých faktorů je znázorněn v tabulce I.

„Většina koagulačních činitelů je tvořena v játrech, některé potřebují k syntéze vitamin K“ (Pecka 2004).



Obr. 3: Koagulační kaskáda (Pospíšilová, Dvořáková, Mayer 2013).

Aktivace koagulace se dělí na 2 skupiny: vnitřní cesta a zevní cesta.

2.2.1 Vnější cesta

V zevní cestě hraje nejdůležitější roli pro aktivaci srážení krve tkáňový faktor (TF), který je významný také díky své vazbě na buněčné elementy, především monocyty, a zvýšené tvorbě některými nádorovými buňkami. Uplatňuje se při rychlé ochraně při poranění tkáně.

Expozicí tkáňového faktoru je vyvolána přeměna protrombinu na trombin. Při této expozici dochází k vazbě F VIIa, který volně cirkuluje v plazmě. Vzniklý komplex aktivuje F Xa. Ten společně s F Va vstupuje do komplexu protrombinázy a vyvolává přeměnu protrombinu na trombin. Vytvořený trombin aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Z fibrinových monomerů se vytváří polymer, který je stabilizován F XIIIa. F XIIIa je aktivovaný trombinem. Výsledkem je nerozpustný fibrin.

Při poškození tkáně dochází k porušení endoteliální bariéry. Ta jinak odděluje buňky nesoucí tkáňový faktor od cirkulující krve. V místě poškození vzniká koagulačně aktivní komplex [TF . VIIa], který je klíčovým bodem iniciace hemostázy.

2.2.2 Vnitřní cesta

Ve vnitřní cestě je nejvýznamnější faktor IX, který tyto dvě cesty spojuje. F IX je součástí prvotního komplexu, kterým je aktivovaná společná cesta koagulace. Při ní do reakce vstupuje F VIII a také F V, který se stává součástí dalšího komplexu spolu s F X. Na vnitřní cestě se účastní převážně činitelé v plazmě, ale také subendotelová kolagenová vlákna a některé extravaskulární činitelé z lymfatických cest.

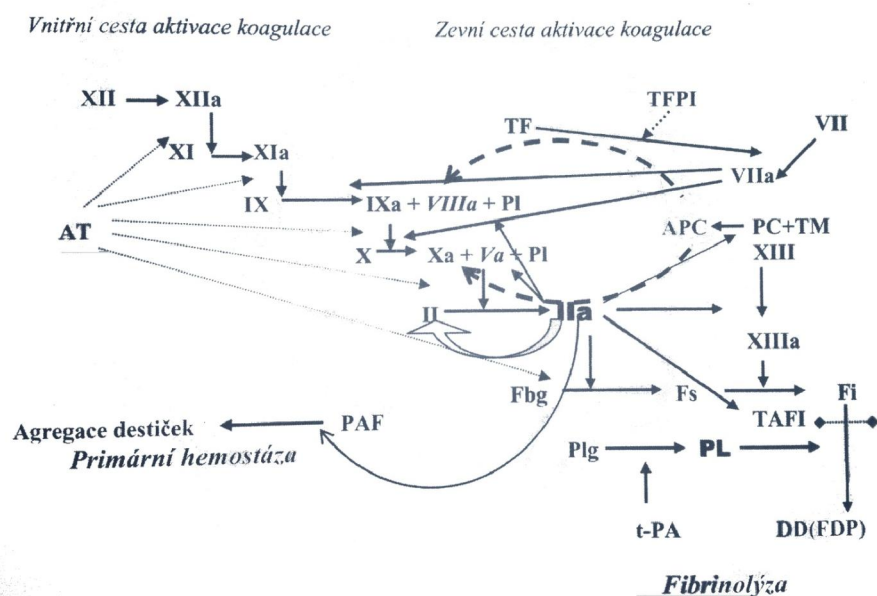
Přeměna protrombinu na trombin je spouštěna ve fázi kontaktu. Je aktivován F XII. F XIIa dále aktivuje F XI a IX. Během toho dochází k zesílení vyvolávajícího efektu a k aktivaci F V a F VIII. F Xa spolu s F Va konvertuje protrombin na trombin. „Vzniklý trombin aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin.“ F XIIIa aktivovaný trombinem stabilizuje polymery z fibrinových monomerů. Výsledkem je nerozpustný fibrin.

Vnitřní systém je aktivován bez porušení kontinuity cév (Donner 1985; Pecka 2004; Indrák 2006). Schéma koagulace a fibrinolýzy je znázorněn na obrázku 4.

Nutné jsou ovšem také inhibitory krevního srážení. K těm patří především antitrombin a systém proteinu C. Účinek antitrombinu výrazně zvyšuje heparin. Antitrombin se váže na serinové proteázy, čímž inaktivuje jejich enzymatickou aktivitu. Aktivovaný protein C (APC) za přítomnosti svého kofaktoru (protein S) proteolyticky štěpí kofaktory koagulace (Indrák 2006).

Tab. I: Přehled faktorů plazmatického systému krevního srážení a některé jejich vlastnosti (Donner 1985; Indrák 2006).

Faktor	Název	Místo tvorby	Koncentrace v plazmě (μg/ml)	Poločas (h)	Hemostatické minimum
FI	Fibrinogen	Játra	10 ³	72-120	0,5 g/l
FII	Protrombin	Játra	150	60-96	40 %
FIII	Tkáňový faktor	Tkáně	0	-	-
FIV	Calcium	-	100	-	-
FV	Proakcelerin	Játra	10	8-24	10-15 %
FVII	Prokonvertin	Játra	0,5	4-6	10 %
FVIII	Antihemofilický globulin	Endotel cév	15	8-12	20-30 %
FIX	Antihemofilický faktor	Játra	3	18-30	20-30 %
FX	Stuartův-Prowerové faktor	Játra	15	30-48	20 %
FXI	Rosenthalův faktor	Játra	<5	48-60	15-20 %
FXII	Hagemanův faktor	Játra	5	50-70	20-30 %
FXIII	Faktor stabilizující fibrin	Játra	20	72-160	1-2 %



Obr. 4: Aktivace koagulační kaskády (Indrák 2006).

2.3 Fibrinolytický systém

Fibrinolytický systém je zodpovědný nejen za lýzu fibrinového koagula, ale také má svou roli při degradaci kolagenu, v angiogenezi či u metastáz tumoru. V lidské krvi je enzymový systém rozpouštějící fibrinovou sraženinu. Za fyziologických podmínek je udržována hemostatická rovnováha. Při narušení této rovnováhy omezuje fibrinové koagulum krevní tok, který může vést až k uzavření cévy.

V mnoha ohledech se fibrinolytický systém neliší od plazmatického koagulačního systému. Hlavní složkou je plazminogen – proenzym serinové proteázy – plazminu. Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) a urokináza (u-PA) patří mezi nejdůležitější aktivátory plazminogenu.

Fibrinolytický systém je aktivován organismem jako reakce na přítomnost fibrinového koagula nebo přítomnost fibrinových vláken. Po navázání plazminogenu na krevní koagulum se aktivuje na plazmin díky působení aktivátorů uvolněných z endotelu. „Plazmin proteolyticky působí na koagulum a je nakonec inaktivován cirkulujícími antiplazminy.“ Specifické štěpení fibrinu a ne fibrinogenu zajišťuje zvýšená afinita plazminogenu i jeho aktivátoru k fibrinu.

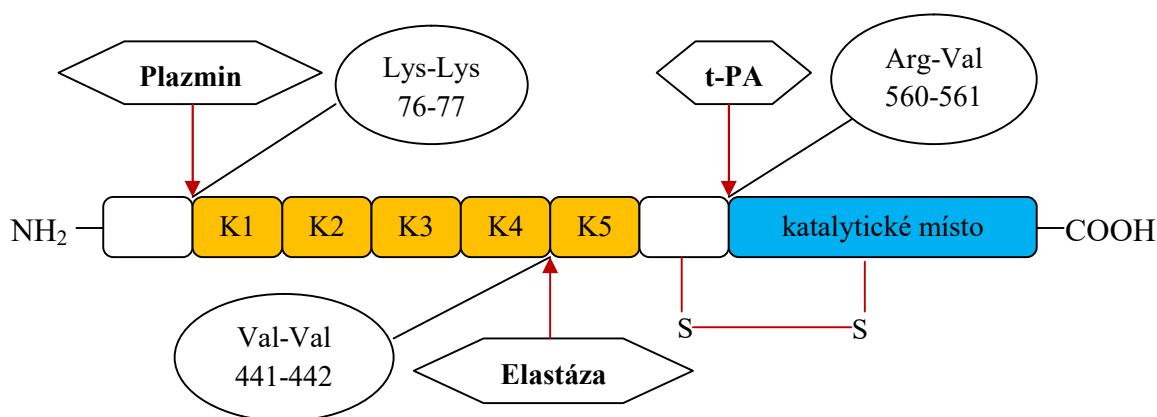
Důsledky při zvýšených fibrinolytických schopnostech krve mohou vést ke krvácení, snížená schopnost může naopak vyvolat trombotické stavy.

2.3.1 Plazminogen

Fyziologické hodnoty plazminogenu jsou 2,4 $\mu\text{mol/l}$ plazmy a 200 – 210 mg/l. Jedná se o jednořetězcový glykoprotein tvořený v játrech ve dvou formacích (Glu- a Lyz- plazminogen). Váže se na membrány krevních buněk a povrchy nejrůznějších buněk pomocí buněčných receptorů pro plazminogen. Těchto receptorů je několik, v případě krevních buněk jde o GP IIb/IIIa.

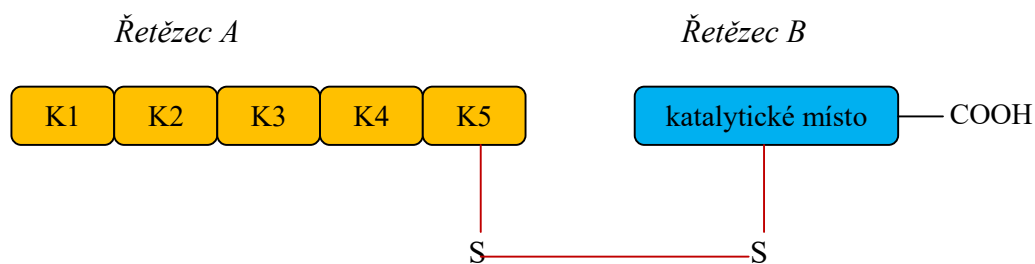
„Plazminogen je prekurzorem antikoagulačního proteinu plazminu, který jako serinová proteáza aktivuje disociaci fibrinové složky krevní sraženiny.“ Plazminogen je složen z bílkovinného řetězce sestávajícího ze 790 aminokyselin a 2 cukerných složek.

Lidský plazminogen (obrázek 5) je tvořen 5 „Kringle“ moduly, které jsou spojeny disulfidickými vazbami, dále obsahuje proteázovou doménu a peptid s koncovou aminoskupinou.



Obr. 5: Struktura plazminogenu (Pecka 2004).

Aktivace plazminogenu probíhá současně s aktivací koagulace. Přeměna plazminogenu na plazmin je způsobena aktivátory plazminogenu. Plazminogen se přes vazebná místa lysinu váže na fibrin. Ve vazebných místech pro plazminogen jsou přítomny i vazebná místa jeho aktivátorů. Při aktivaci pomocí t-PA v přítomnosti fibrinu dochází k několikanásobnému urychlení, protože fibrin slouží jako kofaktor při aktivaci plazminogenu. Molekula plazminogenu je štěpena aktivačními působky v místě Lys⁷⁷, kdy dochází k uvolnění peptidu. Poté dochází k dalšímu štěpení v místě Arg⁵⁶⁰ a vzniká dvouřetězcová molekula tvořená dvěma fragmenty (obr. 6) – těžší A řetězec a lehký B řetězec. Tyto fragmenty jsou spojeny disulfidickou vazbou. B řetězec obsahuje aktivní katalytické místo.



Obr. 6: Dvouřetězcová molekula rozštěpeného plazminogenu (Pecka 2004).

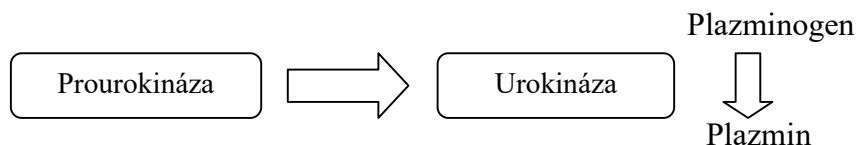
2.3.2 Aktivátory plazminogenu

Aktivátory plazminogenu se dělí na vnitřní a vnější.

Vnitřní aktivátory plazminogenu jsou součástí krevní plazmy a tvoří je především kontaktní systém, mezi který patří F XII, prekalikrein a HMWK, a dále pak trombin a trypsin. Aktivace je spuštěna po kontaktu poškozené cévní stěny s F XII.

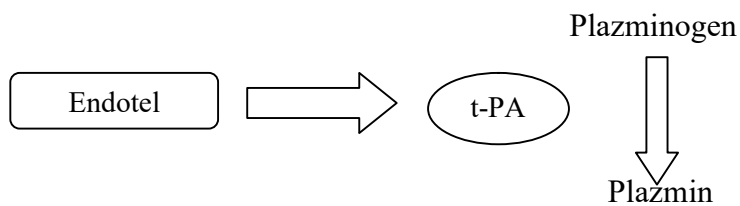
Vnější aktivátory plazminogenu pocházejí z lidského organismu, ale míst jiných než je krevní oběh. Na aktivaci plazminogenu se za fyziologických podmínek podílí z rozdílných částí F XIIa, u-PA a t-PA.

Prourokináza se vyskytuje v nízkých koncentracích v plazmě. Jedná se o jednořetězcovou glykosylovanou proteázu serinového typu, nacházející se především v ledvinách. Z endoteliálních buněk je uvolňována za přítomnosti endotoxinu či tumor nekrotizujícího faktoru (TNF). Přeměna jednořetězcové formace na dvouřetězcovou urokinázu (obrázek 7) je způsobena vlivem kontaktního systému a plazminu. „Urokináza je uvolňována v rámci fibrinolýzy a je rychle vyvazovaná hlavním modulátorem fibrinolýzy PAI-1.“ V plazmě cirkuluje samostatně v nízko- i vysoko-molekulárních formách.



Obr. 7: Přeměna prourokinázy na urokinázu (Pecka 2004).

Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) a jeho inhibitor (PAI-1) patří mezi nejdůležitější faktory ovlivňující fibrinolýzu. Většina cirkulujícího t-PA je v komplexu s jeho inhibitorem, jen malá část cirkuluje ve volné formě. Jedná se o jednořetězcovou proteinázu serinového typu uvolňovanou ze zdravých endotelových buněk po stimulaci trombinem, aktivovaným proteinem C, histaminem, bradykinem nebo IL1, ale buněčným zdrojem jsou i aktivované monocyty a megakaryocyty. Jeho výskyt je především v cévami bohatě zastoupených orgánech, např. děloha, ledviny či plíce. Přeměna jednořetězcové molekuly na aktivní dvouřetězcovou probíhá pomocí F Xa, nebo může být proteolyticky štěpena plazminem nebo tkáňovým kalikreinem. Protože je t-PA odpovědný za fibrinolýzu jako fibrin specifický aktivátor plazminogenu, využívá se při trombotické léčbě cévních uzávěrů. Je účinný při redukcí trombofilie a obnovy recirkulace po trombolýze. Proces t-PA je znázorněn na obrázku 8.



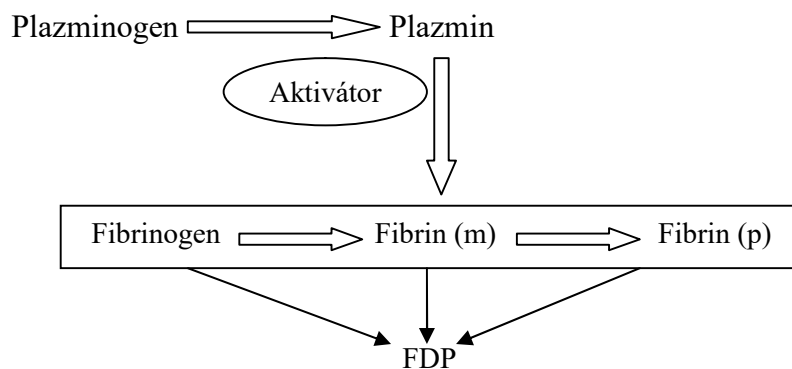
Obr. 8: Funkce t-PA (Pecka 2004).

2.3.3 Přeměna plazminogenu na plazmin

Po vytvoření prvních struktur fibrinu se ihned aktivuje fibrinolytický systém. „Na fibrinový povrch se naváže plazminogen a t-PA.“ Vytváří se komplex t-PA – plazminogen – fibrin, který usnadňuje přeměnu plazminogenu na plazmin. Fibrin je v této reakci kofaktorem. „Plazmin štěpí fibrinové koagulum na jednotlivé fragmenty.“ Během štěpení vznikají koncové řetězce degradovaného fibrinu, které navazují další plazminogen a t-PA. Tím je zvýšena tvorba plazminu a tudíž i účinnost fibrinolýzy.

2.3.4 Plazmin

Plazmin je proteolytický enzym štěpící kromě fibrinu i další bílkoviny koagulačního systému. Jeho funkcí je aktivace F VII a XII, stimulace agregace trombocytů a aktivace části komplementu. Úkolem plazminu je rozpouštět krevní koagulum, kdy dochází ke štěpení fibrinogenu a fibrinu na čím dál menší částice zvané štěpné produkty fibrinogenu (fibrinu). Je vytvářen aktivátory fibrinolýzy ze zymogenu plazminogenu na povrchu fibrinového koagula. Délka štěpení fibrinu je delší než délka štěpení fibrinogenu. Pomocí inhibitorů je plazmin vyvazován ze systému a v neaktivní formě ho vychytává monocytomakrofágový systém. Schéma fibrinolytického systému je znázorněn na obrázku 9.



Obr. 9: Schéma fibrinolytického systému (Pecka 2004).

2.3.5 Aktivace fibrinolýzy

Odbourávání nerozpustného fibrinu, jež je schopností fibrinolytické aktivity, patří mezi základní fyziologické děje organismu. Během aktivity dochází k odbourávání již nepotřebného fibrinového koagula, který vznikl po procesu srážení krve a zhojení rány. Cílem fibrinolýzy je tedy zprůchodnění cév a navrácení do jejich původního stavu. Fibrinolýza je aktivována současně s krevními destičkami a koagulací, ale délka jejího trvání je mnohem delší. Několikahodinový proces rozpouštění fibrinové zátky se může za chorobných stavů zkrátit i na několik minut (Pecka 2004).

3. Hyperkoagulace

Za určitých patologických podmínek lze v krvi prokázat zvýšený sklon ke srážení. Tyto změny lze považovat za pretrombotický stav, který nás včas upozorňuje na možnost vzniku trombózy.

Hyperkoagulace může být způsobena zvýšenou hladinou určitých plazmatických koagulačních faktorů (F VII, F VIII, F VIII RAg, F V, fibrinogenu, protrombinu). Avšak fibrinogen, F V a F VIII mohou být nespecificky zvýšeny i při zánětlivém či maligním stavu, z čehož vyplývá, že jejich zvýšení nelze považovat za specifický znak hyperkoagulace. Dále mohou být některé z faktorů zvýšené v těhotenství či při užívání antikoncepce. Přesto nemusí být trombóza klinicky prokázána. Laboratorní nálezy hyperkoagulace mohou být způsobeny vrozeným nedostatkem antitrombinu III. Přesto se trombóza u většiny lidí neobjeví. Dále se na hyperkoagulačních nálezech můžou zúčastnit fibrinolytické změny v krevní plazmě (Donner 1985).

3.1 Tromboembolická choroba, trombofilní stavy

Vytvoření krevní sraženiny (trombu) v cévním systému je stav charakterizující trombózu neboli tromboembolickou chorobu. Na vzniku trombu se podílí několik mechanismů. Ty lze rozdělit podle Virchowovy teorie do tří skupin:

- poškození stěny cév
- zpomalení toku krve
- změny ve složení krve

Trombofilie vyjadřuje poruchu hemostázy. Pro pacienta znamená predispozice pro vznik trombózy nebo její recidivě (Kubisz 2006).

Embolie je podle lékařského slovníku definována jako vmetení, zaklínění vmetku embolu v krevních cévách s jejich následným ucpáním, které vede k náhlému nedokrvení (ischemii) příslušné oblasti mozku, dolní končetiny aj. Trombóza je definovaná jako srážení krve v cévách za vzniku trombu. V tepnách má za následek ischemii dané oblasti, v žilách zhoršuje odtok krve (venostáza) a může být zdrojem embolu.

Náhlá tromboembolická obstrukce části plicního cévního řečiště je častou, ne však jedinou, příčinou akutní plicní embolie. Příčinou plicní embolie bývají nejčastěji trombózy

hlubokých žil dolních končetin, dále pak pánevních žil, ledvinných žil, dolní duté žíly, pravého srdce a jiné (Widimský, Malý 2011).

Akutní uzávěry periferních tepen jsou podle publikace Vojáček, Malý 2004 definovány jako náhle vzniklé poruchy prokrvení, které jsou způsobeny buď trombózou tepny, nebo častěji embolií do periferní tepny (tepny distálně od břišní aorty). Trombózu periferních žil lze rozdělit na dvě skupiny:

- a) akutní trombóza povrchového žilního systému dolních končetin
- b) akutní trombóza hlubokého žilního systému dolních končetin.

Tyto skupiny se liší klinickým obrazem, léčbou i prognózou (Vojáček, Malý 2004).

V současnosti v rutinní praxi neexistuje pro stanovení diagnózy trombofilie jeden globální laboratorní test a používá se kombinace koagulačních vyšetření, molekulárně biologických metod a biochemických vyšetření (Faber 2015).

Venózní trombózy se ve vyspělých zemích vyskytují v poměru 1:1000 obyvatel. U venózní trombózy je nejzávažnější komplikací posttrombotický syndrom, u plicní embolie je komplikací náhlá smrt. „Venózní trombóza je třetí nejčastěji se vyskytující kardiovaskulární choroba po infarktu myokardu a mozkové mrtvici“ (Penka 2001).

Trombofilní stavy jsou poruchy, které lze rozdělit na vrozené a získané. Rozdělení trombofilních stavů podle dědičnosti je uvedeno v tabulce č. II. Zvýšeným rizikem u těchto stavů je vznik trombózy. Mezi klinická kritéria patří žilní trombózy před 45. rokem věku, opakované idiopatické trombózy a jejich neobvyklá lokalita, tepenné trombózy před 35. rokem věku bez známek přítomnosti arteriální choroby, rodinná anamnéza či opakované předčasné ukončení gravidity.

Tab. II: Dělení trombofilních stavů podle dědičnosti (Kubisz 2006).

Vrozené	Získané
<ul style="list-style-type: none"> • Defekty přirozených inhibitorů koagulace • Mutace protrombinu • Mutace FV Leiden • Defekty fibrinolýzy • Defekty trombocytů • Hyperhomocysteinémie • Geneticky podmíněné zvýšené hodnoty koagulačních faktorů 	<ul style="list-style-type: none"> • Antifosfolipidový syndrom • Hyperkoagulační poruchy trombocytů • Poruchy fibrinolýzy • Defekty inhibitorů koagulace • Poruchy funkce endotelu • DIK, heparinem indukovaná trombocytopenie • Získané zvýšené hodnoty koagulačních faktorů

Pro vznik trombózy je nutná přítomnost více rizikových faktorů současně. Většinou jde o kombinaci vrozených, smíšených i získaných faktorů.

Mezi rizikové faktory patří věk nad 45 let, obezita, operace, poranění, imobilizace, nádorové onemocnění, tromboembolická nemoc, varixy, hormonální léčba, těhotenství, šestinedělí, kouření, hypertenze, poruchy lipidů (Dítě 2007). Příkladem zvýšeného rizika vzniku trombózy může být žena užívající perorální kontraceptivum s obsahem estrogenu. U této ženy je riziko 4x vyšší. Tato pravděpodobnost může být až 30x vyšší, pokud je současně nositelkou Leidenské mutace.

„Protrombogenně mohou působit látky i buňky přítomné v krvi, které se přímo na procesech hemostázy nepodílí (lipidy, homocystein; erytrocyty, leukocyty).“ Je prokázané 2x vyšší riziko vzniku trombózy u lidí s krevní skupinou jinou než 0 (Penka 2001).

V současné době je uznáváno šest abnormalit, které představují genetické rizikové faktory žilní trombózy. Mezi tyto abnormality patří: defekt antitrombinu (AT), proteinu C nebo S, faktor V Leiden (FVL), mutace protrombinu 20210A (PT 20210A), dysfibrinogémie. Dále to mohou být defekty trombomodulinu, inhibitoru zevní cesty tkáňového faktoru a další. Některé vrozené poruchy způsobují výskyt trombózy již v mladém věku a často touto poruchou trpí více členů rodiny. Častá je také recidiva. Dědičný nedostatek inhibitoru krevního srážení je vyvoláno chyběním nebo mutací daného genu. Smíšené faktory jsou složeny z genetických predispozic a získaných faktorů (Sakalová 1995; Penka 2001; Indrác 2006; Dítě 2007).

Při podezření na tento typ onemocnění a k jeho diagnostice se vyšetřuje základní koagulace: APTT, protrombinový čas (PT), fibrinogen, případně trombinový čas/reptilázový čas (TT/ReT). Doplňujícími vyšetřeními jsou krevní obraz, trombocyty, lipidový metabolismus, proC Global (PCG), aktivitu antitrombinu (AT), F VIII. Pokud byl patologický nález potvrzen, vyšetření by mělo být s určitým časovým odstupem zopakováno (Dítě 2007).

K diagnostice akutní plicní embolie lze využít také stanovení biomarkerů a také stanovení D-dimerů. Stanovení biomarkerů je významné pro zpřesnění kvantifikace rizika i přesto, že je lze stanovit pouze u hemodynamicky stabilní plicní embolie. Dělíme je na:

1. troponiny
2. natriuretické peptidy
3. nové biomarkery

První dvě skupiny jsou stále hlavními biomarkery.

Srdeční troponiny jsou nejsenzitivnější a nejspecifičtější biomarkery poškození myokardiálních buněk. Jejich pozitivita se objevuje i při mikroskopické nekróze myokardu. Jejich stanovení by se mělo provést při příjmu pacienta a zopakovat za 6-7 hodin, kdy je jejich koncentrace v krvi maximální. Hraniční hodnoty troponinů určující závažnost prognózy nejsou stále stanoveny a v literatuře se liší. Přesto se jako hraniční hodnota troponinu T pro hospitalizační mortalitu jeví 0,09 ng/ml, negativní prediktivní hodnota 0,99 a pozitivní prediktivní hodnota 0,34.

Natriuretické peptidy jsou syntetizovány a dekretovány po natažení kardiomyocytů. Pro-hormony běžně nejsou v myocytech komor skladovány. To je důvod několikahodinového trvání začátku vzrůstu hodnot po natažení myokardiálních vláken. Po provedení mnoha výzkumů neopravňuje zvýšená hodnota natriuretických peptidů k zahájení invazivní léčby trombózy. Standardem pro detekci dysfunkce pravé komory u nemocných s akutní plicní embolií nadále zůstává echokardiografie.

Novými biomarkery jsou H-FABP (heart-type fatty acid binding protein), GDF-15 (growth differentiation factor-15), hsTnT (highly sensitive troponin T). H-FABP jsou proteiny vázané na mastné kyseliny srdečního typu. „Při poškození myokardu difundují tyto malé proteiny daleko rychleji než troponiny intersticiálním prostorem a objevují se v krevním oběhu již za 90 minut po vzniku symptomů.“ Maximální koncentrace dosahují za 6 hodin. Zvýšená koncentrace H-FABP v kombinaci s tachykardií představuje užitečný rizikový faktor. „ Prognostická hodnota H-FABP se jeví vyšší než pozitivní prediktivní hodnota zvýšeného T troponinu, natriuretických peptidů i dysfunkce pravé komory

na echokardiografii.“ Růstový diferenciační faktor 15 (GDF-15) je cytokin objevující se při ischemii nebo tlakové zátěži. Za normálních podmínek se netvoří. Jeho vznik je podmíněn různými stresory včetně prozánětlivých cytokinů. Vysoce senzitivní troponin T (hsTnT) je schopen diferencovat mezi zvýšeným a normálním rizikem. Negativní prognostická hodnota činí 100% a pozitivní prediktivní hodnota činí také 100%. Nové biomarkery jsou významné především pro svoji lepší pozitivní a negativní predikční hodnotu ve srovnání se současnými biomarkery. Ale je třeba provést další studie a získat větší zkušenosti (Widimský, Malý 2011).

4. Vrozené trombofilie

Cílem této práce je zaměřit se především na vrozené typy trombofilie, jmenovitě pak na rezistenci na aktivovaný protein C a na mutaci faktoru V Leiden.

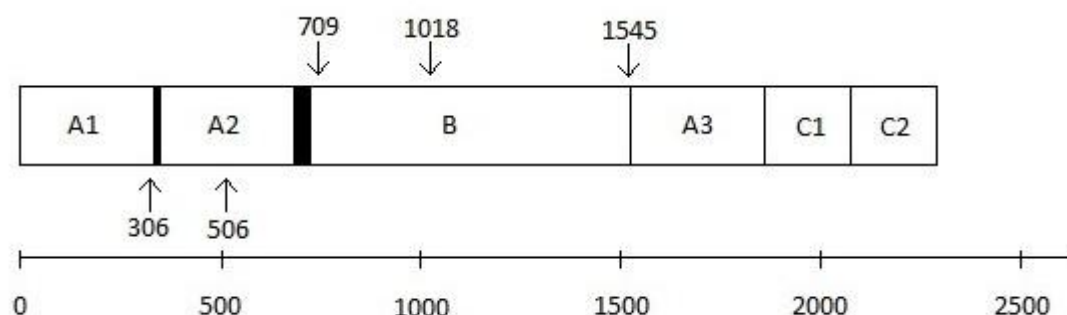
Vrozené trombofilie (primární) bývají spojeny s pozitivní rodinnou anamnézou, kde se často vyskytují opakované tromboembolické příhody u mladších jedinců.

4.1 Leidenská mutace

K Leidenské mutaci se vztahuje faktor V a protein C. Proto se před samotnou mutací zaměřím na tyto dva proteiny.

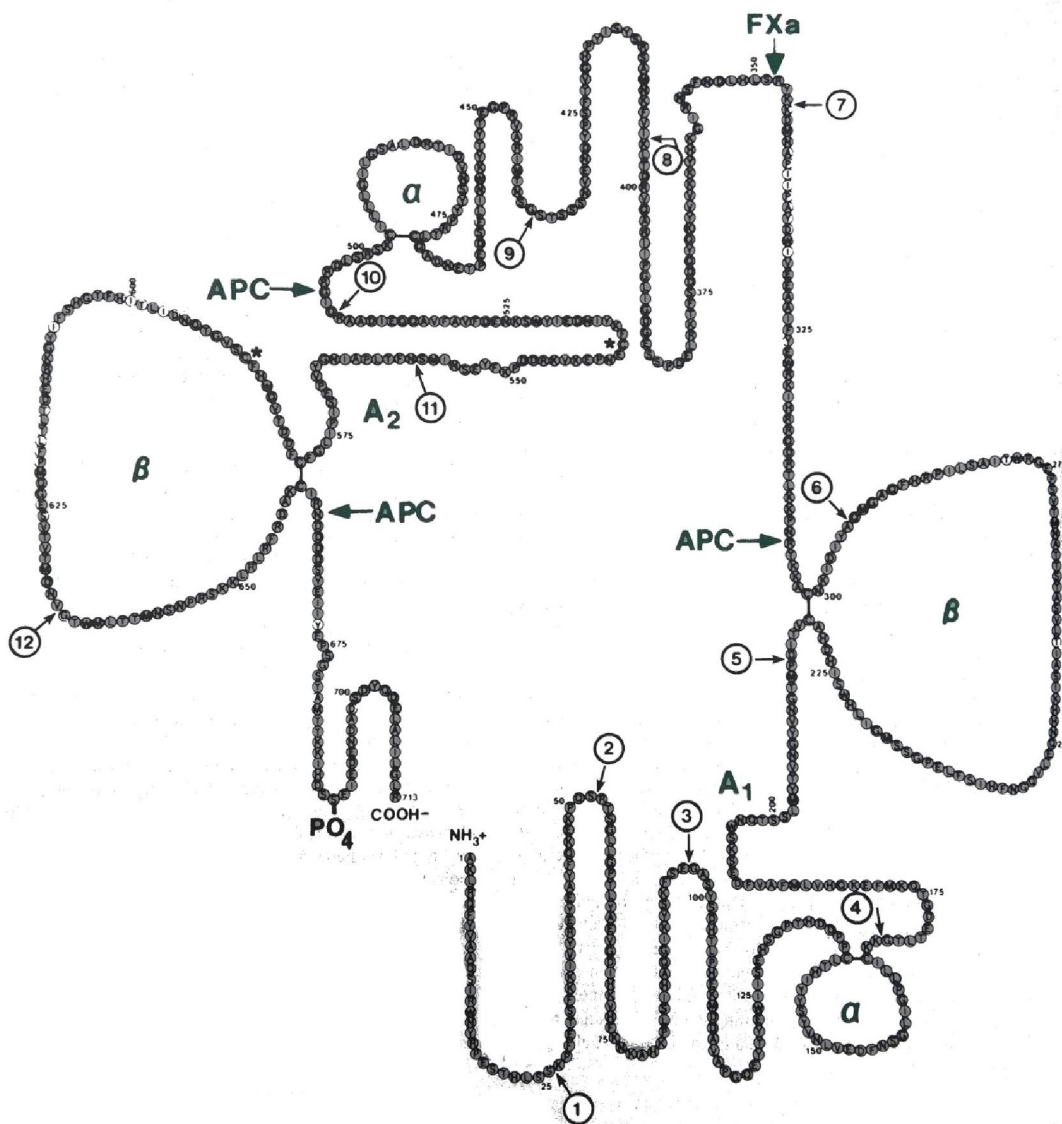
4.1.1 Faktor V

Faktor V se řadí mezi rozpustné faktory krevní plasmy a tvorba jeho komplexů je závislá na vitamínu K. Jeho gen leží na chromosomu 1q21-25, který je 80 kb velký. mRNA tohoto faktoru je velká 6,8 kb. Obsahuje 24 intronů. Na obrázku 10 je znázorněno schéma faktoru V spolu s trombinem (709, 1018, 1545), faktorem Xa a místa štěpení aktivovaného proteinu C (306, 506). Celková organizace proteinu je představována duplikátní A doménou, kterou následuje doména B, jež je následována dodatečnou A doménou a duplikátní C doménou. Často je také identifikován propeptidy a spojovacími segmenty.

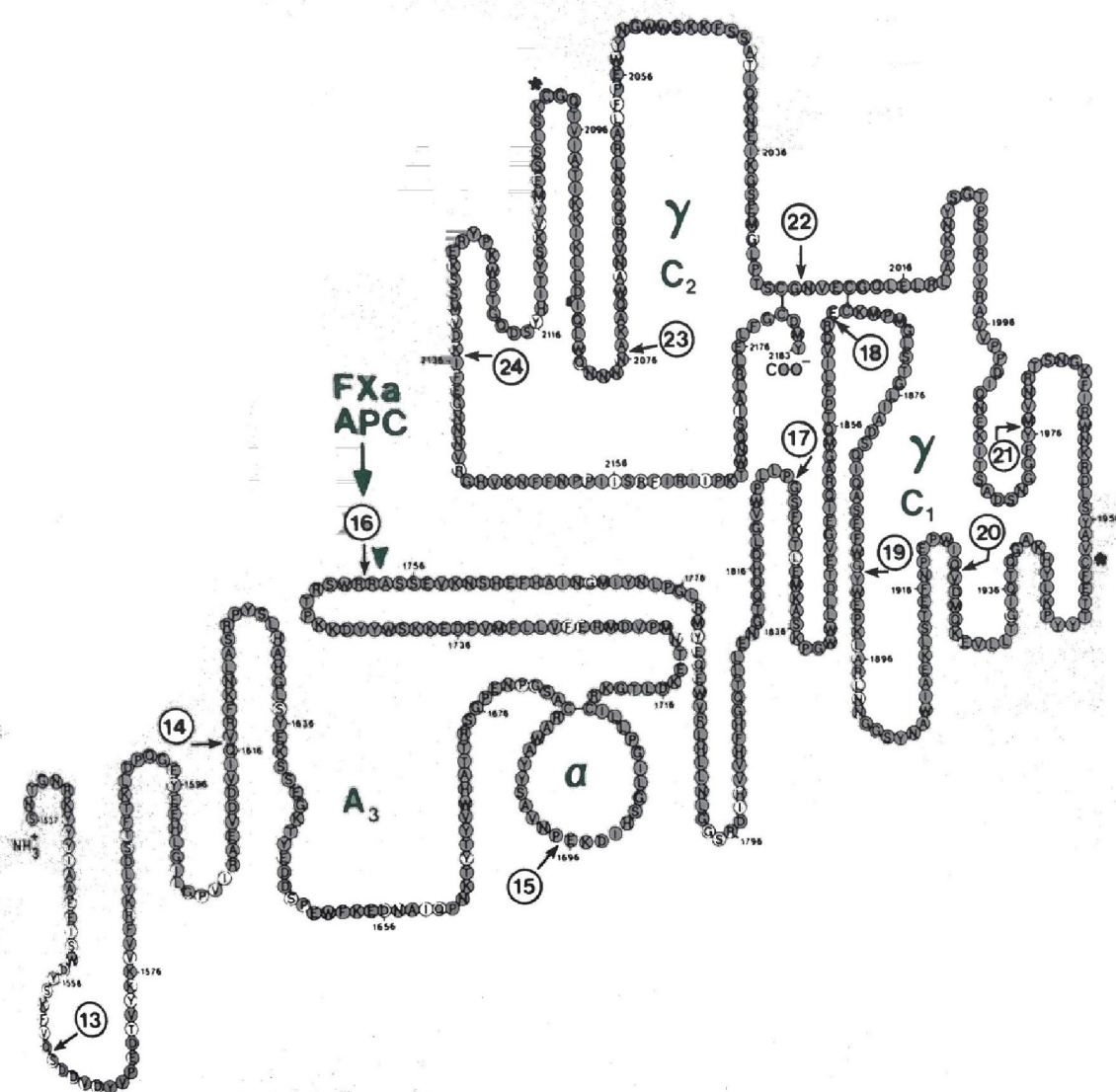


Obr. 10: Lineární znázornění organizace domén v molekule faktoru V (Beutler 1995).

Faktor V cirkuluje jako rozpustný plazmatický protein. Jeho koncentrace v plazmě je kolem 7 mg/l, relativní molekulová hmotnost se rovná 330 000 a jeho poločas je 12-15 hodin. V plazmě cirkuluje primárně jako jednořetězcový prekurzor molekuly. Faktor V je odštěpen α -trombinem, což způsobí tvorbu aktivního kofaktoru (fVa) a dvou silně glykosylovaných aktivovaných peptidů. Výsledný faktor Va je heterodimer, tvořený z těžkého (α) a lehkého (β) řetězce. Tyto řetězce jsou znázorněny na obrázku 11, kde byl použit hovězí faktor Va (Beutler 1995; Sršeň, Sršňová 2005). "



Obr. 11: Hovězí faktor Va (Beutler 1995).



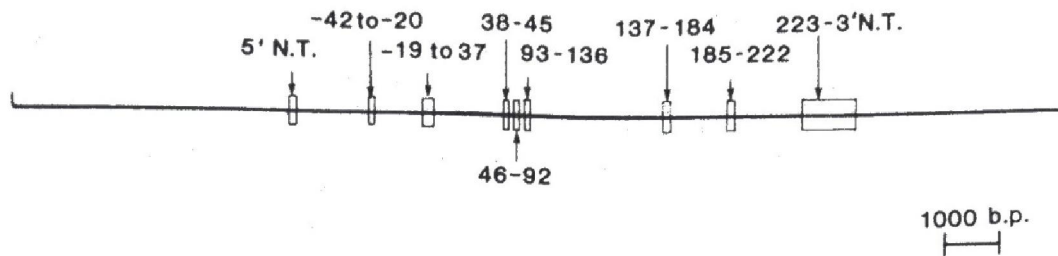
Obr. 11: Hovězí faktor Va (pokračování) (Beutler 1995).

4.1.2 Protein C

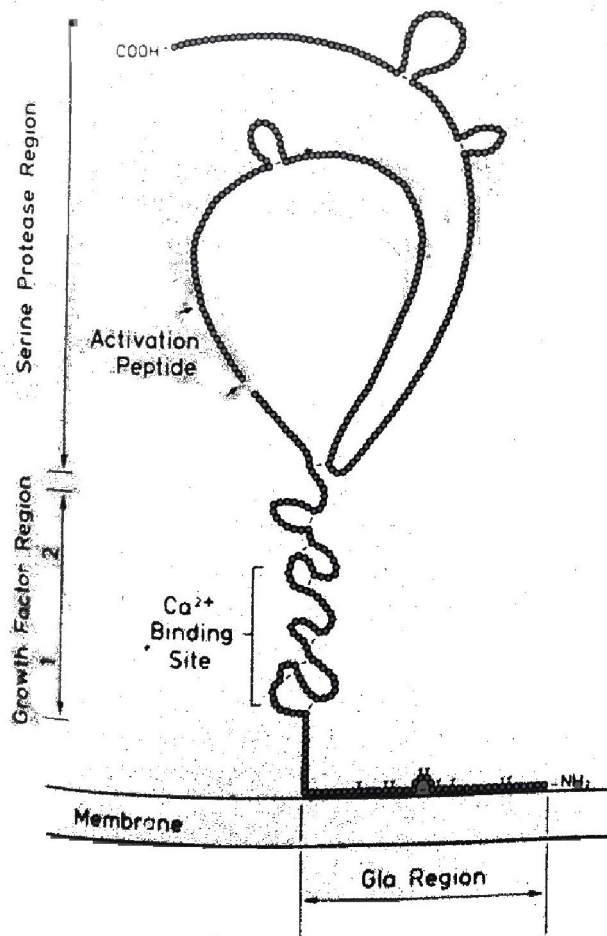
Protein C je vitamín K-dependentní protein, který izoloval v roce 1976 Stenflo. Seegers a spol. následně provedl imunologické testy, které prokázaly, že protein C a autoprotrombin IIa je totéž.

Protein C je plazmatický glykoprotein s relativní molekulovou hmotností 62 000. Je složený z těžkého a lehkého řetězce, které jsou spojeny disulfidickými můstky. Protein C je syntetizován v játrech, cirkuluje v plazmě v koncentraci 4 μ g/ml a jeho biologický poločas je 6-8 hodin. Existují 2 podoby molekuly proteinu C – α a β . Všechny formy jsou aktivovány druhy, které mají antikoagulační aktivitu (Beutler 1995; Sršeň, Sršňová 2005).

Gen kódující protein C je 12 kb velký, obsahuje 9 exonů, je umístěn na chromozómu 2. Obrázek 12 znázorňuje gen proteinu C s čísly, které představují zakódované segmenty zymogenu včetně netranslatovatelných oblastí a signálního peptidu. Na obrázku 13 je znázorněna struktura proteinu C.



Obr. 12: Gen proteinu C (Beutler 1995).



Obr. 13: Struktura proteinu C (Beutler 1995).

Aby protein C mohl plnit svoji antikoagulační funkci, musí být přeměněn na složku se serin proteázovou aktivitou – aktivovaný protein C – vázaný trombinem na cévní trombomodulin za přítomnosti vápenatých iontů. Proces aktivace je závislý na vápník-vázajícím místě v oblasti EGF proteinu C. Obsazení jednoho vápník-vázajícího místa způsobí konformační změnu molekuly, která umožní snadnou aktivaci komplexem trombin-trombomodulin, ale současně zabrání aktivaci samotným trombinem. Aktivovaný protein C má specifickou vazbu pro zbytky obsahující arginin u některých syntetických substrátů, faktoru VIIIa a Va (Beutler 1995).

4.1.2.1 Mechanismu vzniku aktivovaného proteinu C

Trombin je jediná fyziologicky významná serinová proteáza, která mění protein C na aktivovaný protein C. Rychlost vytvoření aktivovaného proteinu C je velmi pomalá. To vedlo k prokázání kofaktoru, který urychluje aktivaci proteinu C závislou na trombinu až 20 000 krát. Dále bylo prokázáno, že kultivované endoteliální buňky mají vysoce afinitní vazebné místo pro trombin, které urychluje změnu proteinu C až 30 krát ve srovnání s volným trombinem. Endoteliální buňka, která váže protein, se nazývá trombomodulin.

Interakce trombinu a trombomodulinu způsobuje reverzibilní konformační změnu enzymu, který za přítomnosti dvoumocných iontů urychluje aktivaci proteinu C. Komplex trombin – trombomodulin má také horší schopnost srážet fibrinogen, aktivovat faktor V či aktivovat krevní destičky (Beutler 1995).

4.1.2.2 Mechanismus aktivace proteinu C

Aby byl účinek APC maximální, je nezbytná přítomnost prokoagulačního fosfolipidového povrchu, iontů Ca^{2+} a kofaktorů proteinu S a inaktivovaného faktoru V (Sršeň, Sršňová 2005).

Povrchová plocha endotelia je větší v mikrocirkulaci, což je důvod primární aktivace proteinu C právě na tomto místě. Trombin se váže na trombomodulinový komplex rychleji za přítomnosti antitrombinu III. Po interakci trombinu s antitrombinem III se komplex odloučí od trombomodulinu, což umožní receptoru vázat další trombin.

Poté, co je vyvinut aktivovaný protein C, je schopný inaktivovat dva kofaktory koagulační kaskády – faktor Va a VIIIa. Prokofaktory (faktor V a VIII) jsou proti proteolýze

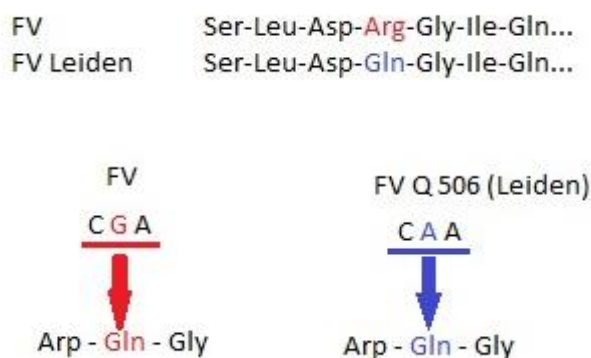
aktivovaným proteinem C relativně odolné. Je-li na faktor Va navázaný faktor Xa, je chráněn před proteolytickou aktivitou aktivovaného proteinu C.

Vzhledem k relativně malému zvýšení rychlosti inaktivace faktorů VIIIa a Va aktivovaným proteinem C za přítomnosti proteinu S vedlo k hledání dalších kofaktorů v antikoagulační dráze proteinu C. Díky tomu byl objeven molekulární defekt faktoru V, který je nejčastějším důvodem rezistence na aktivovaný protein C (Beutler 1995).

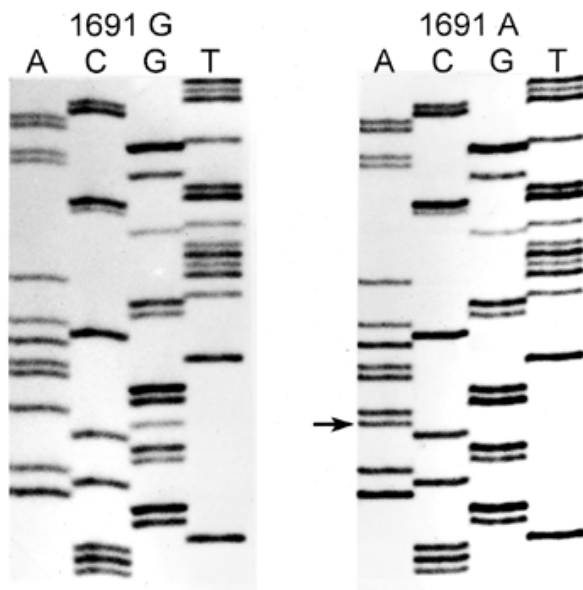
4.2 FV Leiden

Mezi nejvýznamnější vrozenou trombofilií s největším podílem žilních tromboembolických komplikací patří bodová mutace substitučního charakteru FV Leiden (G1691A nebo Arg506Gln) (obr. 15 a 16). Poprvé byla popsána v roce 1993 Dahlbäckem, nachází se v exonu 10 genu kódujícím FV a způsobuje fenotypický nález zvaný rezistence na aktivovaný protein C (APCR).

Jedná se o autozomálně dominantní mutaci. Záměna aminokyseliny v místě rychlého štěpení aktivovaného faktoru V (FVa) proteinem C způsobí delší dobu cirkulace FVa, což vede k pokračující tvorbě trombinu. Triplet, který kóduje protein, vznikl výměnou aminokyseliny argininu (Arg) v pozici 506 za glutamin (Gln) (obr. x) (Penka 2001; Pecka 2004; Sršeň, Sršňová 2005; Kubisz 2006; Indrák 2014).



Obr. 15: Leidenská mutace – kódující triplet (Pecka 2004).



Obr. 16: Leidenská mutace – změna G za A (wikiskripta.eu).

Rezistence na aktivovaný protein C (APCR) znamená nedostatečná nebo vůbec žádná odpověď na aktivovaný protein C. „Popisuje tedy odolnost koagulačního systému vůči inhibičnímu vlivu proteinu C na koagulačně aktivní faktory Va a VIIIa.“ Prokoagulační aktivita patologického faktoru Va (faktor Va-Leiden) je normální, ale nelze ho proteolyticky štěpit aktivovaným proteinem C. Leidenská mutace způsobuje, že v systému proteinu C nedochází ke štěpení těžkého řetězce faktoru Va. Faktor není inaktivován, ale zůstává v aktivované podobě. To způsobuje zvyšování hladiny trombinu v protrombinázovém komplexu.

Mimo jednobodovou mutaci genu pro koagulační faktor V může být APCR také způsobena neznámým defektem (Pecka 2004).

Rezistence na aktivovaný protein C se klinicky projevuje až v dospělosti. 90 % nemocných s APCR má genetický podklad. Mutace zvyšuje riziko výskytu žilní trombózy 5–10x u heterozygotů a 50–100x u homozygotů. Homozygotní forma je však velice vzácná. Výskyt trombózy je také často spojen s geografickým ukazatelem. Výskyt APC rezistence v Evropě je 2–8 % u bílé rasy. U pacientů s venózní trombózou však tuto rezistenci nacházíme u 20–60 %. U jiných ras se vyskytuje pouze výjimečně. V tabulce III je znázorněna prevalence v Evropě. Z tabulky vyplývá, že nejvyšší výskyt je ve Švédsku a směrem na jih klesá. Lidé s touto mutací mají celoživotně zvýšené riziko vzniku trombózy a toto riziko roste s věkem (Sršeň, Sršňová 2005; Indrák 2006; Indrák 2014). Navíc je výrazně zvýšeno riziko retrombózy. U žen, nositelek mutace a současně kuřáček, byl popsán i vyšší výskyt infarktu myokardu (Penka 2001).

„Klinický obraz se neliší od trombóz a tromboembolických příhod jiné geneze.“ Nejprve je nutné vyloučit získané poruchy - choroby jater, ledvin, maligní onemocnění aj., ale také používání léků jako jsou hormonální kontraceptiva, estrogeny, kortikosteroidy či těhotenství nebo menopauzu (Friedmann 1994). Tuto poruchu lze potvrdit pouze na základě molekulárně genetických vyšetření faktoru V (PCR vyšetření) (Penka 2001).

Tab. III: Prevalence FV Leiden v evropské populaci (Sršeň, Sršňová 2005).

Populace	Prevalence (%)	Tendence prevalence v Evropě
Švédsko	12,5-15	Sever
Německo	6,8	P
Česká republika	6,6	O
Slovensko	4	K
Evropská část Ruska	3,4	L
Itálie	2,5-3,5	E
Španělsko	2,5-3,5	S Jih

4.2.1 Laboratorní diagnostika APCR spojené s faktorem V Leiden

APCR lze laboratorně stanovit pomocí funkčních testů (koagulační, chromogenní substráty), kterými je stanoven fenotyp nebo vyšetřením genotypu. Podstatou funkčních testů je vyšetření plazmy za a bez přítomnosti exogenního APC (Hudeček et al. 1999; Pecka 2004).

Koagulační vyšetření APCR je postaveno na principu aktivovaného parciálního tromboplastinového času (APTT). Toto vyšetření je však velmi limitováno řadou faktorů, mezi které patří i použité reagentie a přístroje. Prvním požadavkem jsou normální hodnoty APTT vyšetřované plazmy. Důvodem je nemožnost provést vyšetření u pacientů s antikoagulační léčbou či jiným koagulačním defektem. Výsledek vyšetření je ovlivněn již samotnou preanalytickou přípravou vzorku plazmy. Ta by měla být bezdestičková, protože trombocyty snižují APC-poměr (podíl hodnoty APTT vyšetřované plazmy za a bez přítomnosti exogenního APC). Negativní výsledek vyšetření může být způsoben i zmrazením plazmy, proto ji lze uchovávat jen krátce. Je také důležité, aby APTT byl přibližně stejný jak před rozmrazením vzorku, tak po jeho rozmrazení a také aby kontrolní

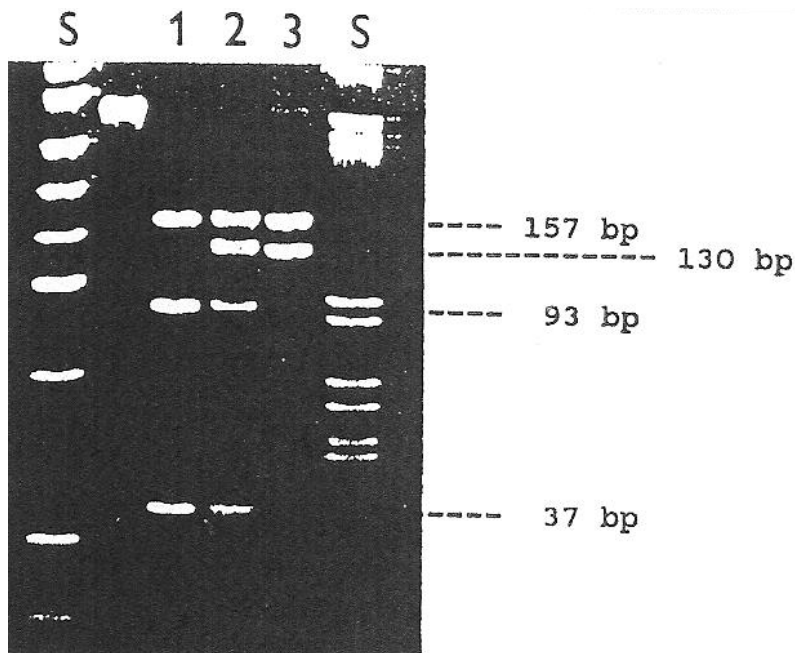
vzorek plazmy byl skladován stejným způsobem. Při použití poolované plazmy jako kontrolního vzorku by neměla být od nositele Leidenské mutace. Avšak je vhodnější použít komerční lyofilizovanou plazmu s definovanými hladinami koagulačních proteinů.

„Většinu nevýhod koagulačního vyšetření APC-R založeného na principu APTT odstraňuje modifikace tohoto vyšetření, které spočívá v ředění vyšetřované plazmy plazmou deficitní na F V (1 díl vyšetřované plazmy a 4 díly F V-deficitní plazmy) před provedením testu.“ Tato modifikace zvyšuje specifitu a senzitivitu klasického koagulačního vyšetření ve vztahu k přítomnosti F V Leiden a také umožňuje rozlišení nosičů mutantního F V Leiden od zdravých osob a jejich rozlišení na heterozygoty a homozygoty.

Chromogenní vyšetření je alternativním přístupem ke stanovení APC-R. Principem je stanovení stupně inhibice F VIIIa APC a jeho kofaktory. Pomocí chromogenního substrátu se stanovuje množství vytvořeného F Xa, které je přímo úměrné koncentraci F VIIIa za a bez přítomnosti exogenního APC. Toto vyšetření neumožňuje heterozygotní a homozygotní formu F V Leiden.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) v laboratorní praxi umožňuje rutinní vyšetření genotypu osob s APCR a potvrzení přítomnosti mutovaného genu F V. Jedná se o molekulárně biologickou metodu založenou na enzymové amplifikaci zvoleného úseku DNA in vitro. Následně jsou tyto úseky restrikčním enzymem štěpeny na fragmenty, jejichž velikost a počet se mění podle přítomnosti mutace. Tyto fragmenty DNA jsou zobrazeny gelovou elektroforézou. Použitím restrikční endonukleázy Mnl I v přítomnosti F V Leiden vzniká charakteristická párová báze 130 (obrázek 17).

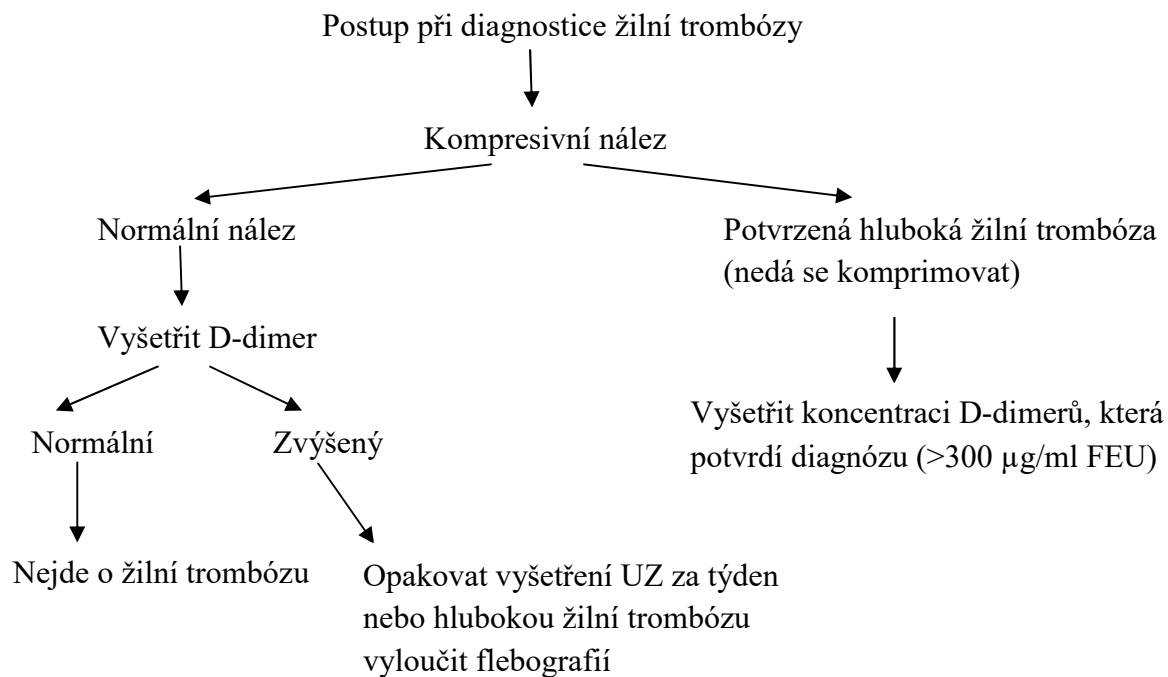
Koagulační test (proC global) stanovuje odpověď na aktivovaný protein C modifikovaným APTT. Výsledky jsou vyjádřeny jako APC-SR (APC sensitivity ratio; APC poměr citlivosti) nebo jako normalizované APC-SROV. Pro APCR jsou normální hodnoty více než 0,75. Hodnoty pod 0,7 již znamenají podezření na FV Leidena. Nevýhodou těchto testů je jejich rozdílnost ve specifitě a senzitivitě pro mutaci faktoru V Leiden. Komplikací také je, že tuto metodu nelze použít u pacientů na orální antikoagulační terapii. Genetickým vyšetřením se zjišťují mutace genu pomocí PCR. Jako templát pro amplifikaci fragmentu genu faktoru V se používá genomová DNA z bílých krvinek. Přítomnost nebo absence mutace lze analyzovat alelově specifickou sondou nebo restrikční enzymovou analýzou (Bertina 1997; Kubisz 2006).



Obr. 17: Elektroforéza DNA F V na akrylamidovém gelu (restrikční endonukleáza Mnl I)
 1 – normální F V (G/G), 2 – heterozygotní F V Leiden (G/A), 3 – homozygotní F V Leiden (A/A), S – standard DNA (Hudeček et al. 1999).

4.2.2 D-dimery

Stanovení D-dimerů napomáhá v určování diagnostiky plicní embolie. D-dimery vznikají jako konečný výsledek působení plazminu na fibrin. Jde o štěpné produkty vzniklé degradací definitivního, zpevněného fibrinu plazminem. Spolu s fibrin-degradačními produkty se podílí na mnoha cévních onemocněních. Jedná se o ukazatel endogenní fibrinolýzy. Pro svou vysokou negativní prediktivní hodnotu slouží jejich stanovení pro vyloučení plicní embolie nebo žilní trombózy a to i při ambulantním vyšetření. Negativní stránkou D-dimerů je jejich nízká specificita. D-dimery lze stanovit metodami ELISA a LIA, aglutinací z plné krve a latex fixačními metodami. Důležité je stanovení D-dimerů ještě před zahájením léčby heparinem, který už po 24 hodinách snižuje hodnotu D-dimerů o 40 % a po 48 hodinách o 50 %. Sporné je také určení hraničních hodnot, které by jednoznačně vyloučily žilní trombózu a/nebo plicní embolii. Bezpečnou hraniční hodnotou je považováno 300 ng/l a nižší (Wells, Anderson, Rodger 2003; Penka 2006; Widimský, Malý 2011; Dong, Duan, Feng et al. 2017). Na obrázku 14 je zobrazen postup při diagnostice žilní trombózy pomocí D-dimerů.



Obr. 14: Postup při diagnostice žilní trombózy (Kvasnička 2003).

4.3 Léčba

Snahou léčby je zabránit zvýšené tvorbě krevního srážením a k rozvoji již vzniklého trombu. Léčba také slouží jako prevence, kdy brání dalšímu srážení krve (Indrák 2006).

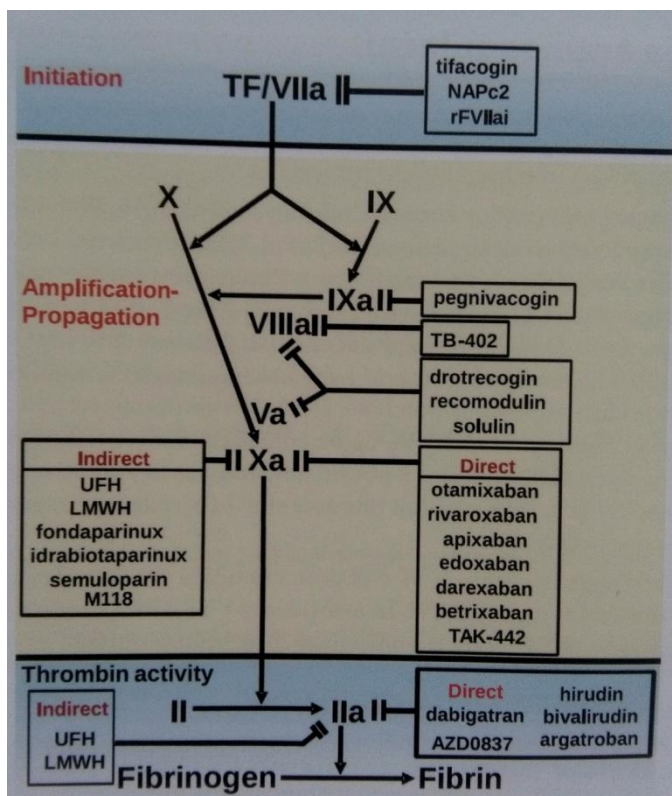
Úkolem antikoagulační léčby je zabránění tvorby trombinu. Ten aktivuje trombocyty, FV, FVIII, a také přeměnu fibrinogenu na fibrin. Léčba napomáhá uvolnění specifického inhibitoru fibrinolýzy TFPI (tissue factor pathway inhibitor; inhibitor tkáňového faktoru).

Léčbu lze rozdělit na dva způsoby:

- Nepřímými inhibitory trombinu (heparin, jeho frakcionované formy, kumarinové deriváty)
- Přímými inhibitory trombinu (hirudin a další rekombinantní syntetické formy).

Cíle jednotlivých léků jsou znázorněny na obrázku 18 (Indrák 2014).

Akutní trombózu lze léčit s.c. podáním (subkutánní) nízkomolekulového heparinu nebo i.v. podáním (intravaskulární) standardního heparinu. V profylaxi lze podávat kumarinové deriváty či alternativní s.c. nízkomolekulové hepariny (Kubisz 2006).



Obr. 18: Cíle jednotlivých antikoagulancií (Indrák 2014).

4.3.1 Heparin

Jedná se o přirozený mukopolysacharid a řadí se do skupiny glykosaminoglykanů. Spolu s antitrombinem způsobuje inhibici trombinu, což v cévním řečišti vede k uvolňování přirozeného inhibitoru tkáňového faktoru (TFPI). Standardní (nefrakcionovaný) heparin (UFH – unfractionated heparin) se vyrábí ze střevních a plicních sliznic vepřů a hovězího dobytka. Ten způsobuje inhibici aktivovaného FIIa a FXa po vazbě s antitrombinem.

Léčba je zahájena intravenózním bolusem. Dávkování je upravováno dle výsledku kontroly aPTT po 6 hodinách monitorování, kdy je cílem dosáhnout prodlouženého aPTT na 1,5-2násobek normy. Heparin je nejčastěji podáván 5-7 dní. Při následné perorální léčbě kumariny je nezbytné současné podávání s heparinem do doby, než hodnoty INR dosáhnout 2,0-3,0 dva dny po sobě. Poté lze heparin vysadit.

Možné je také preventivní podávání heparinu ke snížení rizika pooperační žilní trombózy. Tato metoda je v dnešní době nahrazována nízkomolekulárním heparinem.

Komplikací léčby bývá krvácení způsobené u 5-10 % předávkováním. Další komplikací je heparinem indukovaná trombocytopenie, osteoporóza, alergická reakce,

alopecie, hyperkalemie. „Riziko krvácení se zvyšuje u alkoholiků, při polymedikaci a u pacientů nad 75 let.“

4.3.2 Nízkomolekulární hepariny (LMWH)

Zkratka LMWH je z anglického názvu Low Molecular Weight Heparin. Nízkomolekulární heparin je připravován z klasického heparinu pomocí frakcionace.

V dnešní době je upřednostňován před standardním heparinem díky srovnatelnému antikoagulačnímu účinku s minimálním rizikem vedlejších účinků a jednoduchou aplikací. Je také využíván při léčbě a prevenci aterosklerotických cévních změn. Laboratorní kontrola je nutná pouze v těhotenství, při renální insuficienci, nadváze a v pediatrii. Účinnost se kontroluje stanovením aktivity anti Xa.

Preventivně je podáván ve všech chirurgických oborech, u rizikových pacientů v interních indikacích, u těhotných žen, které mají trombofilie, případně prodělaly TEN.

V ČR jsou dostupné: dalteparin (Fragmin), enoxaparin (Clexane), nadroparin (Fraxiparin), bemiparin (Zibor).

K novějším, klinicky využitelným antitrombotikům patří Fondaparinux (Arixtra) či Idraparinux. Fondaparinux má selektivní vazbu na inhibitor FXa, je podáván s.c. V případě předávkování není stále dostupné antidotum. Používá se v léčbě a při prevenci tromboembolických komplikací u náhrad kyčelních a kolenních kloubů, akutního koronárního syndromu a lze ho také použít u heparin indukované trombocytopenie. Idraparinux se váže na antitrombin. Jeho poločas je delší než 80 hodin, proto je podáván 1x týdně s.c.

Hirudin a jeho syntetická i rekombinantní forma patří mezi přímé inhibitory trombinu, které mají univerzálnější účinek než ostatní antikoagulancia.

4.3.3 Kumarinová antikoagulancia

Jedná se o antagonisty vitamínu K – snižují syntézu faktorů II, V VII a X. Jsou podávány perorálně. Zástupci kumarinů jsou etyl-bis-kumacetát a warfarin sodium. Warfarin je plně účinný s latencí 36-48 hodin, jeho účinnost je individuálně variabilní a může být sezonně ovlivněn stravou.

Kumarinová antikoagulancia jsou užívána při pokračující krátkodobé léčbě heparinem či dlouhodobé nebo celoživotní léčbě. Dále se užívá při prevenci cévní mozkové příhody při fibrilaci síní, v prevenci periferní embolizace, u antifosfolipidového syndromu s prokázanou trombózou.

Účinnost působení je monitorována protrombinovým časem. Účinné terapeutické rozmezí INR je 2,0-43,0. Pokud následuje léčba warfarinem po předchozí heparinizaci, je nezbytné nejprve užívat oba léky současně. Po dosažení hladiny INR 2,0 lze heparin vysadit. Kontrola protrombinového času se provádí zpravidla za 4-6 týdnů.

Při předávkování hrozí krvácení. Při hodnotě INR vyšší než 5 je nutné warfarin na 1-2 dny vysadit. Antidotem je vitamin K. Po jeho podání je nutné počítat s dlouhodobou rezistencí na warfarin. Komplikace mohou nastat také v případě nemocných heterozygotů s defekty proteinů C a S nebo při mutaci genu pro cytochrom P450 2C9 a pro vitamin K epoxid reduktázu, malignit, antifosfolipidového syndromu (Indrák 2006; Indrák 2014).

4.3.4 Nová antikoagulancia (NOACs – new oral anticoagulants)

Nová antitrombotika jsou stále vyvíjena především kvůli nedostatkům uvedených léků a výzkum se snaží přiblížit k ideálnímu antikoagulantu, jehož nástup účinku je rychlý s vysokou účinností, bezpečný při perorálním podání, aplikaci 1x za den, bez nutného monitoringu, bez lékových a potravinových interakcí, dostupnosti antidota a ekonomické přijatelnosti. Výzkum se zaměřuje na dva cíle: inhibici trombinu a inhibici FXa. Oba tyto inhibitory jsou cílené a ke svému účinku nepotřebují antitrombin.

Mezi nová antikoagulancia patří Dabigatran (Pradaxa), Rivaroxaban (Xarelto), Apixaban (Eliquis), Edoxaban (Lixiana) (Indrák 2014). Jedná se o perorální antikoagulancia působící cíleně blokádu jednotlivých faktorů koagulační kaskády. Xabany blokují faktor Xa a gatransy faktor II. Monitorace není nutná (Karetová, Bultas 2012).

Dabigatran inhibuje volný trombin, trombin vázaný na fibrin, agregaci krevních destiček indukovanou trombinem. Nástup účinku je rychlý, většinou za 0,5 – 2 hodiny. Poločas je 12 – 14 hodin bez závislosti na dávce. Vazba na plazmatické bílkoviny je nízká a vylučování probíhá z 80 % ledvinami. Rivaroxaban je selektivní inhibitor F Xa. Na faktor Xa se váže přímo, účinek má rychlý nástup, maximální koncentrace je dosaženo po 2,5 - 4 hodinách, poločas je 9 hodin. Vylučování probíhá ledvinami a stolicí. Apixaban je přímý inhibitor F Xa, je selektivní a reverzibilní. Jeho účinek má rychlý nástup do 3 hodin

s poločasem 9 – 14 hodin. Pro minimální lékové interakce není třeba jeho monitoring. Edoxaban je přímý inhibitor F Xa. „Rychle se resorbuje s GIT, maximální koncentrace dosahuje za 1 – 2 hodiny, plazmatický poločas je 6 – 12 hodin.“ Tento lék zatím není u nás dostupný.

Mezi nedostatky těchto antitrombotik patřila nedostupnost antidot. Ty jsou však dnes buď čerstvě zavedena či se vyskytují v poslední fázi výzkumu.

5. Cíl práce a hypotézy

5.1 Cíl práce

Cílem mé diplomové práce je vztah Leidenské mutace a rezistence na aktivovaný protein C (APCR). Sledovat frekvenci TEN a potratů v osobní i rodinné anamnéze pacientů a zjistit, zda lze nalézt další rizikové faktory, které ovlivňují klinické projevy u pacientů s touto mutací.

5.2 Hypotézy

Lze předpokládat tvrzení, že čím více je patologické APCR, tím závažnější jsou klinické projevy. Dalším předpokladem je ovlivnění frekvence TEN a potratů přítomností dalších vrozených rizikových faktorů (protein C, protein S). A také lze předpokládat vyšší frekvenci klinických projevů u pacientů s vyššími hodnotami D-dimerů.

6. Metody a postupy

V rámci praxe jsem se seznámila s fungováním laboratoře Hematologie v Nemocnici České Budějovice. Byla jsem seznámena se základními, ale i speciálními metodami vyšetření krve prováděnými na tomto pracovišti. Po kompletním seznámení se s pracovištěm jsem se zaměřila na vyšetření krve týkající se mé diplomové práce, a to především na stanovení protrombinového času podle Quicka, aktivovaného parciálního tromboplastinového času, koncentrace funkčního fibrinogenu, stanovení funkčně aktivního proteinu C, rezistence na aktivovaný protein C, stanovení aktivity koagulačního faktoru V. Protože se jedná o onemocnění spojené s genetikou, navštívila jsem také pracoviště Molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice, kde jsem byla seznámena s genetickým vyšetřením na Leidenskou mutaci.

Všechna speciální vyšetření se provádí na plně automatizovaném koagulačním analyzátoru Sysmex CS-2100i, avšak ho lze využít i k základním koagulačním metodám. Tento přístroj využívá k analyzování koagulační, chromogenní či imunologickou metodu. Koagulační metoda je založena na principu aplikace světla do směsi krevní plazmy a reagensů. Změna turbidity se projevuje jako změna procházejícího světla. Chromogenní metoda je zjišťována jako změna světelné absorbance po smíchání krevní plazmy a reagensů. Při imunologické metodě je plazma smíchána s latexovou reagensů a je vyhodnocována jako změna absorbance latexových shluků.

6.1 Principy analýzy

Vzorek je po danou dobu inkubován, poté je k němu přidána reagensie. Na tuto směs je vysíláno světlo, jehož změny jsou zaznamenávány během procesu srážení krve. Ke zjištění koagulačního času se používá metoda procentuální detekce. Ke zjištění změn v absorbanci za minutu se využívá poměrová metoda nebo metoda VLin integral.

6.1.1 Postup při zpracování vzorků pro koagulační vyšetření

Vzorek čerstvé krve je ředěný pufovaným citrátem sodným v poměru 9:1. Všechny vzorky je nutné odstředit a vytemperovat na laboratorní teplotu.

Zpracování vzorku na rutinní koagulační metody, speciální koagulační metody a plazma pro vyšetření faktoru VIII a ostatních koagulačních faktorů se odstředí při 1500 g po dobu 15 minut. Poté je supernatant odebrán do zkumavky, která je řádně označena a tento vzorek je zamražen a uchováván při -70°C . Před samotným vyšetřením je plazma rozmrazena ve vodní lázni v termostatu při 37°C a znovu odstředěna při 1500 g po dobu 15 minut.

6.1.2 Stanovení funkčně aktivního proteinu C

Protein C je na vitaminu K závislý inhibitor koagulace, který reguluje aktivitu F V a F VIII. Je součástí přirozeného antikoagulačního systému, jehož cílem je štěpení aktivovaných kofaktorů V a VIII.

Toto stanovení probíhá chromogenní metodou. Specifickým aktivátorem je hadí jed, který aktivuje protein C a ten přímo úměrně aktivuje následující reakci. Jako reagensie se používá Berichrom Protein C. Barevná změna je měřena jako změna optické hustoty při vlnové délce 405 nm. Kalibrační křivka je určena změnami optické hustoty v závislosti na procentech. Výsledky jsou udávány v procentech. Referenční rozmezí je 70 - 130 %.

6.1.3 Stanovení rezistence na aktivovaný protein C

Rezistence na aktivovaný protein C představuje nedostatečnou nebo vůbec žádnou odpověď na aktivovaný protein C a v 90 – 95 % je vyvolaná Leidenskou mutací.

Tento test je založen na aktivaci endogenního proteinu C hadím jedem. Jako reagensie se používají Pro C^R Ac R Reagent a Pro C^R R Activator. Přidáním aktivátoru k proteinu C u normálního vzorku způsobí prodloužení výsledného času 2x – 3x oproti času v testu s přidáním pufru. U Leidenské mutace způsobí aktivace proteinu C hadím jedem pouze malé prodloužení oproti testu s pufrem.

Výsledky jsou určeny jako poměr koagulačního času s aktivátorem a koagulačního času s pufrem. Referenční rozmezí je 2,0 – 4,2. Výsledek 1,5 – 2,1 si vyžaduje další vyšetření genovou analýzou. Výsledek roven nebo menší než 1,5 značí s největší pravděpodobností Leidenskou mutaci. Vždy je však nutné tuto diagnózu geneticky potvrdit.

6.1.4 Stanovení aktivity koagulačního faktoru V

K plazmě vyšetřovaného vzorku je přidána plazma s deficitem F V a dále vyšetřena protrombinovým časem (PT). Plazma s chybějícím faktorem nemůže kompenzovat chybějící faktor v plazmě s deficitem známého faktoru, proto zůstane PT prodloužený. Výsledek je určen pomocí kalibrační křivky, která je určena změnami času v závislosti na procentech. Výsledek udáván v procentech. Referenční rozmezí je 60 – 140 %.

6.1.5 Stanovení protrombinového času podle Quicka

Protrombinový čas (PT) je měřený pomocí tromboplastinu. Jedná se o test vnější cesty koagulační kaskády, který slouží k odhalování deficitu koagulačních faktorů vnější cesty a k monitorování léčby Warfarinem. PT je doba nutná k vytvoření fibrinového vlákna po aktivaci tromboplastinem. Monitoruje vzájemnou spolupráci faktorů a schopnost tvorby koagula v přiměřeném čase.

Koagulační kaskáda je spuštěna přidáním tromboplastinu a vápníku k plazmě a čas je měřen do vytvoření koagula. Použité reagensie jsou Tromborel S a PT Multi Calibrator. Jedna kalibrační křivka je určena změnami času v závislosti na procentech. Referenční rozmezí je 80 – 120 %, INR 0,8 – 1,2, Ratio 0,8 – 1,2. Výsledky jsou udávána v sekundách, procentech normální aktivity, protrombinovém poměru (PR), INR.

6.1.6 Stanovení aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT)

aPTT nám umožňuje hodnotit funkčnost vnitřní cesty koagulační kaskády. Pomocí tohoto testu lze odhalit deficit některých koagulačních faktorů vnitřní cesty, monitorovat léčbu heparinem, detekovat přítomnost inhibitorů.

Koagulační proces je spuštěn po přidání vápníkových iontů a čas je měřen do vytvoření fibrinového vlákna. Přidávanými reagensiemi jsou Pathromtin SL a Calcium Chloride Solution. Výsledky jsou udávány v sekundách, Referenční rozmezí je 0,8 – 1,2.

6.1.7 Stanovení koncentrace funkčně aktivního fibrinogenu

Tento test slouží k odhalení deficitu či nadbytku fibrinogenu a/nebo k rozlišení prodlouženého trombinového času způsobeného heparinem anebo poruchami tvorby fibrinu. Fibrinogen je protein nezbytný pro tvorbu krevní sraženiny. Je tvořen megakaryocyty a v konečné fázi kaskády je rozpustný fibrinogen měněn na fibrinové vlákno. Tato vlákna jsou spojována do fibrinové sítě. Je důležité přihlížet i na další okolnosti změny koncentrace. Vyšší koncentrace může být způsobena i vzrůstajícím věkem pacienta, ale jedná se také o rizikový faktor pro kardiovaskulární onemocnění. Nižší koncentrace mohou být vrozené či získané.

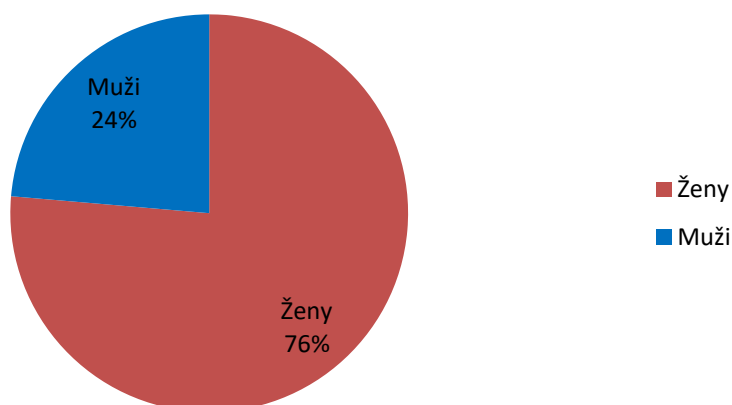
Reagencií je Thrombin Reagent – lyofilizovaný hovězí trombin. Čas je měřen do vytvoření koagula. Tento čas odpovídá nepřímě úměrně koncentraci fibrinogenu v plazmě. Kalibrační křivka je určena změnami času v závislosti na gram na litr. Referenční rozmezí je 1,8 – 4,2 g/l. Výsledek udáván v gramech na litr, což vyjadřuje koncentraci funkčního fibrinogenu.

7. Zpracování dat

Veškerá data pocházejí z Hematologické ambulance Nemocnice České Budějovice a všechna tato data byla mimo nemocnici zpracovávána anonymně.

Obdržela jsem 2 soubory s anonymními daty z hematologické a genetické ambulance. Data z hematologie obsahovala výsledky testů týkajících se koagulačního vyšetření za rok 2014 - 2016. Celkem tento soubor obsahoval data 1897 pacientů. Genetická data obsahovala výsledky testů týkající se přítomnosti či nepřítomnosti Leidenské mutace u pacientů za rok 2014 - 2016. Celkem tento soubor obsahoval data 3237 pacientů, z toho bylo na Leidenskou mutaci pozitivních 610 pacientů, což činí prevalenci v Českých Budějovicích 18,9 % za 3 roky. Z těchto pacientů navštěvuje hematologickou ambulanci 125 pacientů (3,9 %). Poté jsem z těchto souborů vybrala pouze data pocházející z hematologické ambulance, protože k těmto datům lze dohledat další potřebné informace. Jejich celkový počet byl 796 z hematologie a 1004 z genetiky. Následně jsem z těchto dat vybrala pouze ty pacienty, kterým vyšel pozitivní test na Leidenskou mutaci. Poté jsem z těchto dvou souborů vytvořila jeden, kde jsem vybrala pacienty, ke kterým jsem měla jak výsledky koagulačních vyšetření, tak pozitivitu Leidenské mutace za rok 2014 - 2016. Celkem zůstalo 55 pacientů (3,06 %). Z toho 42 žen (76,4 %) a 13 mužů (23,6 %). Procentuelní zastoupení pohlaví je znázorněno na grafu č. 1.

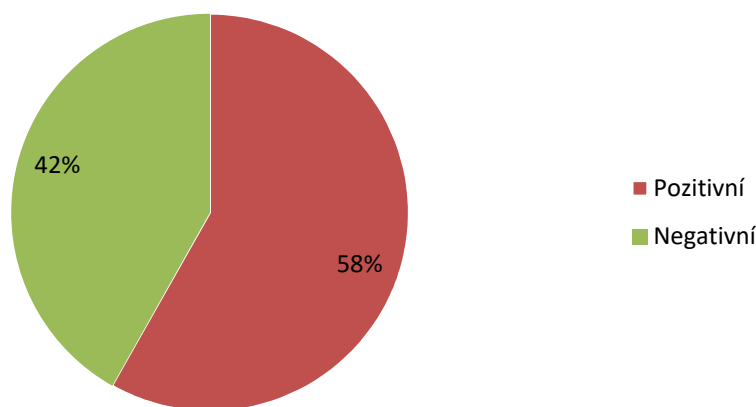
Porovnání pohlaví



Graf č. 1: Rozdělení pacientů pozitivních na Leidenskou mutaci podle pohlaví.

Po zpracování anonymních dat bylo nutné jejich další rozšíření o data klinická. V osobních kartách jsem vyhledávala informace, zda pacient prodělal trombózu, provokovanou trombózu, plicní embolii, u žen potraty, rodinou anamnézu a rodinou anamnézu vzdálených příbuzných. Podle počtu jsem tyto informace ohodnotila. Poté jsem pacienty rozdělala na dvě skupiny – s pozitivními klinickými daty a s negativními klinickými daty. S pozitivními klinickými daty bylo 32 pacientů (58,2 %) a pacientů s negativní klinikou bylo 23 (41,8 %). Procentuelní zastoupení těchto skupin je znázorněno na grafu č. 2. Dále jsem hledala rozdíly mezi těmito skupinami.

Klinické projevy

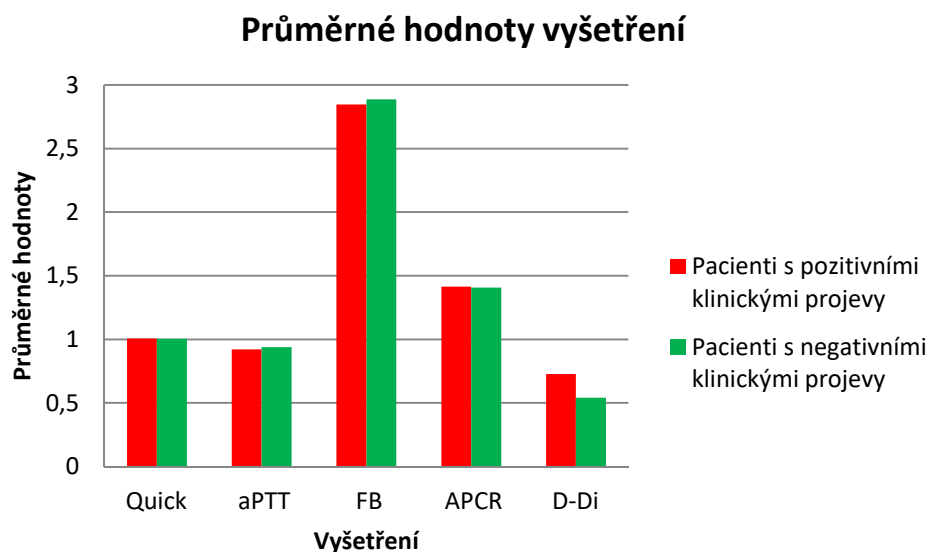


Graf č. 2: Porovnání pacientů podle klinických projevů.

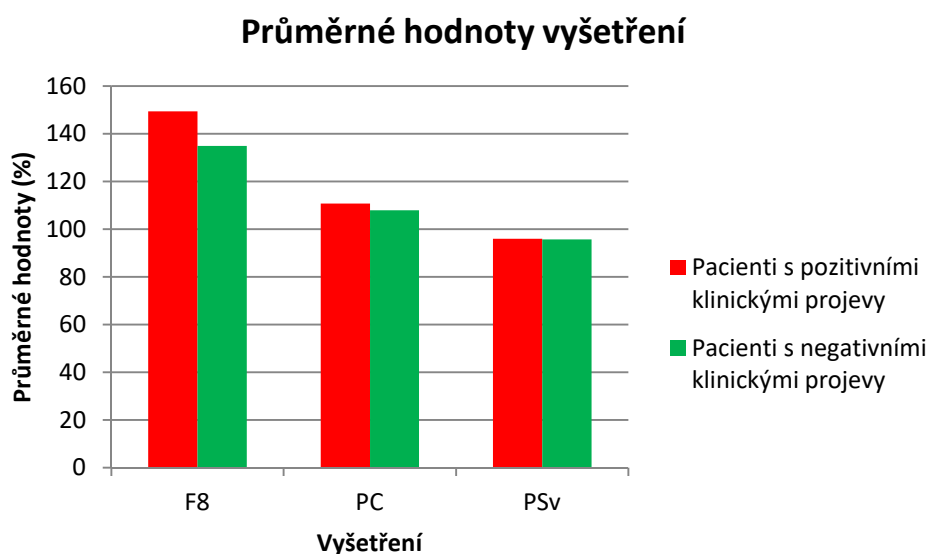
Cílem mé práce bylo najít souvislost mezi hodnotami APCR a závažností klinických projevů. Předvíдалa jsem, že čím více bude patologická APCR, tím budou klinické projevy závažnější.

Nejprve bylo nutné porovnat všechny získané hodnoty a hledat mezi nimi rozdíly. Porovnání průměrných hodnot jednotlivých vyšetření pacientů rozdělených do skupin s pozitivními a negativními klinickými projevy je na grafu č. 3 a grafu č. 4. Na grafu č. 3 jsou porovnány průměrné hodnoty vyšetření v různých jednotkách. Vyšetření protrombinového času podle Quicka je udáváno v INR (international normalized ratio), aPTT je udáváno poměrem (ratio), fibrinogen je udáván v g/l, APCR je udáván poměrem, D-Dimer je udáván v mg/l FEU (fibrinogen ekvivalentní jednotka). Na grafu č. 4 jsou

porovnány průměrné hodnoty faktoru VIII, proteinu C a volného proteinu S. Všechny tyto jednotky jsou udány v procentech.



Graf č. 3: Průměrné hodnoty vyšetření.



Graf č. 4: Průměrné hodnoty vyšetření.

Po porovnání všech dostupných hodnot pacientů a také jejich průměrů (Quick, Protrombinový čas, fibrinogen, rezistence na aktivovaný protein C, faktor VIII, protein C, volný protein S, D-Dimery) jsem zjistila, že nejvýznamnější jsou rozdíly hodnot D-Dimeru.

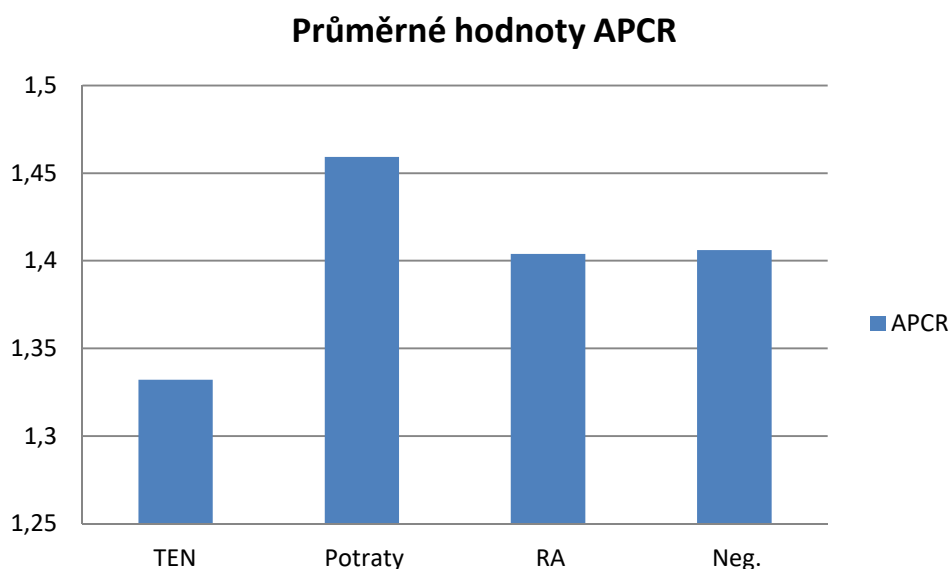
Předvídané APCR neovlivňuje výskyt klinických projevů. Ostatní rozdíly průměrných hodnot jsou minimální a tudíž nevýznamné.

Dle grafu č. 3 je největší rozdíl mezi průměrnými hodnotami D-dimerů. Pro ověření statistické významnosti všech zjištěných rozdílů průměrných hodnot vyšetření jsem použila tabulkový procesor Microsoft Excel, ve kterém jsem využila statistickou funkci jednofaktoriální analýza rozptylu (ANOVA). Pro všechny realizované testy byla zvolena hladina významnosti $\alpha=5\%$.

Statistické testy významnosti však neprokázaly signifikantní rozdíl mezi průměrnou hodnotou D-dimerů u pacientů s pozitivními klinickými projevy a pacientů s negativními klinickými projevy ($df = 51, F = 0,59, p = 0,45$).

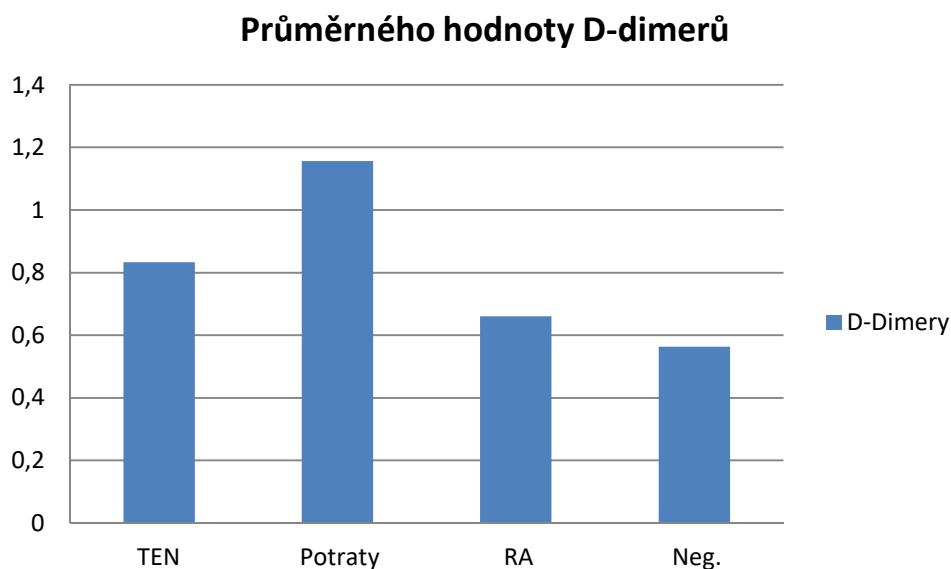
Dále jsem rozdělila pacienty s pozitivními klinickými projevy na 3 skupiny a to na pacienty, kteří prodělali trombózu či embolii (TEN), pacientky, které potratily a na pacienty s pozitivní rodinnou anamnézou (RA). U těchto skupin jsem porovnávala průměrné hodnoty APCR a D-Dimerů.

Na grafu č. 5 jsou znázorněny 4 skupiny pacientů podle klinických projevů a průměrné hodnoty APCR u těchto skupin. U skupiny pacientů s TEN je průměrná hodnota APCR nižší než u ostatních. Statistická významnost rozdílů mezi těmito skupinami nebyla signifikantní ($df = 66, F = 0,79, p = 0,51$).



Graf č. 5: Průměrné hodnoty APCR u skupin pacientů s pozitivními klinickými projevy.

Na grafu č. 6 jsou porovnány průměrné hodnoty D-Dimerů udávaných v mg/l FEU jednotlivých skupin pacientů, rozdělených dle klinických projevů. Podle výsledků průměrných hodnot lze vyvodit, že vysoké hodnoty D-Dimerů v kombinaci s Leidenskou mutací způsobují často potraty. Neobvyklé však nejsou ani trombózy či embolie a v jisté míře lze předpokládat i souhru s rodinnou anamnézou. Statistická významnost rozdílů hodnot však nebyla signifikantní ($df = 62$, $F = 1,17$, $p = 0,33$).

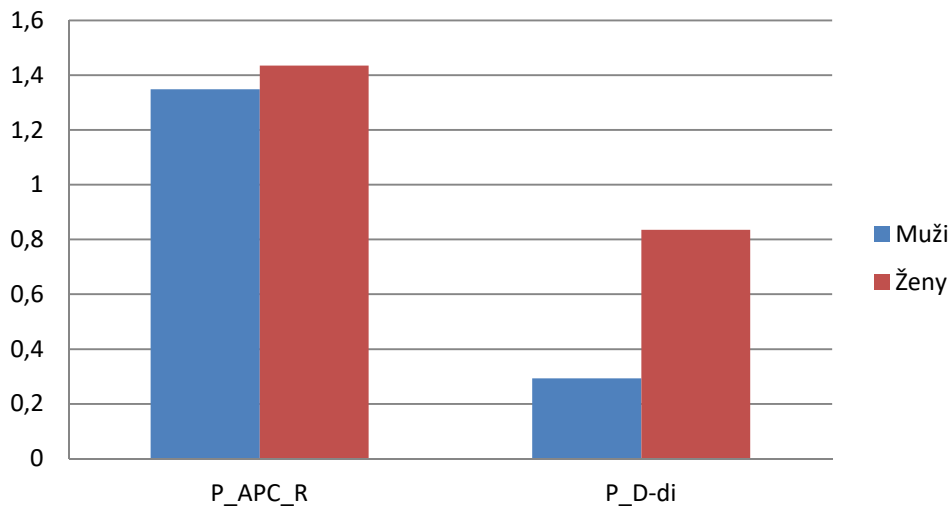


Graf č. 6: Průměrné hodnoty D-dimerů u skupin pacientů s pozitivními klinickými projevy.

Získané údaje bylo třeba dále analyzovat. Proto jsem vytvořila několik grafů, kde jsem porovnávala průměrné hodnoty APCR a D-dimerů u pacientů zařazených do skupin dle různých kritérií.

Na grafu č. 7 jsou porovnány průměrné hodnoty vyšetření APCR a D-dimerů u mužů a žen s pozitivními klinickými projevy. Rozdíl průměrných hodnot APCR je nepatrný a tudíž bezvýznamný. U průměrných hodnot D-dimerů je tomu však již jinak. U žen jsou hodnoty znatelně vyšší, což může být způsobeno výskytem potratů u žen či graviditou žen během vyšetření, protože D-dimery jsou v graviditě fyziologicky zvýšené. Přesto nebyla statistická významnost tohoto rozdílu signifikantní ($df = 31$, $F = 1,31$, $p = 0,26$).

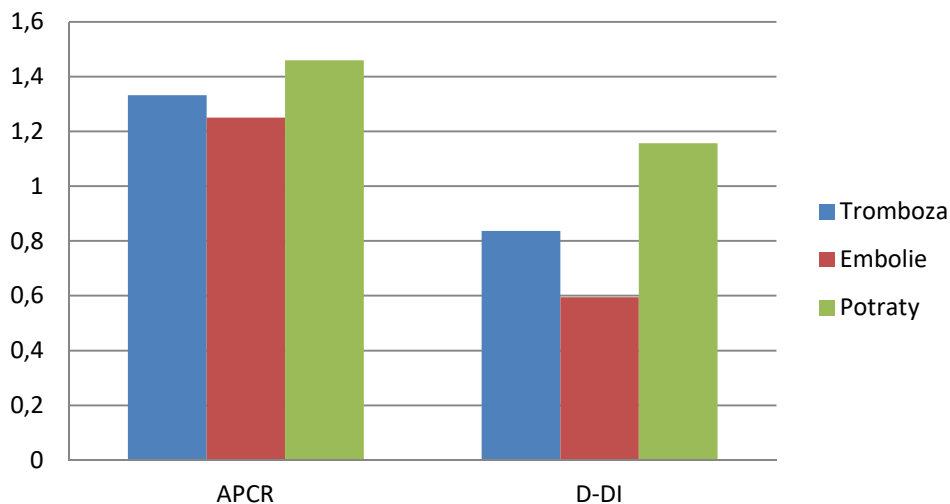
Muži vs. Ženy



Graf č. 7: Porovnání průměrných hodnot vyšetření APCR a D-dimerů u mužů a žen.

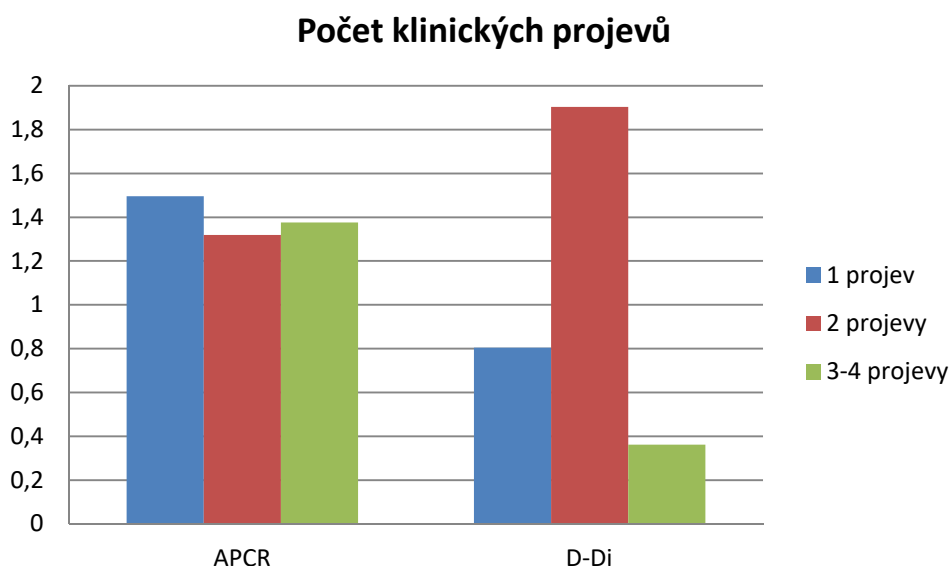
Na grafu č. 8 jsou znázorněné průměrné hodnoty vyšetření APCR a D-dimerů u pacientů, kteří prodělali trombózu, embolii či potrat. Lze vidět nepatrný rozdíl průměrných hodnot APCR. Tento rozdíl však nebyl statisticky významný ($df = 25$, $F = 1,8$, $p = 0,19$). Větší rozdíly jsou patrné u průměrných hodnot D-dimerů těchto skupin, přesto ani zde nebyl prokázán statistický význam ($df = 22$, $F = 0,25$, $p = 0,78$).

Trombóza vs. Embolie vs. Potraty



Graf č. 8: Porovnání průměrných hodnot APCR a D-dimerů u pacientů, kteří prodělali trombózu, embolii či potrat.

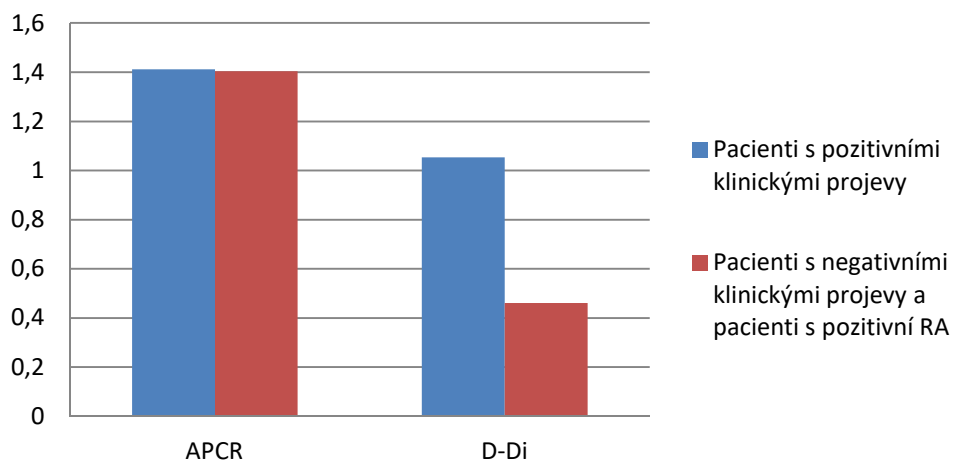
Na grafu č. 9, kde jsou porovnané průměrné hodnoty APCR a D-dimerů u pacientů rozdělených do skupin podle počtu klinických projevů u každého pacienta, lze vidět, že průměrná hodnota APCR se opět příliš neliší. Zato průměrná hodnota D-dimerů se velice liší. Nejzajímavější je, že hodnota D-dimerů je nejnižší u skupiny pacientů, u kterých bylo 3 a více klinických projevů. Přesto statistická významnost nebyla signifikantní ($df = 21$, $F = 2,87$, $p = 0,08$).



Graf č. 9: Porovnání průměrných hodnot APCR a D-dimerů podle počtu projevů u pacientů.

Podle grafu č. 3 a 4 je patrné, že pozitivní rodinná anamnéza neovlivňuje hodnoty APCR a D-dimerů, a že tyto hodnoty jsou téměř shodné se srovnávanou negativní skupinou pacientů. Proto jsem pacienty, kteří měli pouze pozitivní rodinnou anamnézu, přiřadila k pacientům s negativními klinickými projevy a opět provedla porovnání průměrných hodnot APCR a D-dimerů pacientů rozdělených do dvou skupin dle přítomnosti či nepřítomnosti klinických projevů (graf č. 10). Rozdílnost hodnot APCR se nezměnila. U hodnot D-dimerů už je však výraznější rozdíl, který je statisticky signifikantní ($df = 54$, $F = 6,01$, $p = 0,02$).

Pozitivní vs. Negativní klinické projevy a pozitivní rodinná anamnéza



Graf č. 10: Porovnání průměrných hodnot APCR a D-dimerů u pacientů s pozitivními klinickými projevy a pacientů s negativními klinickými projevy s pacienty s pozitivní rodinnou anamnézou.

8. Diskuze

Trombofilní stavy mohou být vrozené či získané, často spojené se zvýšeným výskytem nebo rizikem trombózy. Penka 2001 uvádí prevalenci tohoto onemocnění 1:1000 ve vyspělých zemích. Indrák 2014 uvádí prevalenci tromboembolické nemoci 1 případ na 1000 obyvatel, kdy stoupá s věkem. Salaj 2017 pak udává 40 případů na 100000 obyvatel. K nejvýznamnější vrozené trombofilii patří Leidenská mutace, která je spojená s rezistencí na aktivovaný protein C. Sršeň, Sršňová 2005 uvádí prevalenci APCR 2 – 8 % u bílé rasy. Výskyt však vzrůstá na 20 – 60 % u pacientů s venózní trombózou. V České republice je prevalence 6,6 %. Pro srovnání prevalence lze použít článek o APCR a Leidenské mutace v Mexiku, kde 0,85 % Mexičanů ze 4345 je nositelem Leidenské mutace (Majluf-Cruz, Moreno-Hernandez et al. 2007).

Prevalence Leidenské mutace v Českých Budějovicích za 3 roky odpovídá téměř 19 %. Toto číslo je vyšší než prevalence v ČR z důvodu vyšetření pacientů s podezřením na tuto mutaci či jiný problém spojený s poruchou srážlivosti krve. Častější zachycení Leidena byl u žen. U více jak poloviny těchto pacientů byl pozitivní klinický nále. Předpokládala jsem, že s růstem patologie APCR poroste závažnost klinických projevů.

Všeobecně je známo, že pacienti, kteří prodělali tromboembolickou nemoc, mají nižší hodnotu APCR. Podle získaných dat se však toto tvrzení nepotvrdilo. Ne vždy nízká hodnota APCR znamená přítomnost klinického projevu. Například pacient X má hodnotu APCR 1,82 s 1 klinickým projevem (potrat). Avšak pacient Y má hodnotu APCR 0,84 a přesto je bez klinických projevů.

Při porovnávání průměrných hodnot běžných i speciálních koagulačních vyšetření u pacientů s výskytem klinických projevů a pacientů bez klinických projevů (graf č. 3, graf č. 4) jsem neshledala žádné významné rozdíly s výjimkou D-dimerů. Ani předvídané rozdíly APCR nebyly prokázány. Vyšší hodnoty D-dimerů u pozitivní skupiny pacientů jsou více očekávané než u negativní skupiny. Lze to částečně vysvětlit tím, že tito pacienti prodělali TEN a z tohoto důvodu přišli do hematologické ambulance. Nebo proto, že se jedná o těhotné ženy, které v minulosti potratily, lze tedy předpokládat výskyt komplikací, a proto jsou pod dohledem hematologa. D-dimery jsou fyziologicky ve velmi nízké koncentraci. Avšak jindy patologická hodnota D-dimerů je v těhotenství stále fyziologickou. Koncentrace D-dimerů roste právě v přítomnosti trombu, kdy působí plazmin na fibrin a dochází ke štěpení fibrinu (Penka 2006).

Porovnání průměrných hodnot APCR u různých skupin pacientů s pozitivními klinickými daty (graf č. 5) ukazuje viditelně nižší průměrné hodnoty APCR u skupiny pacientů, kteří prodělali tromboembolickou nemoc.

Stejný postup byl proveden u průměrných hodnot D-dimerů. Zde jsou nejvyšší hodnoty u potratů. Může však záležet, kdy přesně byly tyto hodnoty u pacientek měřeny. Pokud ženy v minulosti prodělaly potrat, spadají do rizikové skupiny kontrolované hematologem. A to hlavně v těhotenství, kdy je fyziologická hodnota D-dimerů vyšší. Tyto výsledky pak mohly způsobit zvýšení průměrných hodnot u této skupiny.

Další porovnání průměrných hodnot APCR a D-dimerů mezi muži a ženami s pozitivními klinickými projevy (graf č. 7) mělo za výsledek vyšší hodnoty D-dimerů u žen. Platí zde jako pravidlo výše – D-dimery jsou v těhotenství fyziologicky vyšší.

Ani u grafu č. 8 není výsledek rozdílný a stále platí pravidlo hodnoty D-dimerů v těhotenství.

Při vyhodnocování grafu č. 9 došlo k velkému překvapení, kdy hodnoty D-dimerů byly nejnižší u skupiny pacientů se 3 a více projevy. Vzhledem k tomu, že tato skupiny obsahovala pouze 5 pacientů a skupiny s jedním a dvěma projevy více pacientů, byla průměrná hodnota výrazně nižší.

Z prvních grafů je patrné, že pacienti s pozitivní rodinnou anamnézou bez dalších klinických projevů mají minimální rozdíly se skupinou pacientů bez klinických projevů. Rodinná anamnéza není klinickým projevem, pouze zvyšuje riziko pacientů. Proto jsem spojila skupinu pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou a s negativními klinickými projevy a následně porovnála průměrné hodnoty. Tím jsem zjistila významný rozdíl u D-dimerů.

Všechny viditelnější rozdíly v grafech jsem statisticky prověřila na jejich významnost. Statisticky významný rozdíl jsem našla pouze u hladiny D-dimerů u skupiny pacientů s pozitivními klinickými projevy bez pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou, které jsem zařadila k negativní skupině. Všechny ostatní nedosahovaly statistické významnosti. Vzhledem k nízkému počtu pacientů u skupiny pacientů s pozitivními klinickými projevy bez pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou nebyla statistika signifikantní. Pro lepší určení statistické významnosti dat by bylo třeba rozšířit celkový počet pacientů.

Při pohledu na data jsou zjevné vyšší hodnoty D-dimerů u pozitivní skupiny pacientů. Při jednom porovnání vyšel rozdíl statisticky významný a u jednoho se statistické významnosti blížil ($p = 0,08$). Pro zvýšení významnosti by bylo vhodné udělat obsáhlejší

práci, což není v podmínkách tohoto pracoviště možné vzhledem k tomu, že se mohla změnit metodika vyšetření, dostupnost dat a menší počet genetických vyšetření v dřívějších letech.

Mezi nejvýznamnější vyšetření patří APCR a také genetické potvrzení Leidenské mutace. Dále pak se jeví být významným vyšetřením hodnota D-dimerů. Ostatní vyšetření jsou s největší pravděpodobností v případě Leidenské mutace méně významné, ne však bezvýznamné.

Určitou předpovědní hodnotu mohou mít počty destiček a jejich střední objem či měření jejich reaktivity pro příhody tepenné trombózy, jak uvádí Matýšková, Hrachovinová 1999.

Ani homozygoti, kteří mají vždy vyšší riziko trombóz, neměli vždy nejzávažnější průběh. Z vybrané skupiny pacientů byli pouze 3 homozygoti a jejich klinické projevy byly rozdílné. Jeden byl zcela bez klinických příznaků, u druhého pacienta se klinické projevy objevily pouze v rodinné anamnéze a třetí měl přímé klinické projevy. Přesto u této skupiny lze tvrdit, že hodnota APCR je významná, protože vždy byla menší než 1.

V posledních letech se značně zvýšil počet genetických vyšetření pacientů na FV Leiden. Dle mého názoru je dobré o takové skutečnosti vědět, především u žen. V době, kdy je kariérní růst upřednostňován před rodinou a většina žen užívá antikoncepci bez jakýchkoliv vyšetření, je dobré o vyšších rizicích vědět a v případě potíží znát svou diagnózu pro urychlení pomoci z pohledu lékaře.

9. Závěr

Cíle mé práce byly:

- Vyhledat pacienty pozitivní na Leidenskou mutaci a s APCR
- Zjistit klinické projevy u pacientů s FV Ledenem
- Zjistit vztah mezi APCR a závažností klinických projevů
- Zjistit, zda existuje další faktor ovlivňující závažnost projevu

Všechny tyto cíle jsem splnila.

Hypotézy byly:

- Čím více je patologické APCR, tím jsou klinicky projevy závažnější → neprokázáno
- Frekvence TEN a potratů je ovlivněna přítomností dalších vrozených rizikových faktorů → neprokázáno
- Vyšší frekvence klinických projevů je spojena s vyššími hodnotami D-dimerů → prokázáno

10. Seznam zkratk

ANOVA	analýza rozptylu
APC	aktivovaný protein C
APCR	rezistence na aktivovaný protein C
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
AT	antitrombin III
DIK	diseminovaná intravaskulární koagulace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FEU	fibrinogen ekvivalentní jednotka
fVL	faktor V Leiden
GDF-15	growth differentiation factor-15
GIT	gastrointestinální trakt
H-FABP	heart-type fatty acid binding protein
hsTnT	highly sensitive troponin T
HŽT	hluboká žilní trombóza
INR	international normalized ratio
LIA	lysine iron agar
LMWH	nízkomolekulární heparin
NOACs	nová orální antikoagulancia
PCG	proC Global
PCR	polymerázová řetězová reakce
PE	plicní embolie
PR	protrombinový poměr
PT	protrombinový čas
RA	rodinná anamnéze
TEN	tromboembolická nemoc
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TNF	tumor nekrotizující faktor
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
UFH	nefrakcionovaný heparin

u-PA

urokináza

vWF

Von Willebrandův faktor

11. Seznam použité literatury

BERTINA, Rogier M. (1997), clinchem.org, staženo z:

<http://www.clinchem.org/content/43/9/1678.full>, 2. 2. 2016

BEUTLER, Ernest et al. *Williams hematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1995.

DÍTĚ, Petr. *Vnitřní lékařství*. 2., dopl. a přepr. vyd. Praha: Galén, 2007, 586 s. ISBN 9788072624966.

DONG, Jian, Xianli DUAN, Rui FENG, et al. Diagnostic implication of fibrin degradation products and D-dimer in aortic dissection. *Scientific Reports* [online]. 2017-3-6, 7, 43957-.

DOI: 10.1038/srep43957.ISSN 2045-2322. Staženo z:

<http://www.nature.com/articles/srep43957>, 9.4.2017

DONNER, Ludvík. *Klinická hematologie*. Vyd. 1. Praha: Avicenum, 1985, 448 s.

FABER, Edgar. *Základy hematologické diagnostiky*. 2. přepracované vydání. Praha: Mladá fronta, 2015. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-3742-6.

FRIEDMANN, Bedřich. *Hematologie v praxi*. 1. vyd. Praha: Galén, 1994, 368 s., barev. fotogr. na příl. ISBN 80-85824-05-1.

HUDEČEK, Ján, Jela IVANKOVÁ, Miroslava DOBROTOVÁ, J. HYBENOVÁ, Rudolf PULLMANN a Peter KUBISZ. Analýza fenotypu rezistence na aktivovaný protein C (APC-rezistence): Analysis of the phenotype of resistance to activated C protein (APC-resistance). *Vnitřní lékařství*. 1999, 45(12), 723-728. ISSN 0042-773x.

INDRÁK, Karel, Štefan ALUŠÍK a Magdaléna LEJSKOVÁ. *Hematologie*. 1. Vyd. Praha: Triton, 2006, 278 s., [9] s. barev. obr. příl. Postgraduální klinický projekt. ISBN 80-7254-868-9.

INDRÁK, Karel. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Triton, 2014, 610 s. Lékařské repetitorium. ISBN 978-80-7387-722-4.

ISBN 00-707-0386-8.

KARETOVÁ, D. a J. BULTAS. Nová perorální antitrombotika v prevenci a léčbě tromboembolizmu. *Kardiologická revue – Interní medicína*. 2012, **14**(2). Staženo z: http://www.kardiologickarevue.cz/kardiologicka-revue-clanek/nova-peroralni-antitrombotika-v-prevenci-a-lecbe-tromboembolizmu-37795?confirm_rules=1, 16. 4. 2017

KUBISZ, Peter a Ján STAŠKO. *Hematológia a transfuziológia: učebnica*. 1. vyd. Bratislava: Grada Slovakia, 2006, 323 s. ISBN 8024717794.

KVASNIČKA, Jan. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. Praha: Grada, 2003. ISBN 8071699934.

Leidenská mutace. WikiSkripta (rok?), wikiskripta.cz, staženo z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Leidensk%C3%A1_mutace#, 16. 2. 2016

MAJLUF-CRUZ, A., M. MORENO-HERNANDEZ, A. RUIZ-DE-CHAVEZ-OCHOA, et al. Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden in Mexico. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* [online]. 2007, **14**(4), 428-437. DOI: 10.1177/1076029607306807. ISSN 1076-0296. Staženo z: <http://cat.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1076029607306807>, 10. 4. 2017.

MATÝŠKOVÁ, Miloslava a Ingrid HRACHOVINOVÁ. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999. ISBN 8070132787.

PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patofyziologie hemostázy*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2004, 237 s. ISBN 808668203x.

PENKA, Miroslav. *Hematologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2001, 201 s., [12] s. barev. příl. ISBN 80-247-0023-9.

POSPÍŠILOVÁ, Šárka, Dana DVOŘÁKOVÁ a Jiří MAYER. *Molekulární hematologie*. Praha: Galén, 2013. ISBN 978-80-7262-942-8.

SAKALOVÁ, Adriena a Tomáš LIPŠIC. *Hematológia a transfuziológia: Teória a cvičenia*. 1. vvd. Martin: Osveta, 1995, 527 s. ISBN 80-217-0444-6.

SALAJ Peter. *Poruchy hemostázy*. Praha: Maxdorf, 2017. ISBN 978-80-7345-513-2

SRŠEŇ, Štefan a Klára SRŠŇOVÁ. *Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata*. 4., přepr. a rozš. vyd. Martin: Osveta, 2005, 445 s. ISBN 80-8063-185-9.

VOJÁČEK, Jan a Martin MALÝ. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0501-X.

WELLS, Philip S., David R. ANDERSON, Marc RODGER, et al. Evaluation of D-Dimer in the Diagnosis of Suspected Deep-Vein Thrombosis. *New England Journal of Medicine* [online]. 2003, **349**(13), 1227-1235. DOI: 10.1056/NEJMoa023153. ISSN 0028-4793. Staženo z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa023153>, 10. 4. 2017.

WIDIMSKÝ, Jiří a Jaroslav MALÝ. *Akutní plicní embolie a žilní trombóza: patogeneze, diagnostika, léčba a prevence*. 3., rozš. a přeprac. vyd. Praha: Triton, 2011. ISBN 978-80-7387-466-7.