

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Zavedení nové citlivější koagulační reagensie
v hematologické laboratoři**

Eliška Dvořáková

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Sadílek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu RNDr. Petru Sadílkovi, Ph.D., za pomoc, podporu a vedení při zpracování mé bakalářské práce. Vážím si jeho času a ochoty, kterou věnoval opravám, konzultacím a kontrolám mé práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15.5.2020

Eliška Dvořáková

1. OBSAH

2.	ABSTRAKT	6
3.	ABSTRACT	7
4.	ÚVOD.....	8
5.	ZADÁNÍ– CÍL PRÁCE.....	9
6.	TEORETICKÁ ČÁST	10
6.1	Hemostáza	10
6.1.1	Vývoj hemostázy.....	10
6.1.2	Složky hemostázy.....	11
6.1.3	Mechanismy hemostázy	14
6.1.4	Testy používané v hemostáze.....	28
7.	PRAKTICKÁ ČÁST	32
7.1	Vyšetřovaný materiál	32
7.2	Automatický koagulometr STA-R Evolution	33
7.3	Principy použitých metod	34
7.3.1	Princip protrombinového testu PT	34
7.3.2	Princip stanovení funkční aktivity FII.....	34
7.3.3	Princip stanovení funkční aktivity FV	35
7.3.4	Princip stanovení funkční aktivity FVII.....	35
7.3.5	Princip stanovení funkční aktivity FX	35
7.4	Použité reagensie	35
7.4.1	Reagensie STA Neoplastin Cl Plus.....	35
7.4.2	Reagensie STA NeoPTimal	36
7.4.3	Příprava reagensií pro PT.....	36
7.4.4	Příprava reagensií pro stanovení funkční aktivity FII.....	37
7.4.5	Příprava reagensií pro stanovení funkční aktivity FV	38

7.4.6	Příprava reagensů pro stanovení funkční aktivity FVII.....	38
7.4.7	Příprava reagensů pro stanovení funkční aktivity FX	39
7.5	Nastavení přístroje	40
7.6	Kalibrace přístroje.....	41
7.6.1	Reagensie potřebné pro kalibraci.....	42
7.7	Kontrola kvality	42
7.7.1	Reagensie pro kontrolu kvality	43
7.8	Pracovní postup.....	43
7.9	Výsledky a jejich statistické vyhodnocení	44
7.9.1	Hodnocení grafů pro stanovení PT – R.....	45
7.9.2	Hodnocení grafů stanovení PT – INR u pacientů s kumarinovou léčbou 46	
7.9.3	Hodnocení grafů stanovení funkční aktivity faktorů II, V, VII a X.....	48
8.	DISKUSE	51
9.	ZÁVĚR.....	53
10.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	54
11.	SEZNAM TABULEK	57
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	57
13.	SEZNAM GRAFŮ	58
14.	POUŽITÁ LITERATURA	59
15.	PŘÍLOHY	66

2. ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce se zabývá zavedením nové reagensie k vyšetření protrombinového testu a stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů II, V, VII a X v koagulační laboratoři.

Teoretická část práce přináší přehled informací o hemostáze, jejím vývoji, složkách, mechanismech působení a způsobech regulace. Dále zde jsou popsány laboratorní testy, které se ke sledování hemostázy používají.

Praktická část je zaměřena na provedení srovnávací studie za účelem zavedení nové citlivější reagensie pro stanovení protrombinového testu a vyšetření funkční aktivity koagulačních faktorů II, V, VII a X.

Tato srovnávací studie porovnává výsledky naměřené novou reagensií STA NeoPTimal firmy Stago s výsledky naměřenými původní reagensií STA Neoplastin CI Plus v rámci vyšetření protrombinového testu a v rámci stanovení funkční aktivity faktorů II, V, VII a X. U protrombinového testu jsem navíc soubor patientských vzorků rozdělila na skupinu bez a skupinu s léčbou antagonisty vitamínu K. V první skupině jsem porovnávala poměr R, ve druhé hodnotu INR.

Naměřené výsledky jednotlivých metod jsem vyhodnotila metodou lineární regrese a vynesla je do korelačního grafu. Pro hodnoty PT – R a PT – INR jsem navíc vytvořila Bland – Altmanův graf. U všech metod bylo dosaženo hodnoty korelačního koeficientu vyšší než $r = 0,97$, což ukazuje na velice dobrou korelaci výsledků naměřených původní a novou reagensií. To potvrzují také rovnice přímků korelačních grafů u protrombinového testu a Bland – Altmanovy grafy.

Ze srovnávací studie vyplývá, že obě reagensie jsou velmi citlivé a měří se srovnatelnou přesností. Nová reagensie STA NeoPTimal tak bude minimálně stejně citlivá a přesná jako reagensie původní a nic tedy nebrání jejímu zavedení do běžného provozu.

Klíčová slova: hemostáza, faktory vnější cesty koagulace, protrombinový test

3. ABSTRACT

The presented bachelor thesis deals with the introduction of a new reagent for the examination of the prothrombin test and the determination of the functional activity of coagulation factors II, V, VII and X in the coagulation laboratory.

The theoretical part of the thesis provides an overview of information about hemostasis, its development, components, mechanisms of action and methods of regulation. Also laboratory tests that monitor hemostasis are described here.

The practical part is focused on performing a comparative study in order to introduce a new more sensitive reagent for the determination of the prothrombin test and to examine the functional activity of coagulation factors II, V, VII and X.

This comparative study compares the results measured with the new STA NeoPTimal reagent from Stago with the results measured with the original STA Neoplastin CI Plus reagent in a prothrombin test and in the determination of the functional activity of factors II, V, VII and X. In the prothrombin test, I divided the group of patient samples into a group without and a group with vitamin K antagonist treatment. In the first group I compared the R ratio, in the second the INR value.

I evaluated the measured results of individual methods by the method of linear regression and plotted them in a correlation graph. In addition, I created a Bland – Altman graph for the PT – R and PT – INR values. For all methods, a value of correlation coefficient higher than $r = 0.97$ was achieved, which indicates a very good correlation of the results measured by the original and the new reagent. This is also confirmed by the equations of the lines of the correlation graphs in the prothrombin test and by the Bland – Altman graphs.

The comparative study shows that both reagents are very sensitive and measured with comparable accuracy. The new STA NeoPTimal reagent will be at least as sensitive and accurate as the original reagent, and nothing prevents its introduction into normal operation.

Key words: hemostasis, external coagulation pathway factors, prothrombin test

4. ÚVOD

Hemostáza, proces srážení krve, je soubor na sebe navazujících reakcí, které vedou k zástavě krvácení v případě poranění cévy. Jedná se o složitý děj, na kterém se podílí řada složek. Porušení hemostatické rovnováhy může vést ke krvácení nebo naopak k trombotickým komplikacím.

Pro sledování stavu hemostázy a monitorování antikoagulační léčby se využívá laboratorní testování. K dispozici máme celou řadu testů – globální, skupinové a specifické. Přestože mají specifické testy největší výpovědní hodnotu, díky své dostupnosti, ceně a krátké době odezvy jsou stále nepoužívanější testy skupinové. Vůbec nejčastějším koagulačním vyšetřením je i v dnešní době protrombinový test, který popisuje tzv. vnější koagulační cestu, zároveň ho lze použít i pro sledování kumarinové antikoagulační léčby. K laboratornímu vyšetření protrombinového testu se dnes používají komerční reagentie s CE značkou, kterých je na trhu velké množství.

V případě, že laboratoř z jakéhokoli důvodu zavádí do provozu novou reagentii, musí nejprve provést srovnávací studii. Tato studie, kdy se soubor pacientů měří současně reagentií původní a novou, má zajistit srovnatelnost výsledků, která je důležitá zejména pro kontinuální sledování stavu pacientů. Rovněž slouží k ověření, že test s novou reagentií bude vydávat správné a přesné výsledky.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na zavedení nové reagentie k vyšetření protrombinového testu a stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů II, V, VII a X v koagulační laboratoři.

5. ZADÁNÍ– CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části mé bakalářské práce je shrnout základní informace o hemostáze, jejím vývoji v organismu člověka, o jednotlivých složkách hemostázy a dějích, které během srážení krve probíhají. Dále pak popis laboratorních testů, které se ke sledování hemostázy používají.

Cílem praktické části je zavést novou citlivější reagentii pro stanovení protrombinového testu a vyšetření funkční aktivity koagulačních faktorů vnější cesty do laboratorní praxe. Za tímto účelem byla provedena srovnávací studie, jejímž cílem bylo porovnat výsledky protrombinového testu a stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů II, V, VII a X naměřené pomocí původní reagentie STA Neoplastin CI Plus firmy Stago a současně pomocí nové citlivější reagentie STA NeoPTimal firmy Stago. Naměřená data statisticky vyhodnotit a potvrdit jejich vzájemnou korelaci.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Hemostáza

Hemostáza je důležitá schopnost organismu zpomalit a zastavit krvácení v místě narušení cévní stěny a zároveň schopnost udržet krev v tekutém stavu v neporušeném cévním řečišti. Jedná se o složitý a komplikovaný mechanismus spojený s vysokým počtem pozitivních a negativních zpětných vazeb, který udržuje rovnováhu mezi zvýšenou srážlivostí a sklonem ke krvácení. (4)

Aby mohl živý organismus existovat, je pro něj zcela nezbytné, aby byl zachován krevní oběh, a tudíž neporušené cévní řečiště. Jestliže dojde k porušení cévní výstelky, začne působit hemostatický mechanismus, který přemění tekutou krev na krevní sraženinu a ta cévu uzavře. (1)

Mechanismy hemostázy se rozlišují podle toho, zda hemostáza probíhá v artériích nebo vénách. U artérií je důležitá okamžitá interakce koagulačních faktorů s trombocyty při tvorbě zátky. Ve vénách je naopak důležitá okamžitá interakce inhibitorů plazmatických koagulačních faktorů, které zabraňují růstu krevní sraženiny a její uvolnění nebo blokaci krevního řečiště. (1)

6.1.1 Vývoj hemostázy

Hemostáza se v průběhu života jedince mění. Popisujeme hemostázu fetální a neonatální, dětského věku a pozdního věku.

6.1.1.1 Fetální a neonatální hemostáza

Jedná se o první stádia hemostázy objevující se ve vývojovém stádiu plodu a po narození. Hemostáza je nevyzrálá a s velmi malou rezervou při odpovědi na různé podněty. Koagulační proteiny neprocházejí bariérou placenty. Syntéza koagulačních proteinů začíná u plodu kolem 10. týdne vývoje a jejich koncentrace se s postupujícím těhotenstvím zvyšuje. Po narození jsou hodnoty koagulačních faktorů na polovině až třičtvrtě hodnot dospělých. Koagulační testy protrombinový test (PT) a aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT) jsou prodloužené, dobu krvácení u novorozence můžeme srovnat s hodnotami u dospělých. (1)

6.1.1.2 Hemostáza dětského věku

V dětském věku se jednotlivé parametry hemostázy blíží hodnotám v dospělosti. U dětí se vyskytuje velmi málo trombóz a tromboembolických příhod. Přes veškeré rozdíly mezi hemostázou v dětském a dospělém věku je zachována hemostatická rovnováha, která není úplně stabilní a má velmi nízkou rezervní kapacitu. Rozkolísání rovnováhy může vést k závažným komplikacím, zejména ke krvácivým stavům. (1)

6.1.1.3 Hemostáza pozdního věku

U lidí starších 50 let se výrazně zvyšuje koncentrace faktorů jako je fibrinogen, VIII, IX, VIIa. Naopak u faktorů II, X či u antitrombinu dochází ke snížení jejich koncentrací. Dále se významně zvyšují koncentrace molekulárních markerů aktivity koagulace a fibrinolýzy, např. D-Dimerů. U lidí ve věku 51–69 let se jedná o 25 % nárůst a u lidí nad 90 let se jedná o nárůst více jak 200 %. U starších osob se proto častěji setkáváme s trombotickými komplikacemi, i když ani krvácivé komplikace nejsou výjimkou. (1)

6.1.2 Složky hemostázy

Správné fungování hemostázy nám zajišťuje optimální souhra mezi endoteliální bariérou, trombocyty, aktivačními a inhibičními faktory koagulačního systému a fibrinolytickým systémem. U těchto systémů hrají velmi důležitou roli krevní elementy i látky, které můžeme v krvi a na povrchu vnitřní strany cévy nalézt, tj. erytrocyty, leukocyty, lipidy, bílkoviny, minerály a další. (1; 3)

6.1.2.1 Cévní stěna

Cévní stěna je tvořena třemi vrstvami – intimou, médií a adventicií. Intima je tvořena jednou vrstvou endoteliálních buněk, proto je také nazývána jako endotel. Média a adventicia poté společně tvoří subendotel. (3)

6.1.2.1.1 Endotel

Jednovrstevná výstelka tvořena endoteliemi a ta část cévy, která přichází do kontaktu s krví. Jeho hlavní vlastností je, že je dokonale nesmáčivý a antitrombotický. Tvoří ochranou bariéru mezi krví a okolními tkáněmi. Na povrchu endotelií je velké

množství receptorů, které hrají významnou roli pro hemostázu. Jedná se například o trombomodulin, receptor pro protein S a fibronectin. Probíhá zde syntéza řady látek ovlivňujících hemostázu i jiných systémů organismu. (1; 3; 4; 9)

6.1.2.1.2 Subendotel

Fyziologicky se subendotel do kontaktu s krví nedostává. Pokud dojde ke kontaktu s krví po poranění cévy, je velmi trombogenní a ihned aktivuje všechny systémy homeostázy. Nejdůležitějšími složkami v subendotelu jsou kolagen a tkáňový faktor (TF), které hrají významnou roli během hemostázy. (3)

6.1.2.1.3 Vazokonstrikce a vazodilatace

Vazokonstrikce neboli zúžení cévy je důležitou vlastností, kdy je céva schopná zmenšit svůj průsvit, a tím v místě poranění snížit průtok krve. Vyvolaná je drážděním hladkém svaloviny. Na vazokonstrikci se podílí např. tromboxan A₂ (TXA₂) nebo serotonin. Vazodilatace neboli rozšíření cévy nastává několik minut po vazokonstrikci a zajišťuje rychlé odplavení hemostaticky aktivních látek, dále udržuje srážecí proces pouze v místě poranění. Vazodilataci způsobuje NO (oxid dusnatý), který se při poranění uvolňuje z endotelu. (4; 10; 12)

6.1.2.1.4 Integriny

Integriny jsou adhezivní povrchové transmembránové receptory přítomné na povrchu buněk. Zprostředkovávají vazby mezi buňkami navzájem a mezi buňkami a adhezivními proteiny. Na trombocytech je označujeme jako glykoproteiny (GP). (4)

6.1.2.2 Složka tkáňová

Při poranění se z tkáně a okolních buněk začne uvolňovat adenosindifosfát (ADP), který vyvolá primární agregaci trombocytů a tkáňový faktor, který aktivuje koagulační kaskádu tím, že vytvoří komplex vnější tenázy spolu s faktorem VIIa. (1)

6.1.2.3 Trombocyty

Trombocyty neboli krevní destičky jsou nejmenší elementy v krvi okrouhlého až diskoidního tvaru, jsou bezjaderné a granulární. Vznikají ze zralých megakaryocytů, které se vyvíjí v megakaryocytární řadě v kostní dřeni. Destičky přežívají v obvodové

krvi 7-10 dní. Staré či poškozené destičky jsou vychytávány makrofágo – histiocytárním systémem ve slezině, játrech a kostní dřeni.

Vlastní destičková membrána je tvořena fosfolipidovou dvojrůstvou, která je důležitá pro plazmatický koagulační systém, vytvářejí se na ní koagulačně aktivní komplexy. Na membráně krevních destiček se nachází řada glykoproteinů, receptorů a antigenů.

Trombocyty mají dva membránové systémy. Otevřený kanálkový systém, který transportuje obsah α -granulí na povrch destičky a denzní tubulární systém, který slouží jako zásobárna Ca^{2+} iontů a místo syntézy enzymů metabolismu prostaglandinů.

Důležitou součástí destiček jsou specifická granula – α -granula, denzní granula, lysozomy a peroxisomy. Látky v nich obsažené hrají významnou roli v hemostáze.

Destičkový cytoskelet je složen ze tří typů polymerů – mikrotubulů, mikrofilament a středních filament. Jsou tvořeny proteiny aktinem, profilinem a myozinem. V hemostáze jsou důležité pro kontraktální funkci destiček (retrakci), tedy smrštění trombu a uvolnění obsahu granulí destiček. Dále udržují tvar destiček v aktivním i neaktivním stavu. (2; 3; 4; 9; 10; 12)

6.1.2.3.1 Funkce trombocytů

Trombocyty zprostředkovávají velké množství interakcí mezi krví a cévní stěnou, účastní se primární hemostázy a tvorby primární zátky. Dále poskytují svůj fosfolipidový povrch pro navázání koagulačních faktorů závislých na vitaminu K. Vazba je vytvářena přes vápenaté můstky. Dále krevní destičky specificky vážou koagulační faktory VIII a V a mají schopnost přímo aktivovat faktory XII a XI. (1; 12)

6.1.2.4 Další důležité složky

Pro správnou funkci hemostázy je velmi důležitý systém plazmatických koagulačních faktorů, systém přirozených inhibitorů hemostázy a složky fibrinolýzy. Společně tvoří soubor plazmatických složek hemostázy a budou blíže pospány v následujících kapitolách.

6.1.3 Mechanismy hemostázy

V této podkapitole jsou rozebrány jednotlivé mechanismy hemostázy. Jedná se o primární hemostázu, plazmatický koagulační systém, fibrinolýzu a systém přirozených inhibitorů hemostázy.

6.1.3.1 Primární hemostáza

Jedná se o proces tvorby primární destičkové zátky, které říkáme agregát nebo destičkový trombus. Agregát trombocytů se tvoří v místě porušení cévní stěny a slouží k zástavě krvácení a znovuobnovení celistvosti cévy. (1; 3)

Neaktivované cirkulující trombocyty jsou velmi citlivé na změny okolního prostředí, na které reagují třemi druhy odpovědí, jedná se o adhezi, změnu tvaru destičky a agregaci, tzv. aktivaci. Jakmile dojde k poškození endotelové vrstvy cévy, dojde k vyplavení látek vyvolávající primární hemostázu. (1; 3; 4)

6.1.3.1.1 Adheze trombocytů

Adheze je prvním krokem při tvorbě primární hemostatické zátky. Trombocyty se pomocí svých glykoproteinových receptorů GP Ia/IIa/IIb a GP Ib/V/IX přichytí na obnažená kolagenová vlákna subendotelu vazbou zprostředkovanou pomocí tzv. adhezivních proteinů, mezi které patří např. von Willebrandův faktor (vWF) nebo fibronectin. Po účinné adhezi destičky se spustí kaskáda biochemických a metabolických pochodů – aktivace trombocytů. (1; 2; 3; 4; 6; 12; 14; 23)

6.1.3.1.2 Aktivace trombocytů

Při aktivaci trombocyt mění tvar na kulovitý a začne vytvářet pseudopodie (výběžky). Další výraznou změnou je přesun granulí do středu destičky, ke změně koncentrace nitrobuňčného vápníku. Během aktivace destičky se mění její povrchové vlastnosti. Dochází k tzv. flip – flop reakci neboli transmembránovému přesunu fosfolipidů v membráně trombocytů. Fosfolipidy na zevní straně se přetočí dovnitř a fosfolipidy na vnitřní straně se přetočí ven. Na povrchu destiček se tak vytvoří negativně nabitý povrch, který je velmi důležitý pro průběh následujících koagulačních reakcí. Během aktivace trombocytu dochází k uvolnění řady látek, zejména destičkového růstového faktoru (PDGF), destičkového faktoru 4 (PF4), β -tromboglobulinu (β TG) a fibrinogenu ze sekrečních granulí. Následně se aktivují a

obnaží receptory GP IIb/IIIa na povrchu destičky. Po aktivaci trombocytu se začnou vylučovat do okolí ADP a tromboxan A₂ (TXA₂), které stimulují a podporují agregaci dalších destiček. (1; 2; 3; 4; 6; 12; 14; 23)

6.1.3.1.3 Agregace trombocytů

Agregace je proces, při kterém dochází ke vzájemnému pospojování trombocytů s cílem vytvořit nerozpustný trombus. Trombocyty se navzájem pospojují prostřednictvím molekul fibrinogenu (případně vWF), které nám vytvoří můstky mezi GP IIb/IIIa sousedních destiček. Nejprve probíhá primární vratná agregace, která je vyvolána působením ADP vyplaveného z porušených tkání a buněk. Následně se vyplaví ADP a trombospondin z granulí destiček a vytvoří stabilizační můstky mezi destičkami. Jedná se o agregaci sekundární, nevratnou. (1; 2; 3; 4; 6; 12; 23)

6.1.3.1.4 Degranulace

Degranulace neboli uvolňovací reakce souvisí s vyplavením látek z granulí destiček, např. TXA₂, ADP, Ca²⁺, čímž se posilují všechny fáze primární hemostázy. (12)

6.1.3.1.5 Retrakce

Jedná se o poslední krok primární hemostázy, kdy dojde ke smrštění kontraktálního aparátu krevní destičky. Tím dojde ke smrštění trombu, stažení rány a obnovení průchodnosti poraněné cévy uzavřené primární hemostatickou zátkou. (1; 2; 3; 4)

6.1.3.1.6 Adhezivní proteiny

Mezi nejdůležitější adhezivní proteiny řadíme vWF, fibronectin a trombospondin.

Von Willebrandův faktor (vWF)

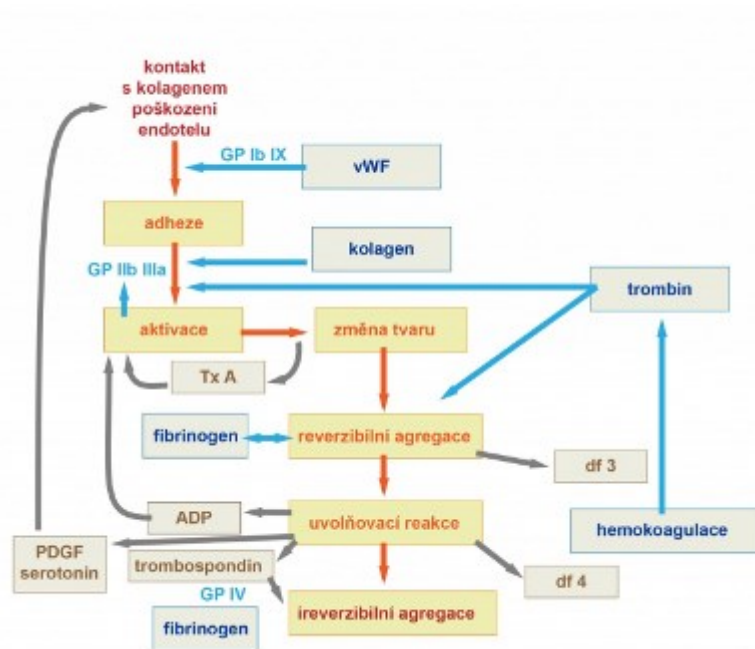
Adhezivní protein trombocytů přítomný v α -granulích, plazmě i subendotelu. V primární hemostáze spojuje destičky s cévní stěnou i destičky mezi sebou. Váže se k subendotelu, zejména na kolagen, dále je schopen vázat heparin, sulfatidy a GP IIb/IIIa. V koagulaci váže a stabilizuje faktor VIII a působí jako jeho nosič. (4; 12)

Fibronectin

Adhezivní protein, který nese specifická místa pro vazbu na krevní destičku, kolagen, fibrin a glykosaminoglykany. Zprostředkovává adhezi trombocytů ke kolagenu a jejich rozptření v klidovém stavu i během cirkulace. (1; 4)

Trombospondin

Jedná se o adhezivní protein, který je uvolňován z α -granulí aktivovaných trombocytů. Je důležitý pro správně fungující agregaci destiček, stabilizuje a zesiluje krevní zátku. (1; 4)



Obrázek 1 – Role trombocytů v hemostáze (vWF – von Willebrandův faktor, GP – glykoproteiny, TxA – tromboxan A, DF 3 – destičkový faktor 3, DF 4 – destičkový faktor 4 (PF4), PDGF – destičkový růstový faktor) (Zdroj: 12, podkapitola Trombocyty a Hemostáza)

6.1.3.2 Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém je soubor dějů vedoucí k vzniku nerozpustného fibrinu. Tyto děje vyvolávají postupnou přeměnu rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin a jeho pevnější polymery, které se pomocí kovalentní vazby spojují do fibrinové sítě. Do té jsou zachycovány krevní elementy a vytváří se tak stabilní fibrinová zátka, červený trombus. (1; 3; 4; 12)

6.1.3.2.1 Plazmatický koagulační systém

Jedná se o systém koagulačních faktorů, které se nacházejí v krevním oběhu v neaktivní formě a k jejich aktivaci dochází až po porušení endotelu. Jsou to zpravidla glykoproteiny, které se syntetizují v játrech a k jejich aktivaci dochází limitovanou proteolýzou. Cílem tohoto systému je vytvořit stabilní fibrinovou sraženinu (koagulum). (1; 3; 4)

Z biochemické hlediska je můžeme rozdělit na:

a) Proenzymy (Zymogeny)

Jsou to neaktivní formy enzymů, které kolují v krvi. Aby se staly aktivní, musí u nich dojít k proteolytickému štěpení za vzniku aktivní serinové proteázy. Mezi zymogeny patří serinové proteázy a transglutaminázy. Serinové proteázy mají v aktivním místě uloženy aminokyseliny s postranními řetězci, které zajišťují reakci se substrátem. Do serinových proteáz patří plazmatické faktory: II, VII, IX, X, XI, XII, prekalikrein, faktory fibrinolýzy: plazminogen, aktivátory plazminogenu (t-PA, u-PA), serpiny a protein C. Faktory II, VII, IX, X, protein C a protein S jsou strukturně velmi podobné. Jejich bílkovinný řetězec je zakončen glutamovou kyselinou, která obsahuje tzv. γ karboxyglutamové zakončení, které je velmi důležité pro správné plnění funkce faktorů a navázání Ca^{2+} iontů. Jedná se o tzv. vitamin K dependentní faktory a k jejich syntéze a správné funkci je tedy nezbytná přítomnost vitamínu K. Právě v přítomnosti vitamínu K je γ karboxyglutamové zakončení karboxylováno enzymem γ glukarboxylázou a vznikají aktivní faktory. V případě nedostatku vitamínu K vznikají méně aktivní faktory označované jako PIVKA. (1; 3; 4; 11)

b) Kofaktory

Kofaktory jsou látky, které napomáhají natočit a udržet proenzym v katalytickém místě serinové proteázy a urychlují tak enzymatické reakce. Kofaktory musí být aktivovány. Výjimkou je tkáňový faktor, který aktivaci nepotřebuje, protože je vázán do buněčné membrány. Dalšími kofaktory jsou plazmatické faktory V, VIII, HMWK a protein S. Při aktivaci dochází k proteolytickému štěpení a následnému spojení fragmentů přes Ca^{2+} ionty. Kofaktory V a VIII jsou inaktivovány pomocí proteinu C. (1;3;4;15)

6.1.3.2.2 Popis, struktura a funkce plazmatických koagulačních faktorů

Koagulační faktory značíme římskými číslicemi nebo názvy, které často souvisí se jmény pacientů, u kterých byl defekt faktoru poprvé objeven. Římská čísla byla faktorům přidělována podle toho, v jakém pořadí byly faktory objeveny. K označení aktivované formy se používá index a. (1; 12)

Faktor I = Fibrinogen

Fibrinogen je glykoprotein přítomný v plazmě a v granulích trombocytů. Je syntetizovaný v játrech. Pro udržení struktury fibrinogenu je velmi důležitá přítomnost Ca^{2+} iontů. Fibrinogen je substrátem pro trombin, který ho přeměňuje na fibrin. Fibrinogen se váže na destičkový GP IIb/IIIa, a tím podporuje agregaci trombocytů. Také má funkci jako protein akutní fáze, kdy se jeho hladina zvyšuje při zátěži, zraněních, zánětech a v těhotenství. (1; 3; 4)

Faktor II = Protrombin

Protrombin patří mezi serinové proteázy a faktory závislé na přítomnosti vitamínu K. Vzniká v játrech. Za pomoci enzymu protrombinázy, která je tvořena komplexem aktivovaných faktorů Va a Xa, vápenatými ionty a fosfolipidy (PI) ($\text{Va.Xa.Ca}^{2+}.\text{PI}$), se protrombin (FII) štěpí na trombin (FIIa). Dalšími funkcemi trombinu je aktivace kofaktorů V a VIII, aktivace faktorů XI a XIII, aktivace trombocytů, formuje fibrin, reguluje zánět a další. Pokud se trombin naváže na trombomodulin, aktivuje protein C či inhibitor fibrinolýzy aktivovaný trombinem (TAFI). Protrombin se vyšetřuje jako faktor tzv. vnější cesty koagulace a jeho stanovením se proto budeme zabývat v praktické části této práce. (1; 3; 4; 41)

Tkáňový faktor (TF)

Tkáňový faktor neboli tkáňový tromboplastin je membránový protein, který není enzymaticky aktivní, a proto nemusí být aktivován. V největším množství se nachází na buňkách subendotelu, které nepřicházejí do kontaktu s krví. Po porušení cévy a jeho odhalení na fibroblastech a svalových buňkách dojde k okamžité aktivaci hemostázy. Malé množství TF se nachází také volně v cirkulující krvi a jeho významným zdrojem pro hemostázu jsou monocyty. Zvýšená hladina TF v krvi může být způsobena nádorovými nebo leukemickými buňkami. Tkáňový faktor působí jako receptor. Váže se s FVIIa do komplexu na fosfolipidovém povrchu za přítomnosti Ca^{2+} iontů a společně tak vytváří komplex vnější tenázy ($\text{VIIa.TF.Ca}^{2+}.\text{PI}$). Vnější tenáza vyvolává

aktivaci FX na FXa. Dále dokáže aktivovat koagulační faktor IX. K inhibici TF v komplexu s FVIIa dochází pomocí inhibitoru tkáňového faktoru (TFPI) a antitrombinem (AT). Tkáňový tromboplastin je hlavní reagent pro protrombinový test (PT), kterým se budeme zabývat v praktické části. Získáváme ho extrakcí z tkání s velkým obsahem TF, např. králičí nebo hovězí mozek, lidská placenta. (1; 3; 4; 18)

Faktor IV = Ca²⁺ ionty

Vápenaté ionty zprostředkovávají připojení γ karboxylových skupin na fosfolipidy u vitamin K dependentních faktorů. Jsou důležité pro vznik koagulačně aktivních komplexů: vnitřní tenázy (VIIIa.IXa.Ca²⁺.PI), vnější tenázy (VIIa.TF.Ca²⁺.PI), protrombinázy (Va.Xa.Ca²⁺.PI) a pro vznik některých komplexů inhibitorů. (1; 3; 4)

Faktor V = Proakcelerin

Proakcelerin patří mezi plazmatické kofaktory. Je syntetizován v játrech a megakaryocytech. Je aktivován trombinem nebo FXa. FV je součástí protrombinázy (Va.Xa.Ca²⁺.PI), kde významně urychluje přeměnu protrombinu na trombin. Inhibice FVa probíhá pomocí aktivovaného proteinu C. Proakcelerin se vyšetřuje jako faktor tzv. vnější cesty koagulace, proto se jeho stanovením budeme zabývat v praktické části. (1; 3; 4; 42)

Faktor VII = Prokonvertin

Prokonvertin patří mezi serinové proteázy a faktory závislé na vitaminu K. Je syntetizován v játrech a přítomen je v plazmě i v séru. Jeho zdrojem jsou hlavně aktivované monocyty nebo makrofágy. FVII je proteolyticky štěpen na FVIIa pomocí trombinu, FIXa, FXa nebo FXIa. Je součástí vnější tenázy (VIIa.TF.Ca²⁺.PI) a podílí se tedy na aktivaci FX na FXa. Inhibice volného FVIIa není možná, lze ho inhibovat pouze v komplexu s TF antitrombinem. Prokonvertin řadíme mezi faktory vnější cesty koagulace a jeho stanovením se budeme zabývat v praktické části. (1; 3; 4; 43)

Faktor VIII = Antihemofilický faktor A

FVIII patří mezi plazmatické kofaktory. V plazmě se nachází navázaný na vWF, který ho chrání před biologickým štěpením a vazbami na inhibitory. Z vazby na vWF je FVIII uvolňován po kontaktu s fosfolipidy nebo stimulací trombinem. Ten zároveň FVIII aktivuje. FVIIIa je součástí vnitřní tenázy (VIIIa.IXa.Ca²⁺.PI) a podílí se na

aktivaci FX na FXa. Zvýšená hladina FVIII je v případě stresu, zánětů a chronických infekcí. Se sníženou hladinou FVIII se setkáváme u hemofilie A. (1; 3; 4)

Faktor IX = Christmas faktor

FIX patří mezi serinové proteázy a faktory závislé na přítomnosti vitamínu K. Syntetizuje se v játrech. Je aktivován pomocí FXIa nebo vnější tenázou (VIIa.TF.Ca²⁺.PI). FIXa je součástí vnitřní tenázy (VIIIa.IXa.Ca²⁺.PI) a podílí se na aktivaci FX na FXa. (1; 3; 4)

Faktor X = Stuart-Prower faktor

Faktor X je serinová proteáza a faktor závislý na vitamínu K. Syntetizuje se v játrech. Je aktivován pomocí vnitřní tenázy (VIIIa.IXa.Ca²⁺.PI) nebo vnější tenázy (VIIa.TF.Ca²⁺.PI) na FXa. FXa je součástí protrombinázy (Va.Xa.Ca²⁺.PI) a vyvolává přeměnu protrombinu na trombin. FXa je nejúčinnějším aktivátorem FV a FVII, kdy reakce je urychlena v případě, že je FVII navázán na TF. Inhibice FXa je pomocí TFPI nebo AT. Faktor X patří do skupiny faktorů vnější cesty hemokoagulace a jeho stanovením se budeme zabývat v praktické části. (1; 3; 4; 44)

Faktor XI = Rosenthalův faktor

Faktor XI je serinové proteáza. Silně adhezuje k negativně nabitým povrchům a zároveň je vyvazován na povrchu trombocytů. Na aktivaci FXI se podílí FXIIa, HMWK a negativně nabitý povrch. FXIa se podílí na aktivaci FIX na FIXa. (1; 3; 4)

Faktor XII = Hagemanův faktor

Hagemanův faktor je serinová proteáza syntetizovaná v játrech. K aktivaci FXII dochází po kontaktu s prekalikreinem, HMWK a negativně nabitými povrchy, ke kterým silně adhezuje. Účastní se aktivace FXI na FXIa. Inhibitorem FXIIa může být C1-inhibitor, α_2 – antiplasmin, α_2 – makroglobulin nebo antitrombin. (1; 3; 4)

Faktor XIII = faktor stabilizující fibrin

Jedná se o zymogenní formu koagulačního faktoru a zároveň poslední faktor koagulační kaskády. Je aktivován trombinem společně s polymerním fibrinem. Funkcí FXIIIa je, že stabilizuje fibrinovou sraženinu pospojováním polymerů fibrinu, čímž nám vznikne stabilní zesíťovaný fibrin. (1; 3; 4)

Prekalikrein

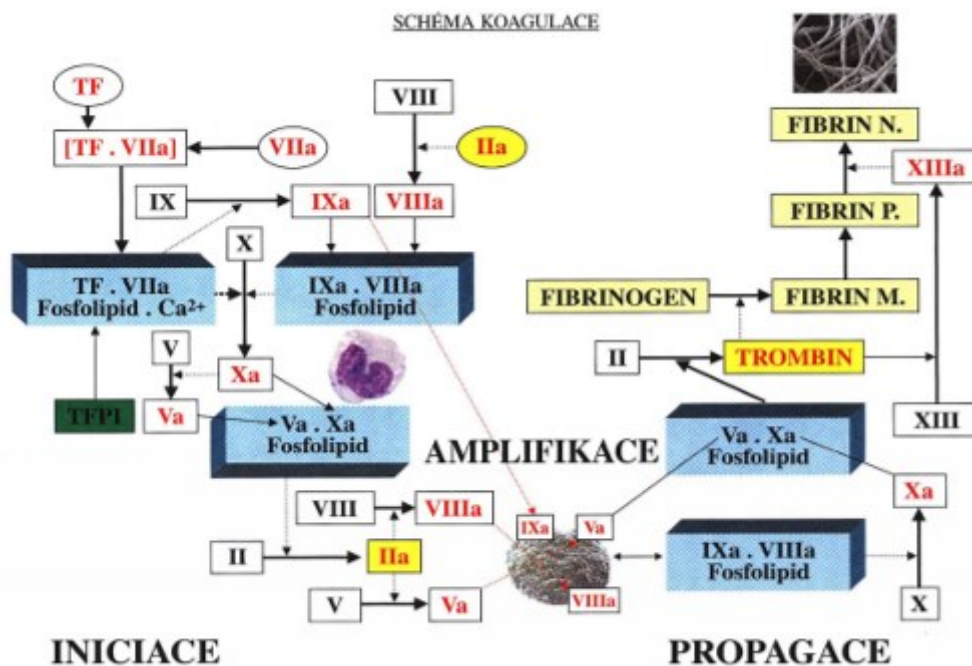
Prekalikrein je syntetizovaný v slinivce břišní a játrech, v plazmě je vázaný na HMWK. Aktivace prekalikreinu na α -kalikrein probíhá pomocí FXIIa. Funkcí α -kalikreinu je poté aktivace FXII a uvolňování kininů z kininogenů. (1; 3; 4)

Vysokomolekulární kininogen (HMWK)

Kininogeny patří mezi plazmatické proteiny. Jsou syntetizovány hlavně v játrech. Z kininogenů, vlivem působení prekalikreinu, vznikají kininy. Ty se podílí na snižování propustnosti cév, navozují bolestivé pocity a vyvolávají kontrakce hladké svaloviny. HMWK funguje jako kofaktor při aktivaci FXII kalikreinem. (1; 3; 4)

6.1.3.2.3 Aktivace koagulačního systému

Cílem koagulačního systému je vytvořit pevná vlákna fibrinu a zpevnit tak primární destičkovou zátku. Celý proces koagulace je postupná, přesně koordinovaná a regulovaná, kaskádovitá, enzymová reakce. Aktivaci koagulačního systému nejlépe vystihuje třístupňový model, který dělí koagulační proces do tří fází – iniciační, amplifikační a propagační. (1; 3; 4; 12)



Obrázek 2 – Schéma koagulačních dějů – Třístupňový model koagulace (Ca^{2+} – vápenaté ionty, TF – tkáňový faktor, TFPI – inhibitor tkáňového faktoru,) (Zdoj: 1, převzato ze strany 82)

Iniciační fáze

Iniciační fáze je první fází modelu. Probíhá na povrchu aktivovaných monocytů exprimujících tkáňový faktor. K aktivaci monocytů dochází z celé řady příčin, jako je zánět, metabolický rozvrat nebo třeba sepse. TF startuje proces koagulace tím, že se naváže do komplexu tis faktor VIIa za vzniku dimeru (TF.VIIa). Současně při vzniku dimerního komplexu dochází k přenosu aktivačního signálu do buňky. V buňce se začne zvyšovat koncentrace nitrobuněčného vápníku, dojde k aktivaci kinázy C a dalších adhezivních kináz. V důsledku změn v buňce vzniká tetramerní komplex vnější tenázy (VIIa.TF.Ca²⁺.PI) a podněcuje se další uvolňování TF. K účinné hemostáze je potřeba, aby aktivované monocyty adherovaly na povrch endotelu, a tím se zvýšilo vylučování TF. Systém vnější tenázy aktivuje FX na FXa, který se na membráně aktivovaných monocytů váže do komplexu protrombinázy (Va.Xa.Ca²⁺.PI). V této formě je následně vytvořeno malé množství trombinu, které stačí pro aktivaci FV, FVIII, FXI a krevních destiček nahromaděných v místě poranění cévy. Společně při vzniku komplexu (TF.VIIa) dochází i k aktivaci TFPI, který blokuje tuto cestu aktivace. Iniciační fáze převážně odpovídá tzv. vnější cestě koagulace, kterou popisovaly starší modely. FXa vznikající vnější cestou je pouze v malém množství, které je nedostatečné pro celý průběh hemostázy. Proto přicházejí na řadu další fáze koagulačního systému, amplifikační a propagační. Laboratorní stanovení vnější cesty koagulace a aktivity faktorů této cesty jsou hlavní náplní praktické části. (1; 12)

Amplifikační fáze

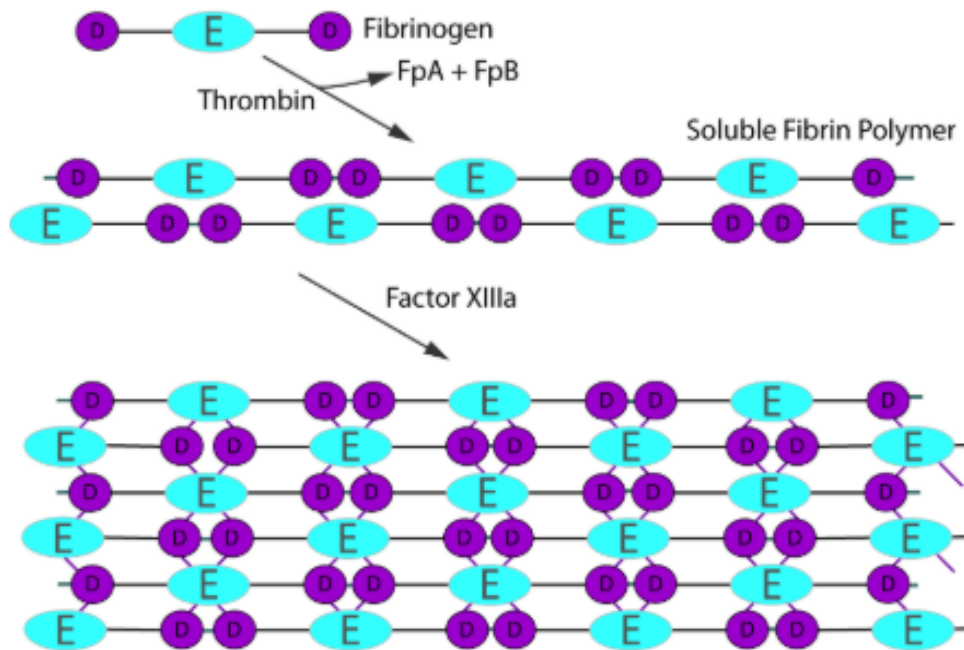
V této fázi se na povrch aktivovaných trombocytů vyvazují faktory, které se aktivovaly malým množstvím trombinu, vytvořeným během iniciační fáze. Aktivované formy FVa, FVIIIa, FXIa a FIXa se s vysokou účinností vážou na negativně nabitou fosfolipidovou dvojvrstvu aktivovaných trombocytů. Výsledkem amplifikační fáze je zesílení a zrychlení celého koagulačního procesu (1; 12; 19)

Propagační fáze

Při propagační fázi hraje důležitou roli vnitřní tenáza (VIIIa.IXa.Ca²⁺.PI), která vyvolá přeměnu FX na FXa, a protrombináza (Va.Xa.Ca²⁺.PI). Oba komplexy se vyvazují na povrchu aktivovaných trombocytů a díky nim vzniká dostatečné množství trombinu na přeměnu fibrinogenu na fibrin a tvorbu pevné a stabilní fibrinové hemostatické zátky. (1; 12)

Přeměna fibrinogenu na fibrin

Molekula fibrinogenu se skládá ze tří domén: dvě D domény na periferní části molekuly a doména E, která tvoří centrální část molekuly. Fibrinogen je štěpen na fibrinové monomery trombinem. Jako první se z molekuly fibrinogenu odštěpí fibrinopeptid A a následně fibrinopeptid B vyskytující se na doméně E. Po odštěpení fibrinopeptidů zůstanou pouze fibrinové monomery, které polymerují a mění se na rozpustné fibrin-polymery. Síť tvořená polymery není dostatečně odolná vůči toku krve, a proto musí dojít k jejímu zpevnění a stabilizaci. Toho je docíleno pomocí FXIIIa s vápenatými ionty. Mezi polymery vznikají příčné kovalentní vazby, které jsou postupně vyztužovány a zvětšovány, čímž se koagulum zpevňuje a vzniká tak stabilní fibrinová zátka. (1; 3; 4; 10; 11; 12; 16; 17)



Obrázek 3 – Přeměna fibrinogenu na fibrin – (FpA – Fibrinopeptid A, FpB – fibrinopeptid B, Soluble fibrin polymer – rozpustné fibrin - polymery, D – D doména, E – E doména) (Zdroj: 13, převzato)

6.1.3.3 Fibrinolytický systém

Fibrinolytický systém je aktivován společně s poslední částí hemokoagulace, tedy tvorbou fibrinu. Průběh fibrinolýzy probíhá oproti ostatním reakcím hemostázy s časovou prodlevou, aby měla rána dost času se zahojit. Fibrinolýza je odpovědná za

lýzu fibrinové sraženiny a za znovu zprůchodnění cévy a toku krve. Jedná se o poslední část hemostázy, je fyziologická, regulovaná a kontrolovaná. Rozpuštění koagula zajišťuje enzym plazmin, který vzniká z neaktivního zymogenu plazminogenu. (1; 3; 4; 12)

6.1.3.3.1 Plazminogen, plazmin

Plazminogen je jednořetězcový glykoprotein. Syntetizuje se hlavně v játrech, ale i v ledvinách. Plazminogen na membránách vytváří vazebná místa pro jeho aktivátory. Plazmin vzniká štěpením plazminogenu pomocí aktivátorů plazminogenu. Jeho funkcí je štěpení fibrinu, fibrinogenu, FII, FV, FVIII, GP Ib, GP IIb/IIIa, vWF a trombospodinu. Má nízkou specifitu, proto štěpí i látky, které štěpit nepotřebujeme. Stimuluje aktivaci FVII a FXII, agregaci trombocytů a aktivaci částí komplementu. Plazmin vzniká přímo na povrchu fibrinové sraženiny v komplexu /plazminogen.tPA.fibrin/. Ze systému je plazmin vyvazován vlivem působení inhibitorů plazminu a vychytáván monocyty – makrofágovým systémem. (1; 3; 4)

6.1.3.3.2 Aktivátory plazminogenu

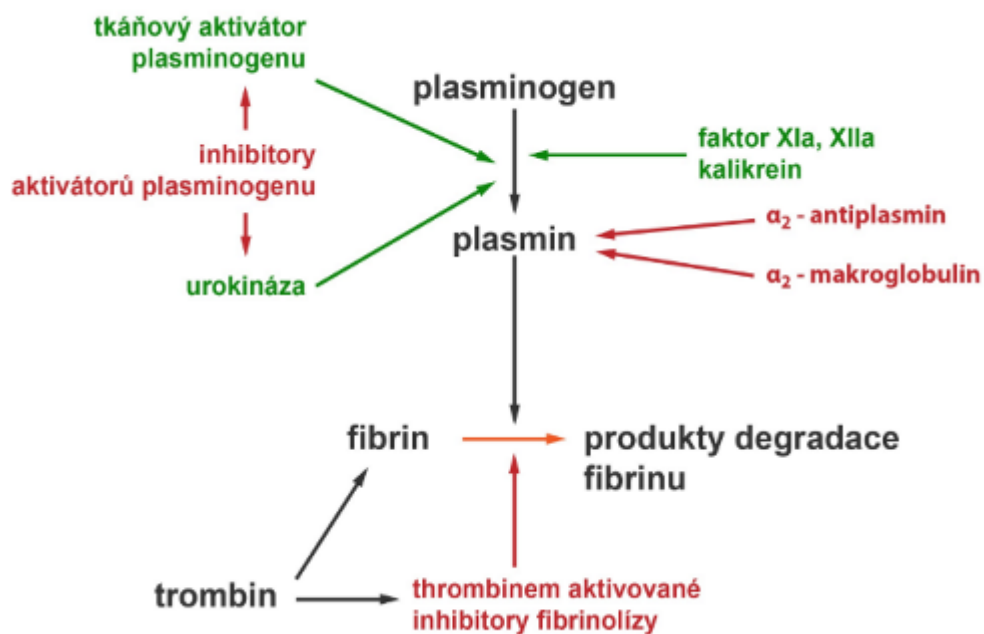
Aktivátory dělíme na vnitřní a vnější. Mezi vnější aktivátory plazminogenu patří tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA) a urokinázový aktivátor plazminogenu (uPA). tPA patří mezi serinové proteázy. Je syntetizován v endotelu, monocitech a megakaryocytech. tPA se váže na fibrin, a tím urychluje přeměnu plazminogenu na plazmin. uPA je produkován hlavně endotelovými buňkami. Nejdůležitější funkcí uPA je štěpení extracelulární matrix v tkáních, čímž umožňuje migraci buněk. To je důležité pro hojení ran, zánětů, embryogenezi a další procesy v organismu. Vnitřní aktivátory najdeme v plazmě a patří sem HMWK, prekalikrein, FXII, trypsin a trombin. (1; 3; 4; 12)

6.1.3.3.3 Inhibitory fibrinolýzy

Mezi hlavní inhibitory fibrinolýzy řadíme α_2 – antiplazmin (α_2 AP), který inhibuje plazmin, inhibitory aktivátorů plazminogenu (PAI) a trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI). Další jsou inhibitory proteáz, např. α_2 – makroglubulin. (1; 3; 4; 12)

6.1.3.3.4 Průběh fibrinolýzy

Plazminogen se společně s tPA naváže na fibrin sraženiny a vznikne komplex /plazminogen.tPA.fibrin/. Takto navázaný plazminogen je poté aktivován na plazmin. Plazmin štěpí fibrin a fibrinogen na tzv. fibrin/fibrinogen degradační produkty (FDP). Štěpení probíhá dvěma způsoby. Při prvním dochází ke štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu za vzniku vysokomolekulárních fragmentů X a Y, které vyvazují monomery fibrinu a zamezují tak vzniku fibrinové sítě. Fragmenty X a Y se dále rozkládají na fragmenty E a D, které jsou odbourány v monocyto – makrofágovém systému. V druhém případě se štěpí nerozpustný fibrin. Opět vznikají fragmenty X a Y, které mají ale mezi sebou příčnou kovalentní vazbu a nemůžou se tak od sebe oddělit. Konečným produktem z těchto fragmentů jsou tzv. D-Dimery, které jsou odolné vůči štěpení plazminem a v této formě se vyplavují do krve. Zvýšené množství D-Dimerů v krvi patří mezi markery trombogeneze. (1; 3; 4; 13)



Obrázek 4 – Průběh fibrinolýzy – (Zdroj: 12, podkapitola Fibrinolýza, převzato)

6.1.3.4 Systém přirozených inhibitorů

Jedná se o skupinu proteinů, které regulují a kontrolují aktivitu proteolytických enzymů podílejících se na všech částech hemostázy. Udržují tak rovnovážný stav

v organismu. Přírodní inhibitory, patří do skupiny základních regulačních plazmatických proteinů. (3; 4)

6.1.3.4.1 Antitrombin (AT)

Patří mezi inhibitory plazmatického koagulačního systému. AT neutralizuje účinek trombinu při koagulaci. Nepůsobí okamžitě, jeho účinek je opožděný. Při štěpení fibrinogenu na fibrin se vysílá signál pro syntézu AT. Můžeme ho zařadit mezi inhibitory serinových proteáz. Kromě trombinu vyvazuje i jiné proteázy, jako je FIXa, FXa, FXIa, FXIIa. Zvláštním typem inhibice je inhibice faktoru VIIa, který musí být vázán v komplexu s TF (TF.VIIa). Volný FVIIa není AT schopen inhibovat. Účinek antitrombinu mnohonásobně zvyšuje vazba s heparinem, čímž se zvýší účinnost blokace srážení krve. Zesílení účinku AT probíhá tak, že se heparin naváže na pozitivně nabitě lyzinové skupiny AT, čímž AT aktivuje. Antitrombin vytváří s proteázami koagulačně neaktivní komplexy v poměru 1:1 a ty jsou poté odbourávány v játrech v monocyto – makrofágovém systému. (1; 3; 4; 9; 11; 12)

6.1.3.4.2 Heparin kofaktor II (HC II)

Glykoprotein působící jako inhibitor trombinu. Nachází se na povrchu endotelu. Účinek je zvyšován působením heparinu a uplatňuje se hlavně, když v krvi poklesne hladina AT. (1; 3; 4; 20)

6.1.3.4.3 Systém proteinu C

Řadí se mezi nejúčinnější systémy inhibitorů hemostázy. Skládá se z proteinu C, proteinu S a trombomodulinu (TM). Zpomaluje srážení krve tím, že štěpí neenzymatické koagulační faktory Va a VIIIa, a tím je inaktivuje. (12; 21)

Protein C

Patří mezi glykoproteiny. Je syntetizován v játrech za přítomnosti vitamínu K. Aktivace proteinu C probíhá na povrchu endotelu, kde se nachází specifický endoteliální receptor trombinu trombomodulin (TM). Jakmile se trombin naváže na TM, stává se trombin neaktivní a umožňuje aktivaci proteinu C. Aktivovaný protein C proteolyticky štěpí, a tím inaktivuje FVa a FVIIIa, které jsou navázány na membráně. Inhibice těchto faktorů následně vede k vytvoření menšího množství vnější a vnitřní tenázy a protrombinázy, což vede ke zpomalení a potlačení koagulace. Inaktivace

proteinu C probíhá pomocí přirozeného inhibitoru aktivovaného proteinu C (PCI). (1; 3; 4; 9; 12; 21)

Protein S

Je to glykoprotein, vznikající v játrech za přítomnosti vitamínu K. V plazmě volný protein S slouží jako kofaktor pro protein C, díky své afinitě k fosfolipidovým povrchům za přítomnosti vápenatých iontů. Protein S je inhibován trombinem. (1; 3; 4; 12)

6.1.3.4.4 Inhibitor tkáňového faktoru (TFPI)

TFPI je nejdůležitější inhibitor vnější cesty koagulace. V plazmě je vázaný na lipoproteiny a jeho množství závisí na množství LDL cholesterolu. TFPI přímo inhibuje FXa a jeho účinek zvyšuje přítomnost heparinu. Dále tvoří koagulačně neaktivní komplex (TFPI.Xa.VIIa.TF), kde inhibuje FVIIa. Celkově TFPI zabraňuje nadměrné aktivaci koagulačního systému. (1; 3; 4; 9)

6.1.3.4.5 Inhibitory fibrinolýzy

Do systému přirozených inhibitorů řadíme i inhibitory fibrinolýzy, jako je α_2 – antiplazmin (α_2 AP), inhibitory aktivátorů plazminogenu (PAI) a trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI). α_2 AP patří mezi glykoproteiny a v plazmě ho najdeme v nadbytku. Dostane-li se volný plazmin do plazmy, okamžitě s ním α_2 AP reaguje a inhibuje ho. Pokud je ale plazmin vázán na fibrin, inhibitor na něj neúčinkuje.

PAI řadíme mezi inhibitory serinových proteáz. V tomto případě dochází k inhibici aktivátorů plazminogenu a plazmin tak vůbec nevzniká. Existují tři typy PAI-1, PAI-2 a PAI-3, kdy PAI-1 je nejdůležitějším inhibitorem aktivátorů plazminogenu.

Dalším důležitým inhibitorem fibrinolýzy je trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI), který zamezuje vytvoření vazby mezi fibrinem a tPA s plazminogenem. (1; 3; 4; 12)

6.1.3.4.6 Nespecifické inhibitory

Tyto inhibitory inhibují prakticky jakoukoliv proteázu v koagulačním systému. Řadíme sem α_2 -makroglobulin (α_2 MG), který inhibuje všechny typy proteáz a jeho

účinek přichází tehdy, když se vyčerpají zásoby ostatních inhibitorů. α_2 MG je primárním inhibitorem FXa. Dalším nespecifickým inhibitorem je C-1 inhibitor, který inhibuje faktory IIa, XIa, kalikrein i plazmin. (1; 3; 4)

6.1.4 Testy používané v hemostáze

Hemostázu můžeme sledovat celou řadou testů. Můžeme sledovat funkci krevních destiček, plazmatického koagulačního systému, fibrinolýzy, systému přirozených inhibitorů hemostázy, ovlivnění hemostázy získanými inhibitory či monitorovat antitrombotickou léčbu. V této práci se zaměříme pouze na testy hemokoagulační, tzn. testy popisující funkci plazmatického koagulačního systému. Ty můžeme rozdělit podle specifity na testy globální, skupinové a specifické.

6.1.4.1 Globální testy

Globální testy slouží k popisu procesu srážení jako celku. Příkladem je test na dobu srážlivosti nativní krve, test krvácivosti, test konzumpce protrombinu, vyšetření fragility krevních kapilár, trombin generační test (TGT) či euglobulinová lýza. Jedná se o testy orientační, většinou rychlé, relativně málo citlivé a nespecifické, často zatížené chybovostí. Jejich výhodou je nízká cena a relativně krátká doba odezvy. V dnešní době jsou globální testy nahrazovány skupinovými. (1; 4; 5; 7; 8)

6.1.4.2 Specifické testy

Používání specifických testů se využívá ke sledování funkční aktivity jedné konkrétní složky hemostázy většinou pomocí koagulačních metod, nebo za využití spektrofotometrie a pro sledování kvantity látky pomocí imunochemických metod na principu reakce antigenu s protilátkou. V současné době lze specificky vyšetřit prakticky jakoukoli složku hemostázy. Nevýhodou specifických testů je vyšší cena a delší doba odezvy, neboť se vyšetřují většinou v sériích. (1; 4; 7; 8)

6.1.4.3 Skupinové testy

Mezi skupinové testy řadíme protrombinový test (PT), aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT), trombinový test (TT) a reptilázový test (ReT). Jsou to

testy, které popisují určitou část koagulační kaskády. Mají větší výpovědní hodnotu než testy globální. Jedná se o nejčastější koagulační vyšetření. Výhodou je jejich poměrně nízká cena a krátká doba odezvy. Lze je také využít k monitorování antikoagulační léčby.

6.1.4.3.1 Protrombinový test – (PT)

PT patří mezi základní koagulační testy, i v dnešní době je stále nejčastějším koagulačním vyšetřením. Sleduje vnější koagulační cestu hemostázy. Pomocí testu dále sledujeme nedostatek nebo sníženou funkci faktorů II, V, VII a X.

Principem testu je zjistit, zda je systém schopen tvořit aktivní koagulační komplexy protrombinázu a vnější tenázu. Tedy vnější cestou vyvolat přeměnu protrombinu na trombin a následně fibrinogenu na fibrin. Měří se tzv. koagulační čas, tzn. čas od přidavku startovací reagentie do detekce fibrinové sraženiny. Protrombinový test, zejména porovnávání citlivosti používaných reagentií, je hlavní náplní praktické části. (1; 4; 5; 7; 26; 27; 45)

Vyjadřování výsledků:

- V sekundách
- Dosazením do vzorce jako poměr časů (R) = čas testované plazmy / čas normální plazmy
- INR (mezinárodní normalizovaný poměr) = R^{ISI}
 - kde ISI je mezinárodní index citlivosti a vyjadřuje citlivost tromboplastinu ku mezinárodnímu standardnímu tromboplastinu. Hodnota ISI existuje pro každý tromboplastin, což jsou různé modifikace tkáňového faktoru a v dnešní době ji uvádí výrobce reagentie u každé šarže. INR se používá k vyjadřování výsledků PT u pacientů s léčbou antagonisty vitamínu K (kumariny), např. warfarin nebo peletan. INR bylo zavedeno Světovou zdravotnickou organizací (WHO), pro standardizaci výsledků u pacientů s antikoagulační léčbou napříč laboratořemi po celém světě. (1; 4; 5; 24; 27)

Reagentie – tkáňový tromboplastin s chloridem vápenatým

- Rekombinantní PT reagentie – skládají se z rekombinantního tkáňového tromboplastinu, vápenatých iontů, fosfolipidů, pufru a stabilizátorů. Tento

tromboplastin se vyrábí genovým inženýrstvím, kdy je gen kódující TF vnesen do bakterie *Escherichia coli*. Gen se v bakterii „uchytí“ a ta začne TF produkovat. TF se poté odseparuje, purifikuje a stabilizuje přidavkem stabilizátoru pro větší odolnost. Tento druh reagentie má vysokou citlivost (ISI se blíží hodnotě 1). Dostává se díky tomu do popředí před tkáňové tromboplastiny. (38; 40)

- Tkáňové tromboplastiny – extrakt z tkání s velkým obsahem tkáňového faktoru (králičí mozek, lidská placenta, hovězí mozek) a vápenaté ionty. (1; 37; 38)

Pro naši analýzu v praktické části budeme používat komerční tkáňový tromboplastin z králičího extraktu. Pro přípravu tohoto tromboplastinu se používá králičí mozek zbavený krevních cév. Takto připravený králičí mozek se naloží do acetonu a vysuší se ve vakuu na prášek. Králičí mozkový prášek se musí následně převést na tromboplastinový extrakt. Prášek se smíchá se zahřátým solným roztokem, odstředí se, odstraní se sediment prášku a zůstane extrakt bohatý na tromboplastin. (37)

Pro zvýšení citlivosti se dle novějších studií extrakční tekutina připraví z chloridu sodného, 0,1–1,0 gramu síranu barnatého na gram tkáně, neiontového detergentu a soli. Tato směs se smíchá s práškem králičího mozku a extrahuje se při teplotě v rozmezí 43–47 °C po dobu 15 minut. Následuje centrifugace při otáčkách 2500 ot./min po dobu 10 minut. Odstraní se sediment, přidají se ionty vápníku, pufr a stabilizátory. Nakonec je produkt lyofilizován, aby se lépe skladoval, resp. měl delší stabilitu při podmínkách běžného skladování. (39)

- Kombinované tromboplastiny – tkáňový tromboplastin, hovězí plazma a vápenaté ionty. Využívají se při monitorování antikoagulační léčby např. warfarinem. (1; 4; 5; 7)

Fyziologické hodnoty:

- $R = 0,8–1,2$

Terapeutické hodnoty (monitorování léčby antagonisty vitamínu K):

- $INR = 2,0–3,0$ (v některých indikacích až 3,5) (1; 45)

Základní požadavky na reagenty PT testu

- Citlivé na snížené nebo chybějící faktory vnější cesty, citlivé u pacientů léčených kumariny, necitlivé na heparin v terapeutické škále, která je udána výrobcem. (1; 4; 7)

Klinický význam: Proloužení času PT, může být způsobeno chyběním/snížením/poruchou funkce faktorů X, VII, V, II i fibrinogenu, nedostatkem vitamínu K nebo při kumarinové léčbě, při onemocnění jater, při zvýšené hladině heparinu, v přítomnosti protilátek proti faktorům nebo protilátek typu lupus antikoagulans. Zkrácení času PT nastává po aktivaci systému hemostázy, např. po podání rekombinačního faktoru VIIa. (1; 4; 5; 7; 24; 27)

Warfarin

Warfarin patří mezi kumariny a používá se jako lék ke zpomalení srážení krve a ke snížení rizika vzniku krevní sraženiny např. u pacientů s chlopenními náhradami nebo fibrilací síní. Warfarin blokuje vitamin K, takže se v játrech nemůžou syntetizovat plnohodnotné koagulační faktory II, VII, IX a X, faktory vitamin K dependentní. Dávka warfarinu je u každého pacienta volena individuálně a pravidelně se musí monitorovat. Při vyšší dávce warfarinu, než je pro pacienta vhodná, se můžou objevit nežádoucí vedlejší účinky, jako je krvácení. Pro monitoring antikoagulační léčby warfarinem se využívá protrombinový test a jeho výsledky jsou vydávány v hodnotách INR, jejichž terapeutické rozmezí je 2,0–3,5. (12; 25; 29; 32)

7. PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část bakalářské práce se zabývá zavedením nové citlivější reagensie pro stanovení protrombinového testu a funkční aktivity koagulačních faktorů vnější cesty do laboratorní praxe. Za tímto účelem byla provedena srovnávací studie, která se zabývala vyšetřením protrombinového testu na souboru pacientů pomocí dříve používané reagensie STA Neoplastin CI Plus firmy Stago a současně používanou novou citlivější reagensií STA NeoPTimal firmy Stago na automatickém koagulometru STA-R Evolution (Stago). Kromě protrombinového testu jsou tyto reagensie využívány pro stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů II, V, VII a X, proto je srovnání nové a původní reagensie provedeno také na stanovení funkční aktivity těchto koagulačních faktorů. Naměřené výsledky byly porovnány a statisticky vyhodnoceny.

7.1 *Vyšetřovaný materiál*

Pro získání vyšetřovaného materiálu pro naši analýzu je nutné dodržet správné postupy při odběru biologického materiálu, jeho transportu do laboratoře, přípravě a skladování před analýzou.

Pro naši analýzu potřebujeme od pacienta správně odebrat vzorek žilní krve, dodržet správný poměr krve pacienta a protisrážlivého činidla. Odběr provádíme pomocí jednorázových pomůcek a doporučených dezinfekčních prostředků. Pacient by měl před odběrem zůstat 15 minut v klidu a měl by vypít dostatečné množství tekutin. Žilní krev odebíráme do zkumavky s citrátem sodným 0,109 mol/l (3,2 %) v poměru 9:1. Aby byl poměr krve a protisrážlivého činidla zachován, je potřeba, aby byla zkumavka naplněná krví přesně po vyznačenou rysku. Ještě před samotným odběrem má být odběrová zkumavka označena rodným číslem a jménem pacienta. Ke každému odběru musí být vyplněna žádanka s informacemi, které jsou stanoveny vyhláškou. (45)

Po odebrání vzorku je nutné ho co nejrychleji transportovat do laboratoře. Pro koagulační vyšetření platí doba do 2 hodin od odběru a během transportu je nutné dodržet optimální teplotu v rozmezí 15–25 °C. Z externích pracovišť je transportována citrátová plazma v mikrozkušavkách ve zmraženém stavu a zde je důležité, aby během transportu nedošlo k rozmrazení. Při převzetí vzorku laboratoří je nutné provést kontrolu vzorku a žádanky, ověřit, že nedošlo k poškození nebo kontaminaci vzorku

během transportu a že vzorek splňuje podmínky dobře odebraného materiálu. Pokud je vše v pořádku, vzorek se zaeviduje do laboratorního informačního systému (LIS) a přidělí se mu speciální číslo. (45)

Před vlastním koagulačním vyšetřením je nutné provést centrifugaci citrátové krve na 10 minut při 3500 ot./min., kdy získáme plazmu chudou na destičky stabilní 6 hodin. Stabilita 6 hodin platí pouze pro PT, ostatní koagulace mají stabilitu většinou 2–4 hodin. Pokud nebudeme připravený vzorek ihned zpracovávat, musíme ho zmrazit, nejlépe při teplotě -60 až -80 °C. (45)

7.2 Automatický koagulometr STA-R Evolution

K vyšetření patientských vzorků jsem použila mechanický automatický koagulometr STA-R Evolution od firmy Diagnostica Stago, který je umístěn v laboratoři IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Přístroj pracuje na principu koagulačním, spektrofotometrickém a imunoturbidimetrickém. (46)

Principem koagulační analýzy je sledování tvorby fibrinového koagula během koagulačního děje. Při měření používáme kyvetu s kovovou kuličkou, která se vlivem magnetického pole pohybuje. Tím, jak koagulace postupuje a mění se viskozita vzorku, zpomaluje se pohyb kuličky v kyvetě. (46)

U spektrofotometrické a imunoturbidimetrické metody měříme změnu absorbance monochromatického světla po průchodu paprsku kyvetou při vlnové délce 405 nm u spektrofotometrických testů a při vlnové délce 540 nm u imunoturbidimetrických testů. (46)

Na přístroji je možné provádět základní koagulační testy (PT, APTT, TT, fibrinogen), spektrofotometrické testy (AT, anti-Xa aktivita), imunoturbidimetrické testy (D-Dimery), speciální testy pro vyšetření aktivity koagulačních faktorů, diagnostiky protilátek lupus antikoagulans, testy pro systém proteinu C a diagnostiku rezistence aktivovaného proteinu C, vWF, aktivitu plazminogenu, monitoring koagulační léčby a spoustu dalších. (46)

Přístroj má 75 pozic pro reagenty, 220 pozic pro vyšetřované vzorky a zásobník na 1000 kyvet pro měření. Přístroj také obsahuje čtečku čárových kódů pro načítání

jednotlivých vzorků i reagensů. Vnitřní prostor přístroje je rozdělen na tři části. Část s uloženými zásobníky a zkumavkami, část s uloženými reagensy pro měření, kde je udržována teplota v rozmezí 15–19 °C a část s inkubačními a měřicími jamkami. Koagulometr má svůj dotykový monitor, externě připojenou klávesnici, myš a tiskárnu. (46)



Obrázek 5 – Automatický koagulometr STA-R Evolution Zdroj: 47 (slide 28, převzato)

7.3 Principy použitých metod

7.3.1 Princip protrombinového testu PT

Při PT testu používáme citrátovou plazmu, ke které přidáme tkáňový tromboplastin obsahující vápenaté ionty a sledujeme, jak dlouhý bude koagulační čas, než se vytvoří první fibrinová vlákna. (45)

7.3.2 Princip stanovení funkční aktivity FII

Pro stanovení funkční aktivity FII potřebujeme plazmu pacienta chudou na destičky, 10krát naředěnou pufrům, která se smísí s deficitní plazmou. To je plazma, která neobsahuje FII, ale všechny ostatní faktory obsahuje v nadbytku. Do směsi dále

přidáme tromboplastin s vápenatými ionty a měříme čas, než se vytvoří první fibrinová vlákna. Tato doba je závislá pouze na aktivitě FII ve vyšetřované plazmě. (41)

7.3.3 Princip stanovení funkční aktivity FV

Pro stanovení funkční aktivity FV potřebujeme vyšetřovanou plazmu chudou na destičky, 10krát naředěnou pufrem, která se smísí s deficitní plazmou. To je plazma, která neobsahuje FV, ale všechny ostatní faktory obsahuje v nadbytku. Ke směsi přidáme tromboplastin s vápenatými ionty a měříme čas, než se vytvoří první fibrinová vlákna. Koagulační čas je závislý pouze na aktivitě FV ve vyšetřované plazmě. (42)

7.3.4 Princip stanovení funkční aktivity FVII

Ke stanovení funkční aktivity FVII použijeme vyšetřovanou plazmu chudou na destičky, 10krát naředěnou pufrem, která se smísí s deficitní plazmou, která neobsahuje FVII, ale všechny ostatní faktory obsahuje v nadbytku. Ke směsi opět přidáme tromboplastin s vápenatými ionty a měříme čas, než se vytvoří první fibrinová vlákna. Koagulační čas je závislý pouze na aktivitě FVII ve vyšetřovaném vzorku. (43)

7.3.5 Princip stanovení funkční aktivity FX

Pro vyšetření funkční aktivity FX použijeme zředěnou vyšetřovanou plazmu, 10krát naředěnou pufrem, která se smísí s deficitní plazmou. Deficitní plazma neobsahuje FX, ale všechny ostatní faktory obsahuje v nadbytku. Ke směsi vyšetřované a deficitní plazmy opět přidáme tromboplastin s vápenatými ionty a měříme čas, než se vytvoří první fibrinová vlákna. Rychlost přeměny protrombinu na trombin, je přímo úměrná aktivitě FX ve vyšetřované plazmě. Koagulační čas je závislý pouze na aktivitě FX ve vyšetřované plazmě. (44)

7.4 *Použité reagensie*

7.4.1 Reagensie STA Neoplastin CI Plus

Reagensie STA Neoplastin CI Plus byla dříve používána v laboratoři IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Jedná se o lyofilizovaný

tromboplastin extrahovaný z králičích mozkových tkání. Tromboplastin byl dodáván v kitu společně s druhou reagentií obsahující rozpouštědlo (diluent) s vápenatými ionty. Reagencie mohou být dodávány v množství 5ml nebo 10ml. Hodnota ISI reagencie STA Neoplasin CI Plus je mezi 1,20–1,30 a je tedy méně citlivá než standard. Činidlo STA Neoplastin CI Plus obsahuje specifický inhibitor heparinu. Jednotlivá balení reagentií uchováváme v lednici při 2–8 °C. (49)

7.4.2 Reagencie STA NeoPTimal

Reagencie STA NeoPTimal je nová citlivější reagencie používaná v laboratoři IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. V nabídce firmy Stago nahrazuje výše uvedenou reagentii STA Neoplastin CI Plus. Také se jedná o lyofilizovaný tromboplastin extrahovaný z králičích mozkových tkání, pouze stupeň čištění tromboplastinu je na vyšší úrovni, reagencie má nižší hodnotu ISI a výrobce uvádí, že je citlivější k zachytu defektů vnější cesty koagulace. V kitu je kromě lyofilizovaného tromboplastinu také rozpouštědlo (diluent) s vápenatými ionty. Reagencie mohou být dodávány v množství 5ml, 10ml nebo 20 ml. Hodnota ISI reagencie STA NeoPTimal se blíží 1. Činidlo STA NeoPTimal obsahuje specifický inhibitor heparinu. Jednotlivá balení reagentií uchováváme v lednici při 2–8 °C. (48)

Obě reagencie se používají ke stanovení protrombinového testu a k vyšetřování funkční aktivity koagulačních faktorů II, V, VII a X. (48; 49)

7.4.3 Příprava reagentií pro PT

Před ředěním musíme lahvičky vytemperovat na laboratorní teplotu 18–25 °C. Poté naředíme lahvičku s tromboplastinem lahvičkou rozpouštědla s vápenatými ionty. Necháme 30 minut ustálit, poté smíchaný obsah lahviček důkladně promícháme. Před vložením reagentií do koagulačního přístroje přidáme do lahviček magnetické míchadélko, které bude reagentii neustále promíchávat a udržovat v homogenním stavu. Reagentii načteme do přístroje pomocí čárového kódu na lahvičce. (45)

Tabulka 1 – Stabilita reagensů pro metodu protrombinového testu

Forma tromboplastinu	Teplota skladování	Doba stability
Lyofilizovaný	2–8 °C	Do doby expirace
Naředěný	15–19 °C	48 hodin
Naředěný	2–8 °C	8 dnů

Zdroj: 45; vlastní zpracování

7.4.4 Příprava reagensů pro stanovení funkční aktivity FII

Pro stanovení koagulačního faktoru II budeme potřebovat reagentie STA Neoplastin CI Plus, STA NeoPTimal, reagentie STA Deficient II od firmy Stago, což je deficitní plazma, která neobsahuje FII, ale ostatní faktory obsahuje v nadbytku a Owren – Kollerův pufr, který se používá pro zředění vyšetřované plazmy. Reagentie STA Neoplastin CI Plus a STA NeoPTimal vytemperujeme na laboratorní teplotu, smícháme příslušné tromboplastiny s roztokem vápenatých iontů, necháme 30 minut ustálit a poté řádně promícháme. Přidáme magnetické míchadélko pro neustále promíchávání a udržení reagensů v homogenním stavu. Reagentie STA Deficient II naředíme 1 ml vody pro injekce, 30 minut necháme ustálit při laboratorní teplotě, poté jemně promícháme. Pufr je již připraven k použití. (41)

Tabulka 2 – Stabilita reagensů pro stanovení funkční aktivity FII

Reagentie	Teplota skladování	Doba stability
Lyofilizovaný tromboplastin	2–8 °C	Do doby expirace
Naředěný tromboplastin	15–19 °C	48 hodin
Lyofilizovaná FII deficitní plazma	2–8 °C	Do doby expirace
Naředěná FII deficitní plazma	15–19 °C	8 hodin
Owren – Kollerův pufr	15–19 °C	3 dny

Zdroj: 41; vlastní zpracování

7.4.5 Příprava reagensů pro stanovení funkční aktivity FV

Příprava reagensů pro stanovení funkční aktivity FV probíhá stejným způsobem jako u přípravy reagensů pro stanovení funkční aktivity FII. Rozdílná je pouze deficitní plazma STA Deficient V od firmy Stago, která neobsahuje faktor V, ale ostatní faktory obsahuje v nadbytku. Deficitní plazmu STA Deficient V naředíme 1 ml vody pro injekce, 30 minut necháme ustávit při laboratorní teplotě, poté jemně promícháme. Zbylé reagensy i pufr zůstávají stejné. (42)

Tabulka 3 – Stabilita reagensů pro stanovení funkční aktivity FV

Reagensie	Teplota skladování	Doba stability
Lyofilizovaný tromboplastin	2–8 °C	Do doby expirace
Naředěný tromboplastin	15–19 °C	48 hodin
Lyofilizovaná FV deficitní plazma	2–8 °C	Do doby expirace
Naředěná FV deficitní plazma	15–19 °C	8 hodin
Owren – Kollerův pufr	15–19 °C	3 dny

Zdroj: 42; vlastní zpracování

7.4.6 Příprava reagensů pro stanovení funkční aktivity FVII

Příprava reagensů pro stanovení funkční aktivity FVII probíhá stejným způsobem jako u přípravy reagensů pro stanovení funkční aktivity FII a FV. Rozdílná je pouze deficitní plazma DG – FVII od firmy Grifols, která neobsahuje faktor VII. Deficitní plazmu DG – FVII naředíme 1 ml vody pro injekce, 30 minut necháme ustávit při laboratorní teplotě, poté jemně promícháme. Zbylé reagensy i pufr zůstávají stejné. (43)

Tabulka 4 – Stabilita reagensů pro stanovení funkční aktivity FVII

Reagencie	Teplota stability	Doba stability
Lyofilizovaný tromboplastin	2–8 °C	Do doby expirace
Naředěný tromboplastin	15–19 °C	48 hodin
Lyofilizovaná FVII deficitní plazma	2–8 °C	Do doby expirace
Naředěná FVII deficitní plazma	15–19 °C	4 hodin
Owren – Kollerův pufr	15–19 °C	3 dny

Zdroj: 43; vlastní zpracování

7.4.7 Příprava reagensů pro stanovení funkční aktivity FX

Příprava reagensů pro stanovení funkční aktivity FX probíhá stejným způsobem jako u přípravy reagensů pro stanovení funkční aktivity FII, FV a FVII. Rozdílná je pouze deficitní plazma STA Deficient X od firmy Stago, která neobsahuje faktor X. Reagensii STA Deficient X naředíme 1 ml vody pro injekce, 30 minut necháme ustálit při laboratorní teplotě, poté jemně promícháme. Zbylé reagensie i pufr zůstávají stejné.

(44)

Tabulka 5 – Stabilita reagensů pro stanovení funkční aktivity FX

Reagencie	Teplota stability	Doba stability
Lyofilizovaný tromboplastin	2–8 °C	Do doby expirace
Naředěný tromboplastin	15–19 °C	48 hodin
Lyofilizovaná FX deficitní plazma	2–8 °C	Do doby expirace
Naředěná FX deficitní plazma	15–19 °C	8 hodin
Owren – Kollerův pufr	15–19 °C	3 dny

Zdroj: 44; vlastní zpracování

Pro měření protrombinového testu byly použity tyto kity reagensí:

Tabulka 6 – Použité reagensie při naší analýze

Název reagensie	STA Neoplastin CI Plus	STA NeoPTimal
Výrobce	Stago	Stago
Šarže	253064	253659
Expirace	11/2019	03/2020
Balení	12 x 10 ml	12 x 10 ml
ISI	1,25	0,99

Zdroj: vlastní zpracování

7.5 Nastavení přístroje

Tabulka 7 – Nastavení koagulometru pro protrombinový test

Nastavení koagulometru:	STA Neoplastin CI Plus	STA NeoPTimal
Vyšetřovaná plazma	50 µl	50 µl
Inkubace (37 °C)	240 s	240 s
Tromboplastin	100 µl	100 µl

Zdroj: 45; vlastní zpracování

Tabulka 8 – Nastavení koagulometru pro stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů II, V, VII a X

Nastavení koagulometru:	STA Neoplastin CI Plus	STA NeoPTimal
Ředěná vyšetřovaná plazma (ředění 10x)	50 µl	50 µl
Deficitní plazma	50 µl	50 µl
Inkubace (37 °C)	240 s	240 s
Tromboplastin	100 µl	100 µl

Zdroj: 41; 42; 43; 44; vlastní zpracování

Tabulka 9 – Fyziologické hodnoty

	Fyziologické hodnoty
PT (R)	0,8–1,2
PT (INR)	2,0–3,5
FII	70–130 %
FV	60–14 %
FVII	60–130 %
FX	70–130 %

Zdroj: 36; 41; 42; 43; 44; 45; vlastní zpracování

Naměřené koagulační časy metodou PT normální plazmy a vyšetřované plazmy pacienta se odečítají přímo z koagulometru. Koagulometr si sám vypočítá hodnoty R a INR. U naměřených koagulačních časů pro jednotlivé faktory vnější cesty koagulace si přístroj sám, odečtením z kalibrační křivky, přiřadí příslušnou hodnotu aktivity k jednotlivým koagulačním faktorům. Každý koagulační faktor má vlastní metodu, kalibrační křivku a kontrolní plazmy. Hodnoty jsou uloženy v paměti koagulometru a zároveň jsou přeneseny do laboratorního informačního systému. (41; 42; 43; 44; 45)

7.6 Kalibrace přístroje

Než začneme proměřovat sérii vzorků pacientů, je nutné mít správně nakalibrovaný přístroj. Kalibraci provádíme pouze u metod, kde je potřeba převést měřenou veličinu na vydávanou veličinu v jiných jednotkách. Takto je tomu právě u měření aktivity koagulačních faktorů, kde se měří koagulační čas v sekundách, ale výsledky funkční aktivity se vydávají v procentech. V těchto případech se bez kalibrační křivky neobejdeme.

Pro kalibraci jednotlivých faktorů vnější cesty potřebujeme mít k dispozici tzv. kalibrační plazmu, která má pro jednotlivé parametry (faktory) přesně definovanou hodnotu funkční aktivity. Tato výchozí hodnota je deklarována výrobcem kalibrační plazmy.

Koagulometr vytvoří kalibrační křivku automaticky. Sám si nařadí kalibrační plazmu na jednotlivé body kalibrační křivky o známé aktivitě jednotlivých faktorů,

každému bodu změří koagulační čas a body proloží křivkou. Kalibrace faktorů vnější cesty jsou 4 bodové. Kalibrační plazma se ředí 1/10, 1/20, 1,40 a 1/80. Osa x i osa y kalibrační křivky jsou logaritmické a závislost grafu je lineární. (12; 28; 41; 42; 43; 44; 45)

7.6.1 Reagencie potřebné pro kalibraci

STA Unicalibrator od firmy Stago je reagencie pro provedení kalibrace přístroje STA-R Evolution (Stago). Lahvička obsahuje lyofilizovanou kalibrační plazmu, kterou je nutné před použitím naředit 1 ml vody pro injekce, nechat ustálit 30 minut při laboratorní teplotě a poté jemně promíchat. (41; 42; 43; 44)

Tabulka 10 – Stabilita reagiencí pro kalibraci přístroje

Reagencie pro kalibraci	Teplota skladování	Doba stability
Lyofilizovaný Unicalibrator	2-8 °C	Do doby expirace
Naředěný Unicalibrator	15-19 °C	4 hodiny

Zdroj: 41, 42, 43, 44; vlastní zpracování

7.7 Kontrola kvality

K zajištění přesnosti a správnosti výsledků je nutné provádět kontrolu kvality. Ta se provádí u speciálních vyšetření měřených v sérii před každou sérií a po každé kalibraci metody, u rutinních metod každý den před zahájením provozu. Kontrola se provádí vždy alespoň na 2 úrovních, normální a patologické. Ke kontrole speciálních metod se používají vždy kontrolní plazmy atestované, které mají výrobcem deklarované rozmezí. U rutinních metod lze místo atestovaných kontrol denně použít kontroly bez atestu a atestovanou kontrolu změřit například pouze jednou týdně. Pokud bychom naměřily hodnoty kontrolních plazem mimo rozmezí deklarovaná výrobcem, nebo v případě změny šarže reagiencí, musíme provést novou kalibraci přístroje a následně kontrolu kvality znovu. Pokud by ani toto nepomohlo, musíme brát v úvahu např. poruchu analyzátoru a v takovém případě nemůžeme patientské vzorky měřit. (41; 42; 43; 44)

7.7.1 Reagencie pro kontrolu kvality

STA System Control N+P od firmy Stago jsou kontrolní plazmy pro kontrolu přesnosti širokého spektra metod. V setu jsou lahvičky s normální a patologickou lyofilizovanou kontrolní plazmou. Každá lahvička se naředí 1 ml vody pro injekce, nechá se ustálit 30 minut při laboratorní teplotě a poté se jemně promíchá. (41; 42; 43; 44)

Tabulka 11 – Stabilita reagensů pro kontrolu kvality

Reagencie pro kontrolu kvality	Teplota stability	Doba stability
Lyofilizovaná System Control N+P	2–8 °C	Do doby expirace
Naředěná System Control N+P	15–19 °C	8 hodin

Zdroj: 41, 42, 43, 44; vlastní zpracování

7.8 Pracovní postup

- 1) V prvním kroku jsem si připravila potřebné reagenty, kalibrační plazmy a kontrolní plazmy.
- 2) Naředěné, promíchané reagenty jsem vložila do reagenční zásuvky přístroje. Originální reagenty Stago jsem načítla pomocí čtečky čárových kódů přímo z lahviček, ostatní reagenty jsem zadala ručně, včetně čísla šarže a objemu; dobu stability si hlídá přístroj sám.
- 3) Před stanovením funkční aktivity koagulačních faktorů jsem provedla kalibrace jednotlivých metod, a to jak pro původní reagenty STA Neoplastin CI Plus, tak pro novou reagenty STA NeoPTimal.
- 4) Po kalibraci jsem spustila u všech metod kontrolu kvality. Jednalo se o protrombinový test, FII, FV, FVII a FX. Každé vyšetření jsem měřila dvěma metodami současně, s původní a s novou reagenty.
- 5) Všechny kontrolní plazmy mi vyšly napoprvé. V případě, že by se naměřené hodnoty nevešly do výrobcem stanovených rozmezí, přístroj by nás pomocí alarmu upozornil. Protože kontrola kvality proběhla v pořádku, mohla jsem přejít k přípravě vzorků pacientů pro analýzu.

- 6) Vzhledem k tomu, že se jednalo o běžné vzorky pacientů FN Hradec Králové, nemohla jsem vzorky zadávat do laboratorního informačního systému. Pro vyšetření aktivity koagulačních faktorů jsem dostala k vyšetření připravenou sérii vzorků, vyšetření protrombinového testu bylo provedeno na vzorcích, které ten den do laboratoře k vyšetření přicházely. Tyto vzorky musely být po příjmu zadány do laboratorního informačního systému a centrifugovány při 3500 ot./min. po dobu 10 min. Vzorky plazmy na vyšetření aktivity koagulačních faktorů již byly zamrazeny v mikrozkušavkách. Vzorky na vyšetření PT jsem vkládala do přístroje načtením čárového kódu ze zkumavky, mikrozkušavky na vyšetření faktorů se vkládaly ručně pod číslem přiděleným laboratorním informačním systémem.
- 7) Přístroj vzorky po vložení automaticky začal měřit, vždy současně s původní (STA Neoplastin CI Plus) a s novou (STA NeoPTimal) reagensií.
- 8) Po změření přístroj výsledky automaticky vytisknul. Naměřená data jsem si zpracovala do tabulek a statisticky vyhodnotila metodou lineární regrese a pomocí Bland – Altmanova grafu.

7.9 Výsledky a jejich statistické vyhodnocení

Výsledky protrombinového testu jsem rozdělila na 2 skupiny, a to na vzorky pacientů bez léčby antagonisty vitamínu K, u kterých jsem hodnotila poměr R a na vzorky pacientů s léčbou antagonisty vitamínu K, u kterých jsem hodnotila INR. První skupina obsahovala vzorky 86 pacientů bez léčby kumariny, druhá vzorky 82 pacientů s léčbou kumariny. Funkční aktivita faktoru II byla měřena u 14 pacientů, faktoru V u 12 pacientů, faktoru VII u 11 pacientů a faktoru X u 15 pacientů. Výsledky byly zpracovány do tabulek č. 12, 13, 14, 14, 16 a 17. Všechny testy byly současně změřeny původní a novou reagensií s cílem zjistit, jak dobře spolu metody korelují.

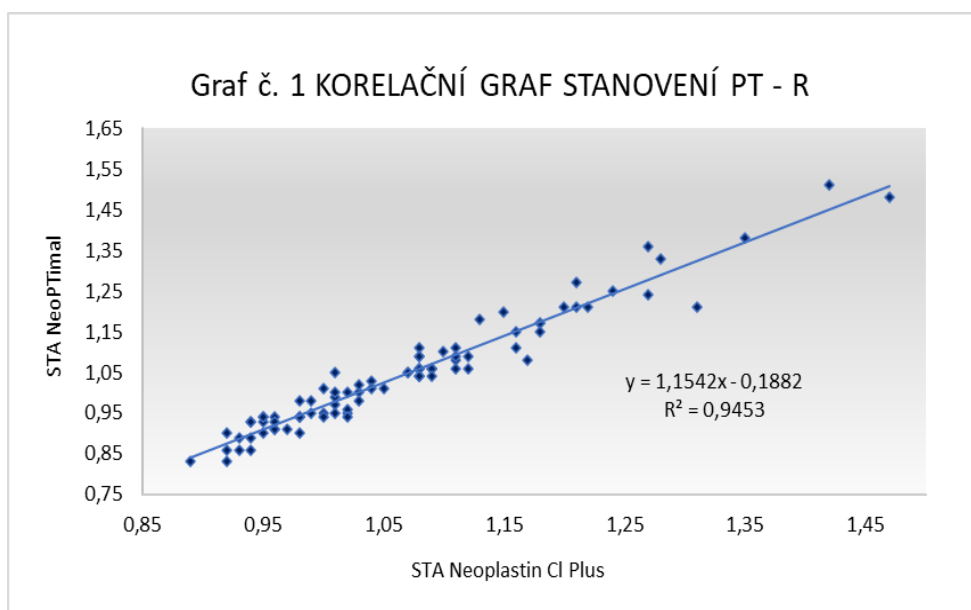
Porovnání výsledků naměřených původní a novou reagensií jsem pro jednotlivé metody statisticky vyhodnotila metodou lineární regrese (korelačním grafem) v programu Microsoft Excel. Korelační závislost výsledků naměřených oběma reagensiemi jsem vyjádřila rovnicí přímky a hodnotou korelačního koeficientu (r). Výsledky protrombinového testu jsem navíc vyhodnotila pomocí Bland – Altmanova grafu.

Korelační graf srovnává výsledky dvou metod, tedy v našem případě hodnoty naměřené původní reagensy STA Neoplastin CI Plus (vyneseny na ose x) s hodnotami naměřenými novou reagensy STA NeoPTimal (vyneseny na ose y). Závislost je lineární. Těsnost mezi oběma metodami udává hodnota korelačního koeficientu (r). Čím více se blíží jeho hodnota 1, tím je těsnost mezi metodami vyšší. U Bland – Altmanova grafu opět porovnááme shodu mezi hodnotami naměřenými reagensy STA Neoplastin CI Plus a STA NeoPTimal. Na ose x jsou vyneseny průměry hodnot a na ose y rozdíly hodnot. Součástí grafu jsou dvě osy rovnoběžné s osou x, které vymezují interval průměru odchylek $\pm 1,96$ SD. V grafu hodnotíme šíři intervalu, průměr odchylek a polohu průměru odchylek. Čím užší je tento interval a čím víc se blíží průměr odchylek 0, tím je shoda mezi metodami lepší. (22; 33; 34; 35)

7.9.1 Hodnocení grafů pro stanovení PT – R

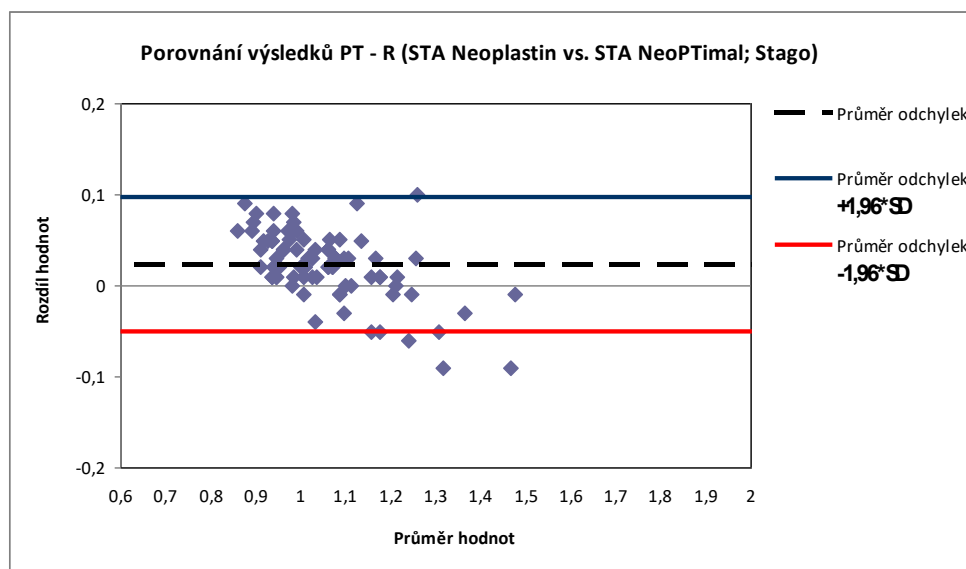
U pacientů neléčených antagonisty vitamínu K porovnááme hodnoty poměru R naměřené původní a novou reagensy. V tomto souboru je rovnice přímky ($y = 1,1542x - 0,1882$; $R^2 = 0,9453$) a korelační koeficient ($r = 0,9722$), který vyšel velmi blízko hodnotě 1, což poukazuje na těsnou korelaci mezi výsledky naměřenými původní reagensy STA Neoplastin CI Plus a novou reagensy STA NeoPTimal. Z naměřených hodnot viz. tabulka č. 12 je patrné, že hodnoty naměřené oběma reagensy nevykazují klinicky významné rozdíly. Z Bland – Altmanova grafu je patrná opět velmi dobrá shoda mezi výsledky naměřenými oběma reagensy. Rozdíly hodnot na ose y jsou ve velmi úzkém intervalu od $-0,05$ do $+0,1$ a hodnota průměru odchylek (přerušovaná čára) se nachází jen těsně nad hodnotou 0, což nás informuje o tom, že celkově jsou hodnoty měřené novou reagensy STA NeoPTimal lehce nižší než hodnoty měřené reagensy STA Neoplastin CI Plus. Rozdíl je ale minimální.

Graf 1 – Korelační graf stanovení PT – R u pacientů bez kumarinové léčby



Zdroj: vlastní zpracování

Graf 2 – Bland – Altmanův graf stanovení PT – R u pacientů bez kumarinové léčby



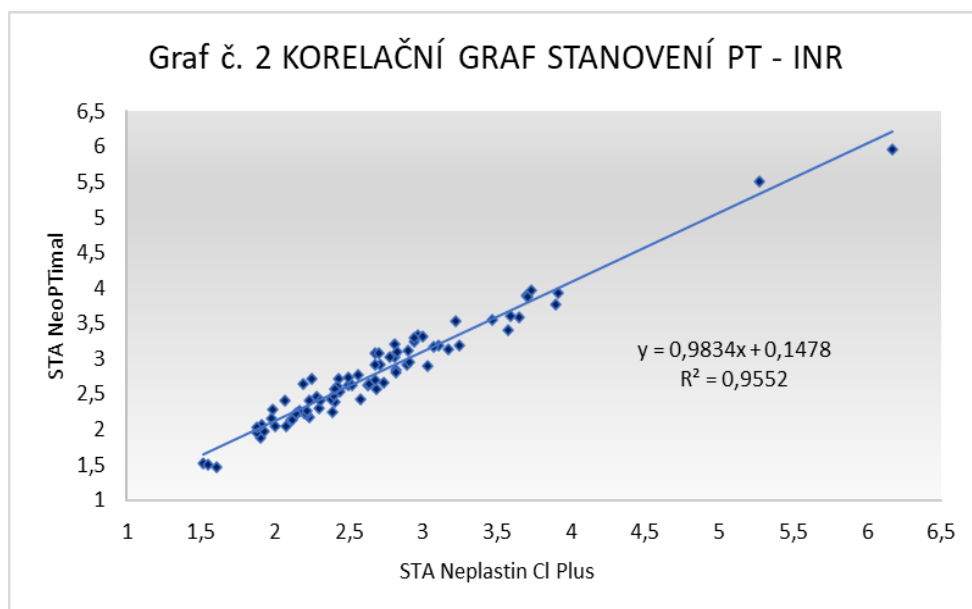
Zdroj: vlastní zpracování

7.9.2 Hodnocení grafů stanovení PT – INR u pacientů s kumarinovou léčbou

U pacientů léčených antagonisty vitamínu K porovnáváme hodnoty INR naměřené původní a novou reagentií. Rovnice přímky je v tomto souboru ($y =$

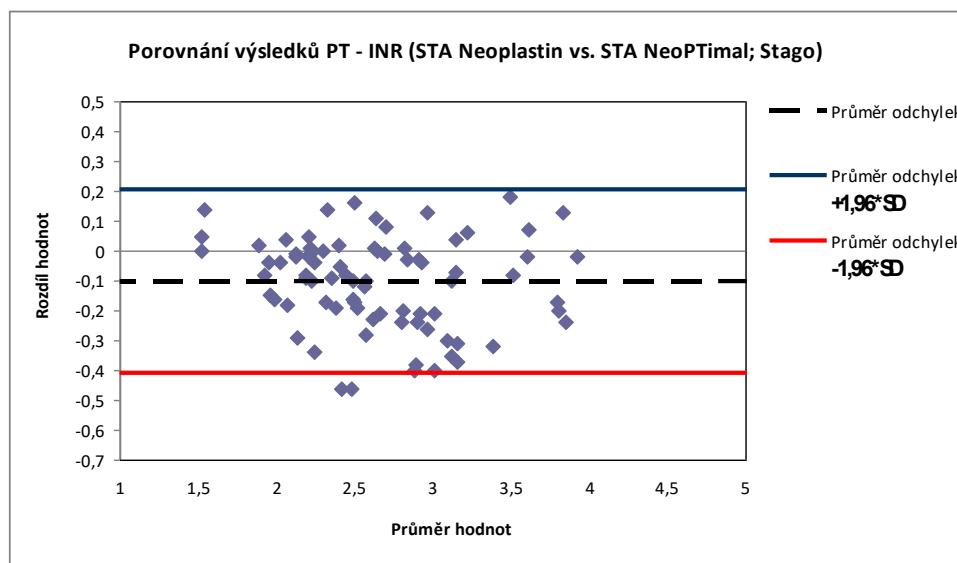
$0,9834x+0,1478$; $R^2 = 0,9552$) a korelační koeficient ($r = 0,9773$), vyšel velmi blízko hodnotě 1, což poukazuje na těsnou korelaci mezi měřením metodami reagenciemi STA Neoplastin CI Plus a STA NeoPTimal. U stanovení PT – INR je korelace lepší než u stanovení PT – R. Z naměřených hodnot viz. tabulka č. 13 je také patrné, že hodnoty naměřené oběma reagenciemi nevykazují klinicky významné rozdíly. Z Bland – Altmanova grafu je patrná opět velmi dobrá shoda mezi výsledky naměřenými oběma reagenciemi. Rozdíly hodnot na ose y jsou ve velmi úzkém intervalu od -0,4 do +0,2. a hodnota průměru odchylek (přerušovaná čára) se nachází na hodnotě -0,1, což nás informuje o tom, že celkově jsou hodnoty měřené novou reagentií STA NeoPTimal vyšší než hodnoty měřené reagentií STA Neoplastin CI Plus. Rozdíl je ale minimální.

Graf 3 – Korelační graf stanovení PT – INR u pacientů s kumarinovou léčbou



Zdroj: vlastní zpracování

Graf 4 – Bland – Altmanův graf stanovení PT – INR u pacientů s kumarinovou léčbou

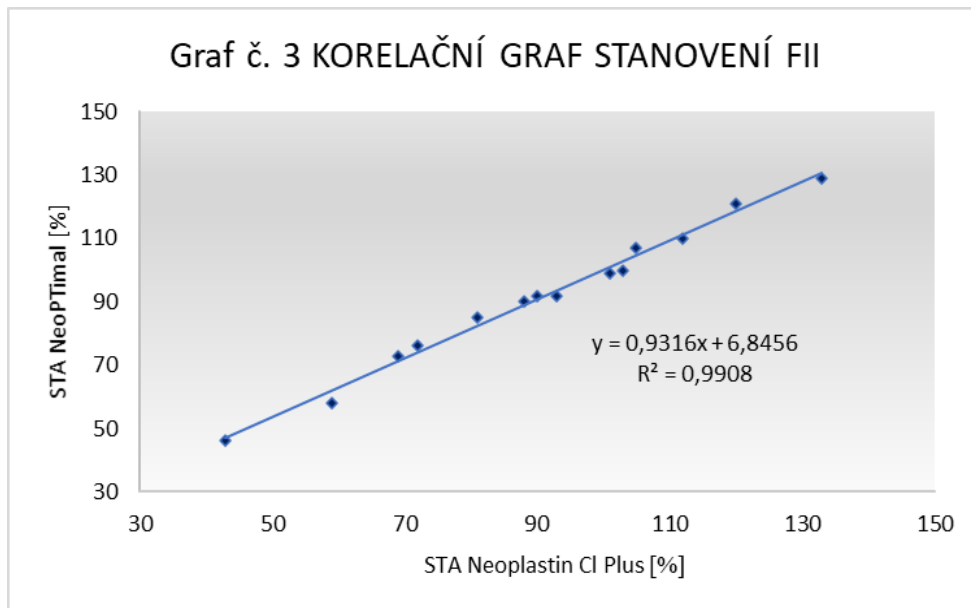


Zdroj: vlastní zpracování

7.9.3 Hodnocení grafů stanovení funkční aktivity faktorů II, V, VII a X

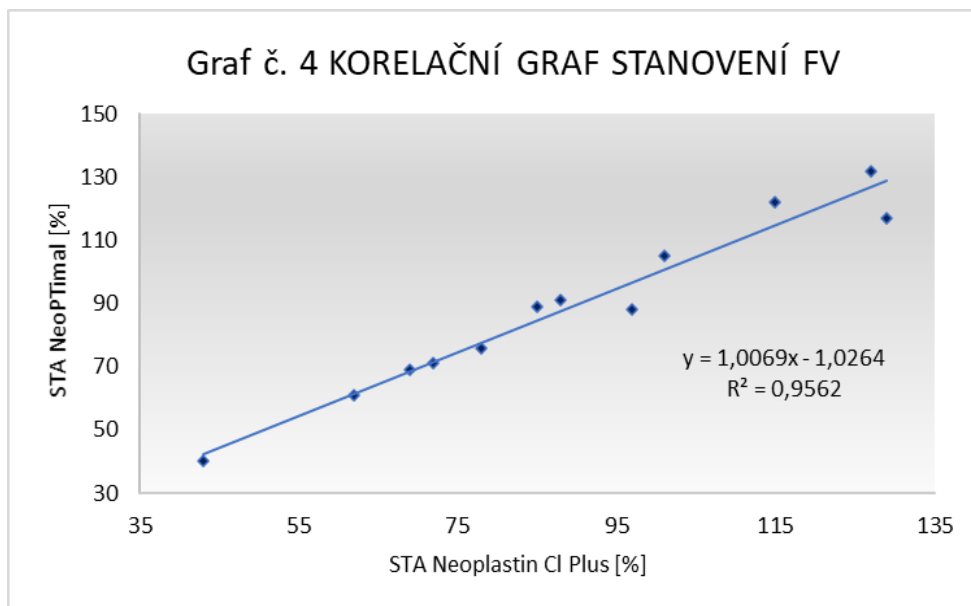
Porovnání výsledků funkční aktivity faktorů vnější koagulační cesty naměřených původní reagensií STA Neoplastin CI Plus a novou reagensií STA NeoPTimal bylo provedeno pouze metodou lineární regrese. Korelační závislost výsledků naměřených oběma reagensiemi jsem vyjádřila rovnicí přímky a hodnotou korelačního koeficientu. Korelační grafy pro jednotlivé faktory vnější cesty koagulace jsou zobrazením regresní přímky. Hodnoty byly do grafu zadávány v procentech. Rovnice přímky je pro FII ($y = 0,9316x + 6,8456$; $R^2 = 0,9908$) a korelační koeficient pro FII ($r = 0,9953$). Rovnice přímky je pro FV ($y = 1,0069x - 1,0264$; $R^2 = 0,9562$) a korelační koeficient pro FV ($r = 0,9779$). Rovnice přímky je pro FVII ($y = 0,9766x + 1,5857$; $R^2 = 0,9904$) a korelační koeficient pro FVII ($r = 0,9951$). Rovnice přímky je pro FX ($y = 0,9139x + 8,7061$; $R^2 = 0,962$) a korelační koeficient pro FX ($r = 0,9808$). Všechny korelační koeficienty se pohybují ve velmi těsné blízkosti hodnoty 1, což poukazuje na těsnou korelaci výsledků naměřených reagensiemi STA Neoplastin CI Plus a STA NeoPTimal. Z naměřených hodnot viz. tabulky č. 14, č. 15, č. 16 a č. 17 je patrné, že hodnoty naměřené oběma reagensiemi se těsně shodují.

Graf 5 – Korelační graf stanovení funkční aktivity faktoru II



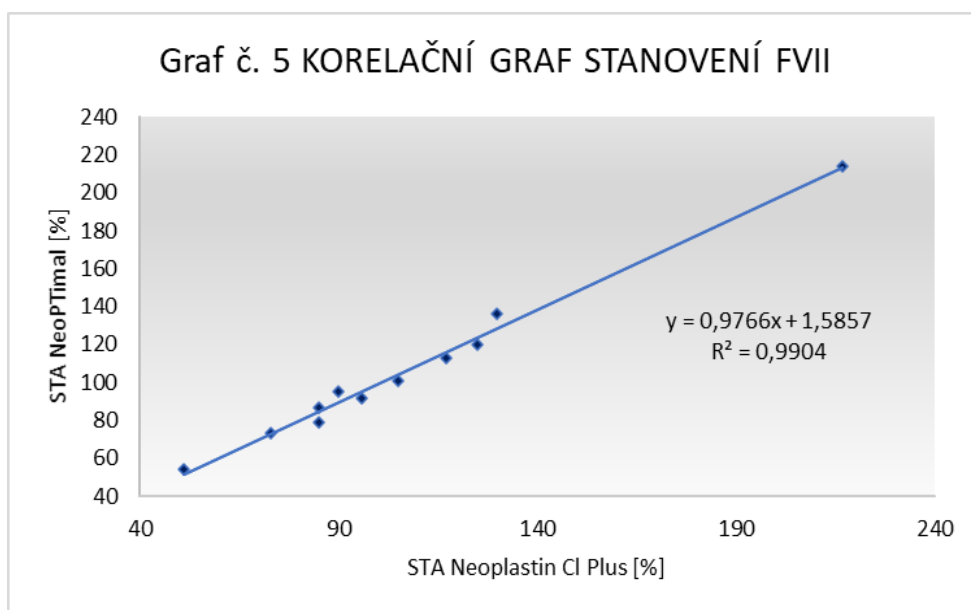
Zdroj: vlastní zpracování

Graf 6 – Korelační graf stanovení funkční aktivity faktoru V



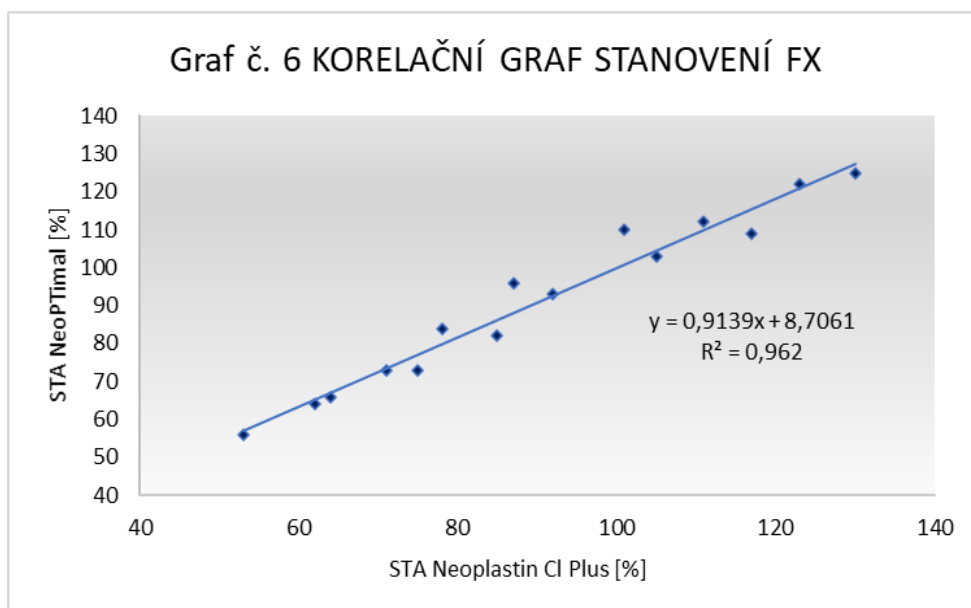
Zdroj: vlastní zpracování

Graf 7 – Korelační graf stanovení funkční aktivity faktoru VII



Zdroj: vlastní zpracování

Graf 8 – Korelační graf stanovení funkční aktivity faktoru X



Zdroj: vlastní zpracování

8. DISKUSE

Protrombinový test je rutinní koagulační vyšetření, používané pro monitorování vnější cesty koagulace, jež odráží funkční aktivitu faktorů II, V, VII, X a fibrinogenu. Používá se také k monitorování antikoagulační léčby antagonisty vitamínu K. U protrombinového testu sledujeme koagulační čas a jeho případné prodloužení. To může poukazovat např. na nedostatečnou funkční aktivitu některého z faktorů vnější cesty koagulace, nedostatek vitamínu K, onemocnění jater, antikoagulační léčbu nebo přítomnost inhibitoru. Stejná reagencie jako na protrombinový test se využívá také na stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů vnější cesty.

Jako reagencie se dnes používají pouze komerční kity s CE značkou. Jejich výroba podléhá přísným výrobním postupům a zajišťuje požadovanou kvalitu reagencí. Přesto je potřeba, aby si každá laboratoř v případě zavádění nové reagencie provedla vlastní srovnávací studii, která porovná novou reagencii s původní, dosud používanou.

V případě naší studie jsme porovnávali výsledky protrombinového testu a hodnoty funkční aktivity faktorů vnější koagulační cesty naměřené starší reagencí STA Neoplastin CI Plus od firmy Stago a nově používané reagencie STA NeoPTimal od firmy Stago. U protrombinového testu jsme do vyšetřovaného souboru pacientů zařadili 86 pacientů bez léčby antagonisty vitamínu K a 82 pacientů léčených kumariny. Pro stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů bylo do studie zařazeno 14 pacientů pro faktor II, 12 pacientů pro faktor V, 11 pacientů pro faktor VII a 15 pacientů pro faktor X. Změření na koagulometru pomocí obou reagencí bylo provedeno současně.

Naměřené hodnoty jsme zaznamenali do tabulek a výsledky jednotlivých metod naměřených původní a novou reagencí vynesli do korelačních grafů. Výsledky protrombinového testu jsme rozdělili na skupinu pacientů neléčených antagonisty vitamínu K, zde jsme porovnávali poměr R a na skupinu pacientů léčených antagonisty vitamínu K, u kterých jsme porovnávali INR. Obě skupiny u protrombinového testu jsme vyhodnotili také pomocí Bland – Altmanova grafu.

Korelaci jsme vyjádřili pro každou metodu rovnicí regresní přímky a korelačním koeficientem. U všech metod jsme dosáhli hodnoty korelačního koeficientu vyšší než $r = 0,97$, což ukazuje na velice dobrou korelaci výsledků naměřených původní a novou reagencí. Také vyhodnocení pomocí Bland – Altmanova grafu ukazuje na velkou shodu naměřených výsledků, což hodnotíme pomocí šíře intervalu rozdílů hodnot a

pomocí hodnoty průměru rozdílů hodnot. (viz kapitola Výsledky a jejich statistické hodnocení)

Z naměřených výsledků je jasně patrné, že rozdíly mezi hodnotami naměřenými původní reagensí STA Neoplastin CI Plus a novou reagensí STA NeoPTimal jsou minimální, což ukazuje, že obě reagensie jsou velmi citlivé a měří se srovnatelnou přesností. Naši studií nedokážeme potvrdit tvrzení výrobce, že nová reagensie STA NeoPTimal má vyšší citlivost než reagensie původní, nicméně dle našich výsledků se zdá citlivost obou reagensí ve většině případů srovnatelná. Nová reagensie STA NeoPTimal tak bude minimálně stejně citlivá a přesná jako reagensie původní.

9. ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce jsem stručně popsala základní informace o hemostáze, které jsou nezbytné k pochopení dané problematiky a zpracování praktické části této práce. Jsou zde uvedeny informace o vývoji hemostázy, složkách důležitých pro hemostázu, mechanismech fungování a regulačních systémech hemostázy. Dále jsem v teoretické části popsala základní hemokoagulační vyšetření, zejména se zaměřením na ta vyšetření, která jsou náplní praktické části bakalářské práce.

Praktická část byla zaměřena na zavedení nové reagentie do provozu hematologické laboratoře. Vlastnímu zavedení reagentie předchází zpracování srovnávací studie, která porovná na souboru patientských vzorků novou reagentii s reagentií původní. V našem případě jsme porovnávali novou reagentii STA NeoPTimal firmy Stago s původní reagentií STA Neoplastin CI Plus. Tato reagentie se používá k vyšetření protrombinového testu a ke stanovení funkční aktivity faktorů II, V, VII a X. Proto jsme porovnávali výsledky všech těchto metod. U protrombinového testu jsme soubor vzorků rozdělili na skupinu bez a skupinu s léčbou antagonisty vitamínu K. V první skupině jsme porovnávali poměr R, ve druhé INR.

Naměřené výsledky jednotlivých metod byly vyhodnoceny metodou lineární regrese a vyneseny do korelačního grafu, u hodnot PT – R a PT – INR i do Bland – Altmanova grafu. Statistickým vyhodnocením výsledků jsme dospěli k závěru, že výsledky naměřené původní i novou reagentií spolu velmi dobře korelují ve všech vyšetřovaných metodách.

Rozdíly mezi naměřenými hodnotami reagentií STA Neoplastin CI Plus a reagentií STA NeoPTimal jsou minimální, což ukazuje, že obě reagentie jsou velmi citlivé a měří se srovnatelnou přesností. Nová reagentie tak může zcela nahradit reagentii původní.

10. POUŽITÉ ZKRATKY

ADP	adenosindifosfát
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
AT	antitrombin
α_2 AP	α_2 – antiplazmin
α_2 MG	α_2 – makroglobulin
β TG	β – tromboglobulin
Ca ²⁺	vápenaté ionty
DF3	destičkový faktor 3
PF4	destičkový faktor 4
FB	fibronectin
FDP	fibrin/fibrinogen degradační produkty
FI, FIa	faktor I fibrinogen a jeho aktivovaná forma
FII	faktor II protrombin
FIIa	faktor II trombin (aktivovaná forma)
FIV	faktor IV vápenaté ionty
FV, FVa	faktor V proakcelerin a jeho aktivovaná forma
FVII, FVIIa	faktor VII prokonvertin a jeho aktivovaná forma
FVIII, FVIIIa	faktor VIII antihemofilický faktor A a jeho aktivovaná forma
FIX, FIXa	faktor IX Christmas faktor a jeho aktivovaná forma
FX, FXa	faktor X Stuart – Prower faktor a jeho aktivovaná forma
FXI, FXIa	faktor XI Rosenthalův faktor a jeho aktivovaná forma
FXII, FXIIa	faktor XII Hagemanův faktor a jeho aktivovaná forma
FXIII, FXIIIa	faktor XIII faktor stabilizující fibrin a jeho aktivovaná forma
GP	glykoproteiny
GP Ia/IIa/IIb	glykoproteinový komplex Ia/IIa/IIb

GP Ib/V/IX	glykoproteinový komplex Ib/V/IX
GP IIb/IIIa	glykoproteinový komplex IIb/IIIa
HC II	heparin kofaktor II
HMWK	vysokomolekulární kininogen
INR	mezinárodní normalizovaný poměru u PT
ISI	mezinárodní index citlivost
LDL – cholesterol	nízkodenzitní lipoprotein cholesterolu
LIS	laboratorní informační systém
NO	oxid dusnatý
PAI	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PAI – 1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PAI – 2	inhibitor aktivátoru plazminogenu 2
PAI – 3	inhibitor aktivátoru plazminogenu 3
PCI	inhibitor aktivovaného proteinu C
PDGF	destičkový růstový faktor
PIVKA	méně aktivní faktory vznikající při nedostatku vitamínu K
PK	prekalikrein
PI	fosfolipidy
PT	Protrombinový test
r	korelační koeficient
R ²	hodnota spolehlivosti
ReT	Reptilázový test
TAFI	inhibitor fibrinolýzy aktivovaný trombinem
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TGT	Trombin generační test

TM	trombomodulin
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TT	Trombinový test
TXA ₂	tromboxan A ₂
uPA	urokinázový aktivátor plazminogenu
vWF	von Willebrandův faktor
WHO	Světová zdravotnická organizace
(Va.Xa.Ca ²⁺ .Pl)	protrombináza
(VIIIa.IXa.Ca ²⁺ .Pl)	vnitřní tenáza
(VIIa.TF.Ca ²⁺ .Pl)	vnější tenáza

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Stabilita reagensí pro metodu protrombinového testu.....	37
Tabulka 2 – Stabilita reagensí pro stanovení funkční aktivity FII	37
Tabulka 3 – Stabilita reagensí pro stanovení funkční aktivity FV	38
Tabulka 4 – Stabilita reagensí pro stanovení funkční aktivity FVII	39
Tabulka 5 – Stabilita reagensí pro stanovení funkční aktivity FX	39
Tabulka 6 – Použité reagensie při naší analýze	40
Tabulka 7 – Nastavení koagulometru pro protrombinový test	40
Tabulka 8 – Nastavení koagulometru pro stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů II, V, VII a X	40
Tabulka 9 – Fyziologické hodnoty	41
Tabulka 10 – Stabilita reagensí pro kalibraci přístroje.....	42
Tabulka 11 – Stabilita reagensí pro kontrolu kvality	43
Tabulka 12 – Naměřené hodnoty u pacientů neléčených kumarinovými preparáty.....	66
Tabulka 13 – Naměřené hodnoty u pacientů léčených kumarinovými preparáty	69
Tabulka 14 – Naměřené hodnoty u pacientů pro koagulační faktor II.....	72
Tabulka 15 – Naměřené hodnoty u pacientů pro koagulační faktor V.....	73
Tabulka 16 – Naměřené hodnoty u pacientů pro koagulační faktor VII	74
Tabulka 17 – Naměřené hodnoty u pacientů pro koagulační faktor X.....	74

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Role trombocytů v hemostáze	16
Obrázek 2 – Schéma koagulačních dějů	21
Obrázek 3 – Přeměna fibrinogenu na fibrin.....	23
Obrázek 4 – Průběh fibrinolýzy	25

Obrázek 5 – Automatický koagulometr STA-R Evolution II.....	34
---	----

13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Korelační graf stanovení PT – R u pacientů bez kumarinové léčby	46
Graf 2 – Bland – Altmanův graf stanovení PT – R u pacientů bez kumarinové léčby...	46
Graf 3 – Korelační graf stanovení PT – INR u pacientů s kumarinovou léčbou.....	47
Graf 4 – Bland – Altmanův graf stanovení PT – INR u pacientů s kumarinovou léčbou	48
Graf 5 – Korelační graf stanovení funkční aktivity faktoru II.....	49
Graf 6 – Korelační graf stanovení funkční aktivity faktoru V.....	49
Graf 7 – Korelační graf stanovení funkční aktivity faktoru VII.....	50
Graf 8 – Korelační graf stanovení funkční aktivity faktoru X.....	50

14. POUŽITÁ LEITERATURA

1. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu – Fyziologie a patologie hemostázy*. Český Těšín: FINIDR, s.r.o., 2004. ISBN 80-86682-03-X.
2. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu – Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín: FINIDR, s.r.o., 2006. ISBN 80-86682-02-1.
3. PENKA, Miroslav, TESAŘOVÁ, Eva. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
4. MATÝŠKOVÁ, Miloslava a Ingrid HRACHOVINOVÁ. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999. ISBN 80-7013-278-7.
5. PENKA, Miroslav. *Hematologie I – Neonkologická Hematologie*. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-247-0023-9.
6. NOSÁL', Radomír a Viera JANČINOVÁ. *Krvné doštičky v biológii a medicíne*. Bratislava: Veda, 1990. ISBN 80-224-0124-2.
7. PECKA, Miroslav a Milan BLÁHA. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art, 2010. ISBN 978-80-903871-9-5.
8. KUBISZ, Peter a Miroslava DOBROTOVÁ. *Hematológia a transfuziológia: učebnica*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1779-4.

9. PENKA, Miroslav, Igor PENKA a Jaromír GUMULEC. *Krvácení*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-0689-4.
10. KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
11. LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
12. FONTANA, Josef a Petra LAVRÍKOVÁ. Funkce buněk a lidského těla: Hemostáza. *Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta* [online]. [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: <http://fblt.cz/skripta/v-krev-a-organy-imunitniho-systemu/4-hemostaza/>
13. Fibrinolysis: D-Dimer Assays. *Practical - Haemostasis.com: Sang Medicine* [online]. 2020, 26.3.2020 [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: https://practical-haemostasis.com/Fibrinolysis/d_dimers.html
14. COLMAN, Robert W. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. ISBN 0-7817-1455-9.
15. WAXMAN, Evan, J. B. Alexander ROSS, Thomas M. LAUE, Arabinda GUHA, S. V. THIRUVIKRAMAN, T. C. LIN, William H. KONIGSBERG a Yale NEMERSON. Tissue factor and its extracellular soluble domain: the relationship between intermolecular association with factor VIIa and enzymic activity of the complex. *Biochemistry* [online]. 2002, 31(16), 3998-4003 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1021/bi00131a015. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00131a015>

16. SCHERAGA, Harold A., Jules A. SHAFER a Deborah L. HIGGINS. Human Fibrinogen. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* [online]. 2008, 26(1), 1-41 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.3109/10408368809105888. ISSN 0590-8191. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408368809105888>
17. DYR, Jan E., Birger BLOMBÄCK, Birgit HESSEL a František KORNALÍK. Conversion of fibrinogen to fibrin induced by preferential release of fibrinopeptide B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 1989, 990(1), 18-24 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1016/S0304-4165(89)80006-6. ISSN 03044165. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416589800066>
18. OSTERUD, B. a S. I. RAPAPORT. 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* [online]. 1977, 74(12), 5260-5264 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5260. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.74.12.5260>
19. HOFFMAN, Maureane, Dougald M. MONROE a Harold R. ROBERTS. Cellular Interactions in Hemostasis. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* [online]. 2004, 26(1), 12-16 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1159/000217233. ISSN 1424-8832. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/217233>
20. TOLLEFSEN, D M a M K BLANK. Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1981, 68(3), 589-596 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1172/JCI110292. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/110292>

21. ESMON, Charles T. *Protein S and protein C. Trends in Cardiovascular Medicine* [online]. 1992, 2(6), 214-219 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1016/1050-1738(92)90027-P. ISSN 10501738. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/105017389290027P>
22. HENDL, Jan. *Statistické přístupy k porovnání biomedicínských metod měření*. Fakulta tělesné výchovy a sportu, Univerzita Karlova [online]. Praha: UK FTVS [cit. 2020-04-05]. Dostupné z: <http://web.ftvs.cuni.cz/hendl/metodologie/blandaltmanclanek1.pdf>
23. LAPELUSA, Andrew a Heeransh D. DAVE. Physiology, Hemostasis. *StatPearls [Internet]* [online]. StatPearls Publishing, 2019, Poslední aktualizace 12.10.2019 [cit. 2020-04-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545263/>
24. AACC. Prothrombin Time and International Normalized Ratio: (PT/INR). *AACC: LAB TEST ONLINE* [online]. 2020, 31.1.2020 [cit. 2020-04-10]. Dostupné z: <https://labtestsonline.org/tests/prothrombin-time-and-international-normalized-ratio-ptinr>
25. IKEM. Antikoagulační léčba Warfarinem. *Institut klinické a experimentální medicíny* [online]. Praha: Česká lékárnická komora s odbornou oponenturou Kliniky kardiologie IKEM Praha, 2016, 9.3.2016 [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/warfarin-upozorneni-pri-uzivani/a-2000/>
26. MAYO CLINIC. Prothrombin time test. *Mayo Clinic* [online]. Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2018, 6.11.2018 [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/prothrombin-time/about/pac-20384661>

27. AACC. Partial Thromboplastin Time (PTT, aPTT). *AACC: LAB TESTS ONLINE* [online]. AACC, 2020, 31.1.2020 [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <https://labtestsonline.org/tests/partial-thromboplastin-time-ptt-aptt>
28. MAYO CLINIC. Activated Partial Thromboplastin Time, Plasma. *Mayo Clinic Laboratories* [online]. Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2016, 4.11.2016 [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/40935>
29. SINHA, Sanjai. Warfarin. *Drugs.com: Know more. Be sure.* [online]. 2019, 23.1.2019 [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/warfarin.html>
30. AACC. Thrombin Time. *AACC: LAB TESTS ONLINE* [online]. 17.3.2020 [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <https://labtestsonline.org/tests/thrombin-time>
31. NEMOCNICE TŘEBÍČ. Aktivovaný parciální tromboplastinový test. *Nemocnice Třebíč: Hematologie* [online]. [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: https://www.nem-tr.cz/data_14/soubory/81.pdf
32. CHLUMSKÝ, Jaromír. *Antikoagulační léčba*. Praha: Grada, 2005. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-9061-0.
33. TRILOBYTE. Kalibrace. *TriloByte Statistical Software* [online]. [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <https://www.trilobyte.cz/downloadfree/qcemanual/calibration.pdf>
34. JABOR, Antonín. Korelační koeficient. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi* [online]. 2004, 29.9.2004 [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <http://www.demo4.smitka.eu/encyklopedie/A/AJDLN.htm>

35. JABOR, Antonín. Blandův a Altmanův graf (rozdílový graf. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi* [online]. 2002, 23.7.2002 [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <http://www.demo4.smitka.eu/encyklopedie/A/AJDNL.htm>
36. PECKA, Miroslav. Doporučení ČHS ČLS JEP k vyjadřování výsledku protrombinového testu. *Česká hematologická společnost ČLS JEP* [online]. 2015 [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: http://hematology.cz/doporuzeni/laboratorni_sekce/files/archiv/2019/Doporuzeni_LS_CHS_CLS_JEP-K_vyjadrovani_vysledku_PT_v02.pdf
37. BARROW, David A. a Richard L. RULLMAN. *Method of preparing a thromboplastin extract*. USA. 5254350 424/570. Uděleno 10/19/1993. Zapsáno 07/22/1991. Dostupné také z: <http://www.freepatentsonline.com/5254350.html>
38. LAFFAN, Mike a Riachard MANNING. Dacie and Lewis Practical Haematology: Investigation of haemostasis – Tromboplastin. *ScienceDirect* [online]. Dacie and Lewis Practical Haematology (Twelfth Edition), 2017, 2006 [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/thromboplastin>
39. HAWKINS, Pamela L.H. a James R. MAYNARD. *Extraction method for preparing thromboplastin reagents*. USA. 5270451 530/381. Uděleno 12/14/1993. Zapsáno 08/06/1992. Dostupné také z: <http://www.freepatentsonline.com/5270451.html>
40. Rekombinantní faktory: co jsou zač a jak se získávají? *Hemofilie.cz* [online]. [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: <https://www.hemofilie.cz/clanky-o-hemofilii/rekombinantni-faktory-co-jsou-zac-a-jak-se-ziskavaji-814>

41. Standardní operační postup technický (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 008 Faktor II, verze 08, 5.3.2019
42. Standardní operační postup technický (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 009 Faktor V, verze 08, 5.3.2019
43. Standardní operační postup technický (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 010 Faktor VII, verze 09, 5.3.2019
44. Standardní operační postup technický (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 026 Faktor X, verze 08, 5.3.2019
45. Standardní operační postup technický (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 002 Protrombinový test, verze 10, 5.3.2019
46. Standardní operační postup technický (SOPT) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 010 Návod na obsluhu, kontrolu a údržbu analyzátoru STA-R Evolution, verze 03, 1.9.2017
47. JAN, Trbušek. *Koagulační vyšetření v rámci laboratorní automatizace a řešení firmy Stago* [online]. In: . Biomedica ČS, 2019, slide 28 [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/112985478-Koagulacni-vysetreni-v-ramci-laboratorni-automatizace-a-reseni-firmy-stago-biomedica-cs-rndr-jan-trbusek-ph-d-biomedica-cs-s-r-o.html>
48. Příbalový leták diagnostické soupravy STA – NeoPTimal
49. Příbalový leták diagnostické soupravy STA Neoplastin Cl Plus

15. PŘÍLOHY

Tabulka 12 – Naměřené hodnoty u pacientů neléčených kumarinovými preparáty

Číslo vzorku	Poměr časů R (STA Neoplastin CI Plus)	Poměr časů R (STA NeoPTimal)
1	1,08	1,06
2	1,09	1,06
3	0,97	0,91
4	0,94	0,89
5	1,27	1,24
6	1,09	1,06
7	1,16	1,11
8	1,02	0,95
9	1,18	1,17
10	0,98	0,90
11	0,96	0,94
12	1,21	1,27
13	1,15	1,20
14	1,27	1,36
15	0,93	0,89
16	1,01	1,05
17	1,05	1,01
18	1,04	1,03
19	1,47	1,48
20	1,07	1,05
21	1,01	0,97
22	0,95	0,93
23	1,22	1,21

24	0,96	0,91
25	1,18	1,17
26	0,92	0,86
27	0,96	0,91
28	1,00	0,95
29	0,95	0,90
30	1,11	1,11
31	1,08	1,04
32	0,93	0,86
33	1,02	0,96
34	1,24	1,25
35	1,02	1,00
36	0,94	0,93
37	0,95	0,94
38	1,03	1,00
39	1,00	0,94
40	1,28	1,33
41	1,01	0,99
42	0,94	0,93
43	0,92	0,90
44	1,01	1,00
45	0,98	0,98
46	1,03	1,02
47	1,35	1,38
48	0,89	0,83
49	0,98	0,94
50	1,08	1,04

51	1,00	1,01
52	1,10	1,10
53	1,02	0,94
54	1,08	1,06
55	1,01	0,95
56	1,08	1,11
57	0,95	0,94
58	1,42	1,51
59	0,92	0,83
60	0,99	0,98
61	1,07	1,05
62	1,09	1,06
63	1,08	1,09
64	1,04	1,01
65	1,11	1,08
66	1,21	1,21
67	1,11	1,06
68	0,94	0,86
69	1,03	0,98
70	0,99	0,95
71	0,98	0,94
72	0,96	0,93
73	1,08	1,06
74	1,12	1,09
75	1,08	1,09
76	1,20	1,21
77	1,31	1,21

78	0,98	0,94
79	1,13	1,18
80	1,09	1,04
81	1,18	1,15
82	1,11	1,09
83	1,08	1,04
84	1,17	1,08
85	1,12	1,06
86	1,16	1,15

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 13 – Naměřené hodnoty u pacientů léčených kumarinovými preparáty

Číslo vzorku	Poměr časů INR (STA Neoplastin CI Plus)	Poměr časů INR (STA NeoPTimal)
1	3,90	3,77
2	2,74	2,66
3	1,52	1,52
4	1,90	1,88
5	1,61	1,47
6	2,23	2,18
7	3,91	3,93
8	2,00	2,04
9	2,41	2,39
10	2,89	2,92
11	2,11	2,13
12	3,17	3,13
13	2,20	2,22
14	3,11	3,18

15	2,44	2,54
16	2,97	3,34
17	6,17	5,96
18	3,65	3,58
19	3,58	3,40
20	2,08	2,04
21	2,69	2,58
22	1,55	1,50
23	2,63	2,62
24	2,82	2,85
25	1,88	1,96
26	2,30	2,30
27	2,22	2,21
28	2,82	2,81
29	3,25	3,19
30	1,93	1,97
31	2,58	2,42
32	2,21	2,22
33	2,39	2,25
34	3,03	2,90
35	1,91	2,07
36	2,81	3,21
37	2,56	2,77
38	2,41	2,58
39	2,23	2,40
40	1,99	2,28
41	2,81	3,02

42	2,90	3,11
43	3,70	3,90
44	5,27	5,50
45	2,71	2,91
46	2,50	2,62
47	2,52	2,62
48	1,98	2,16
49	2,83	3,09
50	3,00	3,31
51	2,43	2,71
52	2,94	3,24
53	2,50	2,73
54	3,07	3,17
55	2,12	2,13
56	2,38	2,43
57	2,15	2,23
58	2,19	2,65
59	2,40	2,48
60	3,73	3,97
61	2,42	2,61
62	2,28	2,47
63	2,68	3,08
64	3,22	3,54
65	2,70	3,08
66	2,25	2,71
67	3,71	3,88
68	1,88	2,03

69	3,47	3,55
70	2,41	2,57
71	2,31	2,40
72	2,78	3,02
73	2,64	2,64
74	3,59	3,61
75	2,68	2,69
76	2,68	2,92
77	2,17	2,27
78	2,94	3,29
79	2,07	2,41
80	2,14	2,23
81	2,22	2,26
82	2,91	2,95

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 14 – Naměřené hodnoty u pacientů pro koagulační faktor II

Číslo vzorku	Funkční aktivita FII [%] (STA Neoplastin CI Plus)	Funkční aktivita FII [%] (STA NeoPTimal)
1	43	46
2	93	92
3	103	100
4	69	73
5	59	58
6	88	90
7	112	110
8	105	107

9	72	76
10	133	129
11	101	99
12	90	92
13	120	121
14	81	85

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 15 – Naměřené hodnoty u pacientů pro koagulační faktor V

Číslo vzorku	Funkční aktivita FV [%] (STA Neoplastin CI Plus)	Funkční aktivita FV [%] (STA NeoPTimal)
1	72	71
2	97	88
3	43	40
4	69	69
5	62	61
6	129	117
7	88	91
8	115	122
9	127	132
10	101	105
11	85	89
12	78	76

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 16 – Naměřené hodnoty u pacientů pro koagulační faktor VII

Číslo vzorku	Funkční aktivita FVII [%] (STA Neoplastin CI Plus)	Funkční aktivita FVII [%] (STA NeoPTimal)
1	51	54
2	85	79
3	85	87
4	217	214
5	125	120
6	117	113
7	105	101
8	90	95
9	96	92
10	73	73
11	130	136

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 17 – Naměřené hodnoty u pacientů pro koagulační faktor X

Číslo vzorku	Funkční aktivita FVII [%] (STA Neoplastin CI Plus)	Funkční aktivita FVII [%] (STA NeoPTimal)
1	53	56
2	101	110
3	92	93
4	62	64
5	64	66
6	87	96
7	78	84
8	105	103

9	117	109
10	123	122
11	71	73
12	85	82
13	130	125
14	111	112
15	75	73

Zdroj: vlastní zpracování