

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



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Zavedení metody k monitorování léčby dabigatranem
na principu ekarinového testu**

Eva Velecká

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Poděkování

Mé poděkování patří zejména panu RNDr. Petru Sadílkovi, Ph.D. za jeho pomoc a cenné rady při odborném vedení této bakalářské práce, jeho vstřícný přístup a nekonečnou trpělivost a také čas, který věnoval opravám této bakalářské 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 12. 5. 2021

Eva Velecká

OBSAH

1	ABSTRAKT	6
2	ABSTRACT.....	7
3	ÚVOD.....	8
4	ZADÁNÍ, CÍL PRÁCE.....	10
5	TEORETICKÁ ČÁST	11
5.1	HEMOSTÁZA	11
5.1.1	<i>Primární hemostáza</i>	11
5.1.2	<i>Plazmatický koagulační systém</i>	12
5.1.3	<i>Fibrinolytický systém</i>	17
5.1.4	<i>Systém inhibitorů hemostázy</i>	17
5.2	MOŽNOSTI ANTIKOAGULAČNÍ LÉČBY A JEJÍHO MONITOROVÁNÍ	20
5.2.1	<i>Antagonisté vitamínu K</i>	20
5.2.2	<i>Nepřímé inhibitory trombinu a aktivovaného faktoru Xa</i>	22
5.2.3	<i>Přímá orální antikoagulancia (DOACs)</i>	24
6	PRAKTICKÁ ČÁST	28
6.1	VYŠETŘOVANÝ MATERIÁL	28
6.2	AUTOMATICKÝ KOAGULOMETR STA-R EVOLUTION.....	29
6.3	PRINCIPY POUŽITÝCH METOD.....	30
6.3.1	<i>Koagulační metoda s reagensy firmy Hyphen BioMed</i>	30
6.3.2	<i>Spektrofotometrická metoda s reagensy firmy Stago</i>	30
6.4	REAGENCIE	32
6.4.1	<i>Reagencie pro koagulační metodu (Hyphen BioMed)</i>	32
6.4.2	<i>Reagencie pro spektrofotometrickou metodu (Stago)</i>	32
6.4.3	<i>Příprava reagensů Hyphen</i>	33
6.4.4	<i>Příprava reagensů Stago</i>	34
6.5	NASTAVENÍ PŘÍSTROJE.....	34
6.6	KALIBRACE METOD.....	35
6.7	KONTROLA KVALITY.....	37
6.8	PRACOVNÍ POSTUP	38
6.9	VÝSLEDKY A JEJICH STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	40

7	DISKUZE	43
8	ZÁVĚR	45
9	POUŽITÉ ZKRATKY	46
10	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	48
11	SEZNAM TABULEK	48
12	SEZNAM GRAFŮ	48
13	LITERATURA	49
14	PŘÍLOHY	54

1 ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá zavedením nové metody k monitorování antikoagulační léčby dabigatranem do provozu hematologické laboratoře.

Teoretická část se zabývá stručným popisem procesu hemostázy, jejími složkami, regulací, ale také možnostmi antikoagulační léčby a jejím monitorováním, především novým přímým inhibítorem trombinu, dabigatranem (Pradaxa).

Praktická část je založena na provedení srovnávací studie referenční (koagulační) a nové (spektrofotometrické) metody, jejímž cílem je ověřit, zda obě metody poskytují srovnatelné výsledky a zda tedy může být nová metoda k monitoraci léčby dabigatranem zavedena do laboratorního provozu. Srovnávací studie porovnává výsledky koncentrace dabigatranu v plazmě naměřené referenční koagulační metodou s reagensy firmy Hyphen BioMed s výsledky naměřenými novou spektrofotometrickou metodou s reagensy firmy Stago. V rámci této studie bylo vyšetřeno 57 vzorků plazmy pacientů FN HK, které byly měřeny současně referenční i novou metodou. Výsledky srovnávací studie byly vyhodnoceny metodou lineární regrese a pomocí Bland-Altmanova grafu.

Statistické vyhodnocení s použitím lineární regrese vypovídá o velmi vysoké vzájemné korelaci obou metod, o čemž vypovídá rovnice přímky $y=0,9675x+0,8712$ a hodnota korelačního koeficientu $r = 0,9975$. Rovněž Bland-Altmanův graf ukazuje na velkou shodu výsledků naměřených současně referenční koagulační metodou a novou spektrofotometrickou metodou.

Z výsledků provedené srovnávací studie vyplývá, že obě metody poskytují srovnatelné výsledky a nová spektrofotometrická metoda na principu ekarinového testu s reagensy firmy Stago tak může být zavedena do laboratorního provozu.

Klíčová slova: hemostáza, dabigatran, dilutovaný trombinový test, ekarinový test, srovnávací studie

2 ABSTRACT

This bachelor thesis deals with introduction of a new method for treatment monitoring of an anticoagulant therapy with dabigatran in the lab of hematology.

The theoretical part introduces you a brief description of the process of hemostasis, its components, regulation, but it also includes options of the anticoagulant therapy and its monitoring, especially new direct thrombin inhibitor, dabigatran (Pradaxa).

The practical part is based on performing a comparative study of reference (coagulation) and new (spectrophotometrical) method in order to find out whether the methods provide comparable results and whether the new method for dabigatran monitoring may be introduced into the lab. The comparative study compares plasma concentrations of dabigatran measured both by the reference coagulation method with Hyphen BioMed reagents and the new spectrophotometrical method with Stago reagents. In this study we examined 57 plasma samples from FN HK patients, which were measured using the reference and the new method at the same time. The results of the comparative study were evaluated by linear regression and Bland-Altman plot.

Statistical evaluation using linear regression indicates very high mutual correlation of both methods, which is indicated by the equation $y=0,9675x+0,8712$ and correlation coefficient $r = 0,9975$. The Bland-Altman plot also shows a high agreement between the results measured both by the reference and the new method.

The results of the comparative study confirm that both methods provide comparable results, so the new spectrophotometrical method based on the ecarin test with Stago reagents may be introduced into the lab.

Key words: hemostasis, dabigatran, diluted thrombin time, ecarin test, comparative study

3 ÚVOD

Hemostáza, neboli srážení krve, je sled mnoha reakcí, které postupně vedou k zástavě krvácení v případě poranění cévy. Cílem hemostatických procesů je vytvoření sraženiny, čímž se zabrání případnému vykrvácení a současně zachování tekutosti krve. Hemostatické procesy jsou regulovány na několika úrovních. Defekt jakékoliv regulační složky může vyústit v poruchu krevního srážení, která se může projevit hypokoagulací či hyperkoagulací.

Nastanou-li potíže spojené s hyperkoagulací, přichází na řadu tzv. antitrombotická léčba, jejíž cílem je tlumení hemostatických procesů a zabránění vzniku trombů. Působení antitrombotické léčby je zajištěno na několika úrovních hemostázy – zamezuje shlukování trombocytů, podporuje rozpuštění fibrinové zátky či snižuje hyperkoagulabilitu plazmatického koagulačního systému.

Nejčastěji podávaná antikoagulantia lze na základě mechanismu účinku rozdělit na nepřímé inhibitory trombinu či aktivovaného faktoru X (hepariny), přímé inhibitory trombinu (gatrany) či aktivovaného faktoru X (xabany) a na antikoagulantia zabráňující vzniku plně funkčních faktorů závislých na vitamínu K (kumarinové deriváty).

Pro všechna léčiva musí být zavedena vhodná laboratorní metoda, monitorující jejich účinek nebo koncentraci léčiva v plazmě pacienta. Určité skupiny léčiv podléhají pravidelnému terapeutickému monitorování (např. kumarinové deriváty), při kterém je sledován jejich účinek. V případě nových přímých orálních antikoagulantů (DOACs), mezi které spadají zmíněné gatrany a xabany, není při běžné léčbě pravidelná monitorace potřeba. Přesto musí být zavedena vhodná laboratorní metoda i pro tato léčiva, neboť se objevují situace, kdy je rychlé a přesné stanovení léčiva nezbytně nutné. V současné době je již k dispozici více metod umožňujících laboratorní vyšetření zmíněných antikoagulantů.

V této práci se zaměříme na laboratorní stanovení koncentrace dabigatranu v plazmě. Mezi nejčastěji používané metody patří koagulační metoda na principu dilutovaného předkalibrovaného trombinového testu. Také v hematologické laboratoři FN HK je tato metoda, využívající reagentie firmy Hyphen BioMed, již dlouhou dobu využívána. Alternativou jsou metody spektrofotometrické, používající chromogenní substráty. Před případným zavedením nové metody do laboratorního provozu musí být provedena srovnávací studie s metodou referenční, která prokáže, zda nová metoda vydává srovnatelné výsledky. Srovnávací studie je prováděna na vzorcích pacientů

oběma metodami současně. Výsledky měření je poté nutno statisticky vyhodnotit. V případě, že jsou výsledky naměřené oběma metodami srovnatelné, může být nová metoda zavedena do provozu laboratoře.

4 ZADÁNÍ, CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce je nejprve vysvětlit základy hemostázy, popsat její složky, proces srážení krve a možnosti regulace hemostatických procesů. Pochopení základů hemostázy je potřebné pro další kapitoly teoretické části, které se zabývají možnostmi terapeutického ovlivnění hemostázy u pacientů s rizikem trombotických komplikací a dále možnostmi laboratorního monitorování podávané antikoagulační léčby.

Cílem praktické části je zavedení nové spektrofotometrické metody k monitorování léčby dabigatranem do běžného laboratorního provozu. V rámci srovnávací studie porovnat výsledky získané metodou referenční koagulační, využívající reagentie firmy Hyphen BioMed s výsledky naměřenými novou spektrofotometrickou metodou, s reagentiemi firmy Stago. Naměřené výsledky poté statisticky vyhodnotit a porovnat jejich vzájemnou shodu.

5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Hemostáza

Hemostáza, neboli krevní srážení, je komplexní děj, skládající se z několika navzájem souvisejících kroků vedoucích k zástavě krvácení. K aktivaci hemostatických mechanismů dochází v případě poranění cévní výstelky a po narušení integrity cévy. Po poranění endotelu je cílem všech hemostatických mechanismů vytvoření konečného produktu – fibrinové zátky, která finálně zastavuje krvácení a vytváří sraženinu (koagulum) pouze v místě poranění a současně zachovává fluiditu krve. (1, 2)

Všechny fáze hemostázy musí být regulovány tak, aby byla zachována rovnováha mezi sklony ke krvácení (hypokoagulaci) a nadměrnému srážení (hyperkoagulaci), což jsou stavy vedoucí k trombóze. (2)

Mezi hlavní složky hemostázy patří cévní stěna, jejíž součástí je endotel a subendotelové struktury. Dále tkáňová složka, uvolňující tkáňový faktor (TF) a adenosindifosfát (ADP) v případě poranění. Trombocyty podílející se společně s cévní stěnou na tvorbě primární hemostatické zátky a plazmatický koagulační systém zahrnující koagulační faktory, aktivátory a přirozené inhibitory plazmatického systému vytvářející sekundární fibrinovou zátku. Konečná fáze je poté zprostředkována fibrinolytickým systémem, který zajišťuje částečné rozpuštění fibrinové zátky a tím znovuoobnovení krevního průtoku v místě poranění. (1, 3)

Na základě časové posloupnosti lze fáze hemostázy rozdělit na primární hemostázu (proces vazokonstrikce, adheze, aktivace, agregace trombocytů a následná tvorba primární trombocytové zátky), poté na hemokoagulaci (aktivace koagulačních faktorů a tvorba sekundární fibrinové zátky) a fibrinolýzu (rozpuštění fibrinové zátky). (1, 3)

5.1.1 Primární hemostáza

Proces primární hemostázy je děj, při kterém dochází k vytvoření primární hemostatické zátky – trombocytového agregátu. Jedná se o fázi, kdy dochází k zacelení narušené cévy a tím k zástavě krvácení. (4)

Vazokonstrikce a poté tvorba primární hemostatické zátky představuje nejrychlejší odpověď organismu na poškození cévní stěny. (5)

Hlavní součásti podílející se na tvorbě primární hemostatické zátky jsou cévní stěna společně s trombocyty. Cévní stěna za fyziologického stavu nepředstavuje pro trombocyty přilnavý povrch, což je zajištěno jak fyzikálními, tak biochemickými faktory. Mezi fyzikální faktory se řadí především záporný náboj trombocytů a endoteliálních buněk, zatímco mezi faktory biochemické povahy patří zejména syntéza inhibitorů aktivace trombocytů, jako je např. oxid dusnatý (NO) a prostacyklin. (1, 6)

Během primární hemostázy dochází k adhezi trombocytů na obnažená kolagenní vlákna v subendoteliálním prostoru, ke změně jejich tvaru a agregaci, čímž se následně vytváří primární hemostatická zátka, tzv. bílý trombus. (2)

Proces adheze je umožněn díky receptorům glykoproteinové (GP) povahy, jako jsou GP Ia/IIa a GP Ib/V/IX, které jsou přítomny na trombocytech a také díky adhezivním proteinům, jako je von Willebrandův faktor (vWf) či fibronektin. Adheze je podporována sekrecí malého množství ADP z okolní tkáně. (1, 3, 4)

Současně s procesem adheze dochází k aktivaci trombocytů, během čehož se mění jejich tvar z diskoidního tvaru na kulovitý s výběžky (pseudopodiemi), zároveň se uvolňuje obsah z alfa a denzních granulí, dochází ke zvýšení koncentrace vápenatých iontů (Ca^{2+}) a také se zvyšuje hustota receptorů na povrchu krevních destiček pro usnadnění agregace. Souběžně dochází k sekreci proagregačních působků, jako je např. destičkový faktor 4 (PF4) či fibrinogen. Za nejsilnějšího agonistu aktivace trombocytů je považován trombin. Dochází také k aktivaci receptorů GP IIb/IIIa. Fenomémem flip-flop se negativně nabitá část fosfolipidů membrány trombocytů dostává na vnější stranu membrány, čímž se umožní navázání koagulačních faktorů. (1, 6)

Nejzásadnějším krokem primární hemostázy je agregace trombocytů, což je jejich vzájemné spojování umožněné membránovým receptorem GP IIb/IIIa přes molekulu fibrinogenu či vWf. Agregace je indukována ADP a tromboxanem A₂ (TXA₂) z granul trombocytů, trombinem, kolagenem, trombospondinem uvolněným trombinem z alfa granulí destiček nebo také působením kyseliny arachidonové. Proagregačními působky se aktivují také další trombocyty a následnou amplifikací procesu dochází postupně k vytvoření tzv. bílého trombu. (1, 4)

5.1.2 Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém zodpovídá za vznik stabilního, nerozpustného fibrinu z fibrinogenu působením trombinu. Trombin vzniká koordinovaným sledem

reakcí postupně vedoucích k vytvoření komplexu *protrombinázy* [FXa.FVa.PL.Ca²⁺], který zajistí aktivaci trombinu z protrombinu. Aktivovaný trombin je poté schopný štěpit fibrinogen na fibrinové monomery, které následně spontánně polymerují. Fibrinové polymery jsou poté propojeny příčnými kovalentními vazbami, což zajišťuje aktivovaný faktor XIII a vzniká tak nerozpustný, stabilní fibrin. (1, 2, 3, 7, 8)

Na koagulačním procesu se podílejí aktivní komplexy, které jsou tvořeny enzymy (serinové proteázy), substráty (proenzymy aktivované proteolýzou), kofaktory (zvyšují účinky serinových proteáz), Ca²⁺ (umožňují vazbu vitamin K dependentních faktorů na fosfolipidové povrchy) a fosfolipidové povrchy (fosfolipidové membrány monocytů či trombocytů či jejich zbytky poskytující na svém povrchu záporně nabitě fosfolipidy – fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin). (1)

Hemokoagulace již není chápána jako přísně kaskádovitý sled reakcí, jako tomu bylo u teorie popisující tzv. vnější a vnitřní cestu aktivace přeměny protrombinu na trombin. V současné době je uznávaný tzv. třístupňový model koagulace (Obr. 1), který říká, že vnější a vnitřní systém neexistují odděleně, nýbrž mezi nimi dochází k řadě interakcí. (1, 9)

5.1.2.1 Koagulační faktory

Vznik fibrinu v plazmatickém koagulačním procesu je zajištěn několika koagulačními faktory, které se označují římskými čísly a v aktivní formě jim je přiřazen index a (např. FXa). Koagulační faktory se v plazmě nacházejí v inaktivní formě a jsou aktivovány procesem limitované proteolýzy. Jedná se o látky, které jsou glykoproteinové povahy a vytvářejí se v játrech, z nichž některé ke své syntéze vyžadují přítomnost vitamínu K. (1, 10)

Koagulační faktory mohou být rozděleny na:

a) Zymogeny (proenzymy)

Jedná se o faktory, které v plazmě kolují v inaktivní formě a proteolytickým štěpením z nich vznikají koagulačně aktivní enzymy, které patří mezi serinové proteázy. K serinovým proteázám řadíme plazmatické faktory (FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII a prekalkrein), proteiny fibrinolýzy (plazminogen, tkáňový aktivátor plazminogenu a urokináza) a nakonec serpiny (protein C). Serinové proteázy jsou hydrolytické enzymy, které umožňují štěpení peptidické vazby. Tyto faktory ve svém aktivním místě obsahují aminokyselinu serin, respektive tzv. katalytickou triádu složenou z aminokyselin Serin-Histidin-Kyselina aspartamová. Aktivní místo má význam zejména pro reakce se substráty, k aktivaci dalších serinových proteáz. Faktory FII, FVII, IX, FX společně s proteinem C a S patří mezi vitamin-K-dependentní faktory. Tyto faktory mají svůj bílkovinný řetězec ukončen glutamovou kyselinou a obsahují tzv. gla oblast – část kyseliny glutamové, ve které se nachází γ -karboxyglutamové zakončení. Vitamin K ve své redukované formě umožňuje karboxylaci této části enzymem γ -glukarboxylázou. Proces je nezbytný pro správnou vazbu těchto faktorů na fosfolipidy pomocí Ca^{2+} . (1, 2, 10)

b) Kofaktory

Úloha kofaktorů spočívá v urychlení reakcí, zvyšují afinitu serinových proteáz k fosfolipidovým povrchům, napomáhají natočit a udržet proenzym v katalytickém místě serinové proteázy. Kofaktory rozlišujeme plazmatické (FV, FVIII, HMWK a protein S) a buněčné (TF). Během proteolytického štěpení dochází ke spojení fragmentů kovalentní vazbou přes Ca^{2+} . TF nepotřebuje být aktivován, je zabudován do buněčné membrány. (1)

c) Substrát

Substrátem v plazmatickém koagulačním systému je fibrinogen, který se nachází v plazmě a v α granulích trombocytů. Je substrátem pro trombin, který jej enzymaticky štěpí na fibrin, ale také pro plazmin, který jej štěpí na fibrinogen degradační produkty. (1, 4)

Tab. 1 Souhrn koagulačních faktorů

I	Fibrinogen
II	Protrombin
III	Tkáňový faktor
IV	Vápenaté ionty
V	Proakcelerin
VII	Prokonvertin
VIII	Antihemofilický faktor A
IX	Christmasův faktor
X	Stuart-Prowerové faktor
XI	Rosenthalův faktor
XII	Hagemanův faktor
XIII	Fibrin stabilizující faktor
Prekalikrein	Fletcherův faktor
HMWK	Vysokomolekulární kininogen

(1, 9; vlastní vypracování)

5.1.2.2 Třístupňový model koagulace

Iniciační fáze

V procesu iniciační fáze koagulačního děje hraje hlavní roli TF, který zprostředkovává ochranu před masivním krvácením. TF je přítomen na celé řadě buněk, jako jsou např. fibroblasty, endoteliální buňky či monocyty. Inicace probíhá zejména na povrchu aktivovaných monocytů. Příčin aktivace monocytů je celá řada, patří zde např. zánět, sepse, metabolický zvrát či aterosklerotické změny. K takto exprimovanému TF se váže FVIIa kolující v krvi a vzniká tak dimerní komplex [TF.VIIa]. Společně se vznikem této vazby dochází k přenosu aktivačních signálů do buňky, které vyvolávají zvýšení koncentrace nitrobuněčného vápníku a aktivaci kináz. Výsledkem je vznik komplexu tzv. *vnější tenázy* [TF.VIIa.Ca²⁺.PL], který aktivuje FIX a především FX, zároveň také dochází ke zvýšení exprese TF. Aktivovaný FX poté aktivuje FV a vytváří na povrchu monocyty komplex *protrombinázy* [FXa.FVa.Ca²⁺.PL], čímž dochází ke genezi malého množství trombinu. Vzniklé množství trombinu není postačující ke vzniku fibrinového koagula, avšak aktivuje faktory V, VIII, XI a trombocyty, které jsou nahromaděny v místě

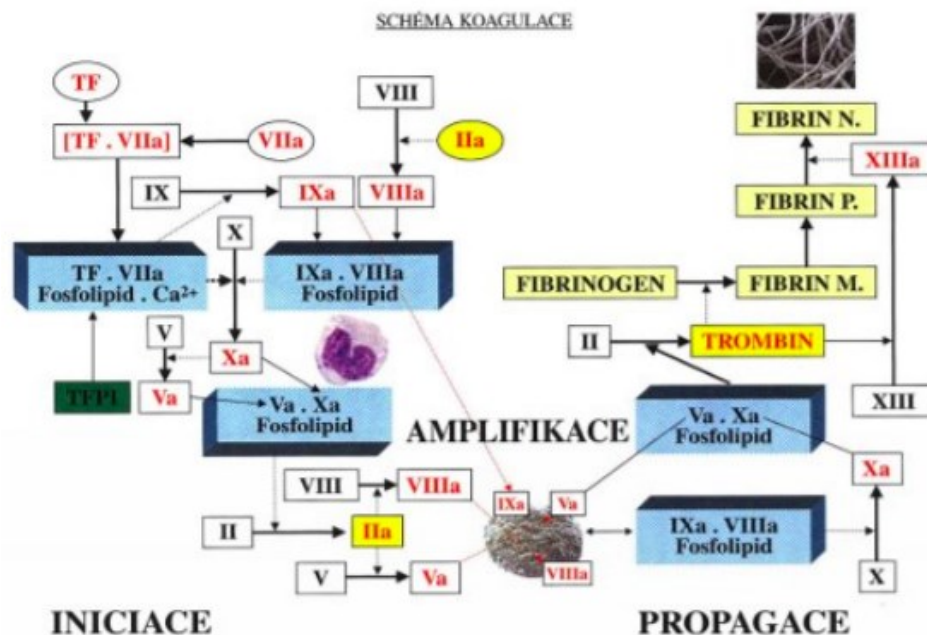
poškození. Hlavním cílem iniciační fáze je tedy vznik malého množství trombinu, který poté zajišťuje pokračování koagulace tzv. amplifikační a propagační fází. (1, 8)

Amplifikační fáze

Během amplifikační fáze dochází k výraznému zesílení a zrychlení koagulace. Dochází k navázání faktorů FVa, FVIIIa, FIXa a FXIa, které byly aktivovány v procesu iniciace na povrch aktivovaných trombocytů. Trombocyty jsou soustředěny v místě poranění a poskytují své záporně nabitě fosfolipidy tzv. flip-flop fenoménem. (1)

Propagační fáze

Propagační fáze zajišťuje vznik dostatečného množství trombinu, který je již schopen efektivní přeměny fibrinogenu na fibrin. V této fázi se uplatňují komplexy *protrombináza* a tzv. *vnitřní tenáza* [FVIIIa.FIXa.Ca²⁺.PL]. Komplexem *vnitřní tenázy* je zajištěna aktivace dalšího FX, který je poté součástí *protrombinázy*. V tomto kroku je *protrombináza* již schopna vytvořit dostatečné množství trombinu potřebné pro přeměnu fibrinogenu. Trombin také hraje roli v aktivaci FXIII, což je faktor zajišťující stabilizaci fibrinové sítě a zároveň aktivuje trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI). (1, 9)



Obr. 1 Schéma třífázového modelu koagulace

(TF – tkáňový faktor, Ca²⁺ - vápenaté ionty, TFPI – inhibitor tkáňového faktoru; zdroj: 1, převzato ze str.

5.1.3 Fibrinolytický systém

Ukončení hemostatického procesu je zprostředkováno fibrinolytickým systémem, který je zodpovědný za rozpuštění fibrinové zátky, čímž se opět obnoví průtok krve v místě poranění. (5)

Zásadní roli zde zastává serinová proteáza plazmin, jehož prekurzorem je plazminogen. Plazmin vzniká z plazminogenu na povrchu fibrinové zátky působením především tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA) a urokinázy (uPA). (5, 11)

Konečné produkty štěpení fibrinogenu a fibrinu se odvíjí od jejich stability a rozpustnosti. Vznikající fragmenty jsou obecně označovány jako fibrin/fibrinogen degradační produkty (FDP). Při štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu dochází ke vzniku fragmentů X a Y (vysokomolekulární) a D a E (nízkomolekulární). Fragmenty X a Y tvoří s monomery fibrinu rozpustné komplexy, čímž jim zabraňují v polymeraci. Při štěpení nerozpustného fibrinu stabilizovaného kovalentními vazbami účinkem FXIIIa jsou konečným produktem tzv. D-dimery. (1, 4, 12)

5.1.4 Systém inhibitorů hemostázy

Systém inhibitorů hemostázy je nezbytný pro udržení hemokoagulační rovnováhy, aby bylo zabráněno nekontrolovatelnému nadměrnému srážení krve během koagulace, které by mohlo vést ke smrti. Hemokoagulační rovnováha je dosažena spoluprací přirozených inhibitorů plazmatického i fibrinolytického systému. Tyto inhibitory jsou zejména proteinové povahy a jsou přirozenou složkou krve. Kromě samotných fyziologických inhibitorů se na regulaci hemostázy také podílí nesmáčivý endotel a tok krve. (1, 4, 9)

5.1.4.1 Přirozené inhibitory plazmatického koagulačního systému

Antitrombin (AT)

AT je jednořetězcový glykoprotein, který se tvoří zejména v játrech, ale také v endotelových buňkách. Jedná se o nejdůležitější inhibitor koagulace. Účinek AT je založen na schopnosti neutralizovat hlavně trombin a FXa, čímž se řadí mezi serpiny (inhibitory serinových proteáz). Jeho syntéza nastává v momentě štěpení fibrinogenu. AT vytváří nevratné komplexy s trombinem a FXa, které jsou poté odbourávány

v monocyto-makrofágovém systému. Tvorbu komplexů značně urychluje přítomnost heparinu. Heparin zároveň umožňuje tvorbu komplexů s jinými proteázami (např. FIXa, FXIa, FXIIa) či s komplexem [TF.FVIIa], které jsou poté také inhibovány. (1, 2, 4, 7, 9)

Heparin kofaktor II (HC II)

HC II je specifický inhibitor trombinu, který je syntetizovaný v játrech a endotelovými buňkami. Jedná se o serpin tvořící s trombinem komplex v poměru 1:1. Inhibice je opět zvýšena v přítomnosti heparinu. Inhibice působením HC II nastává, klesne-li hladina AT pod 30 %. (1)

Systém proteinu C

Systém proteinu C patří mezi velmi významný inhibiční systém. Složkami systému proteinu C jsou protein C, protein S a trombomodulin. Inhibiční účinek spočívá ve štěpení FVa a FVIIIa, což způsobí inhibici vnitřní tenázy společně s protrombinázou, tímto mechanismem je regulována tvorba trombinu. (1, 3, 13)

Protein C je plazmatický glykoprotein vznikající v játrech za účasti vitamínu K. Aktivace proteinu C nastává na povrchu endotelu, kde je přítomen specifický endoteliální receptor trombinu trombomodulin (TM). Trombin po navázání se na TM již není koagulačně aktivní, naopak vykazuje antikoagulační aktivitu tím, že aktivuje protein C. Výsledkem je aktivovaný protein C (APC), který v přítomnosti fosfolipidů a Ca^{2+} inaktivuje faktory Va společně s VIIIa. (1, 7)

Protein S je glykoprotein, který je tvořen v játrech a ke své syntéze vyžaduje vitamin K. Protein S působí zejména jako kofaktor APC, jelikož v přítomnosti Ca^{2+} umožňuje vazbu APC na fosfolipidy trombocytů. (1, 2)

Inhibitor tkáňového faktoru (TFPI)

TFPI patří mezi serpiny a představuje hlavní inhibitor vnější cesty koagulace. TFPI působí buď jako přímý inhibitor FXa nebo s ním vytváří koagulačně inaktivní komplex. V případě přímé inhibice FXa je reakce podporována heparinem. Tvorba inaktivního komplexu [TFPI.Xa.VIIa.TF] je závislá na koncentraci Ca^{2+} , TFPI se váže

pouze na komplex [TF.VIIa], volný FVIIa inhibován není. TFPI je také schopen inhibice malého množství TF. (1, 3, 14)

5.1.4.2 Inhibitory fibrinolýzy

Úkolem inhibitorů fibrinolýzy je zajistit lokalizaci a tlumení fibrinolytických dějů v místě fibrinového koagula a zároveň zabránit šíření fibrinolytických dějů do okolí. Mezi přirozené inhibitory fibrinolýzy patří α_2 -antiplazmin, inhibitory aktivátorů plazminogenu (PAI) a trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI). (1, 14)

Antiplazmin je v plazmě přítomný v nadbytku a váže pouze volný plazmin, s kterým tvoří komplex v poměru 1:1, který je poté odstraněn v monocyto-makrofágovém systému. (1, 4)

PAI patří mezi přirozené inhibitory aktivátorů plazminogenu. Jsou známy tři typy, z nichž pouze PAI-1 štěpí tPA i uPA a je neúčinnějším inhibitorem. (1)

Posledním důležitým inhibitorem je TAFI, který svým působením zajišťuje snížení vazebných míst na fibrinu pro plazminogen a tPA. (3, 15)

5.1.4.3 Nespecifické inhibitory

Jedná se obecně o inhibitory proteáz, které jsou součástí koagulačního systému. Do této skupiny inhibitorů patří α_2 -makroglobulin, α_1 -antitrypsin a C1-inhibitor. (1)

5.2 Možnosti antikoagulační léčby a jejího monitorování

Antikoagulační léčba je jedna z možností antitrombotické léčby. Antitrombotická léčba může být zajištěna na několika úrovních hemostázy a je tak schopna působit jak antiagregačně, trombolyticky, tak antikoagulačně. (16)

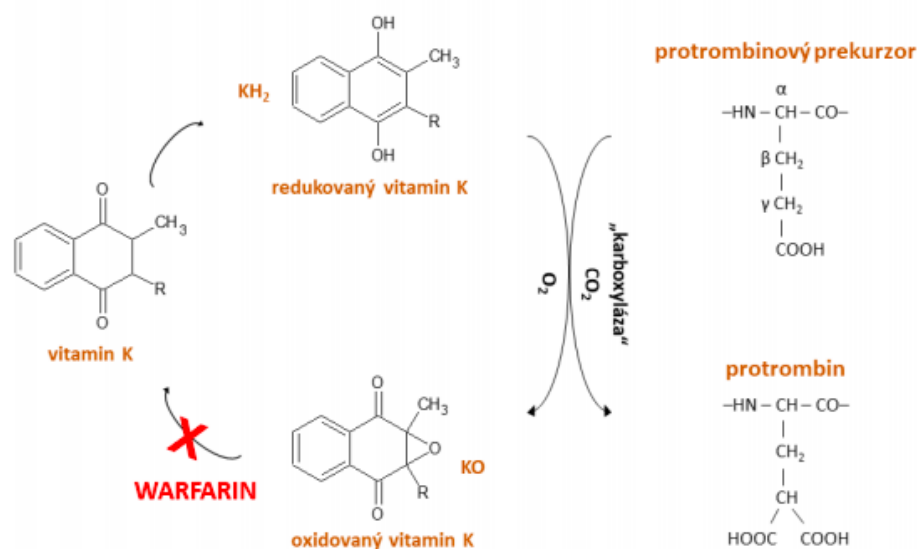
Cílem antikoagulační léčby je zamezení nadměrné aktivace koagulačního systému, a tím snížení možnosti tvorby trombů, což mohou být život ohrožující stavy. Antikoagulační léčba ovlivňuje koagulaci mnoha způsoby – nedochází ke vzniku plnohodnotných faktorů (kumariny), zesiluje účinek AT k vyvázání trombinu a FXa (hepariny), či je schopná vyvazovat trombin (gatran) a FXa (xabany) přímo. (16)

5.2.1 Antagonisté vitamínu K

Hlavním představitelem antagonistů vitamínu K je warfarin patřící mezi nepřímá antikoagulantia, užívaná perorálně. Warfarin je derivát kumarinu, jehož úkolem je zabránit vzniku plnohodnotných faktorů, jejichž syntéza v játrech je závislá na vitamínu K. (10, 16, 17, 18)

Účinkem warfarinu je narušení cyklu vitamínu K (Obr. 2), jelikož působí jako inhibitor enzymu vitamin K 2,3-epoxid reduktázy (VKORC1), což je klíčový enzym cyklu. Jak již bylo řečeno, vitamin K působí jako kofaktor v procesu karboxylace γ -karboxyglutamových zakončení některých faktorů (viz kap. 5.1.2.1). Během tohoto procesu vitamin K podléhá několika změnám. V prvním kroku dochází k redukci vitamínu K na jeho redukovanou formu enzymem vitamin K chinon reduktáza. V této redukované formě je využit jako kofaktor v procesu karboxylace a zároveň se oxiduje na vitamin K 2,3-epoxid, jelikož poskytuje své vodíkové ionty. Za fyziologických okolností přichází na řadu enzym VKORC1, který jej z epoxidové formy redukuje na vitamin K, čímž je cyklus vitamínu K dokončen. V případě léčby warfarinem k redukci nedochází, čímž je následně znemožněna karboxylace a tím tak vznik plnohodnotných faktorů. Výsledkem jsou tzv. PIVKA faktory, které obsahují v místě γ -karboxyglutamového zakončení pouze jednu karboxylovou skupinu, díky čemuž mají omezenou schopnost vazby na fosfolipidy a jsou tak koagulačně méně aktivní. Warfarin je tak indikován zejména pro prevenci tromboembolické příhody (TEN) či u pacientů s náhradou chlopně. Antidotem je vitamin K. (16, 17, 19, 20)

MECHANISMUS ÚČINKU



Obr. 2 Znázornění mechanismu účinku warfarinu

(KH₂ – vitamin K hydrochinon, KO – vitamin K 2,3-epoxid; zdroj: 21, převzato ze str. 7)

K monitoraci antikoagulační léčby warfarinem se využívá protrombinový test (PT), což je základní koagulační test, který patří mezi tzv. skupinové testy. Úkolem PT je sledování schopnosti systému vytvářet aktivní koagulační komplexy vnější tenázu a protrombinázu, které jsou poté zodpovědné za přeměnu protrombinu na trombin a následnou tvorbu fibrinových vláken. Základním měřeným parametrem je tzv. koagulační čas – čas, za který dojde ke genezi prvních fibrinových vláken od přidavku tromboplastinu (modifikace TF) a vápenatých iontů k testované citrátové plazmě. PT může být ovlivněn nejen přítomností warfarinu v plazmě, ale také nedostatečností faktorů II, V, VII, X a fibrinogenu, poté při nedostatku vitamínu K či při jaterních poruchách, a to tak, že dochází k prodlužování koagulačního času. (2, 14, 16, 22, 23)

Účinnost nastavení terapie antagonisty vitamínu K se sleduje pomocí parametru INR, čímž je zajištěno celosvětové sjednocení v interpretaci výsledků. Parametr INR je používán výhradně pro interpretaci výsledků pacientů léčených kumariny. Jedná se o poměr času pacienta ku času normální kontrolní plazmy umocněný hodnotou ISI. ISI je označení indexu citlivosti tromboplastinu, který je získán porovnáním používaného tromboplastinu s mezinárodním standardem. Hodnota ISI musí být známá pro každý používaný tromboplastin a ideálně by se měla blížit hodnotě 1. S rostoucí hodnotou se citlivost tromboplastinu snižuje. (2, 4, 16, 23)

Tromboplastiny jsou látky biologického původu a slouží jako zdroj fosfolipidů v reakci. Biologický původ reagencie způsobuje různou citlivost, proto musí být každý tromboplastin charakterizován vlastní hodnotou ISI. Rozlišujeme tromboplastiny rekombinantní, připravené metodou genového inženýrství; tkáňové, obsahující TF extrahovaný např. z tkáně králičího mozku a kombinované. Terapeutické hodnoty parametru INR by se při správně nastavené léčbě antagonisty vitamínu K měly pohybovat v rozmezí 2,0-3,0. (1, 16)

5.2.2 Nepřímé inhibitory trombinu a aktivovaného faktoru Xa

Účinek nepřímých inhibitorů trombinu/FXa je závislý na přítomnosti jiných endogenních látek, kterým poté usnadňuje připojení k molekule trombinu. Mezi nepřímé inhibitory trombinu/FXa řadíme látku heparin a jeho deriváty. Rozlišujeme nefrakcionovaný heparin (UFH), nízkomolekulární heparin (LMWH) a pentasacharidy, které jsou od heparinu odvozené. Heparin je polysulfonovaný glykosaminoglykan přirozeně se vyskytující v těle. Tvoří se zejména v játrech, plicní tkáni a střevě. Heparin jako takový nemá téměř žádný antikoagulační účinek, funguje zejména jako kofaktor antitrombinu, ale také hraje roli v uvolnění TFPI. Léčba heparinem je indikována pro léčbu a prevenci TEN. (1, 16, 24, 25, 26)

5.2.2.1 Nefrakcionovaný heparin (UFH)

Účinek UFH používaného k léčbě je založený na jeho anti-IIa a anti-Xa aktivitě po jeho vazbě na AT. UFH je složen z několika polysacharidových řetězců, z nichž asi pouze jedna třetina obsahuje pentasacharidovou sekvenci, která se váže na AT, jinou sekvencí se poté váže na trombin. Navázání heparinu na AT zvýší jeho účinek až tisícinásobně. K inaktivaci trombinu je nutný heparin, který je tvořen alespoň 18 monosacharidovými jednotkami, protože musí dojít současně k vazbě AT i trombinu na jednu molekulu heparinu, v případě inhibice FXa není nutná vazba na AT a FXa zároveň. Vazba heparinu k AT je reverzibilní, po uvolnění z vazby může tvořit komplexy i s jinými látkami. AT je po vazbě heparinu schopen inhibice i jiných serinových proteáz (např. FIXa, FXIIa). TFPI je působením heparinu uvolňován.

Rizikem této antikoagulační léčby je vznik tzv. heparinem indukované trombocytopenie (HIT), ke které dochází vlivem protilátek vázajících se na komplex

[Heparin.PF4]. UFH je aplikován intravenózně a je používán kvůli své rychlosti účinku hlavně při akutních cévních příhodách. Jeho antidotum je protamin sulfát. (1, 24, 25, 27, 28)

Monitorování léčby UFH lze provést pomocí aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (APTT), aktivovaného koagulačního testu (ACT), či lze vyšetřit anti-Xa aktivitu UFH. V hematologických laboratořích se nejčastěji používá APTT. K provedení testu je potřeba k testované citrátové plazmě přidat směs fosfolipidů (např. kefalin), aktivátoru urychlujícího reakci (např. křemičitan, silika) a Ca^{2+} . Výsledkem testu je koagulační čas, měřený od přídavku Ca^{2+} . Při kontinuálním podávání UFH by se měl poměr R času pacienta ku času normální kontroly pohybovat v rozmezí 2,0-4,0. (13, 16, 29)

5.2.2.2 *Nízkomolekulární heparin (LMWH)*

LMWH vzniká chemickou depolymerací, frakcionací a štěpením heparinázou z UFH. Výsledkem štěpení jsou kratší polysacharidové řetězce oproti UFH, což výrazně snižuje schopnost LMWH vyvazovat trombin. Kratší délka většiny řetězců neumožňuje jejich současné navázání na AT a na trombin, neovlivňuje ale inaktivaci FXa, jelikož v případě FXa není nutno, aby byl heparin navázán na faktor Xa a AT zároveň. Výhodou léčby LMWH je nižší riziko vzniku HIT, protože obtížněji vytváří komplex s PF4. (1, 26)

Léčba LMWH nemusí být pravidelně monitorována. V praxi lze stanovit tzv. anti-Xa aktivitu. Metoda je založená na přídavku aktivovaného faktoru X k citrátové plazmě. Dochází ke vzniku komplexu [AT.FXa.LMWH] a snížení množství volného FXa, které je přímo úměrné anti-Xa aktivitě LMWH ve vyšetřované plazmě. Množství volného FXa se změří spektrofotometricky s použitím chromogenního substrátu. Množství uvolněného barviva je zde nepřímě úměrné anti-Xa aktivitě LMWH. Terapeutické meze pro LMWH se pohybují v rozmezí 0,6-1,0 IU/ml. (16)

5.2.2.3 *Pentasacharidy*

Pentasacharidy jsou syntetické látky, jejichž účinek spočívá v selektivní inhibici FXa. Jedná se o malé, heparinové fragmenty, které obsahují sekvence pouze 5 monosacharidů (analogá pentasacharidové sekvence heparinu), jejichž inhibiční účinek je opět zprostředkován interakcí s AT. Zástupcem je fondaparinux, který má oproti LMWH výhradně jenom anti-Xa aktivitu a je možnou alternativou léčby pacientů s HIT. Nevýhodou je, že není známo antidotum. Měří se anti-Xa aktivita obdobně jako u

LMWH, kalibrace však musí být provedena na speciální kalibrační plazmy. Výsledky se vydávají jako koncentrace léčiva v mg/l. Terapeutické meze závisí na frekvenci podávání a načasování odběru od času podání léčiva. (1, 30)

5.2.3 Přímá orální antikoagulancia (DOACs)

Přímá orální antikoagulancia (DOACs), zahrnují léčiva, která působí jako přímé inhibitory trombinu (gatraný) a přímé inhibitory FXa (xabany) a nepotřebují tak ke svému působení přítomnost jiné látky (např. AT). DOACs se v poslední době ukazují jako velmi dobrá alternativa k dlouho užívaným léčivům jako je např. warfarin či heparin. Výhody podávání DOACs oproti warfarinu či heparinu spočívají zejména v jejich jednoduchém dávkování a také v tom, že není nutná jejich pravidelná monitorace. Potřeba monitorace může nastat v situacích jako je např. předávkování, krvácení či v případě nutnosti neplánované operace. (31, 32)

5.2.3.1 Xabany

Jak již bylo řečeno, xabany působí jako přímé inhibitory FXa a jejich zástupci jsou rivaroxaban, apixaban a edoxaban. Xabany jsou schopné inhibovat volný FXa, ale také vázaný do komplexu protrombinázy. Xabany dosahují své maximální plazmatické koncentrace 2-3 hodiny po podání a mají biologický poločas kolem 10 hodin, což umožňuje dávkování léku pouze 1-2x denně. Pro xabany dosud není známo antidotum. V případě nutnosti monitorace xabanů je v hematologických laboratořích používán spektrofotometrický test s chromogenním substrátem. Principem testu je inhibice FXa, který je přidán v nadbytku, xabanem monitorovaným v plazmě, zbylý FXa hydrolyzuje chromogenní substrát. Měřená absorbance je nepřímo úměrná koncentraci xabanů ve vyšetřované plazmě. Každý xaban musí mít vlastní kalibrační plazmy, vlastní kalibrační křivku. Výsledek se vydává jako koncentrace léčiva v plazmě v ng/ml. Terapeutické meze závisí na frekvenci podávání a načasování odběru od času podání léčiva. (32, 33, 34)

5.2.3.2 Gatraný

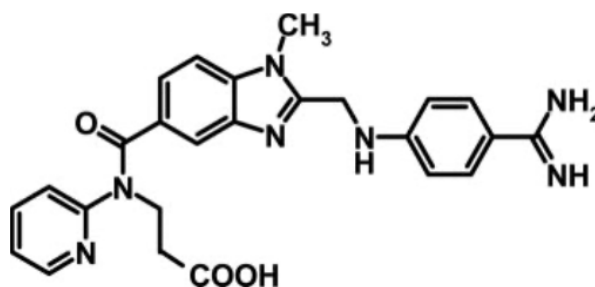
Dabigatran etexilát, který je v ČR dostupný pod názvem Pradaxa, je momentálně jediným přímým reverzibilním inhibitorem trombinu ze skupiny gatránů. Dabigatran etexilát samotný nevykazuje žádný antikoagulační efekt, jedná se o tzv. proléčivo, které

je po perorálním užití metabolizováno v játrech enzymem esterázou na jeho v plazmě aktivní formu dabigatran. Účinek dabigatranu je založen na inhibici volného i na fibrin vázaného trombinu a také na inhibici trombinem indukované agregace trombocytů. Výrazně tedy blokuje přeměnu fibrinogenu na fibrin a tím vznik trombu. (35, 36, 40)

Dabigatran stejně jako ostatní DOACs vykazuje velmi rychlý nástup účinku, zpravidla za 0,5-2 hodiny a dlouhý je opět také poločas léčiva (cca 12-15 hodin), čímž je zajištěno jeho dlouhodobé působení (až 24 hodin) a proto je dostatečné užívání léku 1-2x denně. Mezi další přednosti dabigatranu patří také to, že není metabolizován cytochromy P450, čímž je zajištěna nízká interakce s jinými léky a jeho účinek není ovlivněn příjmem potravy, může pouze dojít k prodloužení nástupu účinku cca o 2 hodiny. Eliminace léčiva z organismu je převážně ledvinami v jeho nezměněné formě, zbylé množství se ve formě aktivních acylglukuronidů vylučuje trávicím systémem. Renální eliminace je problémem pro pacienty trpícími renální nedostatečností, při velmi těžké renální nedostatečnosti již není vhodné dabigatran užívat. (33, 37, 40, 41, 42)

Léčivo je indikováno zejména pro prevenci TEN, zvláště po ortopedických chirurgických operacích (výměna kolenního či kyčelního kloubu), dále pro prevenci cévní mozkové příhody a systémové embolizace ale také jako léčba hluboké žilní trombózy a plicní embolie. (36, 27)

Od roku 2015 je k dispozici specifické antidotum idarucizumab, které je dostupné pod názvem Praxbind. Antidotum je užíváno zejména při naléhavých chirurgických operacích či při život ohrožujícím krvácení. Idarucizumab je monoklonální protilátka, která se váže na dabigatran, vytváří s ním komplex a vyruší tak jeho antikoagulační efekt. (36, 38)



Obr. 3 Chemická struktura aktivní formy dabigatranu

(zdroj: 40)

Jak již bylo řečeno, DOACs nevyžadují rutinní monitoraci, přesto nastávají situace, při kterých je monitorace potřebná (viz kap. 5.2.3). Monitorace se provádí při

zahájení léčby z důvodu ověření správného vylučování léčiva z organismu, zejména u osob vyššího věku, kde je očekávána snížená funkce ledvin a také pro kontrolu, zda pacient užívá léčbu správně. Pro tyto situace bylo zavedeno několik metod. Terapeutické meze závisí na frekvenci podávání, podávané koncentraci léčiva a načasování odběru od času podání léčiva. (34, 39, 42)

Metody používané k monitorování koncentrace dabigatranu v plazmě:

- HPLC/MS
- Koagulační metody – na principu dilutovaného předkalibrovaného trombinového testu
- Spektrofotometrické metody – využívající samotný chromogenní substrát nebo na principu ekarinového testu

HPLC/MS

Zlatým standardem pro kvantifikační analýzu léčiv je HPLC/MS, která ale pro svou finanční náročnost není dostupná všem laboratořím, proto byly zavedeny níže uvedené alternativy. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda využívající k dělení látek kapalnou (mobilní) a pevnou (stacionární) fázi. Stanovovaná látka je mobilní fází unášena stacionární fází (kolonou) a na základě afinity stanovované látky k mobilní a stacionární fází dochází postupně k její separaci. Po skončení separace dochází k detekci stanovované látky, v tomto případě hmotnostním spektrometrem (MS). Detekce pomocí MS je založena na separaci a stanovení látek na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). V iontové části spektrometru dochází k ionizaci látky za vzniku nabitých molekul (iontů), v analyzátoru jsou látky separovány podle poměru m/z a v detektoru jim je přiřazena relativní intenzita za vzniku hmotnostního spektra. Stanovení je prováděno z plazmy. Před nástřikem vzorku do přístroje je však nutná úprava vzorku některou z extrakčních technik, aby se odstranily balastní látky z plazmy. (43, 44)

Koagulační metody

Koagulační metody jsou kvantitativní srážecí metody, při kterých je měřen koagulační čas v sekundách. Používané metody jsou odvozené od trombinového testu. Základem trombinového testu je měření tzv. trombinového času, což je doba, za kterou dojde ke štěpení fibrinogenu trombinem a vzniku fibrinu. Srážení je spuštěno přidávkem exogenního trombinu. Nemodifikovaný trombinový test je ale k dabigatranu velmi

citlivý, zejména při vysokých koncentracích a může tak docházet až k neměřitelným časům. Z tohoto důvodu byl zaveden modifikovaný dilutovaný trombinový test, který měří dabigatran v citrátové plazmě smíchané s normální plazmou. Naředění testované plazmy normální plazmou také zajistí, že nedochází v takové míře k interferencím jinými působky v plazmě a je tak možné sledovat pouze účinek dabigatranu. Působením dabigatranu dochází k inhibici trombinu a tím k prodloužení času úměrně koncentraci dabigatranu, čímž je test vhodný ke kvantifikaci. (16, 34, 42)

Spektrofotometrické metody

Další možností kvantitativní monitorace dabigatranu jsou spektrofotometrické metody využívající chromogenní substráty. Principem testu je štěpení chromogenního substrátu účinkem přidaného trombinu za vzniku barevného produktu, který je poté měřen spektrofotometricky. Naměřená absorbance je nepřímo úměrná koncentraci dabigatranu, jelikož platí, čím vyšší je koncentrace dabigatranu, tím nižší je absorbance. Reakce je založená na inhibici trombinu dabigatranem, dochází k vytváření komplexu [dabigatran.trombin], zbylý trombin je poté schopný štěpit chromogenní substrát, čímž dochází k uvolnění barviva. Nejčastěji užívaným chromoforem je p-nitroanilin (pNA), jehož absorbance je měřena při 405 nm. (16, 47, 48)

Druhou možností je spektrofotometrická metoda na principu ekarinového testu. Ekarin štěpí v nadbytku přidaný trombin na meizothrombin. Meizothrombin nevyvázaný do komplexu s dabigatranem následně štěpí chromogenní substrát.

6 PRAKTICKÁ ČÁST

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo zavedení nové spektrofotometrické metody ke stanovení dabigatranu v plazmě do provozu hematologické laboratoře. V rámci provedené srovnávací studie byly vyšetřované vzorky změřeny koagulační referenční metodou s reagensii firmy Hyphen BioMed a současně také spektrofotometrickou metodou s reagensii firmy Stago. Měření byla provedena v laboratoři IV. interní hematologické kliniky FN HK na automatickém koagulometru STA-R Evolution během února a března 2021 na 57 vzorcích pacientů FN HK. Naměřené výsledky byly porovnány a statisticky vyhodnoceny.

6.1 *Vyšetřovaný materiál*

Základem pro získání správných a přesných výsledků je dodržení podmínek již během samotné preanalytické fáze, která zahrnuje odběr vzorku, jeho transport do laboratoře, zpracování před analýzou a případně jeho uskladnění, pokud není vzorek analyzován ihned.

Odběru předchází příprava pacienta, který by měl vypít dostatečné množství tekutin (nejméně 0,5 litru) a měl by poté být v klidu. Biologický materiál je následně odebrán pomocí sterilních, jednorázových pomůcek do předem označené odběrové zkumavky, v tomto případě se jedná o zkumavku s citrátem sodným. Každý vzorek biologického materiálu přichází do laboratoře spolu s papírovou žádankou, na které je uvedeno požadované vyšetření a údaje o pacientovi. Vzorek bez řádné identifikace nelze přijmout k vyšetření.

Požadovaný biologický materiál pro naši analýzu je vzorek nesrážlivé žilní krve, jež je odebrána do zkumavky s přídatkem protisrážlivého činidla, citrátu sodného 0.109M (3,2%), který vyvazuje Ca^{2+} . Poměr krve a citrátu sodného ve zkumavce by měl být 9:1, proto je nutné odebrat požadovaný objem krve, aby byl tento poměr dodržen. Zkumavky se vzorkem krve určené pro koagulační vyšetření by měly být odebrány hned po odběrech do zkumavek bez aditiv. Pokud je odebírán pouze citrátový vzorek, první 3 ml krve by měly být odstraněny, aby nedocházelo k ovlivnění koagulačních testů vyšší koncentrací tkáňového faktoru, jež je v první odebrané zkumavce přítomna. Po odebrání vzorku je zkumavka s činidlem řádně, ale opatrně promíchána. (49, 50)

Po odebrání vzorku následuje jeho transport do laboratoře a zpracování. Vzorky sloužící pro koagulační vyšetření nesmí být skladovány v chladu, musí být transportovány při teplotě 15-25 °C, aby nedošlo k samovolné aktivaci hemostatických procesů. Zásadním krokem úpravy vzorku je jeho centrifugace, která musí nastat maximálně do 2 hodin po odběru. (50)

V našem případě je centrifugace prováděna 10 minut při 3500 ot./min. Získanou plazmu chudou na trombocyty je možno skladovat při laboratorní teplotě maximálně několik hodin (dle požadovaných vyšetření). V případě potřeby dlouhodobého skladování vzorku je nutné plazmu stáhnout do mikrozkušavky a zamrazit, ideálně na teplotu méně než -70 °C, při které je materiál stabilní několik měsíců. (50)

6.2 Automatický koagulometr STA-R Evolution

Měření byla provedena na automatickém koagulometru STA-R Evolution firmy Stago, který se nachází v laboratoři IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Koagulometr STA-R Evolution je vysoce výkonný systém, který je plně automatizovaný. Systém je schopen provádět analýzy na principu koagulačním, spektrofotometrickém a imunoturbidimetrickém. (51)

V případě koagulačního principu analýzy je sledován reakční čas, za který dojde k vytvoření prvních fibrinových vláken. Výsledný čas je poté porovnán s časem normální plazmy, případně přepočítán např. na koncentraci vyšetřovaného analytu. Nabízí se více možností, jak vytvořené koagulum detekovat, a to např. opticky, elektricky či jako je tomu v našem případě elektromagneticky. Analyzátoři Stago využívají ke svému měření kovovou kuličku, která je umístěna v kyvetě se vzorkem. Kulička se působením magnetického pole pohybuje, vlivem geneze fibrinových vláken dochází ke zpomalování pohybu kuličky, až nakonec dojde k jejímu úplnému zastavení a odečtení koagulačního času. (16)

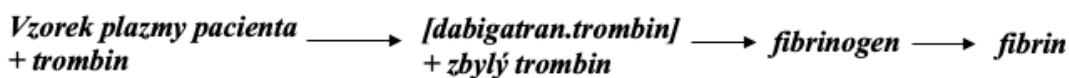
Metody pracující s chromogenními substráty využívají k detekci spektrofotometrické systémy, které měří změny absorbance po průchodu monochromatického záření kyvetou. Základem pro měření absorbance je přítomnost chromoforu navázaného na chromogenním substrátu, který po štěpení poskytuje zabarvení, v případě nejčastějšího chromoforu pNA je absorbance měřena při 405 nm. (4, 16)

Analyzátor se skládá ze 3 částí: vzorková, reagenční a měřicí část. Předností analyzátoru je jeho velká kapacita, která disponuje pozicemi až pro 220 vzorků, je vybaven 75 pozicemi pro reagenty a 1000 pozicemi pro měřicí kyvety. Vzorková část zároveň dokáže přijímat vzorky pro statimová vyšetření bez nutnosti přerušování analýzy. (51, 52)

6.3 Principy použitých metod

6.3.1 Koagulační metoda s reagenty firmy Hyphen BioMed

Tato metoda sloužící pro monitoraci léčby dabigatranem či jinými přímými inhibitory trombinu je založena na principu trombinového testu, jehož principem je přeměna fibrinogenu na fibrin po přidání trombinu a měření tzv. trombinového času, za který dochází k vytvoření fibrinu. Jedná se tak o koagulační metodu. V případě stanovení koncentrace dabigatranu v plazmě se jedná o tzv. dilutovaný předkalibrovaný trombinový test. Tato modifikace trombinového testu umožňuje kvantitativní stanovení dabigatranu z citrátové plazmy. Nejdříve je plazma pacienta smíchána s normální plazmou. Měření je poté zahájeno přidáním exogenního lidského kalciového α -trombinu. Působením dabigatranu dochází k částečné inhibici trombinu, který vyvolává přeměnu fibrinogenu na fibrin. V okamžiku detekce fibrinového koagula dojde k zastavení koagulačního času, který se prodlužuje se zvyšující se koncentrací dabigatranu a je tak přímo úměrný koncentraci dabigatranu ve vzorku. Koncentrace dabigatranu je odečtena z kalibrační křivky, která je lineární, v ng/ml. (45, 53)



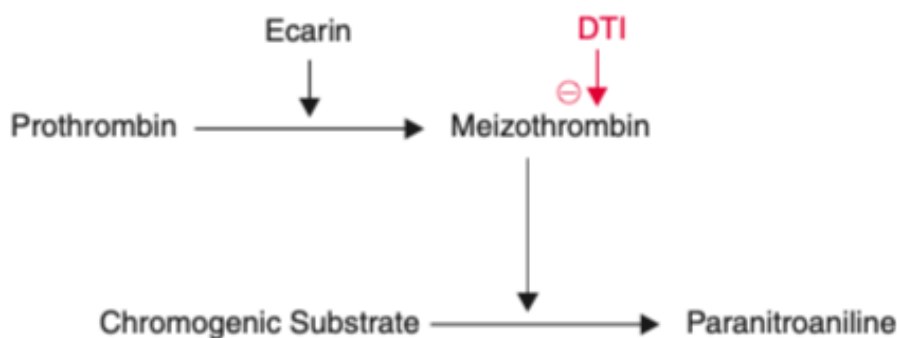
Obr. 4 Schéma použité koagulační metody

(vlastní vypracování)

6.3.2 Spektrofotometrická metoda s reagenty firmy Stago

V tomto případě se jedná o kompetitivní, spektrofotometrickou metodu využívající chromogenní substrát, na principu ekarinového testu. K měření je použita citrátová plazma pacienta, ke které je přidáván protrombin v nadbytku, chromogenní substrát a následně je reakce zahájena přidáním startovací reagenty ekarinu, který štěpí

protrombin na meizotrombin. Ekarin je hadí jed původem ze zmiže (*Echis carinatus*), jedná se o vysoce purifikovanou metaloproteinázu, jež je schopna specifické aktivace protrombinu za vzniku tzv. meizotrombinu, který již vykazuje účinky trombinu. Ekarin štěpí protrombin v jiných místech, než je běžné a zároveň nepotřebuje ke své činnosti přítomnost fosfolipidů a Ca^{2+} . Vzniklý meizotrombin enzymaticky štěpí chromogenní substrát, což způsobí uvolnění pNA z peptidu. Meizotrombin je v průběhu reakce vyvazován do komplexu [dabigatran.meizotrombin] a dochází tak k jeho inhibici. Zbylý meizotrombin, který nebyl dabigatranem blokován, vyvolává štěpení chromogenního substrátu. Množství uvolněného pNA je poté spektrofotometricky měřeno při 405 nm, získaná absorbance je nepřímo úměrná koncentraci dabigatranu, jelikož se zvyšující se koncentrací dabigatranu se snižuje množství meizotrombinu schopného štěpení substrátu. Koncentrace je poté odečtena z kalibrační křivky v ng/ml. (48, 54, 55)



Obr. 5 Schéma použité spektrofotometrické metody

(zdroj: 48)

6.4 Reagencie

6.4.1 Reagencie pro koagulační metodu (Hyphen BioMed)

Reagencie obsažené v kitu Hemoclot Thrombin Inhibitors vyráběné firmou Hyphen BioMed, používané v referenční metodě umožňují kvantitativní stanovení dabigatranu, které je založeno na principu trombinového testu.

Set obsahuje dvě reagencie: normální poolovanou lyofilizovanou plazmu a lidský vysoce purifikovaný lyofilizovaný trombin. Mezi další požadované reagencie, potřebné k uskutečnění stanovení, které nejsou součástí základního kitu patří destilovaná voda, ředící pufr (Owren-Kollerův pufr), kalibrační a kontrolní plazmy. Reagencie mohou být dodávány ve dvou objemech a to buď 1 ml nebo 2,5 ml. (45)

Skladování reagentů se musí řídit doporučením výrobce. V případě neotevřených reagentů Hyphen je skladování možné při teplotě 2-8 °C v jejich původním balení do doby určené expiračním datem. (45)

Tab. 2 Reagencie Hyphen BioMed

	<i>Kit</i>	<i>Kalibrační plazmy</i>	<i>Kontrolní plazmy</i>
<i>Číslo šarže</i>	2001040	F1903037	F2001289
<i>Expirační datum</i>	1/2023	4/2022	3/2023
<i>Objem balení</i>	3x1 ml normální plazmy 3x1 ml trombinu	4x3x1 ml	6x2x1 ml

6.4.2 Reagencie pro spektrofotometrickou metodu (Stago)

Reagencie určené pro spektrofotometrické kvantitativní stanovení přímého inhibitoru trombinu dabigatranu vyrábí firma Stago jako set STA-ECA II.

Firma v diagnostické soupravě dodává lyofilizovaný lidský protrombin, dále chromogenní substrát HSY-83 a lyofilizovaný hadí jed, ekarin. K provedení stanovení jsou nezbytné také další reagencie, jako je Owren-Kollerův pufr sloužící pro ředění testovaných a kontrolních plazem. Diagnostické soupravy, určené pouze pro *in vitro* použití, je nutno skladovat při 2-8 °C. (48)

Tab. 3 Reagencie Stago

	Kit	Kalibrační plazmy	Kontrolní plazmy
Číslo šarže	254286	252221	255381
Expirační datum	4/2022	1/2022	5/2022
Objem balení	2x3,5 ml protrombinu 2x2 ml substrátu 2x2 ml ekarinu	2x5x1 ml	3x2x1 ml

6.4.3 Příprava reagensů Hyphen

Reagencie, které jsou v lyofilizované formě musíme nejprve vytemperovat na laboratorní teplotu a rekonstituovat přesným množstvím destilované vody (Tab. 4). Obsah lahviček poté opatrně promícháme tak, aby došlo k úplnému rozpuštění a nevytvořila se pěna. Lahvičky se poté vkládají do analyzátoru. Stabilita jednotlivých reagensů je uvedena v tabulce č. 5. Nevyužitá reagentia se mohou jednou zamrazit. (45)

Tab. 4 Množství destilované vody potřebné k rekonstrukci reagensů Hyphen

Reagencie	Množství destilované vody
Normální poolovaná plazma	1 ml
Trombin	1 ml
Kalibrační plazmy 1-3	1 ml
Kontrolní plazmy 1-2	1 ml

(45; vlastní vypracování)

Tab. 5 Stabilita naředěných reagensů Hyphen

	Kit	Kalibrační roztoky	Kontrolní roztoky
2-8 °C	24 h	7 dní	7 dní
18-25 °C	8 h	48 h	48 h
15-19 °C (analyzátor)	8 h	8 h	8 h
-20 °C a méně	2 měsíce	6 měsíců	6 měsíců

(45; vlastní vypracování)

6.4.4 Příprava reagensí Stago

Reagencie, které jsou v lyofilizované formě musíme nejprve vytemperovat na laboratorní teplotu a rekonstituovat přesným množstvím destilované vody (Tab. 6). Chromogenní substrát je již připravený k použití. Naředěné reagencie poté necháme rozpouštět při teplotě 18-25 °C nejméně 30 minut. Poté následuje důkladné promíchání všech reagensí, aby byla zajištěna jejich homogenizace. Kalibrační a kontrolní plazmy jsou připraveny stejným způsobem. Stabilita jednotlivých reagensí je uvedena v tabulce č. 7. (48)

Tab. 6 Množství destilované vody potřebné k rekonstrukci reagensí Stago

Reagencie	Množství destilované vody
Lyofilizovaný protrombin	3,5 ml
Lyofilizovaný ekarin	2 ml
Kalibrační roztoky (1-5)	1 ml
Kontrolní roztoky 1, 2	1 ml

(48; vlastní vypracování)

Tab. 7 Stabilita připravených reagensí Stago

	Kit	Kalibrační plazmy	Kontrolní plazmy
2-8 °C	28 dní	Není uvedeno	5 dní
15-19 °C (analyzátor)	3 dny	8 h	8 h

(48; vlastní vypracování)

6.5 Nastavení přístroje

Tab. 8 Nastavení koagulometru pro měření koagulační metodou

Nastavení koagulometru pro koagulační metodu (Hyphen)	
Testovaná plazma ředěná 1/8	50 µl
Poolovaná plazma	100 µl
Inkubace (37 °C)	240 s
Trombin (startovací reagencie)	100 µl

Tab. 9 Nastavení koagulometru pro měření spektrofotometrickou metodou

<i>Nastavení koagulometru pro spektrofotometrickou metodu (Stago)</i>	
Testovaná plazma ředěná 1/5	50 µl
Protrombin	140 µl
Chromogenní substrát HSY-83	70 µl
Inkubace (37 °C)	240 s
Ekarin (startovací reagentie)	70 µl

Vyšetřovaná patientská plazma je v obou případech ředěná Owren-Kollerovým pufrem v analyzátoru.

6.6 Kalibrace metod

Před samotným měřením musí být provedeny kalibrace obou metod. Ta se provádí v případě nových šarží reagentií či pokud nevychází kontroly kvality. Ke kalibraci jsou používány kalibrační plazmy o přesně daných koncentracích. Analyzátor po proměření kalibračních plazem vytvoří kalibrační křivku, z níž je patrný vztah mezi měřenou a vydávanou veličinou. (56)

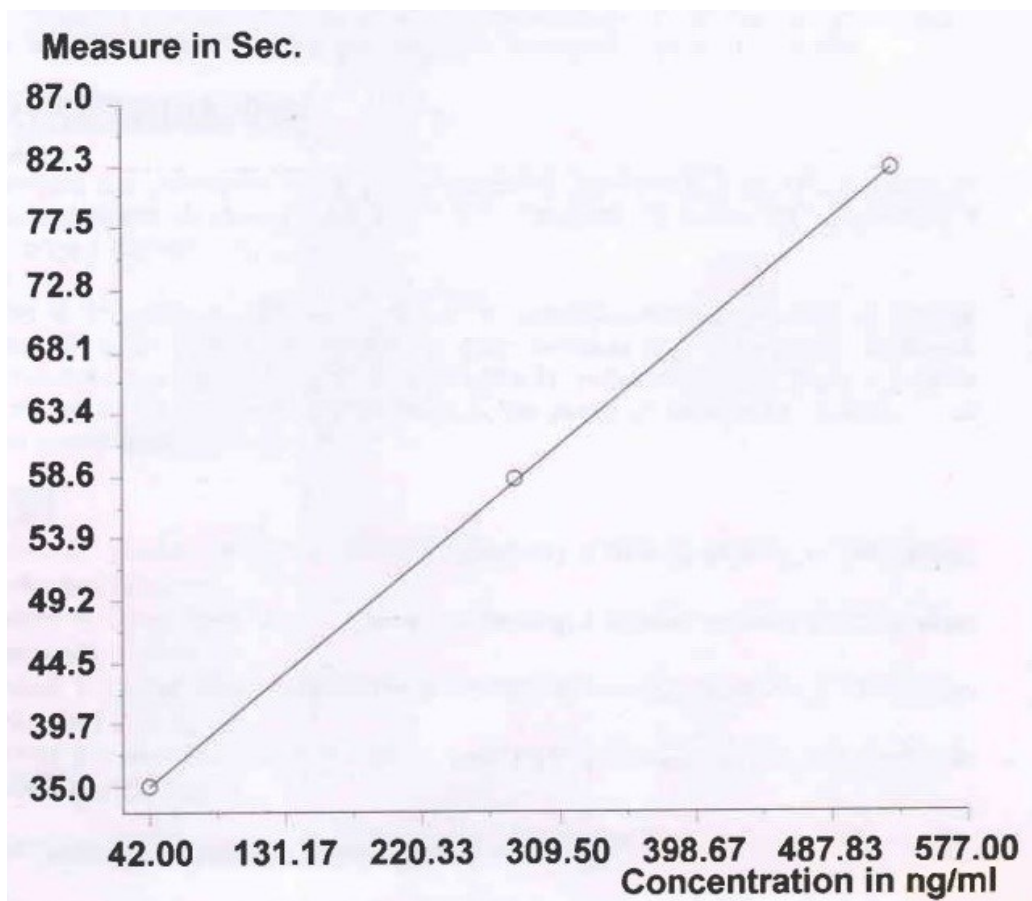
V případě koagulační metody je měřenou veličinou koagulační čas v sekundách, u spektrofotometrické metody je to absorbance. V obou případech je poté pomocí kalibrační křivky měřená veličina převedena na vydávanou veličinu – koncentraci léčiva v ng/ml. Kalibrace pro koagulační metodu je provedena pomocí 3 kalibračních plazem a kalibrační křivka vykazuje lineární závislost. Pro metodu spektrofotometrickou je kalibrace provedena pomocí 5 kalibračních plazem, kalibrační křivkou je polynom 2. stupně. Kalibrační plazmy jsou připraveny podle návodu uvedeného výrobcem (viz kap. 6.4.3 a 6.4.4) a v obou případech v analyzátoru ředěny Owren-Kollerovým pufrem.

Validovaný rozsah metod:

- Koagulační metoda: 50-500 ng/ml
- Spektrofotometrická metoda: 5-550 ng/ml

Tab. 10 Kalibrace koagulační metody

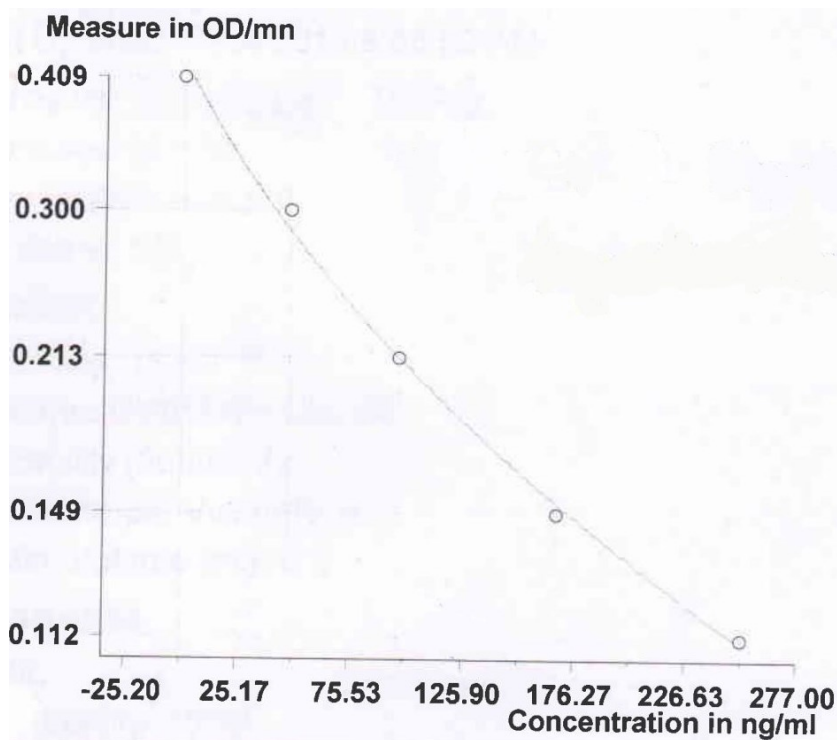
<i>Koncentrace [ng/ml]</i>	<i>Koagulační čas [s]</i>
42,00	35,0
282,00	58,4
528,00	82,0



Graf 1 Kalibrační křivka koagulační metody, Hyphen

Tab. 11 Kalibrace spektrofotometrické metody

<i>Koncentrace [ng/ml]</i>	<i>Absorbance</i>
0,00	0,409
48,00	0,300
97,00	0,213
169,00	0,149
252,00	0,112



Graf 2 Kalibrační křivka spektrofotometrické metody, Stago

6.7 Kontrola kvality

Kontrola kvality je nutná pro ověření, že analyzátor vydává přesné a správné výsledky. Kontrola kvality je prováděna před každou sérií měření, po kalibraci metody či po změně šarže reagentie. Vyšetření koncentrace dabigatranu v plazmě není rutinním vyšetřením, proto se kontrola kvality i příprava reagentií provádějí až po obdržení požadavku na toto vyšetření laboratoří. Je to dáno poměrně krátkou stabilitou naředěné reagentie v přístroji a relativně malou četností provádění tohoto vyšetření. Pro kontrolu kvality slouží komerční kontrolní plazmy. Ty mají výrobcem přesně deklarovaná rozmezí hodnot, obvykle na 2 hladinách, mezi kterými se naměřený výsledek musí nacházet. V opačném případě musí být kontrola kvality změřena znovu, vyměněna reagentie či kontrolní plazma nebo provedena nová kalibrace metody. Dokud se naměřené hodnoty kontrolních plazem nenacházejí v povolených intervalech, nemůžeme vyšetřovat patientské vzorky. (57)

6.8 Pracovní postup

- 1) Nejprve jsem si před samotným měřením přichystala všechny potřebné reagentie k měření, včetně kalibračních a kontrolních plazem a podle návodu dodaného výrobcem je připravila k použití.
- 2) Rozpuštěné a promíchané reagentie jsem poté vložila do analyzátoru; v případě reagentií firmy Hyphen musely být reagentie zadány ručně, reagentie firmy Stago byly do analyzátoru načteny pomocí čtečky čárových kódů a kódů na lahvičkách. Analyzátor si poté dobu stability a objemy reagentií hlídá sám.
- 3) Následovala kalibrace metod pomocí kalibračních plazem. Kalibrace byla provedena pro referenční koagulační metodu i pro srovnávanou metodu spektrofotometrickou. Výsledkem byly kalibrační křivky pro aktuálně používané šarže reagentií.
- 4) Po provedení kalibrací byla provedena kontrola kvality pro obě metody pomocí kontrolních plazem. Kontrola je prováděna s plazmami o nízké a vysoké koncentraci. Výrobce deklaruje rozmezí, v kterých se musí naměřené hodnoty nacházet, aby byla kontrola úspěšná. Všechny kontrolní plazmy nám vyšly hned napoprvé do oběma výrobcem deklarovaných rozmezí.
- 5) Analyzátor byl tak nachystán pro samotnou analýzu vzorků. Analýza byla provedena na patientských vzorcích, které byly po příjmu zadány do laboratorního informačního systému. Nejprve byla provedena centrifugace při 3500 ot./min. po dobu 10 minut, čímž byla získána plazma chudá na destičky, která byla poté použita k vyšetření. Protože se nejedná o časté vyšetření, byly patientské vzorky delší dobu sbírány a po centrifugaci zamražovány v mikrozkuvkách a uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Teprve po nasbírání většího počtu vzorků bylo provedeno měření koncentrace dabigatranu (v sérii). Vzorky byly těsně před samotnou analýzou rozmrazeny v termostatu při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byly ihned vyšetřeny.
- 6) Měření jsem provedla současně oběma metodami najednou, aby bylo dosaženo stejných podmínek.
- 7) Výsledkem analýzy byly vždy dvě koncentrace dabigatranu pro každý vzorek, získané současně referenční koagulační metodou s reagentiemi firmy Hyphen BioMed a srovnávanou spektrofotometrickou metodou s reagentiemi firmy Stago.

8) Získaná data jsem poté zpracovala do tabulky a provedla statistické vyhodnocení metodou lineární regrese a pomocí Bland-Altmanova grafu.

6.9 Výsledky a jejich statistické vyhodnocení

Naměřené výsledky koncentrace dabigatranu v plazmě pacientů FN HK referenční koagulační metodou a současně spektrofotometrickou metodou byly vyneseny do tabulky č. 12.

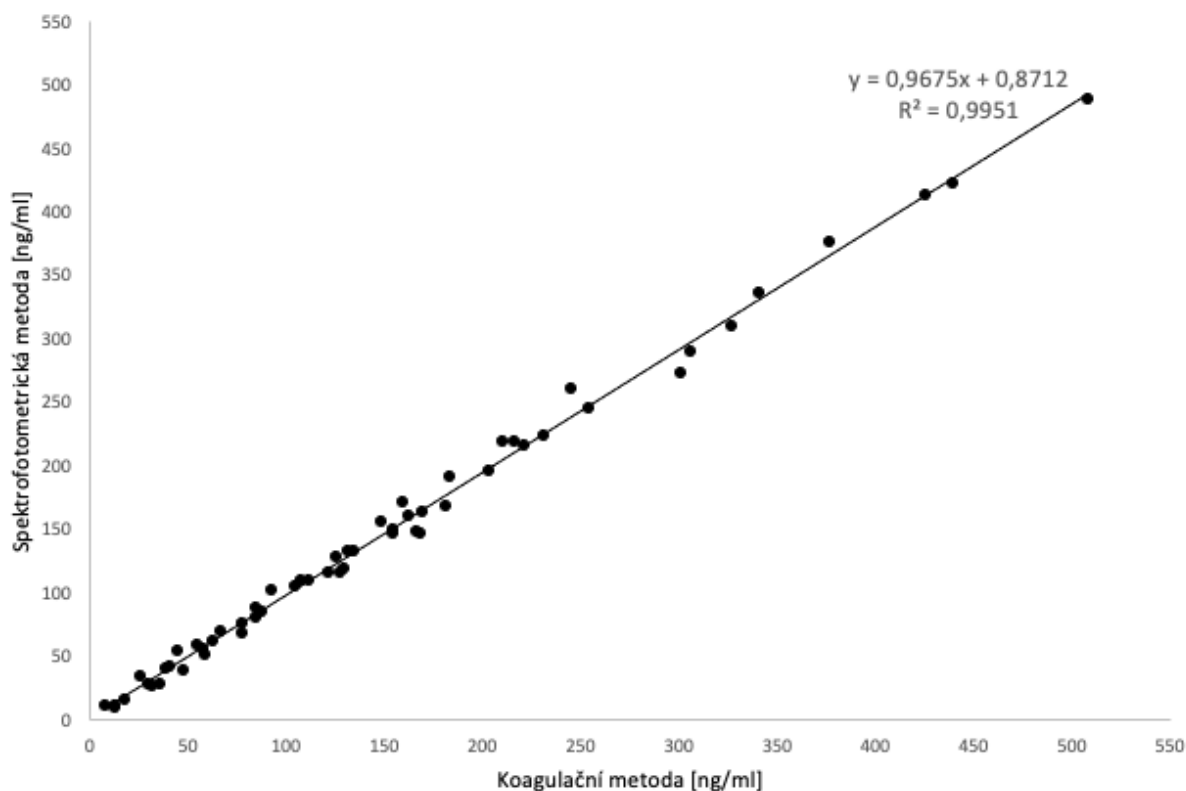
Statistické vyhodnocení bylo provedeno metodou lineární regrese, kdy byly hodnoty proloženy přímkou, byl získán korelační koeficient (r) a rovnice přímky. Vyhodnocení bylo také provedeno pomocí Bland-Altmanova grafu, který je pro porovnání shody dvou metod vhodnější. Ke grafickému znázornění výsledků byl použit program Microsoft Excel.

Lineární regrese

Metoda lineární regrese se zabývá pouze posouzením vztahů dvou proměnných hodnot, neumí vyjádřit jejich rozdíly a chyby, kvůli čemuž není nejvhodnější statistickou metodou pro srovnání shody výsledků získaných dvěma metodami. Lineární regresi můžeme vyjádřit tzv. korelací, která popisuje vztah mezi dvěma proměnnými a je vyjádřena rovnicí přímky a korelačním koeficientem (r). Hodnota r se v případě dobré korelace blíží jedné. Vynesením hodnot na horizontální osu x , na které se nachází nezávisle proměnná a na vertikální osu y , kde se nachází závisle proměnná, získáme rovnici přímky, která má tvar $y = ax + b$. (58,59)

V našem případě jsem na osu x vynesla hodnoty naměřené koagulační metodou, jelikož se jedná o metodu referenční, na osu y jsem vynesla hodnoty získané metodou spektrofotometrickou. Získaná rovnice přímky je ve tvaru $y = 0,9675x + 0,8712$, hodnota $R^2 = 0,9951$, z čehož vyplývá, že $r = 0,9975$. Rovnice přímky i hodnota r ukazují na velmi vysokou korelaci hodnot naměřených oběma metodami. Lze tak říci, že se hodnoty nacházejí ve velmi blízkém lineárním vztahu a nevykazují velké rozdíly hodnot. Grafické vyhodnocení je znázorněno na grafu 3.

Porovnání výsledků metodou lineární regrese



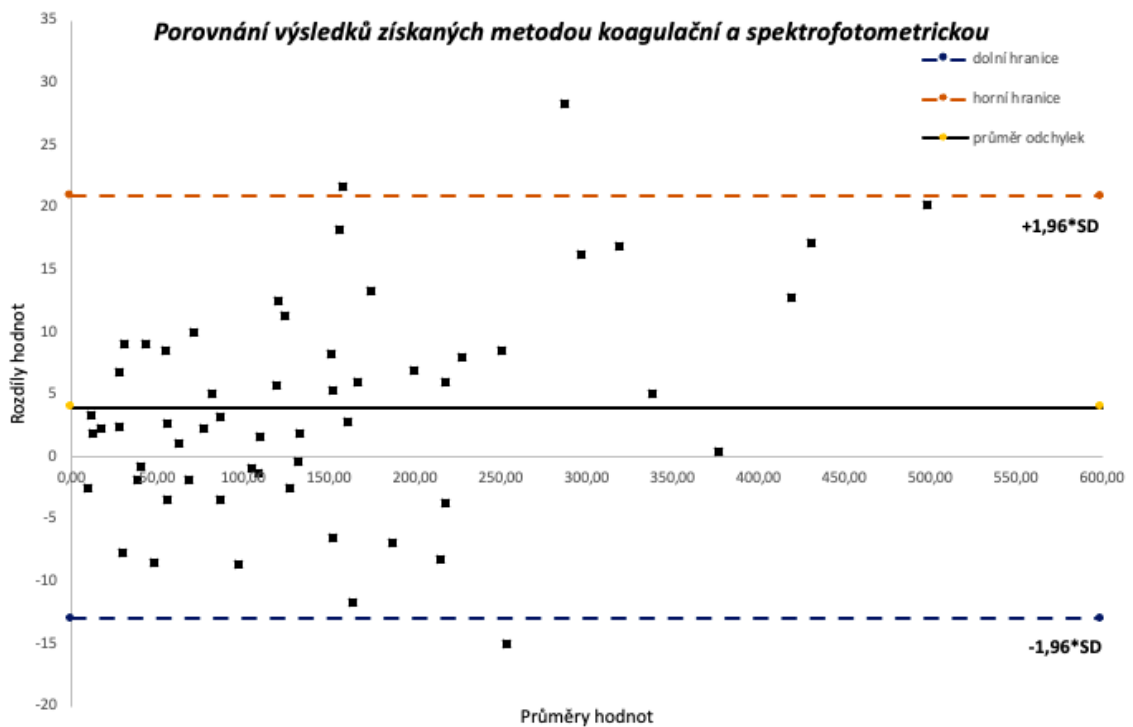
Graf 3 Vyhodnocení výsledků metodou lineární regrese

Bland-Altmanův graf

Bland-Altmanův graf (BA), zvaný také rozdílový graf, lépe popisuje shodu mezi dvěma kvantitativními měřeními. Ke kvantifikaci shody BA graf využívá tzv. limity shody (LOA). Jedná se o velmi používaný graf pro srovnání dvou kvantitativních metod v medicínském prostředí. (58, 59)

Před samotným vytvořením grafu je nejprve potřeba z hodnot x a y, tzn. hodnot koncentrace dabigatranu v plazmě naměřených koagulační a spektrofotometrickou metodou, vytvořit rozdíly (x-y) a průměry hodnot (x+y)/2. Jako hodnoty x jsem zvolila hodnoty naměřené metodou koagulační s reagensy firmy Hyphen BioMed, jelikož se jedná o referenční metodu, hodnoty získané metodou spektrofotometrickou s reagensy firmy Stago byly označeny jako hodnoty y. Získané hodnoty rozdílů a průměrů jsem následně vložila do grafu. Rozdíly (x-y) jsou vyneseny na vertikální ose, zatímco průměry (x+y)/2 jsou na horizontální ose. V grafu se zároveň nacházejí tři osy rovnoběžné s osou x. Středová čára představuje průměr rozdílů hodnot, kolem níž jsou znázorněny dolní a horní hranice LOA $\pm 1,96$ SD. Při hodnocení poté sledujeme šíři intervalu rozdílů hodnot na ose y a polohu středové čáry (průměru rozdílů hodnot). Platí, že čím je širší intervalu

užší a čím bližší je poloha středové čáry k nule, tím je shoda mezi metodami vyšší. V našem případě se širší intervalu rozdílů hodnot pohybuje v rozmezí -12,95 až +20,92. Středová čára zobrazující průměr rozdílů hodnot se nachází na hodnotě +3,99, což značí, že referenční koagulační metoda dává celkově mírně vyšší výsledky než metoda spektrofotometrická. Tento rozdíl ale nenabývá klinického významu. Také nás zajímá počet odlehlých hodnot, tzn. takových, které se nevešly do intervalu LOA. Takové se v grafu nacházejí pouze tři.



Graf 4 Vyhodnocení výsledků pomocí Bland - Altmanova grafu

7 DISKUZE

V současné době se stále častěji podávají pacientům s rizikem trombózy moderní přímá orální antikoagulancia (DOACs) gatrany a xabany. Dosud jediným registrovaným léčivem ze skupiny gatránů je dabigatran etexilát. Jedná se o tzv. proléčivo, které nevykazuje žádné farmakologické účinky, na svou aktivní formu, dabigatran, je přeměněn teprve po metabolizaci v gastrointestinálním traktu. Preskripce dabigatranu je pro pacienta výhodná z mnoha důvodů. Dabigatran oproti jiným antikoagulanciím nevyžaduje pravidelnou monitoraci, což je zásadní rozdíl ve srovnání s warfarinem či heparinem, jelikož jeho farmakologický účinek je dobře předvídatelný. Vzhledem k tomu, že se jedná o přímý inhibitor trombinu, nevyžaduje ke svému účinku přítomnost antitrombinu, jako je tomu u nepřímých inhibitorů trombinu (hepariny). Navíc může dabigatran vázat i trombin již navázaný na fibrinovou síť. Dalším podstatným přínosem dabigatranu je, že se vyznačuje poměrně dlouhým biologickým poločasem, což umožňuje užívání léku pouze 1-2x denně. S užíváním dabigatranu se také pojí nízké riziko krvácení, neinteraguje s potravou a nepodléhá lékovým interakcím jako např. warfarin. Určitou nevýhodou je fakt, že jeho eliminace probíhá převážně ledvinami, což může představovat riziko pro pacienty trpícími renální insuficiencí. Jedná se zejména o pacienty vyššího věku, kterým jsou podle jejich eliminační schopnosti ledvin dávky upravovány, v případě vysoké renální insuficience je užívání dabigatranu kontraindikováno. Hlavní indikací dabigatranu je prevence TEN během operace i po operaci kloubů, poté prevence cévních mozkových příhod, systémové embolizace či jako prevence trombotických komplikací po zavedení chlopenních náhrad.

Přestože moderní antitrombotika nevyžadují pravidelné monitorování, v praxi se opakovaně setkáváme se situacemi, kdy je monitorace léčiva v plazmě nezbytná. V takových případech je nutné mít k dispozici vhodnou a rychlou metodu ke stanovení koncentrace léčiva v plazmě.

Na trhu je dnes dostupných několik komerčních kitů ke stanovení koncentrace dabigatranu v plazmě na automatických koagulometrech. Všechny mají tzv. CE značku, která zaručuje vhodnost jejich použití v laboratoři, přesto by si každá laboratoř měla před zavedením nové reagentie do provozu provést vlastní srovnávací studii, která porovná novou reagentii s původní, dlouhodobě používanou.

V rámci naší srovnávací studie jsme porovnávali výsledky naměřené referenční koagulační metodou využívající reagentie firmy Hyphen BioMed s výsledky

naměřenými novou spektrofotometrickou metodou s reagensii firmy Stago. Měření oběma metodami jsme provedli současně, za stejných podmínek.

Do vyšetřovaného souboru jsme zařadili 57 pacientů FN HK užívajících dabigatran. Naměřené výsledky jsme vyhodnotili metodou lineární regrese a také pomocí Bland-Altmanova grafu. Korelaci jsme vyjádřili rovnicí regresní přímky a korelačním koeficientem. Rovnice přímky $y=0,968x+0,871$ a $r=0,998$ ukazují na velice dobrou korelaci výsledků naměřených referenční koagulační metodou s výsledky naměřenými novou spektrofotometrickou metodou. Vyhodnocení pomocí Bland-Altmanova grafu, který je pro porovnání metod vhodnější, ukazuje rovněž na velkou shodu naměřených výsledků, o čemž nás informuje šíře intervalu rozdílů hodnot i hodnota průměru rozdílů hodnot. Z Bland-Altmanova grafu je rovněž patrné, že referenční koagulační metoda poskytuje lehce vyšší hodnoty koncentrace dabigatranu než nová metoda spektrofotometrická. Nejedná se však o klinicky významné rozdíly, které by zásadně ovlivňovaly interpretaci výsledků.

Na základě našich výsledků je možné říci, že obě metody jsou dostatečně citlivé pro měření terapeutických koncentrací dabigatranu v plazmě a měří se srovnatelnou přesností. Výhodou nové spektrofotometrické metody s reagensii firmy Stago je širší validovaný měřicí rozsah, tzn. že i nízké koncentrace dabigatranu jsme schopni změřit přesně na jednu kalibrační křivku. Rovněž stabilita reagensii po naředění je delší u reagensii pro spektrofotometrickou metodu. Naopak finanční stránka vychází ve prospěch původní koagulační metody s reagensii firmy Hyphen BioMed.

8 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce jsem stručně popsala hemostázu, její jednotlivé součásti, stručně jsem shrnula průběh hemostatického děje a způsoby regulace hemostázy. Dále jsem popsala možnosti antikoagulační léčby, která je podávána pacientům při hyperkoagulačních stavech, včetně možností jejího laboratorního monitorování. Pozornost byla věnována především možnostem laboratorního stanovení koncentrace dabigatranu, jež je náplní praktické části této bakalářské práce.

V praktické části jsem se zaměřila na zavedení nové spektrofotometrické metody k monitorování léčby dabigatranem na automatickém koagulometru. Samotnému zavedení nové metody do laboratorního provozu musí předcházet srovnávací studie, během které je na vzorcích pacientů prováděno měření oběma metodami současně. Naměřené výsledky jsem poté statisticky vyhodnotila. Porovnála jsem výsledky naměřené referenční koagulační metodou s reagensii firmy Hyphen BioMed s výsledky naměřenými novou spektrofotometrickou metodou s reagensii firmy Stago. Studie byla provedena na 57 vzorcích pacientů FN HK, každý vzorek byl měřen současně referenční i novou metodou v laboratoři IV. interní hematologické kliniky FN HK.

Získaná data byla statisticky vyhodnocena metodou lineární regrese a pomocí Bland-Altmanova grafu. Statistickým vyhodnocením výsledků jsem dospěla ke zjištění, že obě metody měří se srovnatelnou přesností a poskytují téměř shodné výsledky. Z Bland-Altmanova grafu je sice patrné, že referenční koagulační metoda vydává mírně vyšší hodnoty než nová spektrofotometrická metoda, nejedná se však o klinicky významné rozdíly. Závěrem provedené srovnávací studie tedy je, že nic nebrání zavedení nové spektrofotometrické metody na principu ekarinového testu s reagensii firmy Stago do běžného laboratorního provozu k monitoraci léčby dabigatranem.

9 POUŽITÉ ZKRATKY

ADP	adenosindifosfát
APC	aktivovaný protein C
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
AT	antitrombin
BA	Bland-Altmanův graf
Ca ²⁺	vápenaté ionty
DOACs	přímá orální antikoagulancia
FVa	aktivovaný faktor V
FVIIa	aktivovaný faktor VII
FIXa	aktivovaný faktor IX
FXa	aktivovaný faktor X
FXIa	aktivovaný faktor XI
GP	glykoproteiny
HC II	heparin kofaktor II
HIT	heparinem indukovaná trombocytopenie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
INR	mezinárodní normalizovaný poměr
ISI	index citlivosti tromboplastinu
KH ₂	vitamin K hydrochinon
KO	vitamin K 2,3-epoxid
LMWH	nízkomolekulární heparin
MS	hmotnostní spektrometrie
NO	oxid dusnatý
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PF4	destičkový faktor 4
PL	fosfolipidy
pNA	p-nitroanilin
r	korelační koeficient
PT	protrombinový test
TAFI	trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TEN	tromboembolická nemoc
TF	tkáňový faktor

TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TM	trombomodulin
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TXA ₂	tromboxan A ₂
UFH	nefrakcionovaný heparin
uPA	urokináza
VKORC1	vitamin K 2,3-epoxid reduktáza
vWf	von Willebrandův faktor

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Schéma třífázového modelu koagulace	16
Obr. 2 Znázornění mechanismu účinku warfarinu	21
Obr. 3 Chemická struktura aktivní formy dabigatranu	25
Obr. 4 Schéma použité koagulační metody	30
Obr. 5 Schéma použité spektrofotometrické metody.....	31

11 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Souhrn koagulačních faktorů.....	15
Tab. 2 Reagencie Hyphen BioMed.....	32
Tab. 3 Reagencie Stago	33
Tab. 4 Množství destilované vody potřebné k rekonstituci reaglií Hyphen.....	33
Tab. 5 Stabilita nařaděných reaglií Hyphen	33
Tab. 6 Množství destilované vody potřebné k rekonstituci reaglií Stago	34
Tab. 7 Stabilita připravených reaglií Stago	34
Tab. 8 Nastavení koagulometru pro měření koagulační metodou	34
Tab. 9 Nastavení koagulometru pro měření spektrofotometrickou metodou	35
Tab. 10 Kalibrace koagulační metody	36
Tab. 11 Kalibrace spektrofotometrické metody	36
Tab. 12 Tabulka výsledků získaných metodou koagulační a spektrofotometrickou	54

12 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Kalibrační křivka koagulační metody, Hyphen.....	36
Graf 2 Kalibrační křivka spektrofotometrické metody, Stago.....	37
Graf 3 Vyhodnocení výsledků metodou lineární regrese	41
Graf 4 Vyhodnocení výsledků pomocí Bland - Altmanova grafu	42

13 LITERATURA

1. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu, Fyziologie a patologie hemostázy*. 3. Český Těšín: FINIDR, 2004. ISBN 80-86682-03-X.
2. MATÝŠKOVÁ, Miloslava, Jiřina ZAVŘELOVÁ a Ingrid HRACHOVINOVÁ. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999, 203 s. ISBN 80-7013-278-7
3. Šlechtová J.: Hemostáza – jak ji možná neznáme Šlechtová J.: Hemostasis – as we possibly don't know it, *Klin. Biochem. Metab.*, 15 (36), 2007, No. 2, p. 97–101.
4. PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
5. HAWIGER, Jacek. Formation and regulation of platelet and fibrin hemostatic plug. *Human Pathology*. 1987, (18), 12. Dostupné z: doi:10.1016/S0046-8177(87)80330-1
6. MCMICHAEL, Maureen. Primary hemostasis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2005, (15). Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-4431.2005.04021.x
7. DAHLBÄCK, Björn. Blood coagulation. *THE LANCET*. 2000, (355), 6. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(00)02225-X
8. TANAKA, Kenichi A, Nigel S. KEY a Jerrold H. LEVY. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesthesia & Analgesia*. 2009, **108**(5), 14. Dostupné z: doi:10.1213/ane.0b013e31819bcc9c
9. FONTANA, Josef a Petra LAVŘÍKOVÁ. Hemostáza. *Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta* [online]. [cit. 2021-03-24]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/v-krev-a-organy-imunitniho-systemu/4-hemostaza/>
10. PALTA, Sanjeev, Richa SAROA a Anshu PALTA. Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia*. 2014, **58**(5). Dostupné z: doi:10.4103/0019-5049.144643
11. CHAPIN, John C. a K. A. HAJJAR. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*. 2015, **29**(1), 17-24. Dostupné z: doi:10.1016/j.blre.2014.09.003

12. CESARMAN-MAUS, Gabriela a Katherine A. HAJJAR. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*. 2005, **129**(3), 15. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x
13. ESMON, Charles. The protein C pathway. *Critical Care Medicine*. 2000, **28**(9), 44-48.
14. PENKA, Miroslav, Igor PENKA a Jaromír GUMULEC. *Krvácení*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-0689-4
15. Miljić P, Heylen E, Willemsse J, Djordjević V, Radojković D, Colović M, Elezović I, Hendriks D. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): a molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Srp Arh Celok Lek*. 2010 Jan;138 Suppl 1:74-8. doi: 10.2298/sarh10s1074m. PMID: 20229688.
16. Pecka M. a kol.: Praktická hematologie Laboratorní metody [Kniha]. Nakladatelství Infiniti art s. r. o., 2010. ISBN 978-80-903871-9-5.
17. HORTON, J. D. a B. M. BUSHWICK. Warfarin Therapy: Evolving Strategies in Anticoagulation. *American Family Physician*. 1999, **59**(3), 635-646.
18. MORAVEC, Vladimír. *Látky ovlivňující proces srážení krve* [online]. [cit. 2021-03-28]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/5653472/>
19. TEI, Jian-Ke a Darrel W. STAFFORD. Structure and Function of Vitamin K Epoxide Reductase. *Vitamins & Hormones*. 2008, **78**, 103-130. Dostupné z: doi:10.1016/S0083-6729(07)00006-4
20. OWEN, Ryan P., Li GONG, H. SAGREIYA, T. E. KLEIN a R. B. ALTMAN. VKORC1 Pharmacogenomics Summary. *Pharmacogenet Genomics*. 2010, **20**(10), 642-644. Dostupné z: doi:10.1097/FPC.0b013e32833433b6
21. MAZÁNKOVÁ, Dana, Veronika BÁRKOVÁ a Hoa Anh NGUYENOVÁ. *Farmaceutická péče u warfarinizovaných pacientů*. Brno, 2019. Odborná práce. Farmaceutická fakulta VFU Brno
22. Prothrombin Time and International Normalized Ratio (PT/INR). *LAB TESTS ONLINE* [online]. 2021 [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://labtestsonline.org/tests/prothrombin-time-and-international-normalized-ratio-ptinr>
23. PT (protrombinový čas, Quick, tromboplastinový test). *Vaše laboratoře* [online]. [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://www.vaselaboratore.cz/seznam-vysetreni/hematologie/item/pt-protrombinovy-cas-quick-tromboplastinovy-test>

24. BAUER, J. Antikoagulační terapie v prevenci a léčbě ischemických iktů. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2010, **73/106**(5), 480-491.
25. HIRSCH, J., S. S. ANAND, J. L. HALPERIN a V. FUSTER. Mechanism of Action and Pharmacology of Unfractionated Heparin. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001, **21**(7), 1094–1096. Dostupné z: doi:10.1161/hq0701.093686
26. HIRSCH, Jack. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety. *CHEST journal*. 2001, **119**(1), 64S-94S. Dostupné z:doi:10.1378/chest.119.1_suppl.64S
27. Dorothy M. (Adcock) Funk; Coagulation assays and anticoagulant monitoring. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; 2012 (1): 460–465. doi: <https://doi.org/10.1182/asheducation.V2012.1.460.3798662>
28. *Heparin-Induced Thrombocytopenia* [online]. 2019 [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/1357846-overview#a1>
29. *Partial Thromboplastin Time (PTT, aPTT)* [online]. 2021 [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: <https://labtestsonline.org/tests/partial-thromboplastin-time-ptt-aptt>
30. CHLUMSKÝ, Jaromír. Pentasacharidy v léčbě akutní plicní embolie. *Remedia*. 2012, **22**(2), 141-143.
31. ADCOCK, D. M. a R. GOSSELIN. Direct Oral Anticoagulants (DOACs) in the Laboratory: 2015 Review. *Thrombosis Research*. 2015, **136**(1), 7-12. Dostupné z: doi:10.1016/j.thromres.2015.05.001
32. KARETOVÁ, D. a J. BULTAS. Nová perorální antitrombotika v prevenci a léčbě tromboembolizmu. *Kardiologická revue – Interní medicína*. 2012, **14**(2), 88-92.
33. Burdová, K. (2015). Přímá perorální antikoagulancia. *Klin Farmakol Farm*, 29(4), 138-143
34. Kvasnička J, Malíková I. Laboratorní kontrola nových přímých antikoagulancií. *Remedia* 2014; 24: 108–112.
35. HANKEY, G. J. a J. E. EIKELBOOM. Dabigatran Etxilate A New Oral Thrombin Inhibitor. *Circulation*. 2011, **123**(13), 1436-1450. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.004424
36. Kvasnička, T. (2016). Dabigatran - klinické důkazy pro léčbu pacientů s TEN. *Solen*, 30(3), 15-17. doi: 10.36290/far.2016.023
37. Bultas, J., & Karetová, D. (2010). Dabigatran etexilát - nový perspektivní hráč na poli antitrombotik. *Interv Akut Kardiol*, 9(1), 27-31

38. *Praxbind (Idarucizumab)* [online]. 2019 [cit. 2021-04-13]. Dostupné z: <https://www.manual-cmp.cz/praxbind-idarucizumab/>
39. Krčová, V., Hluší, A., Palová, M., Slavík, L., & Úlehlová, J. (2012). Nová antikoagulancia - možnosti monitorování antikoagulačního účinku (dabigatran). *Interní Med.*, 14(8-9), 318-322.
40. EISERT, W. G., N. HAUEL a J. STANGIER. Dabigatran: An Oral Novel Potent Reversible Nonpeptide Inhibitor of Thrombin. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010, **30**(10), 1885–1889. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.110.203604
41. STANGIER, J. a A. CLEMENS. Pharmacology, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Dabigatran Etxilate, an Oral Direct Thrombin Inhibitor. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2009, **15**(1), 9S-16S. Dostupné z: doi:10.1177/1076029609343004
42. RYN, J. van, J. STANGIER a S. HAERTTER. Dabigatran etexilate – a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: Interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thrombosis and Haemostasis*. 2010, **103**(6), 1116–1127. Dostupné z: doi:10.1160/TH09-11-0758
43. Kacířová, I., & Grundmann, M. (2020). Terapeutické monitorování léčiv - review. *Klin Farmakol Farm*, 34(2), 47-55. doi: 10.36290/far.2020.011
44. GOUVEIA, F. a J. BICKER. Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review. *Analytica Chimica Acta*. 2019, **1076**, 18-31. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.03.061
45. Příbalový leták diagnostické soupravy HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors, HYPHEN BioMed
46. Příbalový leták diagnostické soupravy Direct Thrombin Inhibitor Assay, HemosIL
47. Příbalový leták diagnostické soupravy Innovance DTI Assay, Siemens
48. Příbalový leták diagnostické soupravy STA-ECA II, Stago
49. Odběr vzorku. In: *Vaše laboratoře* [online]. [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <https://www.vaselaboratore.cz/preanalyticka-faze-manual-pro-odbery-primarnich-vzorku/odber-vzorku>
50. Laboratorní příručka laboratoře pro poruchy hemostázy ÚHKT v Praze, č. 2, verze A2, 26. 5. 2020

51. Diagnostica Stago Launches STA-R Evolution System. In: *Clinical Lab Products* [online]. 2006 [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://clpmag.com/miscellaneous/diagnostica-stago-launches-sta-r-evolution-system/>
52. TRBUŠEK, Jan. *Koagulační vyšetření v rámci laboratorní automatizace a řešení firmy Stago* [online]. Biomedica ČS [cit. 2021-03-19]. 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>
53. Thrombin Time. *A PRACTICAL GUIDE TO HAEMOSTASIS* [online]. SANG Medicine, 2021 [cit. 2021-04-21]. Dostupné z: https://practical-haemostasis.com/Screening%20Tests/thrombin_time.html
54. GOSELIN, R. C. Ecarin based coagulation testing. *American Journal of Hematology*. 2020, **95**(7), 863-869. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.25852
55. LANGE, U., G. NOWAK a E. BUCHA. Ecarin Chromogenic Assay – A New Method for Quantitative Determination of Direct Thrombin Inhibitors Like Hirudin. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2003, **33**(4), 202–205. Dostupné z: doi:10.1159/000081506
56. SKOPAL, M. J. a A. FIALA. Kalibrace a přesnost měření. *Průmyslové spektrum* [online]. Fakulta strojního inženýrství VUT v Brně, 2011 [cit. 2021-04-19]. Dostupné z: <https://www.mmspektrum.com/clanek/kalibrace-a-presnost-mereni>
57. *Řízení analytické kvality* [online]. Brno [cit. 2021-04-10]. Dostupné z: <https://www.med.muni.cz/pes/index.php?id=1190>
58. GIAVARINA, D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemica Medica*. 2015, **25**(2), 141-151. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2015.015
59. HENDL, J. Statistické přístupy k porovnání biomedicínských metod měření. *Česká kinantropologie*. Katedra základů kinantropologie a humanitních věd: Univerzita Karlova v Praze, fakulta tělesné výchovy a sportu, 1997, **6**, 87-96.

14 PŘÍLOHY

Tab. 12 Tabulka výsledků získaných metodou koagulační a spektrofotometrickou

<i>Číslo vzorku</i>	<i>Koncentrace ng/ml (koagulační metoda)</i>	<i>Koncentrace ng/ml (spektrofotometrická metoda)</i>
1	203,41	196,46
2	59,14	50,59
3	47,76	38,75
4	32,31	25,57
5	134,31	132,48
6	169,35	163,33
7	107,52	108,88
8	25,69	33,35
9	104,43	105,36
10	166,26	147,99
11	508,34	488,07
12	301,23	272,85
13	154,92	146,66
14	121,95	116,18
15	58,07	55,43
16	376,45	375,96
17	159,04	170,74
18	183,77	190,69
19	84,68	79,57
20	254,17	245,61
21	38,49	40,37
22	29,55	27,17
23	77,46	67,41
24	67,16	68,97
25	127,85	115,3
26	168,71	147,07
27	425,36	412,62
28	36,31	27,2
29	13,09	9,79
30	341,28	336,23
31	13,39	11,52
32	231,47	223,51
33	40,58	41,35
34	162,78	159,96
35	131,64	132,05

36	78,12	75,87
37	62,54	61,42
38	215,96	219,63
39	111,35	109,68
40	125,75	128,31
41	17,92	15,69
42	55,17	58,61
43	92,89	101,56
44	221,67	215,71
45	84,65	88,09
46	149,03	155,57
47	181,32	167,94
48	45,06	53,54
49	327,25	310,35
50	88,17	84,89
51	245,45	260,38
52	129,87	118,49
53	439,65	422,47
54	154,69	149,36
55	210,68	218,93
56	8,32	10,84
57	305,71	289,47