

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

MONITORING VYBRANÝCH KOAGULAČNÍCH PARAMETRŮ V GRAVIDITĚ

Vedoucí diplomové práce: PharmDr.Miloslav Hronek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2010

Bc. Radka Nováková

Děkuji MUDr. P. Šigutové za poskytnutí potřebných dat, prim. MUDr. J. Šlechtové a MUDr. L. Bultasové za odborné konzultace při sepsání diplomové práce.

Zároveň bych chtěla poděkovat PharmDr. Miloslavu Hronkovi, Ph.D. za vedení a konzultace spojené s diplomovou prací.

Obsah

1.ÚVOD	5
2.CÍL STUDIE.....	6
3.TEORETICKÁ ČÁST	7
3.1. Hemostáza	7
3.2. Systém inhibitorů hemostázy	10
3.2.1. Inhibitory plazmatického koagulačního systému	10
3.3. Fibrinolytický systém	14
3.3.1. Systém plazminogenu a plazminu	16
3.3.2. Aktivátory plazminogenu	18
3.3.3. Inhibitory fibrinolýzy	20
3.4. Těhotenství.....	23
4.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1. Charakteristika souboru.....	26
4.2. Materiál.....	26
4.2.1. Odběr a příprava materiálu.....	27
4.3. Vyšetřovací metody	28
4.3.1. Koagulační metody	28
4.3.2. ELISA metody	34
5.GRAFICKÉ ZPRACOVÁNÍ	47
5.1. Trombomodulin, TM(antigen).....	49
5.2. Plazminogen, Plg(aktivita).....	50
5.3. Tkáňový aktivátor plazminogenu, tPA(aktivita).....	51
5.4. Inhibitor aktivátoru plazminogenu, PAI akt(aktivita)	52
5.5. Inhibitor aktivátoru plazminogenu, PAI Ag (antigen).....	53

5.6.	α_2 antiplazmin, AP(aktivita).....	54
6.	DISKUSE.....	55
6.1.	Trombomodulin.....	55
6.2.	Plazminogen.....	55
6.3.	Tkáňový aktivátor plazminogenu	56
6.4.	Inhibitor aktivátoru plazminogenu (aktivita).....	56
6.5.	Inhibitor aktivátoru plazminogenu (antigen)	57
6.6.	α_2 -antiplazmin	57
7.	ZÁVĚR	58
8.	SOUHRN	59
9.	ABSTRAKT	61
10.	SEZNAM ZKRATEK	63
11.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	66

1. ÚVOD

Opakovaná fetální ztráta je častým zdravotním problémem. V současné době je tímto problémem postiženo 1-5% fertálních žen (19-49 let).[1]

Přestože podle statistik celkový počet potratů po dvou letech stagnace klesá, počet samovolných potratů má naopak stoupající charakter. V roce 2007 bylo registrováno 14 102 samovolných potratů, v roce 2008 už jich bylo 14 273 a v loňském roce 2009 se počet samovolných potratů zvýšil o dalších 356 na 14 629. [2]

Během těhotenství dochází v organismu ženy k některým změnám. Fyziologickou změnou je v tomto období hyperkoagulační stav, který obecně zvyšuje dispozici k trombofilii. Pod vlivem těhotenských hormonů, zejména estrogenu, dochází ke zvýšení hladiny koagulačních faktorů, faktoru II, V, VII, VIII, IX, XII, fibrinogenu a von Willebrandova faktoru.[3][4][5] Dále dochází k poklesu koagulačních faktorů XI a XIII [5] a k inhibici fibrinolýzy.[3][4] Tento stav je během těhotenství kompenzován různými protektivními mechanismy, např. hemodilucí nebo zvýšením aktivity některých přirozených inhibitorů koagulace, zejména inhibitoru tkáňového faktoru (TFPI), α_2 -makroglobulinu a α_1 -antitrypsinu, a proto sám o sobě tento stav k trombotizaci nevede.[3]

U patologického těhotenství je tomu trochu jinak. Nedochází k udržení křehké rovnováhy v systému koagulace, ale naopak dochází velmi snadno k její dekompenzaci. Z hlediska hematologie řadíme k příčinám dekompenzace vrozené a získané poruchy hemostázy, které se mohou projevit buď krvácením, nebo častěji trombotizací v arteriálním a žilním řečišti těhotné ženy nebo fetoplacentární jednotky[6] a ve svém důsledku mohou být i příčinou odúmrtní plodu. Tyto poruchy patří mezi jedny z možných příčin opakujících se časných nebo pozdějších ztrát plodu stejně tak jako snížené plodnosti.[7]

Protože v současnosti zůstává patogeneze opakovaných spontánních ztrát plodu nejasná, je ženám s touto osobní anamnézou v průběhu těhotenství podáván nízkomolekulární heparin (LMHW). Tento lék je považován za bezpečný a účinný při léčbě a prevenci žilního tromboembolizmu (VTE) v těhotenství.[8]

2.CÍL STUDIE

Ve své diplomové práci se zabývám stanovením vybraných koagulačních parametrů u pacientek s opakovanými ztrátami plodu, které byly během těhotenství profylakticky zajišťovány LMWH.

V letech 2006 až 2008 proběhl na našem oddělení, úseku hematologie ÚKBH Lochotín FN Plzeň, ve spolupráci s Gynekologicko-porodnickou klinikou FN Plzeň grant IGA MZ CR NR8917–3[9], který z hematologického hlediska sledoval změny hemokoagulace při dlouhodobém podávání nízkomolekulárního heparinu (LMWH) jako ochrany těhotenství u pacientek s opakovanými ztrátami plodu.

Protože jsem se osobně podílela na přípravě a sběru materiálu, jeho uchování (zamrazování) a následné zpracování (včetně nastavení metod dle aplikačních protokolů a stanovení výsledků), vybrala jsem si pro vypracování diplomové práce některé koagulační parametry stanovené v plazmě těhotných žen zařazených do toho grantu.

Jedná se o stanovení funkčních aktivit a hmotnostních koncentrací aktivátorů a inhibitorů koagulačního a fibrinolytického systému. Funkční aktivitu plazminogenu, inhibitoru aktivátoru plazminogenu a α_2 -antiplazminu jsme stanovovali pomocí chromogenních substrátů na analyzátoru Sysmex CA-1500. Antigeny trombomodulinu, tkáňového aktivátoru plazminogenu a inhibitoru aktivátoru plazminogenu jsme vyšetřovali metodou přímé nekompetitivní ELISY.

Odběry krve byly prováděny v době před otěhotněním a několikrát po dobu těhotenství, v období do 10. týdne, od 10. do 19. týdne, od 20. do 29. týdne a od 30. týdne.

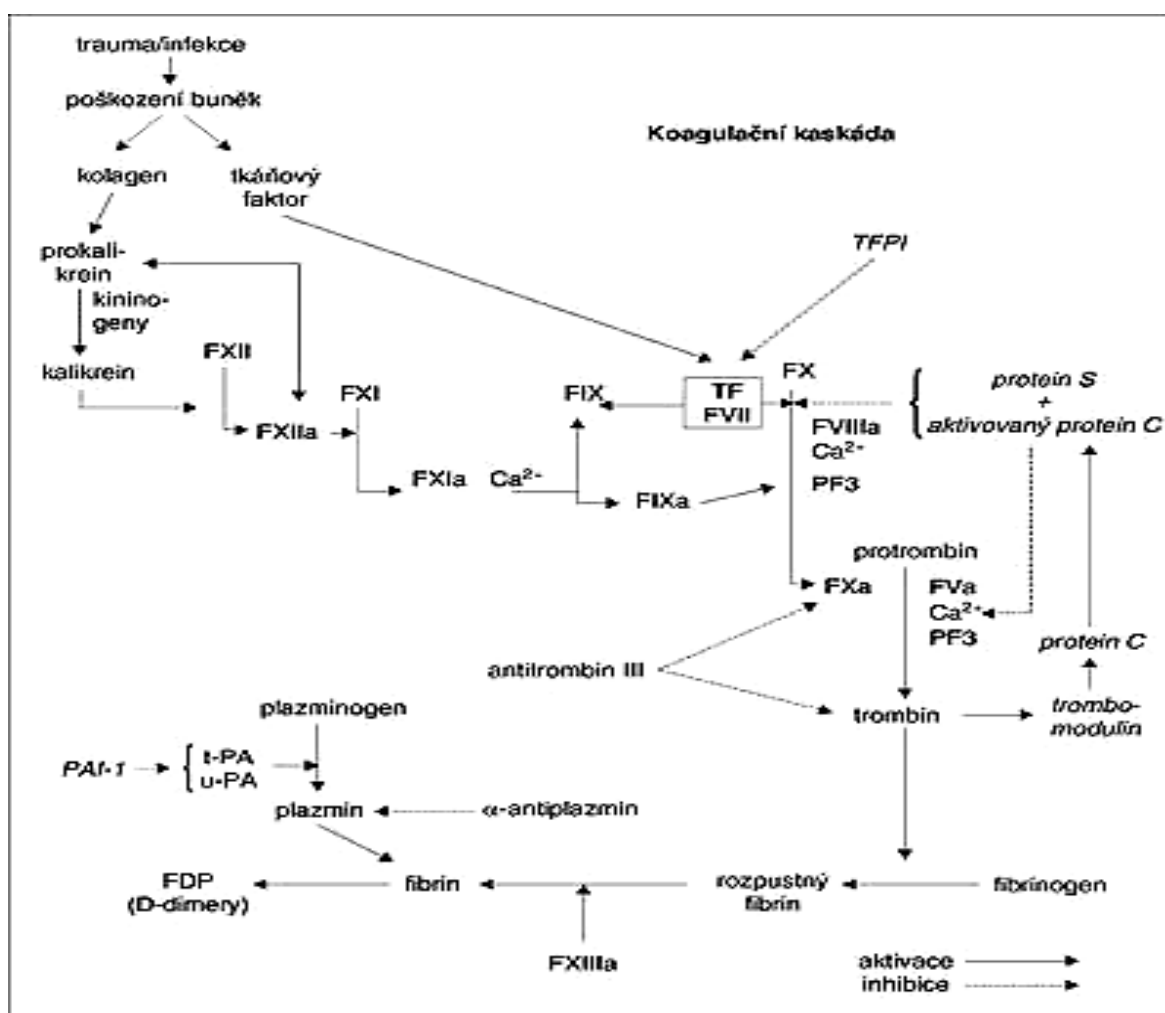
Pacientky byly po dobu gravidity podle osobní anamnézy profylakticky zajišťovány v období 25.–43. týdne nadroparinem (Fraxiparine), event. při alergických projevech enoxaparinem (Clexane).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Hemostáza

Hemostáza je velmi složitý, ale komplexní proces. Podílí se na zástavě krvácení v místě určení řadou mechanismů s rozdílnými vstupy a účinky, celou řadou pozitivních a negativních zpětných vazeb aktivátorů a inhibitorů hemostatického procesu[10] (obr.1).[3]

Obr.1. Schéma koagulace a fibrinolýzy a jejich inhibitory



Základními mechanismy hemostázy jsou primární hemostáza, plazmatický koagulační systém, fibrinolytický systém a inhibitory krevního srážení a fibrinolýzy.

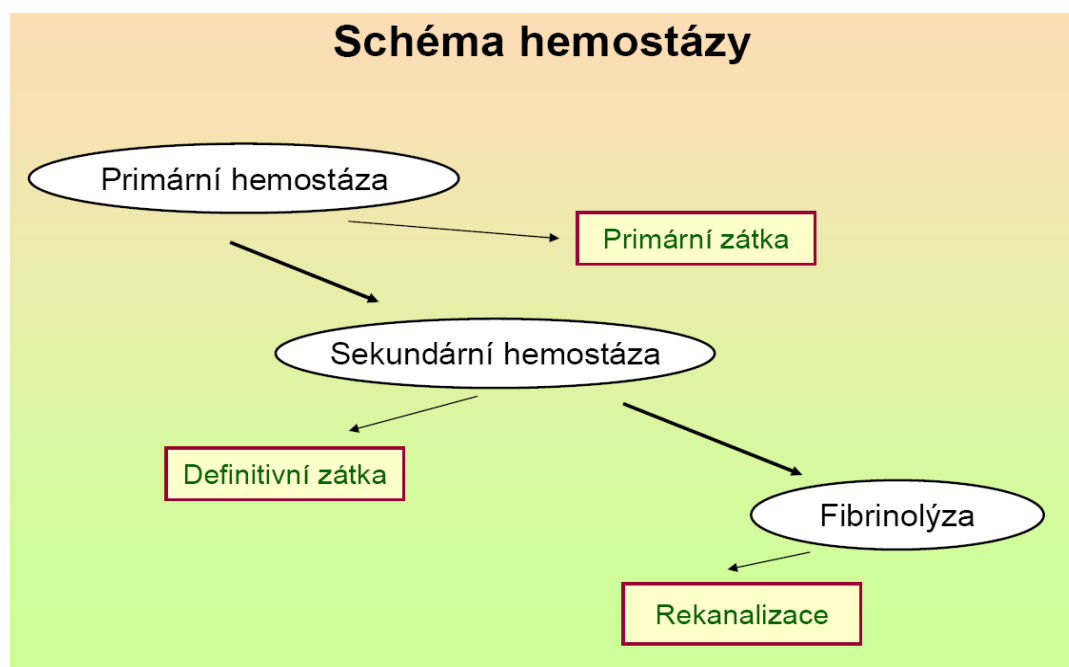
Při poškození cévního endotelu (mechanickém, chemickém, biologickém) je zahájen proces srážení kombinovanou adhezivní reakcí, která zahrnuje jak krevní destičky, tak ostatní buňky nebo látky podílející se na hemostáze.[11] Bezprostředně po poškození mají aktivované destičky snahu přichytit se k cévní stěně. K tomu dochází po spojení povrchových destičkových glykoproteinů GP Ib–IX s von Willebrandovým faktorem, který je produkován stresovaným endotelem. V druhé fázi pak v destičkách dochází k syntéze tromboxanu TXA₂ s "de novo" expresí destičkových glykoproteinů IIb/IIIa, na které se váže fibrinogen. Následně dochází ke shlukování destiček mezi sebou a k vytvoření destičkového trombu [3], tzv. primární hemostatické zátky (obr.2).[11] Ta se aktivací dalších procesů zpevní a po jejím smrštění se vytvoří definitivní krevní zátka vedoucí k zástavě krvácení. [10]

Primární a sekundární hemostáza, tj. tvorba primární hemostatické zátky a její stabilizace fibrinovou sítí, jsou procesy, které se navzájem prolínají a tvoří jeden celek.

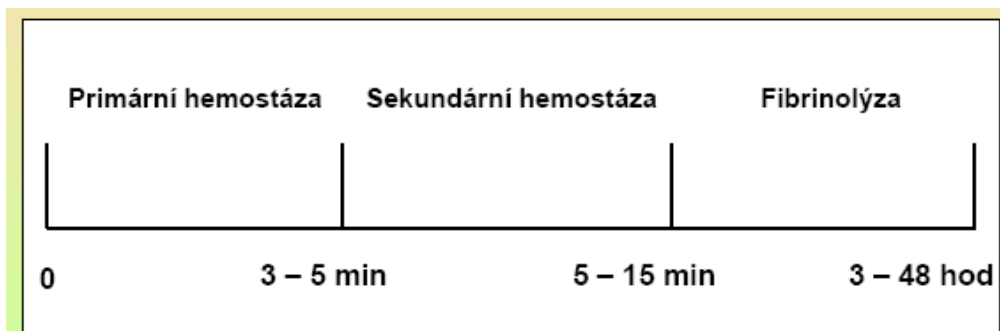
Poslední fází hemostázy je fibrinolýza, která umožní rozpuštěním trombu, rekanalizaci a plné funkční obnovení průtoku krve cévou. Zároveň probíhají reparativní procesy vedoucí v konečné fázi k celkovému zhojení poškozené cévy.

Tento celý proces od vzniku primární hemostázy až po fibrinolýzu (obr.2)[11] trvá podle rozsahu poškození cévy od několika minut až po několik dní (obr.3).[11]

Obr.2. Schéma hemostázy



Obr.3. Časový průběh hemostázy



V neporušeném žilním systému podporuje trombogenezí zpomalení krevního toku a hyperkoagulace. Ta je způsobená na jedné straně nadbytkem koagulačních faktorů a na straně druhé nedostatkem jejich přirozených inhibitorů.

Mezi deficity inhibitorů patří snížená aktivita antitrombinu (AT), který inhibuje nadbytečný trombin a aktivovaný faktor X (Xa). Dále mezi deficit inhibitorů patří snížená hladina proteinu C (PC) a proteinu S (PS), zpětnovazebně inhibující aktivované faktory V (Va) a VIII (VIIIa) a v neposlední řadě deficit přirozeného inhibitoru tkáňového faktoru (TFPI), který potlačuje aktivitu komplexu [TF.FVIIa] a již v počátku blokuje aktivaci zevního systému koagulace. Antitromboticky působí i glykoprotein trombomodulin, který je lokalizován na povrchu endotelu, kde inhibuje volný trombin. Vedle těchto “specifických” inhibitorů aktivovaných koagulačních faktorů, regulují krevní srážení i jiné plazmatické inhibitory, jako je α_2 -makroglobulin, α_1 -antiproteináza aj.

3.2. Systém inhibitorů hemostázy

Inhibitory krevního srážení jsou heterogenní skupinou přirozených složek krve, které se podílí na tlumení jednak procesu srážení vyvolaného plazmatickým koagulačním systémem, a také na procesu fibrinolýzy.

Jedná se o tzv. proteolytické enzymy, serinové proteázy, které brání nekontrolovanému srážení krve. Udržují tak dynamickou koagulační rovnováhu.

Pozměněné hladiny, případně funkční abnormality některých inhibitorů zejména antitrombinu, systému proteinu C a trombinem aktivovaného inhibitoru fibrinolýzy (TAFI) představují značné riziko pro vznik trombózy [10].

3.2.1. Inhibitory plazmatického koagulačního systému

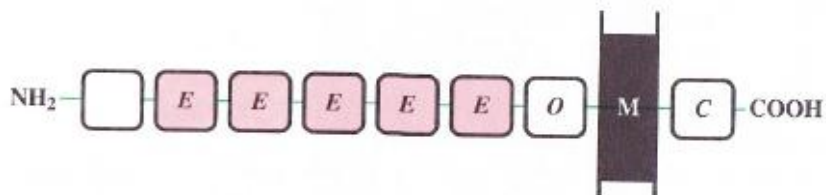
V průběhu srážecího procesu se tvoří v nadbytečném množství proteolytický enzym trombin. Nadbytečný trombin musí být na konci tohoto procesu okamžitě vyvázn, aby se zabránilo nekontrolovatelnému srážení a následně trombóze.

Z přirozených inhibitorů krevního srážení se nejvíce uplatňují antitrombin a α_2 -makroglobulin. Vedle nich existují ještě další inhibitory jako je již zmíněný plazmatický inhibitor serinových proteáz Kunitzova typu TFPI, který inhibuje komplex [VIIa.TF] zevní cesty aktivace koagulace nebo systém proteinu C, který je schopen inaktivovat některé koagulační faktory (VIIIa a Va) a reguluje tak již tvorbu trombinu.

Systém proteinu C tvořený proteinem C, proteinem S a trombomodulinem je klíčovou složkou přirozené antikoagulační cesty. Ta je aktivována na povrchu endotelových buněk trombinem vázaným k trombomodulinu.[10]

Trombomodulin (TM)

Obr.4. Molekula trombomodulinu



Trombomodulin (obr.4)[10] je integrální transmembránový glykoprotein, který má antikoagulační aktivitu.[12] Vazbou na trombin v systému proteinu C aktivuje přirozenou antikoagulační cestu a společně s antitrombinem a TFPI patří k nejúčinnějšímu inhibičnímu systému hemostázy.[10]

Trombomodulin byl nalezen v membráně neaktivovaných endoteliálních buněk tepen, žil, kapilár a lymfatických uzlin metodou imunocytochemického barvení pomocí avidin-biotin peroxidázy. Během těhotenství je přítomen ještě v syncytiotrofoblastu v placentě.[13]

Z membrány buněk endotelu se uvolňuje do krevního řečiště po proteolytickém štěpení enzymem elastázou pocházející z aktivovaných neutrofilů. Při poškození těchto buněk se jeho hladina zvyšuje. Protože se jeho hladina v plazmě odvíjí od stavu endotelu, může se TM považovat za marker endoteliálního poškození jak velkých, tak i malých cév.

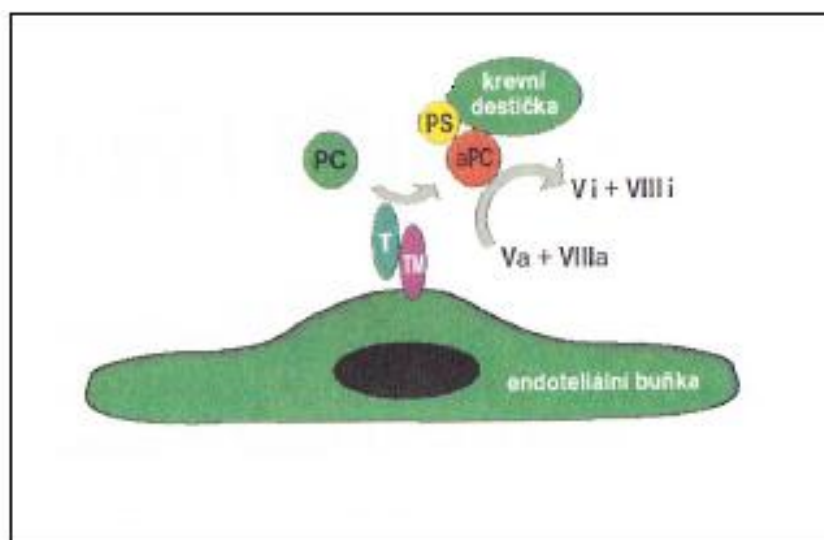
Referenční rozmezí trombomodulinu v plazmě je 34–54 ng/ml. K jeho zvýšení dochází poruchami endotelu např. diseminovanou intravaskulární koagulací (DIC), embolií, lupusem nebo ARDS.[14]

Molekulová hmotnost primární struktury 75kDa byla zjištěna elektroforézou na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). [15]

Sekundární struktura trombomodulinu o molekulové hmotnosti 105kDa obsahuje více cystinových můstků a vzniká snížením disulfidických vazeb. Tato konfirmace poskytuje trombomodulinu větší stabilitu před extrémními hodnotami pH nebo denaturací. Struktura TM se podobá lipoproteinu o nízké hustotě (LDL).[16]

Funkcí trombomodulinu je snížení aktivace protrombinového komplexu s faktorem Xa. Trombomodulinem vyvázaný trombin ztrácí svou prokoagulační aktivitu a tím schopnost štěpit fibrinogen. Trombomodulin dále potencuje aktivaci systému proteinu C (obr.5)[10] a dochází k inaktivaci faktorů Va a VIIIa[14]. Jeho funkce kofaktoru při aktivaci proteinu C trombinem urychluje tuto reakci až 1500x. Vzniklý komplex [TM.trombin] v poměru 1:1 nevyžaduje Ca^{2+} , a přesto dokáže inaktivovat faktory XIII, VIII, V a krevní destičky. Vazbu proteinu C na komplex [TM.trombin] urychluje nízká koncentrace faktoru Va.

Obr.5. Schéma funkce trombomodulinu v systému proteinu C



Pokud se trombomodulin nachází mimo cévy, vzdáleně od endotelu, podporuje vznik sraženiny, ale je-li přítomen v blízkosti endotelu generuje antikoagulační aktivitu aktivovaného proteinu C k zajištění plynulosti krevního toku.[16]

Trombomodulin také inhibuje proteolytický účinek trombinu na makromolekulární substráty. Pokud jeho molekula obsahuje galaktozanimoglykan, urychluje inaktivaci trombinu pomocí antitrombinu.

Mutace genu pro trombomodulin, dnes je známých celkem 29 mutací, se záměnou Ala za Val v 455, nebo Pro za Leu v 483, Gly za Ala v 61, Asp za Tyr v 468 aj. způsobují trombofilii a mohou vést ke vzniku některých arteriálních trombóz.[3]

Trombomodulin se považuje za protein, který se podílí jak na procesu srážení, tak na rakovinném bujení a embryogenezi.

Při studiích prováděných na myších bylo zjištěno, že zatímco mutovaný gen pro TM má zvýšenou tendenci k trombóze (převážně v srdci), tak deficit genu TM vede k časně embryonální letalitě.[17]

U embryí s deficitem trombomodulinu je potrat způsoben tkáňovým faktorem. Ten způsobuje na rozhraní plod-matka aktivaci koagulační kaskády. Aktivované koagulační faktory inhibují růst a indukují odumírání buněk trofoblastu placenty. To se děje dvěma odlišnými mechanismy. Smrt obřích buněk trofoblastu je způsobena přeměnou substrátu trombinu fibrinogenu na fibrin s následným vytvořením fibrin degradačních produktů. Naproti tomu zpomalení nebo zastavení růstu buněk trofoblastu není zprostředkováno fibrinem, ale pravděpodobně je to výsledek zapojení receptorů aktivovaných proteázami (PAR-2 a PAR-4).[18] Tato zjištění poukazují na novou úlohu trombomodulinu, nezbytnou pro udržení těhotenství, v systému proteinu C v kontrole růstu a přežívání buněk trofoblastu v placentě. [19]

3.3. Fibrinolytický systém

Za fyziologických podmínek je tento systém schopen udržovat v lidském organismu hemostatickou rovnováhu.

Jde o systém zodpovědný za enzymatické štěpení vytvořeného fibrinu a tím se podílí na zprůchodnění cévního systému po částečném nebo úplném uzávěru fibrinovým trombem.

Fibrinolýza (Obr.6) je reparační proces zajišťující rekanalizaci poraněné cévy po zhojení defektu cévní stěny. Přítomností svých aktivátorů a inhibitorů je velice podobná systému krevního srážení. Jako je v procesu koagulace centrální složkou trombin, tak je základním prekurzorem fibrinolýzy plazminogen. Ten je svými aktivátory štěpen na vlastní efektorový enzym – plazmin. Protože je proces fibrinolýzy (stejně jako koagulace) nutné regulovat tak, aby byla zachována funkce organismu v optimální rovnováze, jsou v plazmě přítomny specifické inhibitory, které plynule omezují aktivaci plazminogenu (PAI), anebo plazmin vyvazují (α_2 antiplazmin).[20]

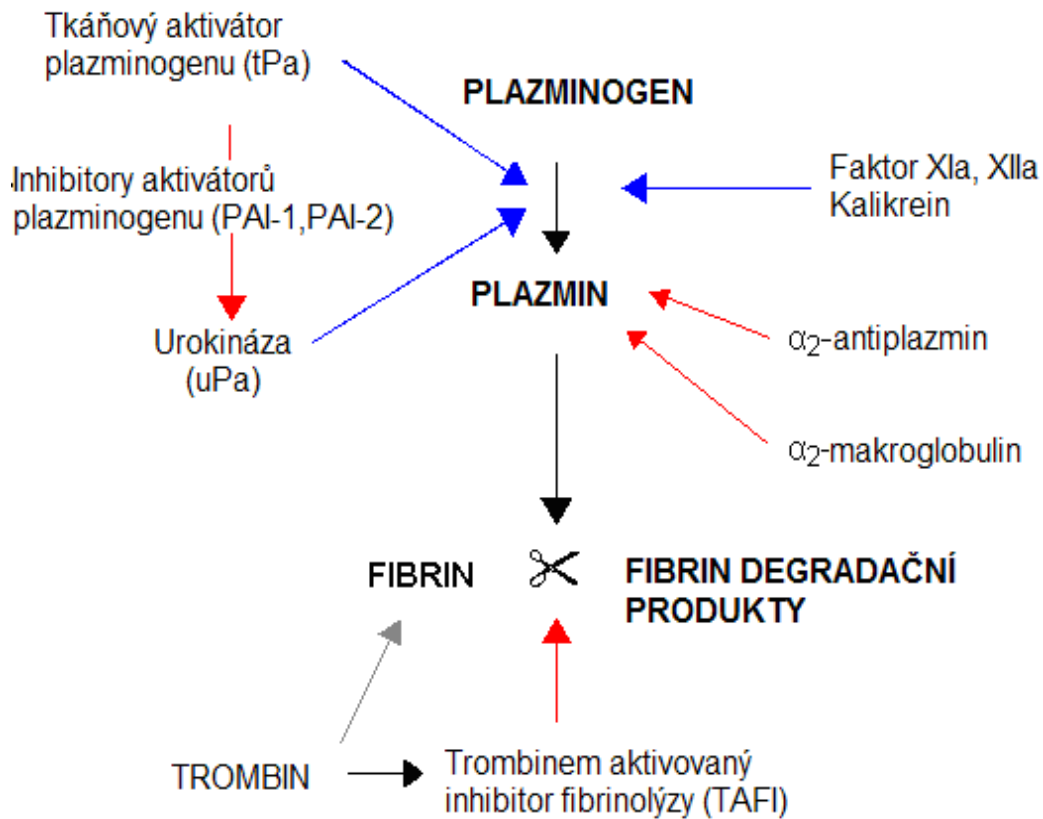
Jak plazminogen, tak i plazmin má vazebné místo pro fibrinogen. Polymerací fibrinových monomerů je plazminogen vestavován přímo do fibrinové sítě. Tento krok je inhibován glykoproteinem bohatým na histidin (HRGP)[20][21], který patří mezi negativní reaktanty akutní fáze (zánětu) a soutěží s plazminogenem o vazebné místo na fibrinogenu.

Zároveň je do fibrinové sítě prostřednictvím faktoru XIII vestavěn i α_2 -antiplazmin, který zde brání předčasné lýze fibrinové sítě působením plazminu. Jeho přeměna z plazminogenu je způsobena tkáňovým aktivátorem plazminogenu (tPA) pocházejícím z krevních destiček tvořících stroma koagula. Protože plazmin vázaný na fibrin je mnohem odolnější k inhibici α_2 -antiplazminem než plazmin volný, dochází uvnitř koagula k mírné převaze fibrinolýzy. Na povrchu koagula je fibrinolýza aktivována tPA uvolněným z okolních buněk (endotelie, monocyty). Plazmin vzniklý touto reakcí, který není na povrchu koagula vázán na fibrin, je vyvázán přítomným α_2 -antiplazminem. Při odbourávání fibrinu se odhalují další vestavěné molekuly plazminogenu, obnažují své koncové karboxylované lyziny fibrinu, na které se váží další a další molekuly tPA a plazminogenu a zapojují se tak stále více do lýzy koagula.[20]

V místě koncových karboxylovaných lyzinů je též místo pro vazbu TAFI, který tak kompeticí brání vstupování tPA a plazminogenu do procesu fibrinolýzy a zpomaluje ji.[20]

Fibrinolýza je nejvýznamněji aktivována sekrecí tPA z buněk endotelu a monocytů. Malé množství je také přítomné v trombocytech, a proto může toto množství působit i uvnitř trombu. Fibrinolýza je současně v malém množství aktivována i cestou faktoru XII.

Obr.6. Zjednodušené schéma fibrinolýzy



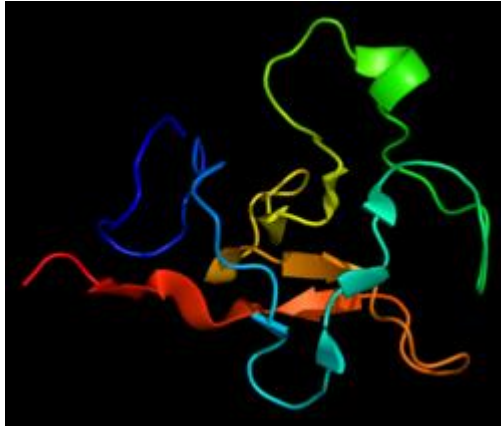
Modré šipky označují stimulační a červené šipky inhibiční.[22]

Fibrinolytický systém hraje také podstatnou úlohu při degradaci kolagenu, v angiogenezi a v procesu tvorby metastáz tumoru[10].

3.3.1. Systém plazminogenu a plazminu

Plazminogen (Plg)

Obr.7 Molekula plazminogenu



Plazminogen (obr.7) [23] je prekurzorem serinové proteázy plazminu, který je antikoagulačním proteinem a centrální složkou fibrinolytického systému.

Je to jednořetězcový glykoprotein syntetizovaný játry ve dvou formách:

- 1) *Glu*-plazminogen o molekulové hmotnosti 90 kDa a biologickým poločasem 48-60 hodin,
- 2) *Lys*-plazminogen s molekulovou hmotností 83 kDa a biologickým poločasem 12-20 hodin.

Bílkovinný řetězec se sestává ze 790 aminokyselin a 2 cukerných složek navázaných v místech Asp²⁸⁹ a Thr³⁴⁶[10].

Za fyziologických podmínek se vyskytuje v plazmě o koncentraci 2,4 μmol/l. Zde bývá zčásti vyvázan glykoproteiny bohaté na histidin. Dále je přítomen v eozinofilech, buňkách ledvin a dalších tkáních.

Sám se váže na různé druhy povrchů. Existuje několik receptorů pro plazminogen, ale nejdůležitější z nich je receptor GPIIb/IIIa přítomný na membráně krevních destiček.

Přeměna plazminogenu, ve formě zymogenu, na plazmin je aktivován prekurzory serinových proteáz tPA a urokinázy (uPA). Komplex plazminogenu s tPA, vyvázaný fibrinem je velmi účinně konvertován na plazmin. V této reakci slouží fibrinová složka koagula jako účinný kofaktor.[10]

Vznik aktivního enzymu plazminu je podmíněn nejdříve štěpením molekuly plazminogenu v místě Lys^{77} , kdy se uvolní peptid, a poté štěpením v místě Arg^{560} . Tak vzniká dvouřetězcová molekula skládající se z těžkého A řetězce a lehkého B řetězce (kde je aktivní katalytické místo) spojená disulfidickou vazbou. [10] Tento proces se nazývá fibrinolýza.

Plazmin

Plazmin je důležitý enzym přítomný v krvi, serinová proteáza (EC 3.4.21.7)[23], která odbourává řadu proteinů krevní plazmy. Hlavní funkcí plazminu je rozpouštět fibrin krevních sraženin.[10] Aktivní forma vzniká působením vnitřních aktivátorů (faktoru XII, prekalikreinu, vysokomolekulárního kininogenu) a vnějších aktivátorů (urokinázy, tPA, streptokinázy)[10]. Pokud je plazminogen vázán na fibrinové vlákno, je aktivace pomocí tPA urychlena. Vedle funkce rozpouštění fibrinového koagula, se také podílí na štěpení dalších proteinů, fibrinogenu, fibronektinu, trombospondinu, lamininu a von Willebrandova faktoru. Dále aktivuje kolagenázy, některé mediátory v systému komplementu. Oslabuje stěnu Graafova folikulu, což vede k ovulaci. Plazmin také hraje významnou roli při hojení ran, během reparace jaterního poškození, štěpí v místě poškození přebytečný fibrin.

Plazmin je inaktivován α_2 -antiplazminem (inhibitorem serinových proteáz – tzv.serpinem). Volný plazmin má velmi krátký biologický poločas. Vázaný na fibrinové vlákno, má poločas delší, a je tak odolnější vůči svému inhibitoru. Štěpením plazminu vzniká fragment o velikosti 38 kDa nazývaný angiostatin.

Nedostatek plazminu může vést k trombóze, protože sraženiny nejsou adekvátně odbourávány. Existuje vzácná porucha zvaná deficit plazminogenu typ I (217090), způsobená mutací PLG genu, která se často projevuje jako conjunctivitis lignea (onemocnění očních spojivek).[23]

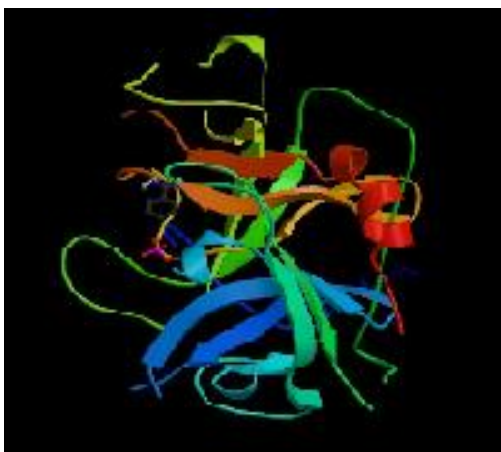
3.3.2. Aktivátory plazminogenu

Pokud jsou aktivátory přítomny v plazmě, jedná se o vnitřní aktivátory, mezi které patří trombin, trypsin a faktor XII, prekalikrein a HMWK a jsou součástí kontaktního systému, tj. aktivace nastává už po kontaktu faktoru XII s poškozenou cévou.

Vnější aktivátory jsou součástí lidského organismu, ale nepochází z krevního oběhu. Za fyziologických podmínek se na aktivaci plazminogenu podílí přibližně z $\frac{1}{2}$ tPA, z $\frac{1}{4}$ uPA a z $\frac{1}{4}$ faktor XIIa.[10]

Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA)

Obr.8. Molekula tPA



Tkáňový aktivátor plazminogenu (obr.8)[24] je specifickým aktivátorem přeměny plazminogenu na plazmin. Je to proteináza serinového typu, která je kódovaná genem PLAT [25] nacházejícím se na 8.chromozomu, a která je po stimulaci trombinem nebo aktivovaným proteinem C, histaminem, bradykinem, případně IL-1 uvolňována ze zdravých endotelových buněk. Dalším zdrojem jsou aktivované monocyty a megakaryocyty a především orgány s velkým cévním zásobením, jako jsou děloha, plíce, ledviny.

Vyskytuje se ve dvou formách. Jednořetězcová molekula má hmotnost 68 kDa, biologický poločas 5-8 min a koncentrací v plazmě 5-10 $\mu\text{g/l}$. Koncentrace se zvyšuje po svalové práci, stresové reakci nebo po žilní okluzi.

Aktivní dvouřetězcová forma vzniká proteolytickým štěpením plazminem, tkáňovým kalikreinem nebo faktorem Xa.

Přirozeným inhibítozem tPA je inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI), který brání přeměně plazminogenu na plazmin, a blokuje tak fibrinolýzu v jejím počátku.

Zvýšení enzymatické aktivity, hyperfibrinolýzy, se projevuje jako nadměrné krvácení. Snížená aktivita vede k hypofibrinolýze a může mít za následek trombózu nebo embolii.

Protože je tPA fibrin specifický aktivátor plazminogenu, zvyšuje se jeho aktivita, je-li plazminogen navázán na fibrinovou síť nebo na z části degradovaný fibrin. Těto specifické vlastnosti se využívá při trombolytické léčbě cévních uzávěrů, především při trombóze koronárních tepen. Má pozitivní vliv při obnově recirkulace krevního toku po trombolýze a zároveň i při redukci trombofilie.

Vyšetření tohoto parametru je užitečné při diagnóze tromboembolických onemocnění, zvláště u mladých jedinců, dále po operaci obstrukce cév, kdy dochází ke snížení fibrinolytického potenciálu a především u městnání v žilním oběhu.

Dnes biotechnologickými postupy vyráběná rekombinantní forma tPA se používá k trombolýze plicní embolie, infarktu myokardu a cévní mozkové příhody. Má-li být léčba efektivní, musí se tPA podávat intravenózně během prvních tří hodin od události nebo maximálně do šesti hodin a sice přes arteriální katétr přímo do místa uzávěru. Při předávkování tPA je možno použít jako antidotum kys. aminokapronovou.[26].

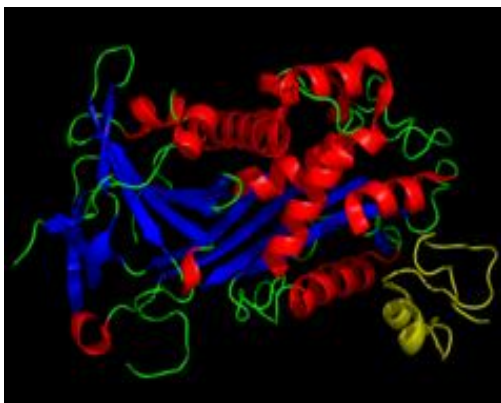
Tkáňový aktivátor plazminogenu je silný proteolytický enzym, který se účastní i jiných procesů, např. nidace oplodněného vajíčka nebo spolu s urokinázou sehrává svoji roli při proliferaci a migraci buněk a remodelaci tkáně.[10]

3.3.3. Inhibitory fibrinolýzy

Slouží k určení místa fibrinolýzy s následným utlumením fibrinolytických procesů a zábraně jejich šíření do okolí.

Inhibitor aktivátorů plazminogenu (PAI-1)

Obr.9. Molekula PAI-1



PAI-1 (obr.9)[27] je hlavním přirozeným inhibitorem aktivátorů plazminogenu tPa a uPa. Jeho působení je zaměřeno proti aktivaci plazminogenu, tzn. ještě před aktivací fibrinolýzy.

Jde o serinovou proteázu vyskytující se ve dvou formách.

Glykosylovaná forma má molekulovou hmotnost 52 kDa, zatímco neglykosylovaná forma jen 43 kDa. Jako jednořetězcový glykoprotein je z velké části přítomen v α -granulích krevních destiček, v menším množství v endotelu a plazmě. Jeho syntéza je zajišťována buňkami endotelu, megakaryocyty, po stimulaci cytokíny i hepatocyty, ale také tukovou tkání. Regulována je trombinem a některými hormony např. inzulínem či glukokortikoidy.

Biologický poločas neaktivní formy při fyziologickém pH a teplotě je přibližně 1 hodina a lehce stabilnější formy, tj. PAI-1 navázaný na Vitronectin, pak 2 hodiny. Mutované formy PAI-1 mají biologické poločasy až 145 hodin.[10]

Koncentrace PAI-1 v plazmě činí 20-100 $\mu\text{g/l}$.

Z řady typů PAI-1, PAI-2 a PAI-3 je hlavním a neúčinnějším inhibítozem PAI-1, který tvoří s tPa v poměru 1:1 komplex [PAI-1.tPa] a tím jej inaktivuje. Celý proces je urychlován fibrinem, který zároveň zrychluje ve své vazbě na PAI-1 jeho vychytávání z plazmy. Komplex je odbouráván játry a takto uvolněný PAI-1 z vazby se rychle přeměňuje na neaktivní formu kolující v plazmě. Při vazbě na negativně nabitý povrch fosfolipidů dochází k jeho aktivaci změnou konformace a odhalením aktivního místa.

Vyšší PAI-1 hladiny upozorňují na aktivaci endotelu. Dále jsou spojeny s dyslipidemií smíšeného typu nebo obezitou, s horečkou a zánětem a fyziologicky se vyskytují také v těhotenství. Při zánětlivých stavech, kdy je fibrin uložen ve tkáních, hraje patrně PAI-1 významnou roli při progresi do fibrózy. Lze jej spolu s fibrinogenem, CRP a α_1 -antitrypsinem zařadit do skupiny tzv. proteinů akutní fáze, syntetizovaných na základě zánětlivé imunitní reakce organismu.

Rozvoj aterosklerózy urychluje svým působením angiotensin II, který zvyšuje syntézu PAI-1.

Lze předpokládat, že snížení hladiny nebo vrozený deficit PAI-1 způsobí nedostatečné potlačení fibrinolýzy a naopak rychlejší degradaci fibrinu, což má za následek zvýšený sklon ke krvácení. Gen pro PAI-1 PLANH1[29] se nachází na 7.chromozómu.

Přítomností mutace 4G/5G v oblasti promotoru genu pro PAI-1[30][6] se hladina tohoto inhibitoru zvyšuje. To má za následek silné potlačení fibrinolýzy a následný sklon k trombofilii. Nadměrné množství PAI-1 inhibuje také proteolýzu a zhoršuje tak průběh nidace oplozeného vajíčka do děložní sliznice[3].

Další inhibitor PAI-2 je vylučován placentou trofoblastu a makrofágy. Jeho hladina se zvyšuje v průběhu těhotenství a při porodu. Je pravděpodobně zapojen do procesu remodelace děložní tkáně. To může mít ochranný charakter proti předčasnému odloučení placenty. Zatímco zvýšená koncentrace PAI-1 může být užitečným markerem závažnosti preeklampsie, snížená hladina PAI-2 naznačuje sníženou placentární funkci a intrauterinní růstovou retardaci.[28] Kromě PAI-2 působí jako inhibitor uPA a tPA proteáza nexin.

Alfa₂-antiplazmin

α_2 -antiplazmin spolu s α_2 -makroglobulinem a α_1 -antitrypsinem patří k hlavním inhibitorům plazminu. Jsou v plazmě přítomny v nadbytku a okamžitě se váží velmi účinně v poměru 1:1 na veškerý nadbytečný plazmin. Biologický poločas volného plazminu v krvi je pouze 0,1 sekundy.[10]

Jde o glykoprotein o molekulové hmotnosti 70 kDa a biologickém poločase 60 hodin, který je kódován genem SERPINF2 [31] na 18. chromozomu.[32] V plazmě se vyskytuje v koncentraci 60-100 mg/l, aktivita činí 80-120% [5] a jeho syntéza probíhá v játrech. Patří mezi inhibitory serinových proteáz a podobně jako fibrin má velkou afinitu k vazebnému místu pro lysin na plazminu. Asi 30% molekul α_2 -antiplazminu není schopno této vazby.

α_2 -antiplazmin vyvazuje v plazmě pouze volný plazmin, s kterým tvoří v poměru 1:1 komplex [plazmin. α_2 -antiplazmin], který je následně odstraněn pomocí MFS. Pokud je plazmin vyvážen fibrinem, pak jej α_2 -antiplazmin již neváže. V tomto případě je jeho inhibiční účinek velmi malý a reakce probíhá asi 50krát pomaleji než s volným plazminem. Kromě neutralizace plazminu je α_2 -antiplazmin schopen štěpit faktory XIIa, XIa, Xa, kalikrein, trombin, tPA a uPA. Volná forma je v přítomnosti faktoru XIIIa inaktivována vyvážením na α řetězec fibrinu.[10]

Nedostatek α_2 -antiplazminu je způsoben mutací genu SERPINF2. To má za následek poruchu inhibice plazminu a následný sklon ke krvácení.[31]

3.4. Těhotenství

Během těhotenství dochází v cévním řečišti gravidní ženy z hematologického pohledu ke zpomalení krevního toku, hyperkoagulaci a zvýšenému riziku trombogeneze. Hlavním ochranným mechanismem organismu je snížení viskozity krve.[33]

Protože vlivem těhotenských hormonů, zejména estrogenu, dochází ke zvýšení hladiny fibrinogenu, koagulačních faktorů II, V, VII, VIII, IX, XII i von Willebrandova faktoru [IV], a současně také dochází k inhibici fibrinolýzy, je v tomto období ženy fyziologicky zvýšená dispozice k trombofilii.[4][5] Tento stav "fyziologické hyperkoagulace" je během těhotenství kompenzován různými protektivními mechanismy, jakým je např. hemodiluce nebo zvýšení aktivity některých přirozených inhibitorů koagulace (zejména TFPI, α_2 -makroglobulinu, α_1 -antitrypsinu a annexinu V produkovaného placentou) [6][34], a proto sám o sobě k trombotizaci nevede. Toto equilibrium se však snadno dekompenzuje neinhibovaným uvolněním většího množství TF.

V průběhu fyziologického těhotenství dochází v II. a III. trimestru ke snížení proteinu S [4][5], avšak může se zde projevit i nižší inhibiční účinek aktivovaného proteinu C (sekundární syndrom APC rezistence) způsobený vyšší aktivitou protrombinu v krevní plazmě těhotných žen. Na druhé straně jsou u těhotných žen fyziologicky zvýšeny i hladiny inhibitorů α_2 -makroglobulinu a α_1 -antiproteinázy, takže se obě výchytky v konečném ovlivnění koagulace mohou eliminovat. Hodnoty AT jsou v těhotenství stejné jako u netěhotných žen. Postupným zvýšením hladiny těhotenských estrogenů dochází ve II. a III. trimestru ke snížení zánětlivých adhezivních molekul E-selektinu, P-selektinu a ICAM-1 molekul, které na sebe váží plazmatický fibrinogen a umožňují tak přichycení aktivovaných destiček.[6]

Při patologickém těhotenství nedochází ke kompenzaci hyperkoagulace fyziologického těhotenství, ale naopak velice snadno dochází k dekompenzaci neinhibovanou expresí značného množství TF. K takovým situacím dochází především při rozpadu buněk, po traumatu např. dělohy, při rozpadu erytrocytů, při „syndromu mrtvého plodu“.[6]

K patologické trombotizaci vede také intrauterinní infekce, kdy zánětlivé cytokiny, IL-1 β , TNF- α a IFN- γ , aktivují endotel, který spolu s aktivovanými monocyty začne produkovat TF. Dojde-li k zánětlivé reakci spojené s neinhibovaným uvolněním zánětlivých cytokinů typu IL-1 a s aktivací endotelu v cévním systému těhotné dělohy nebo placenty, nastane aktivace hemostázy, komplementového, fibrinolytického a prostaglandinového systému a to může způsobit přerušení těhotenství nebo vyvolat děložní kontrakce, popř. i předčasný porod.[3][6]

Poruchy koagulačního procesu v těhotenství vedou k selhání placenty. Ztráta časného těhotenství může být způsobena celou řadou vyvolávajících faktorů. Může být spojena s koagulační poruchou, s nedostatečností trofoblastu[3] a také s genetickými nebo gynekologickými abnormalitami.

V těhotenství se může žilním tromboembolizmem manifestovat i některá dědičně podmíněná trombofilie. Ta vzniká na podkladě chybění či mutace genu inhibitoru koagulace, např. AT, proteinu C a S aj. V naší populaci se z dědičných trombofilii vyskytuje nejčastěji tzv. syndrom APC rezistence způsobený mutací genu faktoru V, tzv. faktoru V Leiden, další geneticky podmíněnou trombofilii (asi u 1% naší populace) je výskyt variantního genu pro protrombin, se záměnou nukleotidu G za A na místě 20210. Trombofilii způsobuje i dědičná hyperhomocysteinémie, která vede k poškození jak žilního, tak arteriálního endotelu nebo mutace genu pro trombomodulin.

Stortini ve své práci porovnává hodnoty trombomodulinu u žen s opakovanými samovolnými potraty s ženami dobrovolně podstupujícími přerušení těhotenství. U skupiny žen s opakujícími spontánními potraty je významně snížena ($p < 0,05$) exprese hladiny trombomodulinu v porovnání s kontrolní skupinou žen až na 1,82- násobné snížení, což odpovídá snížení trombomodulinu o 45%. Přestože v současné době neznáme přesný důvod jeho snížené exprese v placentární tkáni, potvrzuje tento výsledek pozorování, že nedostatečná funkce trombomodulinu je příčinou předčasné post-implantační embryonální letality. Deficit trombomodulinu v endotelu krevních cév může způsobit nadměrnou aktivaci krevního srážení v embryonálním systému. Ale pro přesnější objasnění biologické dráhy tohoto důležitého faktoru při patofyziologii trofoblastu a reprodukční biologie jsou nezbytné další studie.[35]

Fibrinolýza je v těhotenství ovlivňována endotelem a placentou matky, což je zásadní pro patogenezi některých porodnických patologií. Její potlačení v cévním systému těhotné podporuje trombofilní sklony. V těhotenství vede zvýšená

produkce těhotenských estrogenů a transformačního růstového faktoru β (TGF- β) k nárůstu syntézy PAI-1, PAI-2 a TAFI.[6]

Příčinou potratu v časném stádiu těhotenství může být i autoimunitní onemocnění antifosfolipidový syndrom (AF syndrom). U nemocných s AF syndromem je kromě trombofilie možná v pozdějším průběhu těhotenství i přítomnost krvácení, které je většinou spojeno s trombocytopenií.

Zvlášť rizikovou skupinou těhotných s vyšší hladinou fibrinogenu a PAI-1, a tím s vyšším sklonem k trombofilii, jsou těhotné ženy s gestačním diabetem, gestační hypertenzí a preeklampsií. Ve srovnání s "fyziologickou těhotenskou hyperfibrinogenémií" je u nich hladina fibrinogenu zvýšena o dalších 10–20 %.[3] Jestliže u zdravých žen během těhotenství stoupá hladina PAI-1 přibližně 4krát, pak u žen s gestační hypertenzí stoupá až 9krát.[36]

Bylo prokázáno, že v těhotenství a šestinedělí je s. c. aplikace nízkomolekulárními hepariny účinná nejen při profylaxi, ale i při léčbě hluboké žilní trombózy, včetně léčby plicní embolie.[8]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Charakteristika souboru

- ❖ soubor 73 žen s opakujícími časnými aborty (8.-12. týden) nebo pozdními ztrátami plodu (1 – 6)
- ❖ TEN v osobní anamnéze
- ❖ vrozená trombofilní dispozice:
 - mutace FV Leiden heterozygotní forma
 - mutace 20210A v genu FII heterozygotní forma
 - mutace v genu pro MTHFR 677T heterozygotní forma i homozygotní forma a 1298C heterozygotní forma i homozygotní forma
 - mutace FV Leiden + MTHFR
 - mutace FII 20210A + MTHFR
 - mutace MTHFR 677T + 1298C
- ❖ získaná trombofilní dispozice (AP syndrom)
- ❖ hyperhomocysteinémie
- ❖ in vitro fertilizace (IVF)
- ❖ věk žen (23 – 40 let), medián 31 rok
- ❖ BMI (18 – 35)
- ❖ nikotinismus (5 pacientek; do 15ks/den)
- ❖ léčba nadroparinem event. enoxaparinem

4.2. Materiál

Primárním biologickým materiálem je plná krev pacientek. Po přípravě biologického materiálu se k vlastnímu zpracování použije pouze její tekutá část, plazma.

4.2.1. Odběr a příprava materiálu

Odebírá se venózní krev do zkumavek s 3,2%ním (0,109 M) citrátem trisodným v poměru 9 dílů krve na 1 díl citrátu trisodného, nejlépe systému Vaccuette.

Po řádné identifikaci ID štítkem a správně vyplněnou žádankou pacientky se materiál zašle do hematologické laboratoře. Ta jej po kontrole zadá do Laboratorního identifikačního systému, označí ID štítkem laboratoře a předá ke zpracování.

Takto odebraná krev se centrifuguje 10 min při 2500 x g (4000 ot./min), oddělí se plazma. Tato plazma se centrifuguje ještě jednou za stejných podmínek. Poté se supernatant rozplní po 500 µl (popř. 300 µl) do mikrozkušavek, označí štítkem se jménem, rodným číslem a datumem odběru a okamžitě zamrazí. V hlubokomrazícím boxu při teplotě -70°C jsou uloženy v označených krabičkách s názvem příslušné metody až do samotného zpracování.

Před vlastní analýzou vzorky šokově rozmrazíme ve vodní lázni při 37°C a šetrně protřepeme na ruční třepačce zkumavek.

Nedoporučuje se měření hemolytických, ikterických a chylózních vzorků, protože stanovení fotooptickou metodou na analyzátoru může být zatíženo chybou.

Přístroje a pomůcky: centrifuga, hlubokomrazící box.

Spotřební materiál: odběrové zkumavky, lepící štítky pro identifikaci vzorku, žádanky, jednorázové plastové pipety, plastové zkumavky o objemu 10 ml, špičky k pipetám, mikrozkušavky (Eppendorff), úložné krabičky do hlubokomrazícího boxu.

4.3. Vyšetřovací metody

4.3.1. Koagulační metody

Pro kvantitativní stanovení funkční aktivity plazminogenu, inhibitoru aktivátoru plazminogenu a α_2 -antiplazminu byly použity koagulační metody na principu chromogenních substrátů. V našem případě jde o metody nepřímé detekce prováděné na analyzátoru Sysmex CA-1500 (Sysmex-TOA).

Princip nepřímé detekce chromogenní metody:

Stanovovaná složka se váže do komplexu s jinou aktivní složkou, která je v reakční směsi v nadbytku. Zbylá nevyvázaná část aktivní složky štěpí chromogenní substrát na produkt [10] a uvolňuje tak z vazby žlutě zbarvený chromofor p-nitroanilín (pNA), jehož intenzita je přímo úměrná aktivitě stanovované složky.

Detekce intenzity žlutého zbarvení p-NA na analyzátoru Sysmex CA-1500:

Světlo z halogenové lampy projde filtrem a vlnová délka 405 nm osvětluje kyvetu s reakční směsí. Část světla prochází v závislosti na velikosti absorbance a dopadá na fotodiodu (detektor), kde se tvoří elektrické signály. Mikroprocesor el. signály monitoruje a počítá změnu absorbance (optické denzity) vzorku. Podíl světla, který prošel neabsorbován je transmitance T (dOD). Její hodnota se získá lineární regresí absorbančních dat mezi počátečním a koncovým bodem, které se nastavují jako Analysis Range detektoru.

Přístroje a pomůcky: fotooptický koagulometr Sysmex CA-1500 firmy Sysmex – TOA, vodní lázeň, pipety.

Spotřební materiál: špičky k pipetám, buničitá vata, „kepíky“ (nádobky „cup“ do analyzátoru), plastové zkumavky a mikrodestičky pro analyzátor Sysmex CA-1500.

Kvantitativní stanovení aktivity PAI-1 chromogenní metodou pomocí diagnostické soupravy Stachrom PAI firmy Diagnostica Stago

Princip

Po inkubaci napipetovaného vzorku uvnitř přístroje při teplotě 37°C, si analyzátor dle pipetovacího protokolu ke vzorku napipetuje aktivátor plazminogenu urokinázu a během následující inkubace vznikne komplex [PAI-1.urokináza]. Po přidání plazminogenu a po inkubaci generuje zbytková urokináza plazmin, který z přidaného chromogenního substrátu odštěpuje pNA, jehož žluté zabarvení způsobí navýšení absorbance, kterou koagulometr detekuje a vyhodnocuje.

Čím větší je zbytková aktivita urokinázy, tím je větší intenzita zabarvení reakční směsi, větší změna absorbance, a zároveň menší aktivita PAI-1.

Hodnoty aktivit PAI-1 kontrol a pacientů vydávaných v AU/ml vypočítá analyzátor po odečtu z kalibrační křivky sestavené na základě měření firemních kalibrátorů.

Reakční schéma:

PAI-1 + urokináza (nadbytek) → [PAI-1 . urokináza] + urokináza (zbytková)

urokináza (zbytková)
plazminogen → plazmin

plazmin
S-2403 → peptid + pNA (žlutý)

Reagencie:

- diagnostická souprava Stachrom PAI Art.No.00853(Diagnostica Stago):
 - Reagent 1 (Urokinase), 20 nkat, 2x 2ml
 - Reagent 2 (Plasminogen), 5 PEU, inhibitory proti α_2 antiplasminu a α_2 makroglobulinu, 2x 2ml
 - Reagent 3 (Substrate), CBS 10.65, 8 μ mol, 2x 2ml
 - Reagent 4a (PAI Calibrator 1), PAI-1 deficitní lidská plazma, 2x 0,5ml
 - Reagent 4b (PAI Calibrator 2), PAI-1 kolem 20 AU/ml, 2x 0,5ml
 - Reagent 4c (PAI Calibrator 3), PAI-1 kolem 40 AU/ml, 2x 0,5ml
- voda pro injekce na rozpouštění reagentů
- Owren-Kollerův pufr pro případné ředění vzorků s vysokou koncentrací

Neatestované kontroly:

- Coag-Norm (Diagnostica Stago)
- NVN

Kalibrátor:

- PAI Calibrator 1, 2, 3 s hodnotami 0; 20 a 40 AU/ml jsou součástí diagnostické soupravy

Kalibrační křivka:

Naměřené hodnoty T (dOD) kalibrační plazmy o 3 koncentracích jsou vyneseny a zpracovány lineární regresí do 3-bodové kalibrační křivky, z které jsou změny absorbancí vzorků pacientů odečteny jako výsledné koncentrace.

Příprava reagentů, kontroly Coag-Norm a kalibrátorů dle příbalového letáku.

NVN je nutné před analýzou šokově rozmrazit ve vodní lázni při 37°C.

Skladování neotevřených reagentů v chladničce při 2 – 8°C do doby expirace uvedené na štítku.[37]

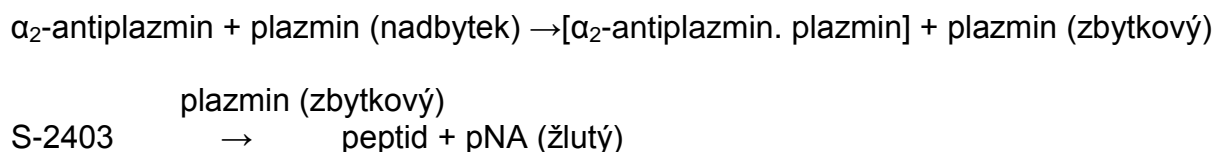
Kvantitativní stanovení aktivity α_2 antiplazminu chromogenní metodou pomocí diagnostické soupravy Coamatic Plasmin Inhibitor firmy Chromogenix

Princip

Fotooptický koagulometr dle pipetovacího protokolu naředí plazmu pacienta Owren-Kollerovým pufrem, nepipetuje alikvot do kyvetky a provede předepsanou inkubaci při 37°C. K naředěné plazmě přidá nadbytek plazminu a opět inkubuje. Dochází k rychlé tvorbě komplexu α_2 -antiplazminu a přidaného plazminu. Zbytková aktivita plazminu se měří pomocí chromogenního substrátu, ze kterého se odštěpuje pNA a dochází tak ke zbarvení roztoku do žluta a zvýšení absorbance. Tuto změnu koagulometr monitoruje a vyhodnocuje.

Čím větší zbytková aktivita plazminu, tím větší intenzita zbarvení a změna absorbance, ale tím menší aktivita α_2 -antiplazminu. Hodnoty aktivity α_2 -antiplazminu pacientů a kontrol v % počítá přístroj po odečtu z kalibrační křivky, která je výsledkem kalibrace prováděné laboratoří s využitím firemního kalibrátoru.

Reakční schéma:



Reagencie:

- diagnostická souprava Coamatic Plasmin Inhibitor Art.No.823187 (Chromogenix):
 - S-2403, 1x 8,4 mg
 - Plasmin Solvent, 1x 10ml
 - Buffer, stock solution, 2x 10ml
 - Plasmin 8 nkat, 1x
- voda pro injekce

Atestované kontroly pro kontrolu správnosti:

- Control Plasma Normal – Art.No.82354263 (Chromogenix, 10 x 1 ml) – normální kontrola, hodnota aktivity v normálních mezích
- Control Plasma Abnormal Level 1 & 2 – Art.No.82355963 (Chromogenix, 2 x 5 x 0,5 ml) – patologické kontroly
 - L1: rozmezí 50-60 % aktivity a L2: rozmezí 20-30 % aktivity

Kalibrátor:

- Calibration Plasma Art.No.823534 (Chromogenix, 10 x 1 ml)

Kalibrační křivka:

Naměřené hodnoty T (dOD) kalibrační plazmy o koncentracích 0; 25; 50; 75; 100 a 125% jsou vyneseny a zpracovány lineární regresí do 6ti bodové kalibrační křivky, z které jsou změny absorbancí vzorků pacientů odečteny jako výsledné koncentrace.

Příprava reagensů, kontrol a kalibrátoru dle příbalového letáku.

Skladování neotevřených reagensů v chladničce při 2 – 8°C do doby expirace uvedené na štítku.[37]

Kvantitativní stanovení funkční aktivity plazminogenu chromogenní metodou pomocí diagnostické soupravy Coamatic Plasminogen (Chromogenix)

Princip

Fotooptický koagulometr dle pipetovacího protokolu naředí plazmu pacienta Owren-Kollerovým pufrem, napipetuje alikvot do kyvetky a provede předepsanou inkubaci při 37°C. K naředěné plazmě přidá nadbytek streptokinázy a opět inkubuje. Dochází k tvorbě komplexu [plazminogen.streptokináza]. Tento komplex hydrolyzuje specifický substrát a uvolňuje z něj pNA ve formě žlutého chromoforu. Intenzita zabarvení je přímo úměrná aktivitě plazminogenu v plazmě a je detekována koagulometrem.

Z hodnot naměřených změn absorbancí analyzátor dle kalibrační křivky vyhodnotí hodnoty aktivit plazem pacientů vyjádřených v %.

Reakční schéma:

Plazminogen + streptokináza (nadbytek) → [plazminogen.streptokináza]+ plazmin
(zbytkový)

S-2403 plazmin (zbytkový)
 → peptid + pNA (žlutý)

Reagencie:

- diagnostická souprava Coamatic Plasminogen Art.No.822452 (Chromogenix):
 - S-2403
 - Streptokinase/Fibrinogen
- voda pro injekce
- Owren Veronal buffer pro ředění standardů a vzorků

Atestované kontroly pro kontrolu správnosti:

- Control Plasma Normal – Art.No.82354263 (Chromogenix, 10 x 1 ml) – normální kontrola, hodnota aktivity v normálních mezích
- Control Plasma Abnormal Level 1 & 2 – Art.No.82355963 (Chromogenix, 2 x 5 x 0,5 ml) – patologické kontroly
 - L1: rozmezí 50-60 % aktivity a L2: rozmezí 20-30 % aktivity

Kalibrátor:

- Calibration Plasma Art.No.823534 (Chromogenix, 10 x 1 ml)

Kalibrační křivka:

Naměřené hodnoty T (dOD) kalibrační plazmy o koncentracích 0;25;50;75;100 a 124% jsou vyneseny a zpracovány lineární regresí do 6ti bodové kalibrační křivky, z které jsou změny absorbancí vzorků pacientů odečteny jako výsledné koncentrace.

Příprava reagensí, kontrol a kalibrátoru dle příbalového letáku.

Skladování neotevřených reagensí v chladničce při 2 – 8°C do doby expirace uvedené na štítku.[37]

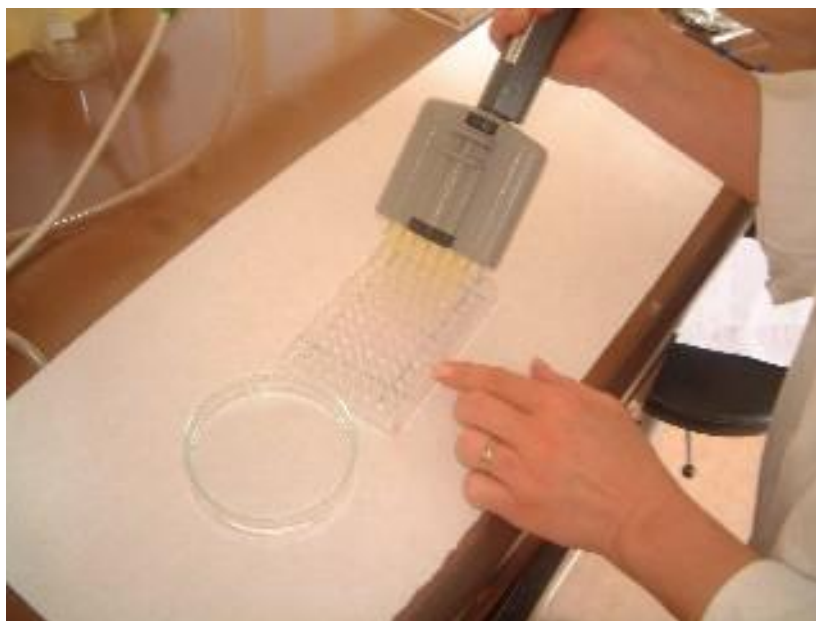
4.3.2. ELISA metody

Metodami ELISA byly kvantitativně stanoveny hmotnostní koncentrace antigenů tkáňového aktivátoru plazminogenu, inhibitoru aktivátoru plazminogenu a trombomodulinu v lidské plazmě. Jde o nejčastěji využívané uspořádání enzymové imunoanalýzy na pevné fázi, přímé nekompetitivní ELISA metody – „Sandwich. Provádíme ji na mikrotitrační destičce s 96 jamkami (obr.10) a k odečtu výsledků využíváme fotometr Reader 530 (Organon Teknika).

Princip přímé nekompetitivní ELISA:

V prvním kroku jsou na pevné fázi imobilizovány protilátky. Poté je přidán antigen, který reaguje s navázanými protilátkami. Po odstranění nenavázaných složek následuje aplikace protilátky značené enzymem (nejčastěji peroxidáza, alkalická fosfatáza, b-galaktosidáza a glukózoxydáza). K detekci je využita enzymová reakce, kdy je bezbarvý substrát přeměněn na barevný.

Obr.10 Provedení ELISA metody na mikrotitrační destičce[38]



Pomůcky a přístroje:

- osmikanálová pipeta
- odměrný válec o objemu 1000 ml
- promývačka
- Reader 530

Spotřební materiál:

špičky k pipetám, plastové zkumavky, mikrozukavky, buničina, filtrační papír, parafilm.

Kvantitativní stanovení antigenu inhibitoru aktivátoru plazminogenu (PAI- 1) pomocí diagnostické soupravy Elitest – PAI-1 (Hyphen BioMed)

Princip

Během inkubace vzorku v jamce mikrotitrační destičky je PAI-1 vyvázán myší monoklonální protilátkou anti-PAI-1 navázanou v jednotlivých jamkách. Přidaný konjugát myší monoklonální protilátky anti-PAI-1 značený enzymem křenovou peroxidázou se váže na zachycený PAI-1 antigen. Vzniklý sendvičový komplex reaguje pomocí peroxidázy s přidaným chromogenním substrátem tetramethylbenzidinem (TMB) za vzniku modrého zbarvení, které se po zastavení reakce kyselinou sírovou změní na žluté. Intenzita žlutého zbarvení je změřena jako absorbance mikrodestičkovým fotometrem při 450 nm a je přímo úměrná množství PAI-1 ve vzorku. Čím větší je intenzita žlutého zbarvení (absorbance), tím vyšší je koncentrace PAI-1.

Koncentrace PAI-1 (ng/ml) ve vzorcích pacientů se získávají odečtem z kalibrační křivky sestavené na základě stanovení kalibračních bodů nebo popř. po vynásobení dilučním faktorem u ředěných vzorků s vysokou hodnotou koncentrace.

Reagencie:

Diagnostická souprava Elitest – PAI-1 kat.č. CK102A (Hyphen BioMed) obsahuje:

1. mikrotitrační destička s 96 mikrojankami, jejichž stěny jsou potaženy myší monoklonální protilátkou proti PAI-1 (anti-PAI-1) a 4 adhezivní fólie pro zakrytí, uzavírací sáček

2. PAI-1 Standards 5 – 100 ng/ml pro kalibraci 6 x 0,3 ml (kapalné rekombinantní PAI-1, fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny, EDTA, konzervační látka 0,05%ní Kathon CG)

3. Sample Diluent, SD – diluent pro ředění vzorků 2 x 30 ml (kapalný, fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny, EDTA, konzervační látka 0,05%ní Kathon CG)

4. Conjugate, C konjugát 1 x 300 µl (kapalná myší monoklonální protilátka proti PAI-1 (anti-PAI-1) značená křenovou peroxidázou, konzervační látka 0,05%ní Kathon CG)

- naředěný konjugát je stabilní 8 hod při 15-30°C ve tmě

5. Conjugate Diluent, CD diluent pro ředění konjugátu 1 x 30 ml (kapalný, fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny, konzervační látka 0,05%ní Kathon CG)

6. Substrate, S substrát 1 x 0,5 ml (kapalný, chromogenní substrát tetramethylbenzidin (TMB) v dimethylsulfoxidu)

- chránit před silným světlem

- naředěný substrát je stabilní 1 hod při 15-30°C ve tmě

7. Substrate Buffer, SB pufr pro ředění koncent. Substrátu 1 x 30 ml (fosfátový citrátový pufr obsahující 0,006%ní H₂O₂)

8. Wash Solution, WS promývací roztok 2 x 30 ml (fosfátový pufr s konzervační látkou 0,17%ním Kathonem CG)

- naředěný promývací roztok je stabilní 2 týdny při 2-8°C

Nespotřebované a nenaředěné reagencie lze skladovat v uzavřené originální lahvičce při 2-8°C do uvedeného data expirace.

Reagencie neobsažené v soupravě:

- voda pro injekce
- destilovaná voda
- 1 M kyselina sírová H₂SO₄ p.a. (stop roztok)

Kontroly:

- NVN
- Coag-Norm

Kalibrátory:

- PAI-1 Standards 5 – 100 ng/ml, obsažené v diag.soupravě

Vlastní stanovení

1) Příprava promývacího roztoku naředěním koncentrovaného WS ze soupravy 25x.

2) Příprava standardů, kontrol a vzorků pacientů naředěním v plastových zkumavkách 1:11 (50µl plazmy+ 500 µl SD).

3) V mikrodestičce:

a) Napipetujeme 200 µl naředěných standardů, kontrol a vzorků pacientů do jamek – standardy (S1 až S6) a kontroly (R2 a R3) vždy duplicitně; S1-nejnižší koncentrace, S6-nejvyšší koncentrace; R2-NVN, R3-Coag-Norm.

b) Do obou jamek pro reagenční blank (R1) napipetujte 200 µl diluentu pro ředění vzorků.

c) Obě jamky pro vodní blank (BL) ponecháme prázdné.

4) Přikryjeme destičku adhezivní fólií a inkubujeme 60 min při 37°C.

5) Během inkubace připravíme roztok konjugátu cca 100násobným naředěním Conjugate (c): 240 µl Conjugate (c) + 24 ml Conjugate Diluent (CD), na 1 strip 20 µl do 2 ml

6) Promyjeme 4x na promývačce naředěným promývacím roztokem

7) Osmikanálovou pipetou pipetujeme 200 μ l naředěného konjugátu do všech jamek, kromě dvou pro vodní blank. Opatrným poklepem s destičkou zajistíte promíchání.

8) Přikryjeme destičku novou adhezivní fólií a inkubujte 60 min při 37°C.

Během inkubace připravíme roztok substrátu cca 100násobným naředěním Substrate (S): 240 μ l Substrate (S) + 24 ml Substrate Buffer (SB), na 1 strip 20 μ l do 2 ml

9) Promyjeme 4x na promývačce naředěným promývacím roztokem

10) Osmikanálovou pipetou pipetujeme 200 μ l naředěného substrátu do všech jamek, kromě dvou pro vodní blank. Opatrným poklepem s destičkou zajistíte promíchání.

11) Inkubujeme zakryté před světlem 30 min při 20-25°C, během této doby dojde k modrému zabarvení.

12) Osmikanálovou pipetou pipetujeme 50 μ l 1 M kyseliny sírové, ve stejném pořadí a stejnou rychlostí jako tomu bylo u substrátu, do všech použitých jamek, kromě dvou pro vodní blank. Opatrným poklepem s destičkou zajistíte promíchání. Dojde k zastavení reakce a změně barvy na žlutou. Do jamek pro vodní blank napipetujeme 250 μ l vody pro injekce.

13) Do 15 min změříme absorbance na mikrodestičkovém readeru – test PAI-1 (nastaveno dle aplikačního protokolu).

14) Pomocí softwaru readeru zkontrolujeme kalibrační křivku (popř. vyloučíme odlehlé body) a výsledky kontrol, blanku a pacientů a vytiskneme naměřená data na připojené tiskárně.

Kalibrační křivka:

Šesti bodová křivka zobrazuje rostoucí nelineární závislost absorbance (y) na koncentraci c (x) vydávanou v g/ml. Platí, čím je větší koncentrace, tím větší je absorbance. Hodnoty absorbancí získáme měřením standardů o koncentracích 5; 10; 25; 50; 75 a 100 ng/ml.

Kvantitativní stanovení antigenu tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) pomocí diagnostické soupravy Elitest – t-PA (Hyphen BioMed)

Princip

Během inkubace vzorku v jamce mikrotitrační destičky je tkáňový aktivátor plazminogenu vyvázán myší monoklonální protilátkou proti lidskému t-PA navázanou v jednotlivých jamkách. Přidaný konjugát myší monoklonální protilátky proti lidskému t-PA značený enzymem křenovou peroxidázou se váže na zachycený t-PA antigen. Vzniklý sendvičový komplex reaguje pomocí peroxidázy s přidaným chromogenním substrátem tetramethylbenzidinem (TMB) za vzniku modrého zbarvení, které se po zastavení reakce kyselinou sírovou změní na žluté. Intenzita žlutého zbarvení je změřena jako absorbance mikrodestičkovým fotometrem při 450 nm a je přímo úměrná množství t-PA ve vzorku. Čím větší je intenzita žlutého zbarvení (absorbance), tím vyšší je koncentrace t-PA.

Koncentrace t-PA (ng/ml) ve vzorcích se získávají odečtem z kalibrační křivky sestavené na základě stanovení kalibračních bodů nebo popř. po vynásobení dilučním faktorem u ředěných vzorků s vysokou hodnotou koncentrace.

Reagencie:

Diagnostická souprava Elitest – t-PA kat.č. CK101A (Hyphen BioMed) obsahuje:

1. mikrotitrační destička s 96 mikrojamkami, jejichž stěny jsou potaženy myší monoklonální protilátkou proti lidskému t-PA a 4 adhezivní fólie pro zakrytí, uzavírací sáček
2. t – PA Standards 1 – 20 ng/ml pro kalibraci 6 x 0,5 ml (kapalně rekombinantní t-PA, fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny, EDTA, konzervační látka 0,05%ní Kathon CG)
3. Sample Diluent, SD – diluent pro ředění vzorků 2 x 30 ml (kapalný, fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny, EDTA, konzervační látka 0,05%ní Kathon CG)
4. Conjugate, C – konjugát 1 x 300 μ l (kapalná myší monoklonální protilátka proti lidskému t-PA značená křenovou peroxidázou, konzervační látka 0,05%ní Kathon CG)

- naředěný konjugát je stabilní 8 hod při 15-30°C ve tmě

5. Conjugate Diluent, CD – diluent pro ředění konjugátu 1 x 30 ml (kapalný, fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny, konzervační látka 0,05%ní Kathon CG)
6. Substrate, S – substrát 1 x 0,5 ml (kapalný, chromogenní substrát tetramethylbenzidin (TMB) v dimethylsulfoxidu)
 - chránit před silným světlem
 - naředěný substrát je stabilní 1 hod při 15-30°C ve tmě
7. Substrate Buffer, SB – pufr pro ředění koncent. Substrátu 1 x 30 ml (fosfátový citrátový pufr obsahující 0,006%ní H₂O₂)
8. Wash Solution, WS – promývací roztok 2 x 30 ml (fosfátový pufr s konzervační látkou 0,17%ním Kathonem CG)
 - naředěný promývací roztok je stabilní 2 týdny při 2-8°C

Nspotřebované a nenaředěné reagentie lze skladovat v uzavřené originální lahvičce při 2-8°C do uvedeného data expirace.

Reagentie neobsažené v soupravě:

- voda pro injekce
- destilovaná voda
- 1 M kyselina sírová H₂SO₄ p.a. (stop roztok)

Kontroly:

- NVN
- Coag-Norm

Kalibrátory:

- t – PA Standards 1 – 20 ng/ml, obsažené v diag.soupravě

Vlastní stanovení

- 1) Příprava promývacího roztoku naředěním koncentrovaného WS ze soupravy 25x.
- 2) Příprava standardů, kontrol a vzorků pacientů naředěním v plastových zkumavkách 1:4 (150 μ l plazmy + 450 μ l SD).
- 3) V mikrodestičce:
 - a) Napipetujeme 200 μ l naředěných standardů, kontrol a vzorků pacientů do jamek – standardy (S1 až S6) a kontroly (R2 a R3) vždy duplicitně; S1-nejnižší koncentrace, S6-nejvyšší koncentrace; R2-NVN, R3-Coag-Norm.
 - b) Do obou jamek pro reagenční blank (R1) napipetujte 200 μ l diluentu pro ředění vzorků.
 - c) Obě jamky pro vodní blank (BL) ponecháme prázdné.
- 4) Přikryjeme destičku adhezivní fólií a inkubujeme 60 min při 37°C.
- 5) Během inkubace připravíme roztok konjugátu cca 100násobným naředěním Conjugate (c): 240 μ l Conjugate (c) + 24 ml Conjugate Diluent (CD), na 1 strip 20 μ l do 2 ml.
- 6) Promyjeme 3x na promývačce naředěným promývacím roztokem.
- 7) Osmikanálovou pipetou pipetujeme 200 μ l naředěného konjugátu do všech jamek, kromě dvou pro vodní blank. Opatrným poklepem s destičkou zajistíte promíchání.
- 8) Přikryjeme destičku novou adhezivní fólií a inkubujte 60 min při 37°C.
Během inkubace připravíme roztok substrátu cca 100násobným naředěním Substrate (S): 240 μ l Substrate (S) + 24 ml Substrate Buffer (SB), na 1 strip 20 μ l do 2 ml.
- 9) Promyjeme 3x na promývačce naředěným promývacím roztokem.
- 10) Osmikanálovou pipetou pipetujeme 200 μ l naředěného substrátu do všech jamek, kromě dvou pro vodní blank. Opatrným poklepem s destičkou zajistíte promíchání.
- 11) Inkubujeme zakryté před světlem 30 min při 20-25°C, během této doby dojde k modrému zbarvení.
- 12) Osmikanálovou pipetou pipetujeme 50 μ l 1 M kyseliny sírové, ve stejném pořadí a stejnou rychlostí jako tomu bylo u substrátu, do všech použitých jamek, kromě dvou pro vodní blank. Opatrným poklepem s destičkou zajistíme

promíchání. Dojde k zastavení reakce a změně barvy na žlutou. Do jamek pro vodní blank napipetujeme 250 µl vody pro injekce.

13) Do 15 min změříme absorbance na mikrodestičkovém readeru – test TPA (nastaveno dle aplikačního protokolu).

14) Pomocí softwaru readeru zkontrolujeme kalibrační křivku (popř. vyloučíme odlehlé body) a výsledky kontrol, blanku a pacientů a vytiskneme naměřená data na připojené tiskárně.

Kalibrační křivka:

Šesti bodová křivka zobrazuje rostoucí nelineární závislost absorbance [mOD] na koncentraci analytu v ng/ml. Platí, čím větší je koncentrace, tím větší je absorbance. Hodnoty absorbancí křivky získáme měřením standardů o koncentracích 1; 2,5; 5; 10; 15 a 20 ng/ml.

Kvantitativní stanovení antigenu trombomodulinu (TM) pomocí diagnostické soupravy Imubind Thrombomodulin ELISA (American Diagnostica – USA), určena pouze pro výzkumné účely.

Princip

Během inkubace vzorku v jamce mikrotitrační destičky je trombomodulin obsažený v patientské plazmě vyvázan monoklonální protilátkou proti trombomodulinu navázanou na povrchu jamky. Přidaný konjugát monoklonální protilátky proti lidskému trombomodulinu značený enzymem peroxidázou se váže na zachycený antigen. Vzniklý sendvičový komplex reaguje pomocí peroxidázy s přidaným chromogenním substrátem tetramethylbenzidinem (TMB) za vzniku modrého zbarvení, které se po zastavení reakce kyselinou sírovou změní na žluté. Intenzita žlutého zbarvení je změřena jako absorbance mikrodestičkovým fotometrem při 450 nm a je přímo úměrná množství trombomodulinu ve vzorku. Čím větší je intenzita žlutého zbarvení (absorbance), tím vyšší je koncentrace.

Koncentrace TM (ng/ml) ve vzorcích se získávají odečtem z kalibrační křivky sestavené na základě stanovení kalibračních bodů.

Reagencie:

Diagnostická souprava Imubind Thrombomodulin ELISA Product No. 837 (American Diagnostica – USA) obsahuje:

1. mikrotitrační destička s 96 mikrojamkami, jejichž stěny jsou potaženy monoklonální protilátkou proti trombomodulinu a 4 adhezivní fólie pro zakrytí, uzavírací sáček
2. TM Standard – 10 ng/ml pro kalibraci, 2 x 1 ml (lyofilizovaný)
3. TM Depleted Plasma – TM deficitní plazma 2 x 0,5 ml (lyofilizovaná), lidského původu – potenciálně infekční
4. TM Reference Plasma – kontrolní TM referenční plazma 1 x 0,5 ml (lyofilizovaná)
5. HRP-Conjugated Detection Antibody – konjugát 1 x 200 µl (lyofilizovaný, konjugát protilátky s enzymem peroxidázou)
6. Detection Antibody Diluent – diluent pro ředění konjugátu 1 x 15 ml (kapalný)

7. Substrate – substrát 1 x 22 ml (kapalný)
8. PBS buffer, 0,05%Tween 20 – 1 x sáček s PBS pufrém a Tweenem 20

Nspotřebované a nenaředené reagentie lze skladovat v uzavřené originální lahvičce při 2-8°C do uvedeného data expirace.

Reagentie neobsažené v soupravě:

- voda pro injekce
- hovězí sérový albumin (BSA)
- 0,5 mol/l kyselina sírová H₂SO₄ p.a. (stop roztok)

Kontroly:

- TM referenční plazma, obsažená v diagnostické soupravě
- NVN
- Coag-Norm

Kalibrátory:

- TM Standard – 10 ng/ml, obsažený v diag.soupravě
- TM Depleted Plasma – TM deficitní plazma – 0 ng/ml

Vlastní stanovení

1) Příprava promývacího roztoku rozpuštěním sáčku PBS pufr/Tween 20 v 900 ml destilované vody, promícháme a doplníme do 1000 ml.

2) Příprava pufru pro ředění vzorků, tak aby výsledná koncentrace byla 1%, tj.1g BSA na 100 ml promývacího pufru.

3) Příprava standardů:

a) TM deficientní plazmy přidáním 0,5 ml chladné (2-8°C) destilované vody, na ledu nechat stát 2-3 min a poté promíchat.

b) Příprava 5%ní TM def. plazmy – 0,5 ml rozpuštěné TM def. plazmy do 9,5 ml chladné (2-8°C) destilované vody, mírně promícháme a necháme stát 5 min.

- c) Do lahvičky se standardem TM (10 ng/ml) přidáme 1 ml 5%ní TM def. plazmy a sériově jej naředíme na hodnoty 5;2,5;1,25;0,625 ng/ml do označených zkumavek.
- d) Do těchto zkumavek napipetujeme 500 µl 5%ní TM def.plazmy.
- e) Ze standardu 10 ng/ml odpipetujeme 500 µl do zkumavky pro 5 ng/ml a promícháme.
- f) Ze standardu 5 ng/ml odpipetujeme 500 µl do zkumavky pro 2,5 ng/ml a promícháme, takto postupujeme až do koncentrace 0,625 ng/ml.
- g) Jako standard s hodnotou 0 ng/ml použijeme 5%ní TM def. plazmu.
- 4) K TM referenční plazmě přidáme 0,5 ml chladné (2-8°C) destilované vody a lehce mícháme 2 min, před stanovením naředíme spolu se vzorky a kontrolami pufrem pro ředění vzorků v poměru 1:4.
- 5) V mikrodestičce:
- a) Napipetujeme 200 µl standardů, naředěných kontrol a vzorků pacientů do jamek – standardy (S1 až S6) a kontroly (R2 až R4) vždy duplicitně; S1-nejnižší koncentrace, S6-nejvyšší koncentrace;R2-referenční plazma, R3-NVN, R4- Coag-Norm.
- b) Do obou jamek pro reagenční blank (R1) napipetujte 200 µl diluentu pro ředění vzorků.
- c) Obě jamky pro vodní blank (BL) ponecháme prázdné.
- 6) Přikryjeme destičku adhezivní fólií a inkubujeme 60 min při 37°C.
- 7) Během inkubace připravíme ředící roztok pro konjugát přidáním 15 ml destilované vody do Detection Antibody Diluentu a důkladně promícháme. Takto připravený diluent přidáme k dalším 15 ml destilované vody a důkladně promícháme.
- 8) Do takto připraveného ředícího roztoku pro konjugát přidáme konjugát HRP-Conjugated Detection Antibody v množství 10 µl konjugátu na 1ml ředícího roztoku (celkové potřebné množství ředícího roztoku se vypočítá: počet jamek x 200 µl).
- 9) Promyjeme 4x na promývačce naředěným promývacím pufrem.
- 10) Osmikanálovou pipetou pipetujeme 200 µl naředěného konjugátu do všech jamek, kromě dvou pro vodní blank. Opatrným poklepem s destičkou zajistíte promíchání.

11) Přikryjeme destičku novou adhezivní fólií a inkubujte 30 min při laboratorní teplotě (20-25°C).

12) Promyjeme 4x na promývačce naředěným promývacím pufrem

13) Osmikanálovou pipetou pipetujeme 200 µl naředěného substrátu do všech jamek, kromě dvou pro vodní blank. Opatrným poklepem s destičkou zajistíte promíchání.

14) Inkubujeme zakryté před světlem 20 min při laboratorní teplotě (20-25°C), během této doby dojde k modrému zbarvení.

15) Osmikanálovou pipetou pipetujeme 50 µl 1 M kyseliny sírové, ve stejném pořadí a stejnou rychlostí jako tomu bylo u substrátu, do všech použitých jamek, kromě dvou pro vodní blank. Opatrným poklepem s destičkou zajistíte promíchání. Dojde k zastavení enzymatické reakce a změně barvy na žlutou. Do jamek pro vodní blank napipetujeme 250 µl vody pro injekce.

16) Do 30 min změříme absorbance na mikrodestičkovém readeru při 450 nm – test TM (nastaveno dle aplikačního protokolu).

14) Pomocí softwaru readeru zkontrolujeme kalibrační křivku (popř. vyloučíme odlehlé body) a výsledky kontrol, blanku a pacientů a vytiskneme naměřená data na připojené tiskárně.

Kalibrační křivka:

Šesti bodová křivka zobrazuje rostoucí nelineární závislost absorbance na koncentraci vydávanou v ng/ml. Platí, čím je větší koncentrace, tím větší je absorbance. Hodnoty absorbancí získáme měřením standardů o koncentracích 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5 a 10 ng/ml.

5.GRAFICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Původním záměrem mé práce bylo zpracování kompletních dat pacientek z naší ambulance, které vstoupily do studie na začátku těhotenství a pravidelně navštěvovaly tuto ambulanci po celou dobu těhotenství, po kterou jim byly v daných intervalech odebírány vzorky krve. Ale protože se většinou pacientky k pravidelným odběrům nedostavily, a současně byly do studie přibírány nové pacientky v různém stádiu gravidity, rozhodla jsem se z důvodu velké heterogenity náběrů vytvořit dva soubory.

První soubor tvoří výběr 15 pacientek, které do grantu vstoupily v začátku těhotenství, chodily pravidelně až do poslední kontroly a mají provedeny kompletní náběry a vyšetření.

Druhý soubor tvořený všemi 73 pacientkami je charakteristický velkou rozdílností intervalů mezi jednotlivými odběry (důvodem je jejich rozdílný vstup a výstup ze studie).

Grafické zpracování hodnot obsahuje u každého stanovovaného parametru oba soubory s grafy naměřených hodnot za jednotlivá období a jejich chybovými úsečkami a zároveň tabulku hodnot, z kterých je počítána statistika, obsahující počet stanovených vyšetření (n), průměrnou hodnotu vyšetření v dané skupině (Mean) a chybu měření (Std. Error).

Ke statistickému zpracování jsem použila autorizovaný program GraphPad Prism 5.

Legenda:

TM 0,Plg 0,tPA 0,PAI akt 0,PAI Ag 0,AP 0 – náběry před otěhotněním

TM 1,Plg 1,tPA 1,PAI akt 1,PAI Ag 1,AP 1 – náběry do 10. týdne těhotenství

TM 2,Plg 2,tPA 2,PAI akt 2,PAI Ag 2,AP 2 – náběry od 10. do 19. týdne těhotenství

TM 3,Plg 3,tPA 3,PAI akt 3,PAI Ag 3,AP 3 – náběry od 20. do 29. týdne těhotenství

TM 4,Plg 4,tPA 4,PAI akt 4,PAI Ag 4,AP 4 – náběry od 30. týdne těhotenství

**Doporučené referenční meze dle České hematologické společnosti
ČLS JEP: [39]**

plazminogen, chromogenní m. 80 - 120%,

PAI-1, aktivita 0 - 10,0 AU/ml,

PAI-1, antigen 1,0 – 25,0 ng/ml,

tPA, antigen 1,0 – 10,0 ng/ml,

α_2 antiplazmin, chromogenní m. 80 – 120%.

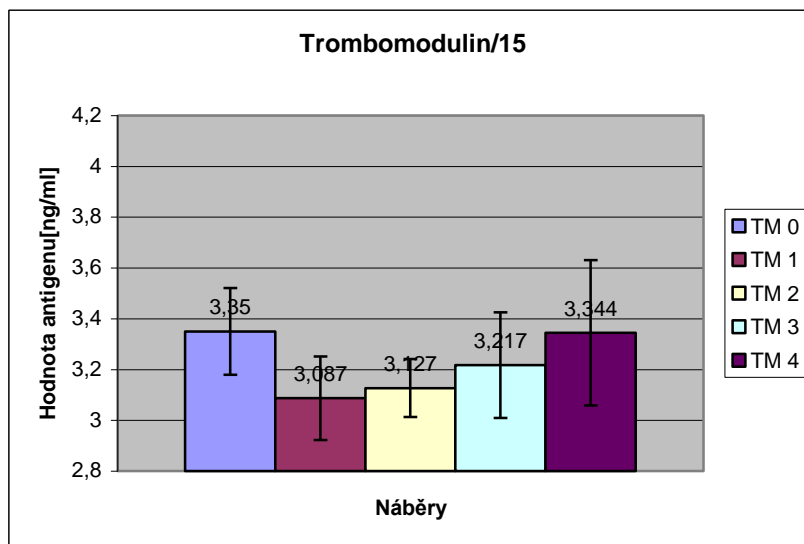
Referenční mez pro trombomodulin [40]:

ženy 2,73 – 4,79 %,

muži 4,00 – 5,35%.

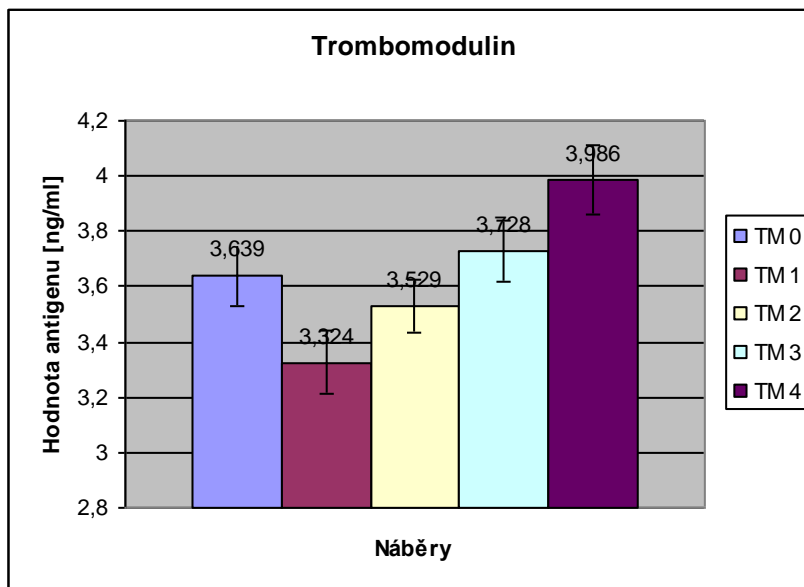
5.1. Trombomodulin, TM(antigen)

a) soubor 15 pacientek



	TM 0	TM 1	TM 2	TM 3	TM 4
n	4	15	15	12	9
Mean	3,35	3,087	3,127	3,217	3,344
Std. Error	0,1708	0,1644	0,114	0,2081	0,2858

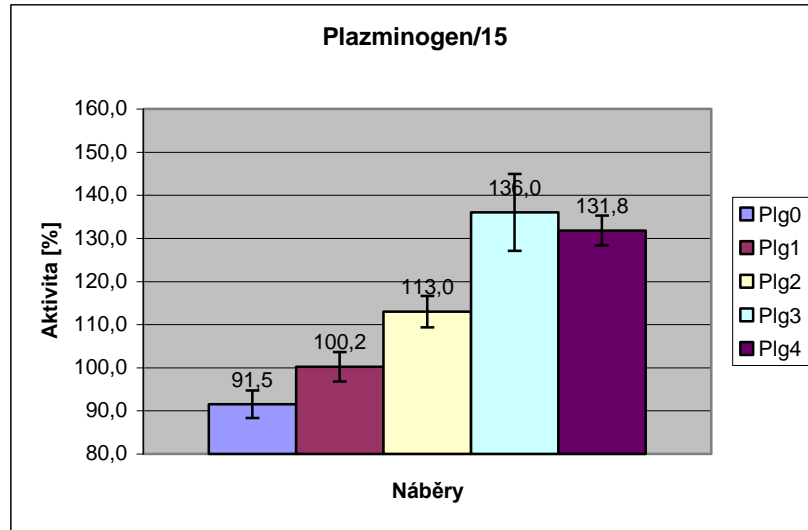
b) celý soubor



	TM 0	TM 1	TM 2	TM 3	TM 4
n	38	38	63	71	71
Mean	3,639	3,324	3,529	3,728	3,986
Std. Error	0,1118	0,1141	0,09446	0,1108	0,127

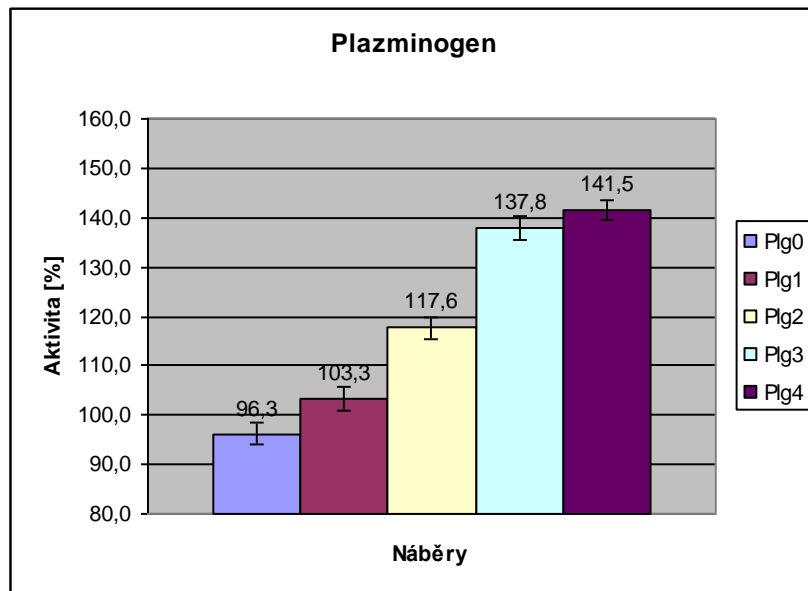
5.2. Plazminogen, Plg(aktivita)

a) soubor 15 pacientek



	Plg0	Plg1	Plg2	Plg3	Plg4
n	4	15	15	15	15
Mean	91,5	100,2	113,0	136,0	131,8
Std. Error	3,175	3,431	3,649	8,893	3,459

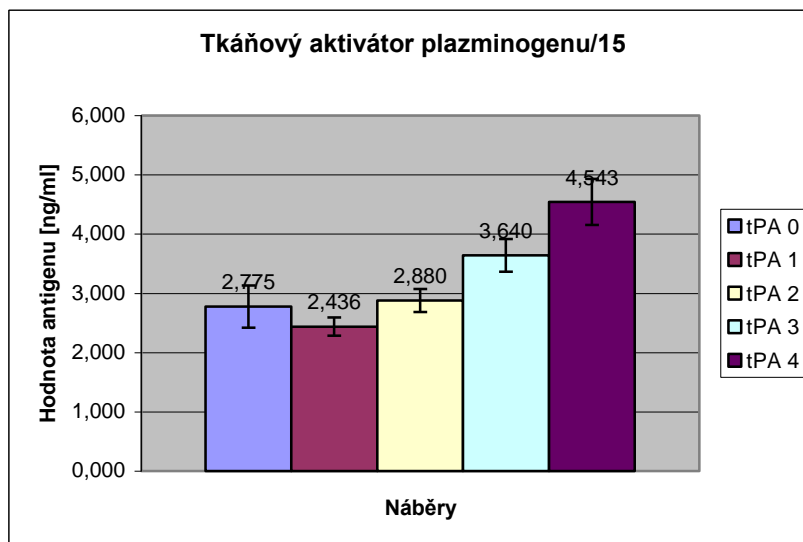
b) celý soubor



	Plg0	Plg1	Plg2	Plg3	Plg4
n	39	38	62	71	73
Mean	96,3	103,3	117,6	137,8	141,5
Std. Error	2,234	2,378	2,061	2,508	2,013

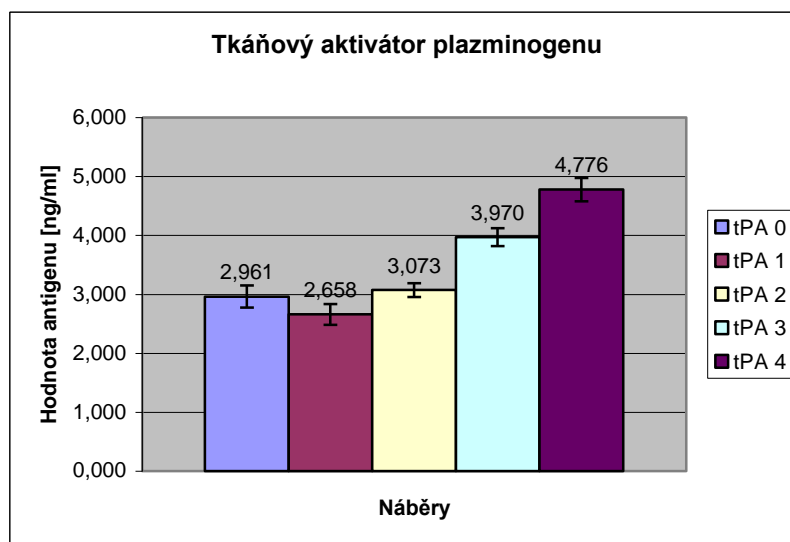
5.3. Tkáňový aktivátor plazminogenu, tPA(aktivita)

a) soubor 15 pacientek



	tPA 0	tPA 1	tPA 2	tPA 3	tPA 4
n	4	14	15	15	14
Mean	2,775	2,436	2,880	3,640	4,543
Std. Error	0,3568	0,1539	0,1955	0,2758	0,3894

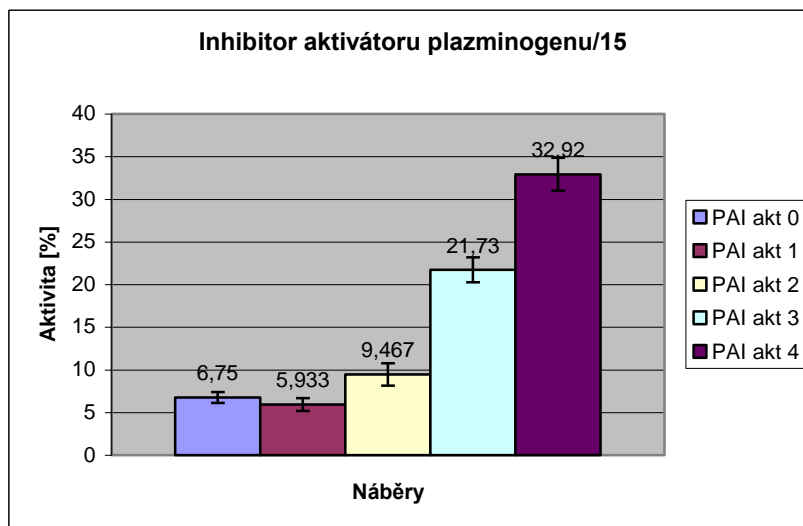
b) celý soubor



	tPA 0	tPA 1	tPA 2	tPA 3	tPA 4
n	38	36	63	70	71
Mean	2,961	2,658	3,073	3,970	4,776
Std. Error	0,1861	0,1759	0,1167	0,1501	0,1965

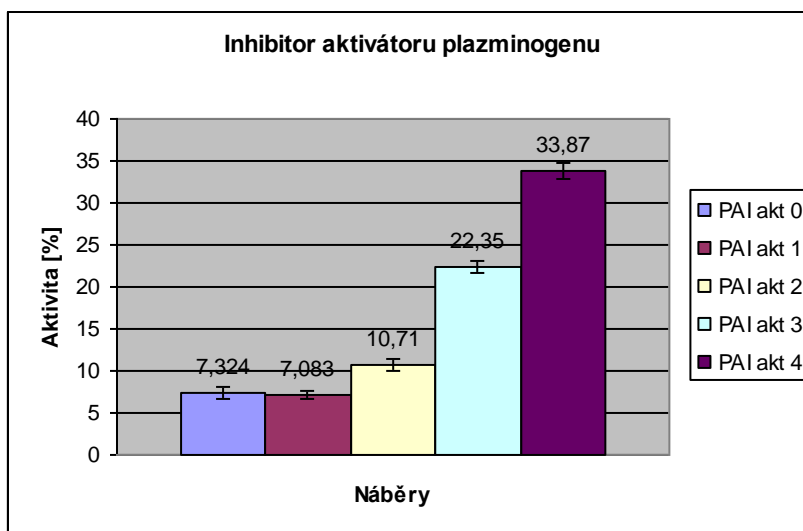
5.4. Inhibitor aktivátoru plazminogenu, PAI akt(aktivita)

a) soubor 15 pacientek



	PAI akt 0	PAI akt 1	PAI akt 2	PAI akt 3	PAI akt 4
n	4	15	15	15	13
Mean	6,75	5,933	9,467	21,73	32,92
Std. Error	0,6292	0,7462	1,312	1,469	1,926

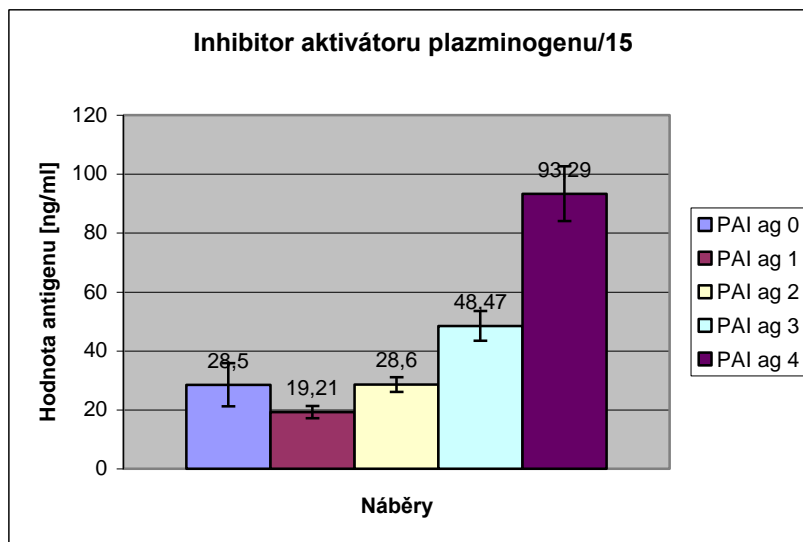
b) celý soubor



	PAI akt 0	PAI akt 1	PAI akt 2	PAI akt 3	PAI akt 4
n	37	36	59	57	47
Mean	7,324	7,083	10,71	22,35	33,87
Std. Error	0,776	0,5139	0,6314	0,7024	0,9432

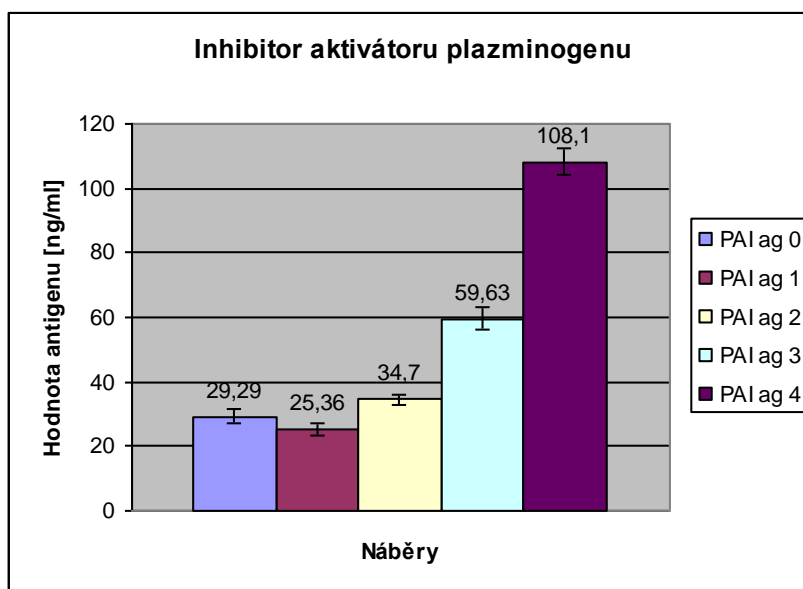
5.5. Inhibitor aktivátoru plazminogenu, PAI Ag (antigen)

a) soubor 15 pacientek



	PAI ag 0	PAI ag 1	PAI ag 2	PAI ag 3	PAI ag 4
n	4	14	15	15	14
Mean	28,5	19,21	28,6	48,47	93,29
Std. Error	7,309	2,044	2,499	5,075	9,286

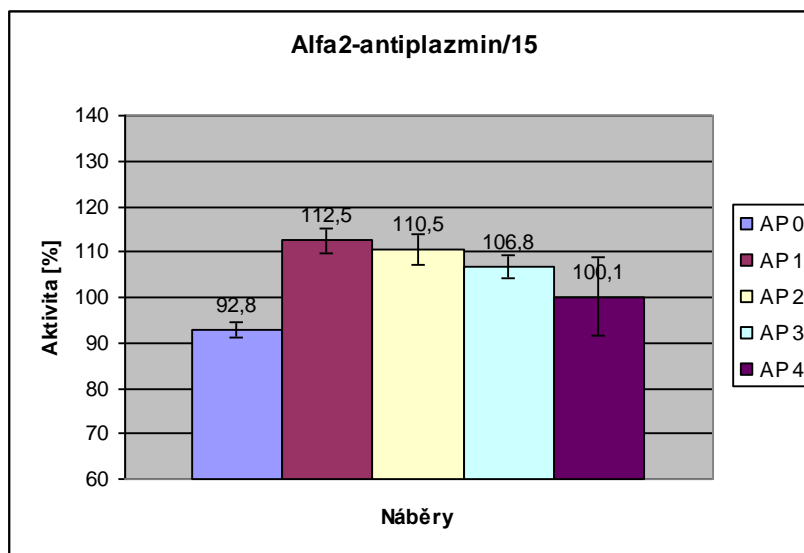
b) celý soubor



	PAI ag 0	PAI ag 1	PAI ag 2	PAI ag 3	PAI ag 4
n	38	36	63	71	70
Mean	29,29	25,36	34,7	59,63	108,1
Std. Error	2,224	1,932	1,6	3,513	4,075

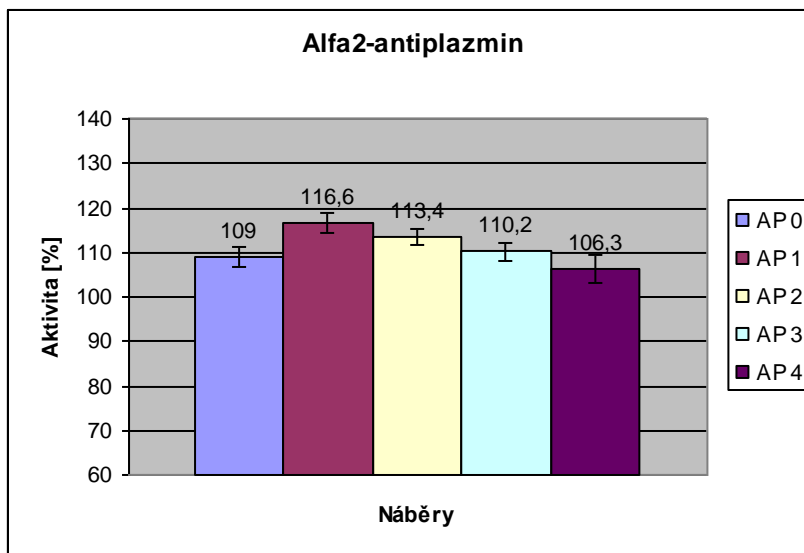
5.6. α_2 antiplazmin, AP(aktivita)

a) soubor 15 pacientek



	AP 0	AP 1	AP 2	AP 3	AP 4
n	5	15	15	12	13
Mean	92,8	112,5	110,5	106,8	100,1
Std. Error	1,562	2,72	3,379	2,468	8,641

b) celý soubor



	AP 0	AP 1	AP 2	AP 3	AP 4
n	34	27	49	46	41
Mean	109	116,6	113,4	110,2	106,3
Std. Error	2,176	2,216	1,883	1,933	3,174

6.DISKUSE

6.1. Trombomodulin

U obou skupin byly hodnoty v době před otěhotněním vyšší než na začátku těhotenství. V průběhu těhotenství se postupně zvyšovaly. U celého souboru překročila průměrná hodnota v 30.týdnu hodnotu před těhotenstvím. U souboru 15 pacientek se hodnota z 30.týdne gravidity přibližovala hodnotě před otěhotněním. Zatímco u prvního souboru nebyl statisticky sledován mezi jednotlivými obdobími rozdíl ($p = 0,8531$), tak u druhého souboru byl rozdíl při $p < 0,05 (0,0022)$ statisticky významný. Variační koeficienty stanovení se pohybovaly u prvního souboru 10,20 - 25,64% a u druhého souboru 18,93-26,85%.

6.2. Plazminogen

U obou skupin byly průměrné hodnoty na začátku těhotenství vyšší než v době před otěhotněním. Od začátku těhotenství docházelo k postupnému nárůstu hodnot až do 29.týdne. Rozdíl výsledků nastal v posledním intervalu, kdy u skupiny 15 pacientek průměrná hodnota plazminogenu klesla, zatímco u celého souboru byla oproti předchozímu náběru zvýšená. Tento rozdíl si vysvětlují objemem dat celého souboru a současně větší přítomností vyšších hodnot (až 202%) oproti souboru s 15 pacientkami, kde maximální hodnota dosahovala 147%. Variační koeficienty stanovení se pohybovaly u prvního souboru 6,94-25,33% a u druhého souboru 12,15-14,50%, kdy tento rozdíl byl způsoben výskytem extrémní opakované hodnoty 253% v 1. skupině ve 20.-29.týdnu. Rozdíly mezi jednotlivými obdobími při $p < 0,0001$ byly u obou souborů shledány jako statisticky významné.

6.3. Tkáňový aktivátor plazminogenu

tPA-u obou skupin byly hodnoty v době před otěhotněním vyšší než na počátku těhotenství. V průběhu těhotenství se postupně zvyšovaly až na jeho konci dosáhly téměř dvojnásobných hodnot. Variační koeficienty stanovení se v obou skupinách pohybovaly podobně, u prvního souboru 23,65-32,07% a u druhého souboru 30,13-39,70%. Rozdíly mezi jednotlivými obdobími při $p < 0,0001$ byly u obou souborů shledány jako statisticky významnými.

6.4. Inhibitor aktivátoru plazminogenu (aktivita)

Obě skupiny měly průměrné hodnoty v době před otěhotněním mírně vyšší než na počátku těhotenství, ale během těhotenství se postupně zvýšily přibližně až na pětinašobek původní hodnoty. Rozdíly mezi jednotlivými obdobími při $p < 0,0001$ byly u obou souborů shledány jako statisticky významnými. Široké rozpětí variačních koeficientů bylo obdobné u obou skupin. U prvního souboru se hodnoty pohybovaly od 18,64% do 53,69%, kdy byla tato rozličnost výsledků způsobena jednotlivými hodnotami 0-23% z 2.náběru těhotenství. U druhého souboru je variabilita CV ještě větší, tj. 19,09-64,45%, způsobená rozptylem hodnot (0-19%) u 1. náběru, tzn. ještě před otěhotněním.

6.5. Inhibitor aktivátoru plazminogenu (antigen)

V případě PAI antigenu byly nárůsty průměrných hodnot u obou skupin podobné. Jako v předchozím případě byly v době před otěhotněním mírně vyšší než na počátku těhotenství, ale během těhotenství se postupně zvýšily přibližně na čtyřnásobek původní hodnoty. Dalo by se říci, že korelovaly s hodnotami funkčních aktivit tohoto inhibitoru. Rozdíly mezi jednotlivými obdobími při $p < 0,0001$ byly u obou souborů shledány jako statisticky významnými. Variabilita variační koeficientů byla u obou skupin obdobná, menší než u funkční aktivity, ale přesto významná. Hodnoty CV se u první skupiny 15 pacientek pohybovaly v rozmezí 33,84-51,29% a u druhé skupiny 31,55-49,64%.

6.6. α_2 -antiplazmin

Nejvyšší průměrné hodnoty byly u obou skupin na začátku těhotenství. Od počátku až do konce těhotenství měly klesající charakter. Průměrné hodnoty náběrů před otěhotněním byly u obou skupin v referenčním rozmezí. U první skupiny byly nižší než na konci těhotenství. Ve druhé skupině se průměr hodnot v tomto období přiblížil průměru hodnot III.trimetru. Variační koeficienty jednotlivých měření skupiny 15 pacientek byly mezi 3,76 a 31,13%. Hodnota CV 31,13% byla u posledního náběru způsobena ojedinělým výskytem extrémní hodnoty 11% (opakovaně stanovená hodnota). Rozpětí variačních koeficientů ve druhé skupině se pohybovalo od 9,87% do 19,12%. Zatímco rozdílnost výsledků mezi jednotlivými obdobími nebyla u prvního souboru statisticky významná ($p = 0,1246$), u druhého souboru s hodnotou $p = 0,0395$ ($p < 0,05$) byla. [41;42;43;44]

7.ZÁVĚR

Ve své práci jsem se snažila zdokumentovat vývoj koagulačních parametrů v průběhu těhotenství na dvou souborech pacientek s opakovanými spontánními potraty, které byly po dobu těhotenství léčebně zajišťovány LMWH.

Z výsledků není patrný význam výběru souboru 15 pacientek, které měly kompletní náběry v průběhu celého těhotenství, přesto že všechny průměrné hodnoty daných parametrů měly za příslušná období nižší hodnotu.

Z výsledků je zřejmé, že hladina trombomodulinu (endoteliálního inhibitoru hemostázy) se s přibývajícím těhotenstvím zvyšuje jako ochrana organismu gravidní ženy před hyperkoagulačním stavem. Jeho počáteční hodnota 3,324 ng/ml se navýšila o 19,9% na hodnotu 3,986 ng/ml, ale přesto nepřesáhla referenční mez.

Hladiny hlavního aktivátoru plazminogenu tPA se pohybovaly v referenčních mezích. Přesto že nárůst činil necelých 80% (79,68%), z původní hodnoty 2,658 ng/ml na 4,776 ng/ml.

Nárůst hladin funkčních aktivit plazminogenu v průběhu těhotenství činil 36,98%, tj. ze 103,3% na 141,5%.

Extrémně vysoký nárůst hodnot zaznamenala jak funkční aktivita, tak i hodnota antigenu u inhibitoru aktivátoru plazminogenu PAI-1. U aktivity byl nárůst o 378%, z hodnoty na začátku těhotenství 7,083% na hodnotu 33,87%. Nárůst hladin antigenu koreloval s nárůstem funkční aktivity. Jeho nárůst činil 326%, tj. z hodnoty 25,36 ng/ml na hodnotu 108,1 ng/ml.

Stanovené hladiny α_2 -antiplazminu měly během těhotenství opačný charakter. Jeho průměrná hladina dosahovala vrcholu hned na počátku těhotenství (116,6%) a s přibývajícím délkou gravidity postupně klesala (106,3%). Tento pokles není příliš vysoký, činí 0,91%. V průběhu těhotenství, kdy se organismus zvyšovanou aktivitou koagulačního a zároveň fibrinolytického systému připravuje na velkou krevní ztrátu při porodu, hodnoty α_2 -antiplazminu, inhibitoru plazminu, klesají až k hodnotám naměřeným před těhotenstvím.

8.SOUHRN

V souboru 73 pacientek s opakovanými spontánními potraty, které měly v osobní anamnéze alespoň jednu trombofilní dispozici, ať už vrozenou mutaci faktoru V Leiden v heterozygotní formě, nebo mutaci 20210A v genu faktoru II v heterozygotní formě nebo mutaci v genu pro MTHFR 677T nebo 1298C v heterozygotní nebo homozygotní formě, anebo měly získanou trombofilní dispozici antifosfolipidového syndromu, případně hyperhomocysteinémii, jsme sledovali vývoj hladin koagulačních parametrů v průběhu celého těhotenství. Po tuto dobu byly pacientkám v pravidelných intervalech odebírány vzorky krve. U některých pacientek byly sledované parametry vyšetřeny ještě v době před těhotenstvím. Pacientky byly v období 25.–43. týdne gravidity zajišťovány nadroparinem (Fraxiparine), event. při alergických projevech enoxaparinem (Clexane).

Metodou nepřímé detekce pomocí chromogenního substrátu na analyzátoru Sysmex CA-1500 (Sysmex-TOA) jsme stanovili funkční aktivity plazminogenu, inhibitoru aktivátoru plazminogenu a α_2 antiplazminu.

Pomocí přímé nekompetitivní ELISA metody jsme zjistili kvantitativní množství antigenů tkáňového aktivátoru plazminogenu, inhibitoru aktivátoru plazminogenu a trombomodulinu.

Prokázali jsme, že hladiny trombomodulinu a plazminogenu se chovají stejně jako u zdravých žen s fyziologickým průběhem těhotenství. Hladina TM se s přibívajícím těhotenstvím zvýšila o 19,9% a hladina plazminogenu, která už na konci II. trimestru překonala referenční mez se navýšila o 36,98%.

Nejvýraznější nárůst po celou dobu těhotenství jsme zaznamenali u hladin PAI-1[5]. Hodnota jeho aktivity dosahovala hraničních mezí již během II.trimestru a na konci těhotenství dosahovala až jejich trojnásobek. Celkový nárůst aktivity PAI-1 za celé období gravidity činil 378%. Hladiny antigenu PAI-1 se pohybovaly už na počátku těhotenství při horní referenční mezi. Během těhotenství jeho čtyřnásobné navýšení činilo celých 326%. Zvýšenou hladinu PAI-1 jsme zjistili u pacientek i v době před jejich otěhotněním.

Chování hladin tPA u našeho souboru bylo shodné se stoupajícím charakterem hodnot v průběhu těhotenství u zdravých žen dle Kvasničky[6]. Hodnoty tPA se během těhotenství pohybovaly v referenčních mezích, přestože jejich nárůst činil 79,68%.

Jiný vývoj parametrů jsme zaznamenali u hladin α_2 -antiplazminu. Na začátku těhotenství jsme u pacientek s opakovanými spontánními potraty prokázali zvýšenou hladinu α_2 -antiplazminu, která po celou dobu těhotenství

klesala. Pokles hladin α_2 -antiplazminu nebyl výrazný (o 0,91%) a v průběhu těhotenství se pohyboval v referenčních mezích. Bohužel výsledky měření nekorelují s hladinami α_2 -antiplazminu u fyziologického těhotenství, kdy v průběhu těhotenství dochází k nárůstu jeho hodnot.[5] Hladiny α_2 -antiplazminu na konci těhotenství u našich pacientek dosahovaly téměř stejných hodnot jako v době před otěhotněním.

Námi dosaženými výsledky jsme sice zjistili odlišnost chování α_2 -antiplazminu, ale nedokážeme na základě jednoho odlišně se chovajícího parametru, vysvětlit souvislost s trombofilními dispozicemi žen s opakovanými samovolnými potraty a objasnit tak z hematologického hlediska příčinu této problematiky. Nadále tak otázka vlivu trombofilí na vzniku opakované potratovosti zůstává nezodpovězena.[45].

Vliv léčivého účinku LMWH podávaným našim pacientkám byl potvrzen 67 zdravě narozenými dětmi.[1]

9. ABSTRAKT

In the group of 73 patients with recurrent spontaneous abortions, which they had a personal history of at least one thrombophilic disposition, either congenital acquired mutation of factor V Leiden in heterozygous form, or 20210 mutation in the gene of factor II in heterozygous form or mutation in the gene for MTHFR 677T or 1298C in heterozygous or homozygous form, or they had acquired thrombophilic disposition of antiphospholipid syndrome, or hyperhomocysteinemia, we studied the level-progress of blood coagulation parameters during the entire pregnancy. During this period, blood samples were taken from the patients on a regular basis. By some patients the parameters were examined even before pregnancy. Patients were getting nadroparin (Fraxiparine) in the 25th – 43rd week of pregnancy, alternatively enoxaparin (Clexane) who had showed allergic reaction.

With the indirect detection method using a chromogenic substrate for the analyzer Sysmex CA-1500 (Sysmex-TOA) we evaluated functional activity of plasminogen, plasminogen activator inhibitor and α 2-antiplasmin.

With the direct non-competitive ELISA method, we found out a quantitative amount of antigen plasminogen tissue activator, plasminogen activator inhibitor and trombomodulin.

We documented that the levels of trombomodulin and plasminogen behave the same way like by healthy women who had physiological course of pregnancy. The level of TM with advanced pregnancy increased by 19,9% and the level of plasminogen, that already at the end of II. trimester exceeded the reference limit, increased by 36,98%.

The most noticeable growth throughout pregnancy we observed in the levels of PAI-1 [5]. The value of its activities was reaching boundary limits during II. trimester and at the end of pregnancy it was three times higher. The total increase in activity PAI-1 over the entire period of gravidity was 378%. The levels of antigen PAI-1 were reaching already at the beginning of pregnancy the upper reference limit. The fourfold increase during pregnancy was whole 326%. The increased level of PAI-1 we found by patients even in the period before they got pregnant.

The reaction of tPA levels in our group was identical with increasing values shown by healthy women throughout the pregnancy as per Kvasnicka. The values of tPA during pregnancy moved within reference limits, although their increase did 79,68%.

Different development we observed in the levels of α_2 antiplasmin. Patients with recurrent spontaneous abortions had at the beginning of pregnancy increased level of α_2 antiplasmin, but throughout the pregnancy the level was sinking. The level-decline of α_2 antiplasmin was not significant (0,91%) and throughout the pregnancy it had moved within the reference limit. Unfortunately the results don't correlate with the α_2 antiplasmin levels by physiological pregnancy, where the value [5] increases throughout the gravidity. Our patients had at the end of pregnancy almost the same values like in the period before pregnancy.

As outcome we did find out a difference in behaviour of α_2 antiplasmin, but we can not explain connection of thrombophilic disposition by women with recurrent spontaneous abortions based only on one differently behaving parameter and therefore we can not solve this problem as for haematology aspect. Therefore the question of influence of thrombophily on recurrent spontaneous abortions remains in existence .[45].

The curative effect of LMWH given to our patients has been verified by 67 healthy born children. [1]

10. SEZNAM ZKRATEK

A – absorbance

Ala – aminokyselina alanin

AP syndrom (AF syndrom) – antifosfolipidový syndrom

APC – aktivovaný protein C

ARDS – syndrom dechové tísně dospělých

Arg – aminokyselina arginin

Asp – kys. asparágová

AT – antitrombin

BSA – hovězí sérový albumin

c - koncentrace

C – konjugát

Coag – Norm – druh kontroly fi. Diagnostika Stago

CRP – C reaktivní protein

CV – variační koeficient

DIC – diseminovaná intravaskulární koagulopatie

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

ELISA – enzymová imunoanalýza na pevné fázi

gen PLANH1 – gen pro PAI-1

gen PLAT – gen pro tPA

gen PLG – gen pro plazminogen

gen SERPINF2 – gen pro α_2 antiplazmin

Gly – aminokyselina glycin

GP – glykoprotein

HMWK – vysokomolekulární kininogen

HRGP – glykoprotein bohatý na histidin

HRP-Conjugated Detection Antibody - konjugát protilátky s enzymem peroxidázou

ICAM-1 – mezibuněčná adhezivní molekula-1

ID štítkem – identifikační štítkem

IFN- γ – interferon γ

II, V(a), VII, VIII(a), IX, X(a), XIa, XII(a), XIII(a) – koagulační faktory (aktivované)

IL- 1 (β) – interleukin 1 (β)

LDL – lipoprotein o nízké hustotě

Leu – aminokyselina leucin

LMWH – nízkomolekulární heparin

MFS – mononukleárový fagocytární systém

NVN – druh kontroly, nefiltrovaný vlastní normál

PAI-1, PAI-2, PAI- 3 – inhibitory aktivátoru plazminogenu 1, 2, 3

PAR-2, PAR-4 – receptory aktivované proteázami

PBS buffer – solný fosfátový pufr

PC – protein C

pH = $-\log [H_3O^+]$

pNA – p-nitroanilín

Pro – aminokyselina prolin

PS – protein S

S – substrát

s.c. aplikace – podkožní aplikace např. léku

S-2403 – druh substrátu

SB – pufr pro ředění koncentrovaného substrátu

SD – ředidlo

SDS-PAGE – elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného

T – transmitance

TAFI – trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy

TF – tkáňový faktor

TFPI – inhibitor tkáňového faktoru

TGF- β – transformační růstový faktor β

Thr – aminokyselina threonin
TM – trombomodulin
TMB – tetrametylbenzidin
TNF- α – tumor nekrotizující faktor α
TPA – test na stanovení tPA
tPA – tkáňový aktivátor plazminogenu
TXA2 – tromboxan A2
Tyr – aminokyselina tyrosin
uPA – urokináza
Val – aminokyselina valin
VTE – žilní tromboembolizmus
WS – promývací roztok

11. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1.Sigutova, P., Hajsmanova, Z., Slechtova, J., Ulcova-Gallova, Z. Monitoring of haemocoagulation changes during long-term low molecular weight heparin protection of pregnancy. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007, vol. 5, suppl.2, abstract number PP-TH-368.

2.URL<<http://www.czso.cz/csu/csu.nsf/informace/coby031510.doc>> [cit. 2010-04-08].

3.Anonymous. Porodnická encyklopedie | Patologické těhotenství | Změny hemostázy v těhotenství a šestinedělí [cit. 2010-03-28]. URL<<http://www.porodnici.cz/zmeny-hemostazy-v-tehotenstvi-a-sestinedeli>>

4.Bremme, K.A. Haemostatic changes in pregnancy, Best Practice and Research: Clinical Haematology, 2003, vol. 16, no. 2, pp.153-168.

5.Lothar Thomas. Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. 1.ed. Frankfurt/Main:TH-Books-Verl.-Ges., 1998. ISBN 3-9805215-4-0.

6.Kvasnička, Jan. Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi. 1.vyd. Praha: Grada Publishing a.s.2003. 300 s. ISBN 80-7169-993-4.

7.Hague, W.M., Dekker, G.A. Risk factors for thrombosis in pregnancy, Best Practice and Research: Clinical Haematology, 2003, vol. 16, no. 2, pp.197-210.

8.Greer, I.A., Nelson-Piercy, C. Low-molecular-weight heparins for thromboprophylaxis and treatment of venous thromboembolism in pregnancy: a systematic review of safety and efficacy , Blood, 15 July 2005, vol. 106, no. 2, pp. 401-407.

9.URL<<http://www.fnplzen.cz/kliniky/ukbh/ukbhCZ/zdroj/vyzkum/vyzkum.html>> [cit. 2010-04-08].

10.Pecka, Miroslav. Laboratorní hematologie v přehledu III. 1.vyd. Český Těšín: Finidr, 2004. 237 s. ISBN 80-86682-03-X.

11.URL<http://video.upol.cz/dpx_enterprise_media_user/dpx/slidemedia/54/03_01.pdf> [cit. 2010-04-20].

12.Peterson, J.J., Rayburn, H B., Lager, DJ., Raife, T.J., Kealey,G.P., Rosenberg, R.D., Lentz, S.R. Expression of Thrombomodulin and Consequences of Thrombomodulin Deficiency during Healing of Cutaneous Wounds. American Journal of Pathology. 1999.vol.155.1569-1575.

13.Maruyama, I., Bell, C.E., Majerus, P.W. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast Of human placenta, Journal of Cell Biology, 1985, vol.101, no.2, pp. 363-371.

14.URL<<http://lekarske.slovniky.cz/pojem/trombomodulin>> [cit. 2010-04-16].

15.URL<http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/Protein/Protein_Electrophoresis/SDS-PAGE/index.html> [cit. 2010-04-16].

16.Dittman, W.A., Majerus, P.W. Structure and function of thrombomodulin: A natural anticoagulant , Blood, 1990, vol. 75, iss.2, pp.329 -336.

17.Sood, R., Sholl, L., Isermann, B., Zogg, M., Coughlin, S.R., Weiler, H. Maternal Par4 and platelets contribute to defective placenta formation in mouse embryos lacking thrombomodulin, Blood, 2008, vol.112, no.3, pp. 585-591.

- 18.URL<<http://www.scbt.com/datasheet-13504-par-2-sam11-antibody.html>> [2010-04-12].
- 19.Isermann, B., Sood, R., Pawlinski, R., Zogg, M., Kalloway, S., Degen, J.L, Mackman, N., Weiler, H. The thrombomodulin-protein C system is essential for the maintenance of pregnancy, *Nature Medicine*, 2003, vol. 9, no.3, pp. 331-337.
- 20.URL<<http://quizlet.com/334667/print/>> [2010-04-30].
- 21.URL<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/FIAJU.htm> [2010-04-18].
- 22.URL<<http://www.copewithcyto kines.de/cope.cgi?key=HRGP>> [2010-04-22].
- 23.URL<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Plazmin>> [2010-04-20].
- 24.URL<<http://en.wikipedia.org/wiki/Plasminogen>> [2010-04-20].
- 25.URL<http://bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/Molecular_Biology_Syllabus/tPA/tPA_image/tpa_image.htm> [2010-05-01].
- 26.URL<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id_type=entrezgene&id=5327> [2010-05-01].
- 27.URL<<http://en.wikipedia.org/wiki/PAI-1>> [2010-04-18].
- 28.Åstedt, B., Lindoff, C., Lecander, I. Significance of the plasminogen activator inhibitor of placental type (PAI-2) in pregnancy, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 1998, vol. 24 (5), pp. 431-435.
- 29.URL<<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERPINE1&search=PLANH1>> [2010-05-01].

- 30.URL<<http://www.lfg-brno.cz/trombofilie-rozšření1.htm>> [2010-04-12].
- 31.URL<<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERPINF2&search=SERPINF2>> [2010-05-01].
- 32.URL<<http://en.wikipedia.org/wiki/Antiplasmin>> [2010-04-18].
- 33.Racek, Jaroslav. et al. *Klinická biochemie*. 2.vyd. Praha: Galén, 2006. 329 s. ISBN 80-7262-324-9.
- 34.Uičová-Gallová, Z. *Nepłodnost: Útok imunity*. 1.vyd. Praha: Grada Publishing,a.s. 2006. 144 s. ISBN 80-247-1493-0.
- 35.Stortoni, P., Cecati, M., Giannubilo, S.R., Sartini, D., Turi, A., Emanuelli, M., Tranquilli, A.L. Placental thrombomodulin expression in recurrent miscarriage. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2010, vol. 8, no. 1.
- 36.Ballegeer, V., Spitz, B., Kieckens, L., Moreau, H., Van Assche, A., Collen, D. Predictive value of increased plasma levels of fibronectin in gestational hypertension, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1989, vol. 161, no. 2, pp. 432-436.
- 37.URL<www.chromogenix.com> [2010-03-21].
- 38.URL<http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/ELISA_cz.html> [2010-03-21].
- 39.URL<<http://www.hematology.cz/doporuceni-chs-meze.php>> [2010-04-22].
- 40.URL<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/_KOMP_TM.htm#_TAB_P_TM_ELISA> [2010-04-12].

- 41.URL<<http://www.economicexpert.com/a/P:value.htm>> [2010-04-18].
- 42.URL<<http://business.clayton.edu/arjomand/business/p-value.htm>> [2010-04-18].
- 43.URL<http://www.am.vsb.cz/~lit40/STA1/Materialy/Testovani_princip.pps> [2010-04-18].
- 44.URL<<http://www.graphpad.com/articles/pvalue.htm>> [2010-04-04].
- 45.Procházka, M., Geierová, M., Procházková, J., L'ubušký M. Trombofilní stavy v porodnictví - II. část, Praktická Gynekologie, 2004, 6, s. 20-21.