

Bakalářská práce

2010/2011

Markéta Bartošová

UK v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Hradec Králové

Srovnání výsledků koagulačních parametrů měřených různými metodami

Markéta Bartošová

2010/2011

Mgr. Petr Sadílek

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

V Hradci Králové, 30. 4. 2011

Markéta Bartošová

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při zpracování bakalářské práce. Především děkuji Mgr. Petru Sadílkovi za odbornou konzultaci, všestrannou pomoc a čas, který věnoval této práci.

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíl práce (zadání)	8
3. Teoretická část	9
3. 1. Hemostáza	9
3. 1. 1. Složky hemostázy	9
3. 1. 1. 1. Cévní stěna	9
3. 1. 1. 2. Tkáňová složka	10
3. 1. 1. 3. Krevní destičky	10
3. 1. 1. 4. Systém plazmatických koagulační faktorů.....	11
3. 1. 1. 4. 1. Koagulační kaskáda	14
3. 1. 1. 5. Fibrinolytický systém	16
3. 1. 1. 6. Systém inhibitorů hemostázy	17
3. 2. Protrombinový test (Quickův, PT)	18
3. 2. 1. Historie protrombinového testu	18
3. 2. 2. Provedení testu z citrátové plazmy	18
3. 2. 3. Provedení testu z kapilárního odběru - z kapky krve	19
3. 2. 4. Reagencie pro protrombinový test	19
3. 2. 5. Výsledky protrombinového testu	19
3. 2. 6. Klinická interpretace výsledků	20
3. 2. 7. Monitorování léčby pomocí protrombinového testu	20
4. Metody, materiál a přístroje	22
4. 1. Princip použité metody stanovení PT	22
4. 2. Vyšetřovaný materiál	22
4. 2. 1. Odběr vzorku a jeho transport do laboratoře	22
4. 2. 2. Příjem materiálu a jeho zpracování laboratoří	22
4. 3. Reagencie, jejich příprava a stabilita	23
4. 3. 1. Diagnostické soupravy	23
4. 3. 2. Stabilita použitých reagensů	23
4. 4. Přístroj	23
4. 4. 1. Nastavení koagulometru	24
5. Praktická část	24

5. 1. Pracovní postup	24
5. 2. Výsledkový list	24
5. 3. Hodnocení výsledků	27
6. Závěr	31
7. Diskuze	32
8. Seznam zkratk	33
9. Seznam použité literatury	35

1. Úvod

Hemostáza je schopnost organismu zastavit krvácení. Za fyziologických poměrů hemostáza zajišťuje fluiditu krve v cévním řečišti a v případě porušení celistvosti cévní stěny aktivuje mechanismy vedoucí k zástavě krvácení. Aby byla hemostáza v rovnováze, je zapotřebí normální funkce cévní stěny, krevních destiček a plazmatických činitelů zahrnujících systém koagulační, fibrinolytický a jejich inhibitory. Narušení homeostatické rovnováhy může vyústit na jedné straně v krvácivé stavy a na straně druhé ve stavy trombofilní.

K diagnostice poruch hemostázy či k monitorování antikoagulační léčby se používá mnoho laboratorních vyšetření. Nejčastěji požadovaným vyšetřením hemostázy je protrombinový test. Jedná se o základní rutinně používaný skupinový koagulační test, který popisuje tzv. vnější cestu aktivace přeměny protrombinu na trombin a používá se také k monitorování antikoagulační léčby kumarinovými preparáty, jako je např. warfarin.

Vzhledem k tomu, že se jedná o opravdu často používaný test, vyšetřovaný ve všech hematologických koagulačních laboratořích, objevuje se na trhu obrovské množství výrobců a jejich reagentů ke stanovení tohoto testu. Ne všechny reagenty jsou však stejně kvalitní, stabilní, citlivé a drahé.

Proto jsme se v této práci rozhodli porovnat výsledky protrombinového testu naměřené reagenty 3 různých výrobců (Diagon, Diagnostica Stago a Grifols), abychom prokázali, zda jsou naměřené výsledky srovnatelné.

2. Cíl práce (zadání)

Cílem mé práce bylo porovnat výsledky protrombinového testu u náhodně vybraných vzorků plazmy pacientů FN Hradec Králové, změřené současně reagensy firmy Diagon, reagensy firmy Diagnostica Stago a reagensy firmy Grifols.

3. Teoretická část

3. 1. Hemostáza

Hemostáza, neboli srážení krve, je soubor navzájem propojených a regulovaných proteolytických reakcí, které končí vytvořením fibrinové zátky. Celý proces je nezbytný k udržení vnitřního prostředí těla, zejména k zástavě krvácení v případě poranění. Zabezpečení organismu proti ztrátě krve je organizováno na několika strukturních úrovních. Na koagulaci se podílejí proteiny plazmy, krevní elementy a různé typy buněk tvořících stěnu poškozené cévy (endotel, subendotelové struktury, hladké svalstvo cévní stěny). (http://cs.wikipedia.org/wiki/Sr%C3%A1%C5%BEen%C3%AD_krve)

K narušení cévní stěny může dojít působením zevních i vnitřních mechanických sil (poranění, vliv svalové práce, krevní tlak, apod.). Vnitřní i zevní krvácení je nebezpečné dle množství uniklé krve a v některých případech i v jeho lokalizaci. Poraní-li se drobné arterioly, venuly a kapiláry, pak se zástavy krvácení účastní pouze krevní destičky tvorbou tzv. destičkového trombu (bílý trombus). U větších cév vede k zástavě krvácení definitivní trombus (červený), vznikající vlivem plazmatických koagulačních faktorů. Výsledkem hemokoagulace je tedy vznik fibrinové sraženiny neboli červeného trombu, který zabrání dalšímu úniku krve. (Penka, 2001)

3.1.1. Složky hemostázy

Hemostáza je komplexní děj, na kterém se podílí řada složek a mechanismů s rozdílnými vstupy a účinky. Jedná se o složitý mechanismus spojený celou řadou pozitivních a negativních zpětných vazeb. (Pecka, 2004) Hlavními složkami hemostázy jsou: cévní stěna, tkáňová složka, krevní destičky (primární hemostáza) a plazmatický koagulační systém koagulačních faktorů, jejich aktivátorů, inhibitorů se složkami fibrinolýzy.

3. 1. 1. 1. Cévní stěna

Stěny cév se skládají ze tří vrstev – tunica intima, tunica media a tunica adventitia. Nejvnitřnější vrstvu tvoří tunica intima, která se skládá z endotelových buněk, které vystylají vnitřní povrch cév. Pod endotelem se nachází vrstva řídkého subendotelového vaziva a další vrstvy cévy, tvořené buňkami hladké svaloviny,

kolagenními a elastickými vlákny. (Rosypal, 2003)

Endotel tvoří jednovrstevnou výstelku všech cév. Vytváří mechanickou bariéru mezi krví a tkáněmi a má také metabolické a sekreční vlastnosti. Endoteliální buňky secernují různé látky ovlivňující tonus cév jako oxid dusnatý, prostacyclin a endonukleázy. Dále udržují neadhezivní, antikoagulační, fibrinolytické a antitrombotické vlastnosti cévního lumina, ovlivňují proliferaci buněk stejně jako zánětlivé a imunologické reakce v cévní stěně. (Vojáček, 2003)

Cévní stěna má v procesu srážení krve tři hlavní úkoly. V případě poranění dochází k vazokonstrikci cévy pomocí její hladké svaloviny a elastických vláken. Je místem interakce jednotlivých systémů hemostázy, především se při jejím poškození aktivují všechny ostatní systémy hemokoagulace. Sama cévní stěna uvolňuje látky, některé faktory a inhibitory důležité pro zástavu krvácení i udržování trombocytů v intaktním nebo naopak aktivním stavu. (Pecka, 2004)

3. 1. 1. 2. Tkáňová složka

Tkáňovou složku hemostázy tvoří látky uvolňující se při porušení celistvosti z endotelu a ostatních buněk. Patří sem adenosindifosfát (ADP), který vyvolává primární agregaci krevních destiček a tkáňový faktor, který startuje tzv. vnější koagulační cestu aktivace přeměny protrombinu na trombin. (Pecka, 2004)

3. 1. 1. 3. Krevní destičky

Během primární hemostázy vytvoří trombocyty v místě poranění cévní stěny primární destičkovou zátku. Krevní destičky adherují k odkrytým subendoteliálním strukturám (ke kolagenu, fibronektinu, vitronektinu a trombospondinu) pomocí svých receptorů GP Ia/IIa/IIb a GP Ib/V/IX. S adhezí trombocytů dojde zároveň k jejich aktivaci. Po aktivaci trombocyty změní svůj diskoidní tvar na kulovitý a uvolní ze svých granulí ADP, tromboxan A₂, serotonin a odkryjí vazebná místa receptorů GP IIb/IIIa pro fibrinogen, což způsobí, že se trombocyty spojují navzájem - agregují.

Nejprve probíhá primární agregace, která bývá vyvolána hlavně ADP uvolněným z porušených buněk a tkání. Z granulí krevních destiček se uvolní další proagregační působky (ADP, tromboxan A₂) a trombospondin, který vytvoří stabilizující můstky mezi destičkami a agregace se tak stává nevratnou – sekundární agregace. Proagregační stimuly aktivují další destičky, dochází k amplifikaci děje a postupně se tvoří tzv. bílý trombus – destičková zátka. (Nečas, 2003)

3. 1. 1. 4. Systém plazmatických koagulační faktorů

Mezinárodní komise pro názvosloví koagulačních faktorů sjednotila jejich názvy tak, že doporučila označovat jednotlivé faktory římskými čísly, podle časové posloupnosti, jak byly objeveny. Současně ponechala i některá synonyma. Aktivované formy se označují indexem a. (Pecka, 2004)

Faktor I, fibrinogen

Fibrinogen je glykoprotein nacházející se v krevní plazmě a granulích krevních destiček. Je syntetizován v játrech. (Blombäck, 1996) Na své molekule obsahuje specifická vazebná místa pro vápenaté ionty, bílkovinný komplex krevních destiček GP IIb/IIIa, receptory fibroblastů, endoteliálních, hemopoetických, mezoteliálních a jiných buněk. Fibrinogen je substrátem pro trombin, plazmin a podobné enzymy. Podporuje také agregaci krevních destiček. (Hosseson, 1997)

Faktor II, protrombin

Syntéza protrombinu probíhá v játrech a závisí na přítomnosti vitamínu K. Protrombin se skládá z 532 aminokyselin. Účinkem koagulačního komplexu protrombinázy se mění na aktivní koagulační faktor IIa, trombin.

Trombin je koagulační faktor s mnoha funkcemi. Dochází díky němu ke štěpení fibrinogenu na fibrin, aktivuje krevní destičky a koagulační faktory V, VIII, IX a XIII, po stimulaci trombodulinem aktivuje protein C a TAFI, podporuje tvorbu t-PA a uplatňuje se i v zánětlivých procesech. (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Trombin>)

Faktor III, tkáňový faktor

Tkáňový faktor (TF) se nachází na povrchu řady buněk a v membráně endoplasmatického retikula. Za normálních okolností se tento membránový protein o 263 aminokyselinách nevyskytuje na krevních buňkách. Tkáňový faktor nevyžaduje pro svou aktivaci žádné kroky. Při kontaktu s krví slouží TF jako receptor pro faktor VIIa. Spolu s ním a vápenatými ionty vytvoří komplex, který dále aktivuje faktor X. (Rapaport a Vijaya Mohan Rao, 1995)

Faktor IV, vápenaté ionty

Vápenaté ionty hrají při srážení krve velmi důležitou roli. Aby se krev srazila,

musí být jejich koncentrace v krvi nejméně 0,5 mmol/l. Pro svou správnou funkci je potřebují jednak koagulačně aktivní komplexy i faktory závislé na vitamínu K. (Pecka, 2004)

Faktor V, proakcelerin

Faktor V je jednořetězcový glykoprotein, který vzniká v megakaryocytech a játrech a ukládá se do alfa granulí krevních destiček, přičemž jeho větší část se nachází v krevní plazmě. Aktivuje ho faktor Xa, trombin a některé další látky, jako je například plazmin. Jeho hlavní úlohou je tvoření komplexu protrombinázy, kde F Va urychluje proteolytické štěpení protrombinu faktorem Xa až 200 000 krát. (http://cs.wikipedia.org/wiki/Faktor_V)

Faktor VI

Termín faktor VI se dnes již neuvádí. Dříve se takto označovaly fosfolipidy vnitřní dvojvrstvy membrány krevních destiček.

Faktor VII, prokonvertin

Faktor VII je jednořetězcový glykoprotein o 406 aminokyselinách. Během koagulace, za přítomnosti trombinu nebo faktoru IXa, Xa či XIa, je proteolyticky štěpen na aktivní faktor VIIa. Po navázání faktoru VIIa na tkáňový faktor pokračuje koagulační kaskáda aktivací faktorů IX a X na faktory IXa a Xa. (Nemerson, 1992)

Faktor VIII, antihemofilický faktor A

Faktor VIII je plazmatický glykoprotein o 2332 aminokyselinách. V plazmě se nachází vyvázaný v komplexu s vWF. Z komplexu se uvolňuje po styku s fosfolipidy nebo trombinem. Funkčně aktivní faktor VIIIa z něj vzniká za účasti fosfolipidů a vápenatých iontů, kdy se propojují jednotlivé řetězce faktoru VIII. Tento faktor je nezbytný k aktivaci faktoru X, při tvorbě aktivního komplexu tenázy. (Vehar, 1984) Jeho defekty či nedostatek vedou k těžkému krvácivému stavu – hemofilii A. Naopak při zánětech a sepsích se jeho hladina zvyšuje.

Faktor IX, Christmas faktor

Faktor IX je jednořetězcový glykoprotein, který vzniká v játrech za účasti vitamínu K. Jedná se o jednořetězcový glykoprotein. V Gla oblasti obsahuje 12

skupin gama karboxyglutamové kyseliny. Faktor IX se uplatňuje při tvorbě koagulačně aktivního komplexu vnitřní tenázy, která zajišťuje přeměnu faktoru X na Xa. (http://cs.wikipedia.org/wiki/Faktor_IX)

Faktor X, Stuarta-Prowerové

Faktor X vzniká v játrech za účasti vitamínu K, tentokrát se ale jedná o dvouřetězcový glykoprotein. V Gla oblasti obsahuje 11 skupin gama karboxyglutamové kyseliny. Tento faktor je součástí komplexu protrombinázy, která katalyzuje přeměnu protrombinu na trombin. (http://cs.wikipedia.org/wiki/Faktor_X)

Faktor XI, Rosenthalův

Faktor XI je glykoprotein, který je aktivován při tzv. kontaktní fázi plazmatického koagulačního procesu (Thompson, 1977). F XI silně adhezuje k aniontovým povrchům, jako je sklo, celit, kaolin, ale také povrch krevních destiček. (Hu a spol, 1998) Aktivuje ho faktor XIIa, trypsin, F VIIa a trombin. Během aktivace se tento faktor proteolyticky rozštěpí v katalytickém místě, jeho molekula však zůstává stále spojena pomocí disulfidických můstků.

Faktor XII, Hagemanův faktor

Faktor XII, glykoprotein patřící mezi serinové proteázy, vzniká v játrech. Nachází se v plazmě i séru. Při kontaktu se subendoteliálními strukturami, sklem, celitem, kaolinem, chrupavkou, kůží, mastnou kyselinou atd. se aktivuje. Také po štěpení kalikreinem se změní v aktivní faktor XIIa. (http://cs.wikipedia.org/wiki/Faktor_XII)

Faktor XIII, Transglutamináza

Faktor XIII se nachází v plazmě a játrech v podobě tetrameru, dále pak v některých krevních buňkách ve formě dimeru. Po chemické stránce ho řadíme do skupiny transferáz. Na svou aktivní formu XIIIa se mění pomocí hydrolýzy, kterou iniciuje trombin. Celá reakce je katalyzována polymerním fibrinem. Tak se zajistí, aby dokud ještě není vytvořený fibrin, nevznikalo tohoto faktoru příliš mnoho. Jeho funkcí je stabilizace fibrinové sraženiny a katalýza intermolekulárních vazeb mezi různými proteiny. Příznivě ovlivňuje hojení ran a v těhotenství má důležitou roli při udržení plodu v těhotenství. (Pecka, 2004)

Prekalikrein, Fletcherův faktor

Prekalikrein se syntetizuje ve slinivce břišní a játrech. Patří do skupiny proteináz. V krevní plazmě se vyskytuje ve formě zymogenu a je vyvázaný na HMWK. Prekalikrein je aktivován faktorem XII na kalikrein, kalikrein může dále aktivovat faktor XII a zvyšuje uvolňování kininů z kininogenů. (Schoesser a spol., 1997)

Vysokomolekulární kininogen (HMWK)

HMWK patří mezi plazmatické proteiny syntetizované v játrech. Za účasti kininogenáz se mění v kininy. (Heimark a spol., 1980) Nejdůležitější z nich jsou bradykinin a lysylbradykinin, které snižují propustnost cév a způsobují kontrakce hladkého svalstva. HMWK se váže na povrch aktivovaných trombocytů, na neutrofilů a endotelové buňky. Jeho hlavní funkcí vazba spolu s faktorem XI a prekalikreinem na poškozenou cévní stěnu. Dále slouží jako kofaktor při aktivaci F XII kalikreinem.

3. 1. 1. 4. 1. Koagulační kaskáda

Klasické schéma plazmatického koagulačního systému se rozděluje na „vnitřní“ dráhu (spouštěnou při kontaktu krevních elementů se subendotelovými strukturami) a „vnější“ dráhu (spouštěnou při poranění tkáně a porušení celistvosti cévy stykem s tkáňovým faktorem). Vnější dráha koagulace se aktivuje během několika sekund, vnitřní během několika minut. Obě cesty se spojují na úrovni aktivace F X. (Penka, 2001)

Převážná část faktorů, s výjimkou tkáňového faktoru, je v plazmě přítomna ve formě proenzymu a pro svou správnou funkci vyžaduje proteolytické štěpení, při kterém z původního proenzymu vzniká koagulačně aktivní enzym. Jediný F VII cirkuluje v nízké koncentraci jako aktivní forma F VIIa.

Faktory II, VII, IX, X, XI, XII a prekalikrein řadíme mezi serinové proteázy. Ty mají ve svém katalytickém místě aminokyselinu serin. Faktory VIII, V a HMWK řadíme mezi kofaktory. (Pecka, 2004)

Celá koagulační kaskáda je uspořádána tak, že aktivní faktor z předcházejícího kroku aktivuje proteolytickým štěpením zymogen v následujícím kroku. Hlavním proteolytickým enzymem tohoto systému je trombin - faktor IIa. Vedle

aktivace koagulace je velmi důležitý i k její inhibici. Za normálních podmínek koagulace končí tvorbou fibrinové sítě a její následnou fibrinolýzou. Odhaduje se, že jeden mililitr plazmy obsahuje koagulační potenciál dostatečný pro přeměnu fibrinogenu na fibrin v celkových 5 litrech krve. (Nečas, 2003)

Koagulace krve vnější cestou nastává v případě porušení kontinuity cév, kdy krev, resp. plazma pronikne do subendotelových a extravaskulárních struktur. Tkáňový faktor představuje vysoce afinitní membránový receptor pro F VII. Klíčovým bodem iniciace hemostázy je tvorba koagulačně aktivního komplexu [TF . FVIIa] v místě poškození cévy. (Nemerson, 1988) Tento koagulačně aktivní komplex vyvázaný na fosfolipidové matrix buněčné membrány a v přítomnosti vápenatých iontů způsobí aktivaci F X. Faktor Xa následně štěpí protrombin na trombin.

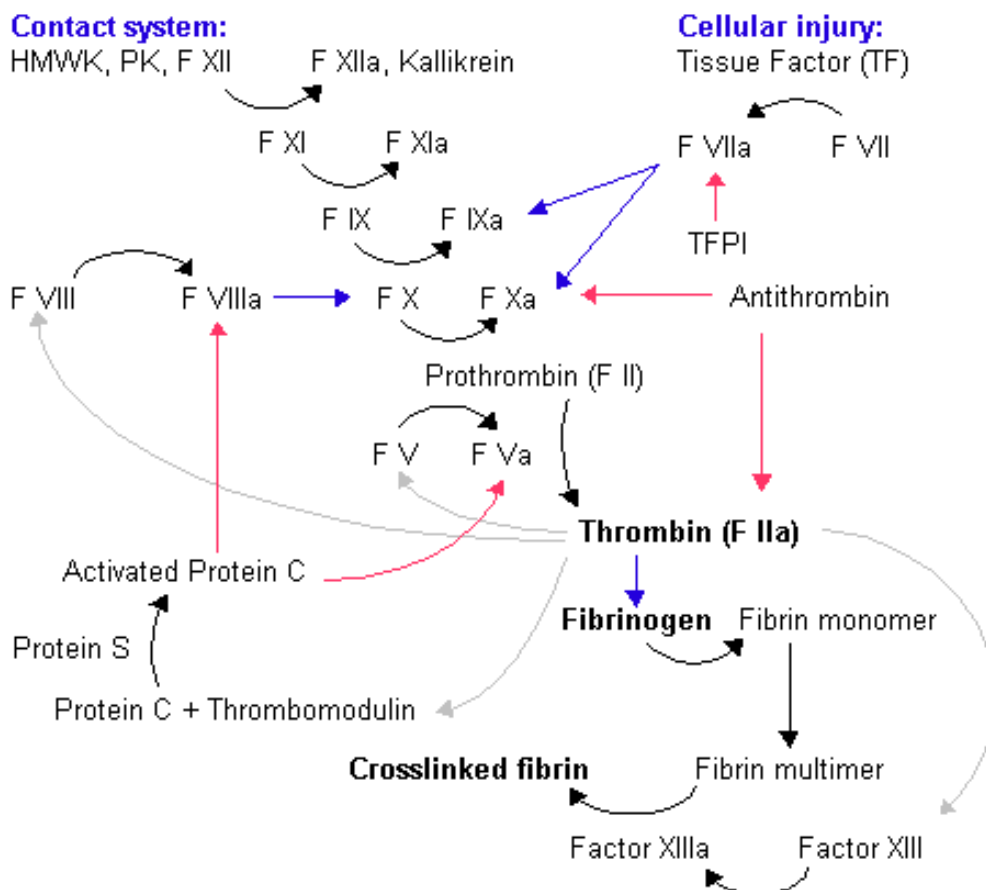
Koagulace krve vnitřní cestou se aktivuje kontaktem při neporušené celistvosti cév. (Heimark, 1980) Koagulaci zahajuje aktivace Hagemanova faktoru po jeho kontaktu s poškozeným cévním povrchem (subendotelové struktury). Za účasti kalikreinů a HMWK se tento faktor mění na faktor XIIa. Faktor XIIa aktivuje faktor XI a štěpí prekalikrein na kalikrein.

Následně F XIa a kalikrein štěpí HMWK na kininy, jako je např. bradykinin. To jsou vasoaktivní peptidy, které přispívají k hemostáze vasokonstrikcí. Buňky v okolních tkáních pro ně mají receptory a odpovídají syntézou regulačních faktorů, jako jsou prostaglandiny a PAF (platelet-activating factor). Tyto regulační faktory ovlivňují agregaci krevních destiček. Kalikrein navíc aktivuje složku komplementu C5 (pro zabránění invaze mikroorganismů) a spouští fibrinolytické reakce. (Nečas, 2003)

V průběhu koagulační kaskády se dále aktivuje F IX. Faktor VIIIa, aktivovaný trombinem, spolu s F IXa, vápenatými ionty a fosfolipidy aktivuje F X. Tento komplex se nazývá vnitřní tenáza. F Xa spolu s F Va, fosfolipidy a vápenatými ionty vytváří koagulačně aktivní komplex protrombinázu, který štěpí protrombin na trombin. (Hemker a spol., 1967)

Vzniklý trombin vyvolá přeměnu fibrinogenu na fibrinové monomery, které spontánně polymerují a působením aktivovaného faktoru XIII vytváří v konečné fázi nerozpustný (zesíťovaný) fibrin. Faktor XIII je aktivován trombinem. (McKee a spol., 1972)

V první fázi se kovalentně spojují komplementární vazebná místa na doménách fibrinových monomerů a labilní částice nekovalentními vazbami do větších celků. Takto vznikne intermediární polymer. Dalším spojováním intermediárních polymerů v komplementárních vazebných místech vznikají nejprve dvouvláknové protofibrily až vznikne rozpustný fibrin. Z něho se tvoří mechanicky slabá vlákna o průměru 40-200 nm, tzv. fibrinový gel. Účinkem faktoru XIIIa a vápenatých iontů dojde k příčnému vystužení vláken fibrinového gelu a tím ke zpevnění koagula. Vzniká polymerní stabilní fibrin, který má mnoho dalších úloh ve fyziologických reakcích. Reguluje fibrinolýzu, aktivuje trombin, faktor XIII a adhezi buněk. (Pecka, 2004)



Obr. č.1 Schéma koagulační kaskády

3. 1. 1. 5. Fibrinolytický systém

Fibrinolytický systém za normálních okolností udržuje hemostatickou rovnováhu tak, že lyzuje fibrinové koagulum a udržuje tak cévu v průchodném stavu. Základem fibrinolytického systému krve je plazminogen, prekurzor serinové proteázy

plazminu. Plasminogen je aktivován působením tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) či urokinázy (u-Pa), které pocházejí z míst organismu mimo krevní oběh, nebo se aktivuje při kontaktu s faktorem XII, prekalkreinem, HMWK, trombinem či trypsinem, které jsou přímo součástí krevní plazmy. (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Plazmin>)

Plazmin zajišťuje rozpouštění krevního koagula. Je to proteolytický enzym, který má malou specifitu a štěpí kromě fibrinu také fibrinogen, koagulační faktory II, V, VIII, GP Ib, GP IIb/IIIa, vWF, trombospondin. Aktivuje faktory VII a XII a části komplementu.

Plazmin štěpí fibrinové koagulum na tzv. štěpné produkty fibrinu/fibrinogenu. Nejprve vznikají vysokomolekulární štěpné produkty X, Y, které mají antikoagulační účinky, jelikož zabraňují monomerům fibrinu v polymeraci, poté nízkomolekulární štěpné produkty D a E, které vychytává monocytomakrofágový systém. MFS vychytává i samotný plazmin v neaktivní podobě. V případě štěpení nerozpustného fibrinu vznikají jako konečné produkty tzv. D-dimery, které se stanovují jako jeden z markerů trombofilních stavů. (Bounameux a spol., 1994)

3. 1. 1. 6. Systém inhibitorů hemostázy

Inhibitory krevního srážení jsou přirozenou složkou krve. Jsou základním regulačním mechanismem procesu hemokoagulace a fibrinolýzy. Podle původu můžeme inhibitory rozdělit na přirozené a získané. Přirozené inhibitory se dále dělí na specifické inhibitory koagulace a fibrinolýzy a nespecifické inhibitory s rozšířeným spektrem účinků. Velkou skupinu získaných inhibitorů tvoří serpiny neboli inhibitory serinových proteáz. Jedná se o nespecifické inhibitory, které většinou tvoří komplex se svým cílovým enzymem a v tomto komplexu blokují serinové receptory. V systému hemostázy hrají tyto inhibitory velice důležitou roli.

Cílem regulace krevního srážení inhibitory koagulace je řídit celý proces krevního srážení tak, aby proběhl jen v místě poranění cévy a dál se již nešířil. Zabraňují nekontrolovatelnému srážení a udržují dynamickou koagulační rovnováhu. (Pecka, 2004) K nejvýznamnějším inhibitorům hemostázy patří antitrombin, systém proteinu C, a inhibitor tkáňového faktoru (TFPI).

3. 2. Protrombinový test (Quickův, PT)

Protrombinový test patří mezi základní skupinové koagulační testy. Sleduje vnější cestu aktivace přeměny protrombinu na trombin, tedy koagulační faktory II, V, VII, X a fibrinogen. Používá se také k monitorování antikoagulační léčby kumarinovými preparáty.

3. 2. 1. Historie protrombinového testu

Jak už jeden z názvů testu napovídá, jeho objevitelem je Dr. Armand Quick. Princip v klinické praxi velice rozšířeného Quickova neboli protrombinového testu zveřejnil v roce 1935 a vyvinul ho na základě již známé koagulační teorie Paula Morawitze. Paul Morawitz přišel na to, jak se protrombin přeměňuje na trombin působením tkáňového faktoru a vápenatých iontů a následně že trombin způsobuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Díky protrombinovému testu byly dále objeveny a popsány plazmatické faktory V, VII a X a začala se pomocí něho zjišťovat i aktivita podávaných antikoagulancií. (http://cs.wikipedia.org/wiki/Protrombinov%C3%BD_%C4%8Das#Historie)

3. 2. 2. Provedení testu z citrátové plazmy

Protrombinový test se nejčastěji vyšetřuje z citrátové plazmy. Provedení předchází standardní odběr krve ze žíly do zkumavky s citrátem sodným.

Test se pak provádí přidáním tkáňového tromboplastinu a vápenatých iontů k citrátové plazmě. Test se dnes provádí zejména na automatických, někdy na poloautomatických koagulometrech. U automatů stačí zkumavku s krví odebranou do citrátu sodného zcentrifugovat, poté odvíčkovat a vložit do přístroje. Ten si napipetuje do kyvety požadované množství plazmy a po jejím vytemperování na 37 °C přidá tromboplastinovou reagensii a začne měřit koagulační čas (čas od přidání startovací reagensie do okamžiku detekce vzniku koagula). Detekce je dle typu přístroje buď optická (kyvetou prochází světelný paprsek a koagulum způsobí změnu jeho rozptylu) nebo mechanická (kyveta obsahuje kovovou kuličku, která se pohybuje v magnetickém poli - vznik koagula způsobí zastavení pohybu kuličky).

Koagulometr vydá výsledek ve formě koagulačního času, případně jako poměr času pacienta ku času normální kontrolní plazmy, u pacientů léčených kumarinovými preparáty jako INR. (<http://www.imalab.cz/clanek/186-quick-protrombinovy-cas->

[pt.aspx](#))

3. 2. 3. Provedení testu z kapilárního odběru - z kapky krve

Druhou možností provedení protrombinového testu je tzv. bed side test, neboli POCT - Point-of-care testing, měření na přenosných přístrojích přímo u lůžka pacienta pomocí testovacích proužků, na které se nanese jedna kapka krve z bříška prstu (kapilární odběr). Přístroj nejdříve provede vnitřní kontrolu kvality a poté fotometrickým principem změří a zobrazí výsledek testu ve zvolených jednotkách, buď v sekundách nebo jako INR. (http://www.labtestsonline.cz/understanding/testy_doma.html)

3. 2. 4. Reagencie pro protrombinový test

Z reaglií pro protrombinový test jsou k dispozici: rekombinantní tromboplastiny, které jsou připravené postupy genového inženýrství a obsahují rekombinantní tkáňový faktor, vápenaté ionty, pufr a stabilizátory. Dále jsou to tkáňové tromboplastiny obsahující málo čištěný extrakt z tkání obsahujících velké množství tkáňového faktoru. Takovou tkáň představuje např. lidská placenta či kraví a králičí mozek nebo plíce. Samozřejmě i tyto reagenty obsahují stabilizátory a vápenaté ionty. Kombinované tromboplastiny obsahují tkáňový tromboplastin, absorbovanou hovězí plazmu a vápenaté ionty. (Pecka, 2004)

Výrobce musí doplnit každou reagentii příbalovým letákem, který obsahuje informace o složení reagentie, její přípravě, stabilitě, způsobu skladování, kontrole kvality, výsledcích či bezpečnosti práce. Každá šarže musí mít uvedenou expiraci a hodnotu indexu citlivosti tromboplastinu (ISI).

3. 2. 5. Výsledky protrombinového testu

U neléčených osob vydáváme výsledek ve formě poměru koagulačního času vyšetřované osoby ku času normální kontrolní plazmy, u léčených kumariny hodnotu mezinárodního normalizovaného poměru INR (poměr času pacienta ku času normálu umocněný na ISI).

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT}_{\text{pacient}}}{\text{PT}_{\text{kontrola}}} \right)^{\text{ISI}}$$

Zavedením INR došlo ke standardizaci výsledků.

Hodnotu ISI (International Sensitivity Index) musí každý výrobce tromboplastinové reagensie uvádět ke každé šarži a stanovit ji porovnáním s referenčním tromboplastinem. Hodnota nás informuje o tom, jak je daná šarže tromboplastinu srovnatelná s mezinárodně standardizovaným tromboplastinem, tzn. udává jeho citlivost. Hodnota ISI referenčního tromboplastinu je 1.

3. 2. 6. Klinická interpretace výsledků

Protrombinový test se využívá při diagnóze poruch jaterního parenchymu a u koagulopatií jiného typu s poruchou tvorby aktivátorů protrombinu (poruchy vnější cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin). S jeho prodloužením se setkáváme u pacientů s vrozenou či získanou nedostatečností faktoru II, V, VII, X a fibrinogenu, u deficiencie více faktorů (diseminovaná intravaskulární koagulace) a u pacientů antikoagulovaných perorálními antikoagulanty (Pelentan, Warfarin).

Tabulka č. 1 Ovlivnění PT při krvácivých stavech

Výsledek PT	Výsledek APTT	Možná příčina
prodloužený	normální	nemoci jater, nedostatek vitamínu K, snížení, nebo porucha funkce F VII
normální	prodloužený	snížení nebo porucha funkce F VIII, IX nebo XI, nebo přítomnost lupus antikoagulans
prodloužený	prodloužený	snížení nebo porucha funkce F I, II, V nebo X, von Willebrandova choroba, nemoci jater, diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC)
normální	normální	snížení funkce destiček, trombocytopenie, nedostatek F XIII, mírný nedostatek ostatních faktorů, slabá forma von Willebrandovy choroby

Zdroj: www.labtestonline.cz

3. 2. 7. Monitorování léčby pomocí protrombinového testu

Protrombinový test se využívá pro monitorování léčby perorálními antikoagulanty kumarinového typu. Kumariny jsou látky odvozené od alkaloidu dikumarolu, který se vyskytuje v některých rostlinách. Kumariny patří mezi antagonisty vitamínu K. Nejrozšířenějším lékem této skupiny je Warfarin. Účinek kumarinů

spočívá v inhibici syntézy těch koagulačních faktorů, jejichž syntéza v játrech je závislá na vitamínu K. Jedná se o faktory II, VII, IX a X.

Frekvence provádění protrombinových testů se u pacientů liší podle délky terapie. Na začátku terapie se doporučuje měřit INR obden, než se INR stabilizuje na požadované hodnotě. Naopak u pacientů, u kterých léčba kumariny probíhá dlouhodobě a INR se prakticky nemění, se kontrolní měření provádějí obvykle ve 4 týdenních intervalech. Pravidelné měření INR je velice důležité hlavně u pacientů, jejichž INR se pohybuje mimo terapeutické rozmezí, protože u těchto pacientů dochází velice často ke komplikacím jako jsou krvácivé nebo naopak trombotické stavy.

Důležité je mít na vědomí, zda pacienti užívají také jiné léky, které mohou s kumarinovými preparáty interferovat. Mezi léky, které zesilují antikoagulační účinek Warfarinu patří například cefalosporiny I. a III. generace, heparin, fenylobutazon, metronidazol. Dále jeho účinek zvyšuje nízký příjem vitamínu K v potravě nebo malá absorpce vitamínu K, hepatopatie, obstrukční žloutenka, hypermetabolické stavy, dlouhodobé horečnaté stavy, infekce nebo tyreotoxikóza. (http://www.roche-diagnostics.cz/produkty/primarnipece/coaguchek_faq.aspx#8)

Naopak ke snížení antikoagulačního účinku Warfarinu vedou látky jako barbituráty, či karbamazepin. Stejný efekt má i vysoký příjem vitamínu K v potravě nebo u některých pacientů nízká afinita receptorů k warfarinu či rezistence na něj. Některé látky mohou ovlivňovat absorpci Warfarinu v organismu, například cholestyramin nebo colestipol. (http://www.roche-diagnostics.cz/produkty/primarnipece/coaguchek_faq.aspx#8)

Při správně nastavené terapeutické dávce se INR pohybuje v rozmezí 2,0 – 3,5. Při léčbě a prevenci hluboké žilní trombózy, plicní embolie, fibrilace síní se nastavuje INR na hodnotu 2,0-3,0, u pacientů s mechanickou chlopenní protézou v aortální pozici na hodnotu INR 2,0-3,0, u pacientů s mechanickou chlopenní protézou v mitrální pozici nebo u pacientů po infarktu myokardu s rizikem systémové embolizace na hodnotu INR 2,5-3,5. (<http://www.labtestsonline.cz/tests/INR.html?tab=3>)

Vyšetření protrombinového testu společně s APTT tvoří součást předoperačního vyšetření.

4. Metody, materiál a přístroje

4.1. Princip použité metody stanovení PT

K citrátové plazmě se přidá reagensie (tromboplastin obsahující vápenaté ionty) a sleduje se koagulační čas do vytvoření prvních fibrinových vláken.

4. 2. Vyšetřovaný materiál

Jako vyšetřovaný materiál jsme použili citrátovou plazmu náhodně vybraných pacientů FN Hradec Králové.

4. 2. 1. Odběr vzorku a jeho transport do laboratoře

Odebere se 9 dílů krve do zkumavky z umělé hmoty s 1 dílem 0,109 mol/l (3,2%) citrátu sodného. Úlohou citrátu je vyvázat vápenaté ionty a zachovat fyziologické funkce trombocytů. Množství odebrané krve musí být přesně po rysku vyznačenou na odběrové zkumavce výrobcem. Ihned po odběru je potřeba odebranou krev promíchat s antikoagulačním činidlem opakovaným převrácením odběrové zkumavky. Se zkumavkou se nesmí třepat.

Špatný odběr krve nebo špatná příprava pacienta pro koagulační vyšetření mohou vést k falešnému prodloužení či zkrácení výsledku testu. Pokud je pacientovi nabíráno více zkumavek s různým obsahem z jednoho vpichu, nabírá se jako první zkumavka bez přísad, poté zkumavka s přísadami pro hemokoagulační vyšetření a až jako poslední zkumavka s dalšími přísadami. V případě, že pacient užívá nějaké antikoagulační léky, které nemůže před odběrem na delší dobu vysadit, měl by se tento fakt uvést na žádanku, neboť léčba pravděpodobně ovlivní výsledky koagulačních vyšetření. Pacientům se doporučuje 12 hodin před odběrem lačnit. Tím se zabrání případné chylozitě plazmy, která ovlivní výsledek naměřený optickým analyzátozem. Pacient by měl být v klidu. Intenzivní fyzická zátěž prodlužuje dobu hemokoagulace.

Odebraný materiál musí být co nejrychleji dopraven do laboratoře – nejdéle do dvou hodin od odběru nebo by se krev měla alespoň centrifugovat.

4. 2. 2. Příjem materiálu a jeho zpracování laboratoří

Zkumavka s odebranou krví musí být řádně označena štítkem se jménem a rokem narození nebo rodným číslem pacienta. Do laboratoře je zkumavka dodána

vždy se správně a úplně vyplněnou žádankou pro dané vyšetření. Při příjmu vzorku laboratoří je identifikovaný materiál zadán do laboratorního informačního systému (LIS) a je mu přiřazeno identifikační číslo, pod kterým putuje laboratoří.

Vzorky citrátové krve jsou centrifugovány 15 minut při 4000 ot./min. Po odběru je plazma na vyšetření protrombinového testu stabilní 8 hodin při laboratorní teplotě.

4. 3. Reagencie, jejich příprava a stabilita

Byly srovnávány 3 diagnostické soupravy. Diagnostická souprava Dia-PT R LIQ firmy Diagon se soupravou STA NEOPLASTINE CI Plus 5 firmy Diagnostica Stago a se soupravou DG-PT firmy Grifols.

4. 3. 1. Diagnostické soupravy

Tab. č. 1: Diagnostické soupravy

Firma	Diagon	Diagnostica Stago	Grifols
Název	Dia-PT R LIQ	STA NEOPLASTINE CI Plus 5	DG-PT
Šarže	900312	105869	8006,901
Balení	12 x 8 ml	6 x 5 ml	6 x 10 ml
Exspirace	VIII.10	I.12	III.11
ISI	1,09	1,32	1,27

4. 3. 2. Stabilita použitých reagensů

Tab. č. 2: Stability reagensů

		Grifols	Stago	Diagon
Ředění		vodou	diluentem (součást setu)	neředí se
Stabilita	lyofilizovaný	2-8 °C do expirace	2-8 °C do expirace	2-8 °C do expirace
tromboplastinu	naředěný	15-19 °C 24 hodin	15-19 °C 48 hodin	16 °C 2 týdny

Poznámka: Tromboplastin firmy Diagon se dodává již naředěný od výrobce a je navíc rekombinantní. Tromboplastiny firem Diagnostica Stago a Grifols jsou lyofilizované, králičí.

4. 4. Přístroj

Všechny vzorky byly měřeny na automatickém koagulometru STA-R firmy Diagnostica Stago, rok výroby 2000.

4. 4. 1. Nastavení koagulometru

Tab. č. 3: Nastavení koagulometru

Firma	Diagon	Stago	Grifols
Plasma	50 µl	50 µl	50 µl
Ředění	-	-	-
Inkubace	240 sec.	240 sec.	240 sec.
Reagencie	100 µl	100 µl	100 µl

5. Praktická část

Měření bylo provedeno v hematologické laboratoři FN v Hradci Králové dne 30. 08. 2010, a to jak u zdravých jedinců, tak u pacientů FN v Hradci Králové.

5. 1. Pracovní postup

K měření jsem použila krev od zdravých lidí i pacientů FN v Hradci Králové nabranou do zkumavek s citrátem sodným. Zkumavky jsem označila čísla 1-80. Po centrifugaci jsem získala citrátovou plazmu, kterou jsem použila k měření. Jména a rodná čísla pacientů jsem zadala do LISu, který jim přiřadil pořadová čísla. Požadavky na vyšetření jsem přeposlala z LISu do automatického koagulometru. Přímo na koagulometru jsem vytvořila pracovní list. Ze zkumavek jsem sejmula víčka a všechny podle pracovního listu naskládala do koagulometru na dané pozice. Ještě před začátkem měření jsem provedla vnitřní kontrolu kvality pomocí kontrolních plazem Dia-Cont I a Dia-Cont II. Výsledné hodnoty jsem zaznamenala do tabulky (Výsledkový list) a vyhodnotila metodou regresní přímky.

5. 2. Výsledkový list

Tab. č.1: Kontrolní plazmy:

	Diagon (sec.)	Stago (sec.)	Grifols (sec.)
Dia-Cont I	11,5	12,8	13,4
Dia-Cont II	18,9	21,4	23,0

Tab. č. 2: Vzorky zdravých osob

Číslo vzorku:	Diagon		Stago		Grifols	
	Čas (sec.)	R	Čas (sec.)	R	Čas (sec.)	R
1	13,4	1,17	13,2	1,03	14,6	1,09
2	14,7	1,28	14,8	1,16	16,1	1,20
3	14,5	1,26	15,1	1,18	16,3	1,22
4	13,2	1,15	13,9	1,09	15,4	1,15
5	12,9	1,12	13,3	1,04	14,6	1,08
6	13,1	1,15	13,7	1,07	15,3	1,13
7	13,3	1,16	13,2	1,03	14,5	1,07
8	13,9	1,21	14,1	1,10	16,2	1,20
9	12,9	1,12	14,6	1,14	15,9	1,18
10	13,8	1,20	15,0	1,17	16,9	1,25
11	13,8	1,20	14,1	1,10	15,8	1,17
12	13,5	1,17	14,3	1,11	16,0	1,19
13	12,3	1,07	14,1	1,10	15,5	1,15
14	13,0	1,13	13,4	1,05	15,1	1,12
15	13,6	1,18	12,2	0,95	15,3	1,13
16	12,8	1,11	12,8	1,00	14,3	1,06
17	12,5	1,02	14,0	1,06	15,8	1,14
18	13,2	1,08	14,1	1,06	15,5	1,12
19	12,6	1,03	12,8	0,96	13,8	0,99
20	12,1	1,00	13,0	0,98	14,1	1,02

Tab. č. 3: Vzorky pacientů léčených kumarinovými preparáty

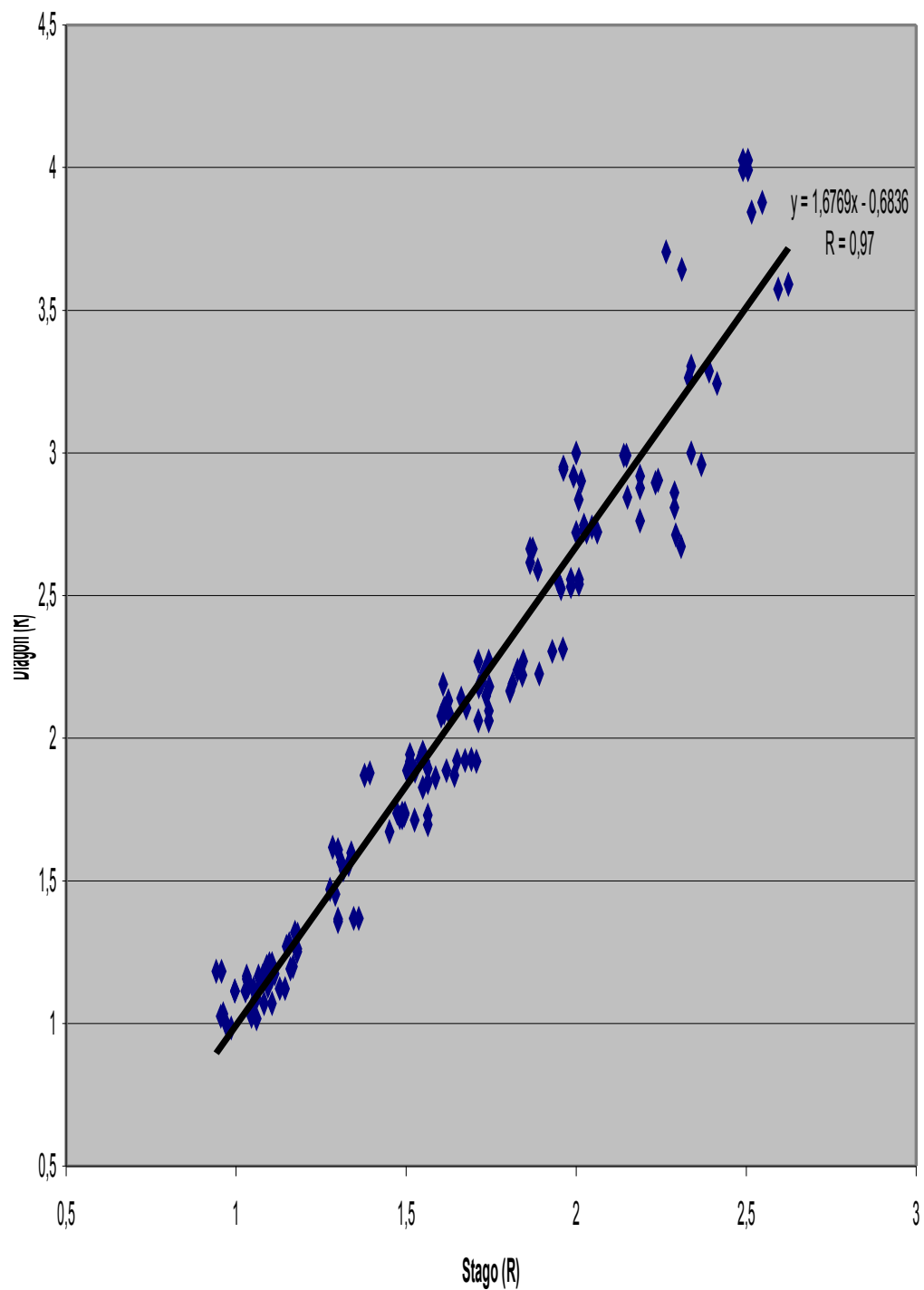
Číslo vzorku	Diagon			Stago			Grifols		
	Čas (sec.)	R	INR	Čas (sec.)	R	INR	Čas (sec.)	R	INR
21	37,5	3,27	3,64	30,8	2,40	3,18	35,6	2,66	3,46
22	34,4	2,99	3,30	27,5	2,15	2,74	31,7	2,36	2,98
23	26,6	2,31	2,49	25,0	1,95	2,41	29,7	2,20	2,74
24	44,4	3,86	4,36	32,4	2,54	3,40	39,6	2,96	3,96
25	32,6	2,35	3,11	29,3	2,29	2,98	33,2	2,48	3,17
26	29,2	2,54	2,76	25,6	1,99	2,49	28,8	2,15	2,64
27	46,1	4,01	4,54	32,1	2,50	3,35	42,8	3,17	4,33
28	26,1	2,27	2,44	22,2	1,73	2,06	25,3	1,87	2,22
29	31,4	2,73	2,99	26,4	2,06	2,59	30,9	2,29	2,86
30	33,4	2,90	3,20	28,8	2,24	2,90	33,7	2,50	3,20
31	23,7	2,06	2,20	22,2	1,73	2,06	26,8	1,99	2,39
32	21,6	1,88	1,99	17,8	1,39	1,54	20,5	1,52	1,70
33	19,8	1,72	1,81	19,4	1,51	1,73	22,8	1,69	1,95
34	24,4	2,13	2,27	22,4	1,74	2,08	26,1	1,93	2,31

35	46,1	4,01	4,54	32,1	2,50	3,35	42,8	3,17	4,33
36	42,3	3,64	4,13	29,4	2,29	2,98	35,6	2,64	3,43
37	25,2	2,18	2,34	23,3	1,81	2,19	27,4	2,03	2,46
38	16,8	1,46	1,51	16,5	1,29	1,39	19,1	1,41	1,55
39	22,1	1,92	2,04	21,4	1,66	1,96	24,6	1,82	2,14
40	15,7	1,37	1,40	16,7	1,30	1,41	19,1	1,41	1,55
41	18,6	1,62	1,69	16,6	1,29	1,40	19,2	1,42	1,56
42	24,1	2,10	2,24	20,8	1,62	1,89	24,0	1,78	2,08
43	29,4	2,56	2,78	25,7	2,00	2,49	31,0	2,30	2,87
44	17,8	1,55	1,61	17,0	1,33	1,45	19,2	1,42	1,56
45	31,4	2,73	2,99	26,1	2,02	2,55	29,1	2,16	2,65
46	24,0	2,09	2,23	20,7	1,61	1,87	24,7	1,83	2,15
47	21,6	1,88	1,99	21,0	1,63	1,91	24,7	1,83	2,15
48	21,8	1,90	2,01	19,4	1,51	1,72	22,9	1,70	1,96
49	25,9	2,25	2,41	24,0	1,78	2,28	27,2	2,01	2,43
50	25,9	2,13	2,27	22,3	1,67	1,97	26,0	1,87	2,22
51	26,4	2,98	3,28	31,3	2,36	3,10	37,8	2,73	3,57
52	33,4	2,74	3,00	26,8	2,01	2,52	32,5	2,34	2,95
53	23,5	1,93	2,04	22,6	1,70	2,15	27,2	1,96	2,35
54	31,8	2,60	2,84	25,0	1,88	2,30	30,9	2,23	2,77
55	22,6	1,85	1,96	21,0	1,58	1,82	25,8	1,86	2,20
56	40,2	3,28	3,66	31,1	2,34	3,07	37,4	2,70	3,52
57	35,0	2,87	3,16	26,8	2,15	2,52	31,5	2,27	2,83
58	26,5	2,19	2,35	22,9	1,72	2,05	29,8	2,15	2,64
59	36,1	2,96	3,26	26,6	2,00	2,49	32,8	2,36	2,98
60	20,7	1,70	1,78	19,5	1,47	1,66	22,5	1,62	1,85
61	36,0	2,95	3,25	26,1	1,96	2,43	31,2	2,25	2,80
62	26,4	2,16	2,32	21,5	1,62	1,89	25,9	1,87	2,21
63	20,9	1,72	1,80	20,8	1,56	1,80	23,9	1,72	2,00
64	21,1	1,73	1,82	19,7	1,48	1,68	23,2	1,67	1,92
65	34,2	2,81	3,08	28,9	2,17	2,78	34,2	2,47	3,15
66	23,3	1,91	2,02	20,8	1,56	1,80	24,6	1,77	2,07
67	16,7	1,37	1,41	18,0	1,36	1,49	21,7	1,56	1,77
68	32,5	2,66	2,91	24,9	1,87	2,29	30,1	2,17	2,68
69	27,2	2,23	2,40	24,4	1,84	2,23	27,1	1,95	2,34
70	23,7	1,94	2,06	20,6	1,55	1,78	25,1	1,81	2,12
71	23,6	1,93	2,05	20,1	1,51	1,72	23,0	1,66	1,90
72	43,7	3,58	4,02	34,7	2,61	3,55	41,8	3,01	4,06
73	35,4	2,90	3,19	29,1	2,19	2,81	33,4	2,41	3,05
74	32,9	2,69	2,95	30,6	2,30	3,01	34,7	2,50	3,20
75	16,1	1,32	1,35	15,7	1,18	1,24	18,1	1,30	1,40
76	31,0	2,54	2,76	26,0	1,95	2,42	31,7	2,29	2,86
77	22,7	1,86	1,97	20,5	1,54	1,77	24,5	1,77	2,06
78	19,3	1,59	1,65	17,6	1,33	1,46	21,7	1,56	1,77
79	26,8	2,21	2,37	23,1	1,74	2,07	27,6	1,99	2,40
80	21,2	1,74	1,83	19,9	1,50	1,70	23,6	1,70	1,96

5. 3. Hodnocení výsledků

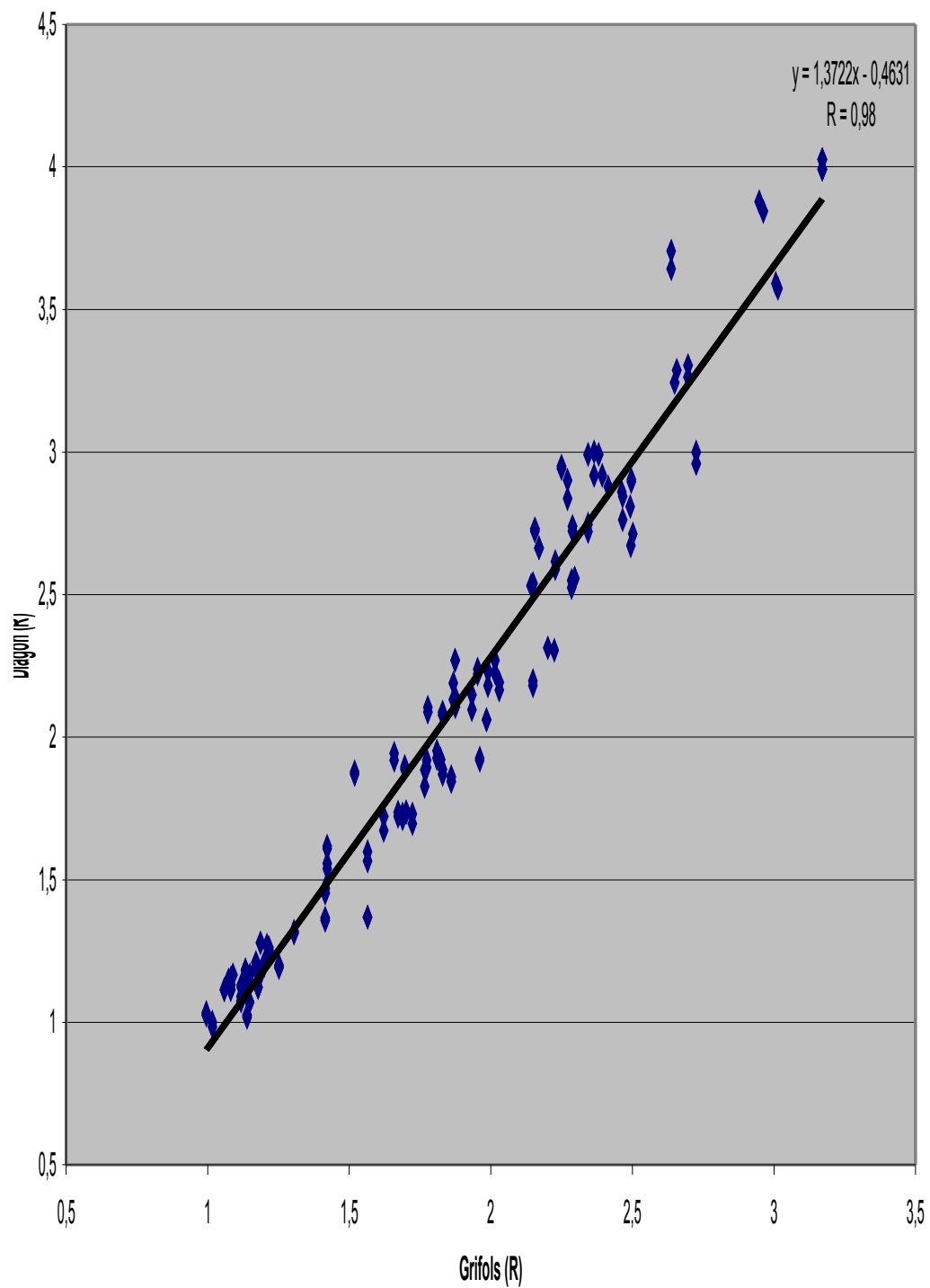
Naměřené hodnoty protrombinového testu reagensí firmy Diagon byly porovnány s hodnotami naměřenými na stejných vzorcích reagensími firem Diagnostica Stago a Grifols pomocí korelačního grafu (lineární regrese).

PT (R) Stago x Diagon



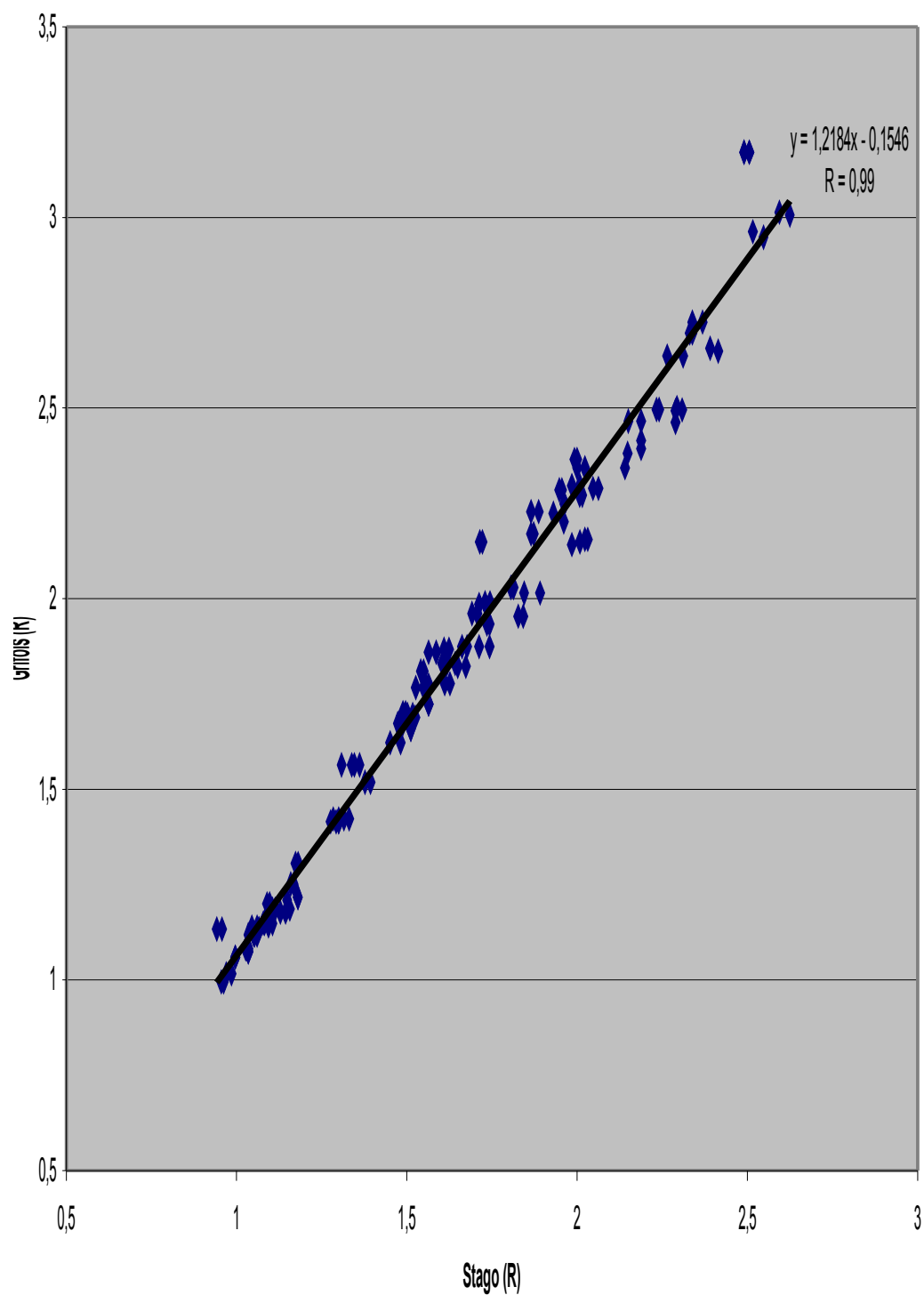
Graf č. 1: Lineárně regresní závislost výsledků naměřených za použití reagentů firem Stago a Diagon

PT (R) Grifols x Diagon



Graf č. 2: Lineárně regresní závislost výsledků naměřených za použití reagentů firem Grifols a Diagon

PT (R) Stago x Grifols



Graf č. 3: Lineárně regresní závislost výsledků naměřených za použití reagentů firem Stago a Grifols

6. Závěr

U vybraných vzorků zdravých osob a pacientů FN Hradec Králové jsme souběžně vyšetřili protrombinový test reagensy 3 různých výrobců (Diagon, Diagnostica Stago a Grifols).

Výsledky měření jsou zpracovány v tabulkách. Vždy je uveden koagulační čas v sekundách, poměr R času měřeného vzorku a normální kontrolní plazmy a u pacientů léčených kumarinovými preparáty také INR.

Naměřené hodnoty byly vyneseny do korelačních grafů a vyhodnoceny pomocí parametrů regresní přímky. Zjistila jsem, že hodnoty naměřené reagensy všech 3 firem spolu poměrně dobře korelují a jsou srovnatelné. Závislost hodnot naměřených reagensy firem Diagnostica Stago a Diagon je popsána rovnicí přímky $y = 1,68x - 0,68$; korelační koeficient je $R = 0,97$. Při porovnání reagensy firem Grifols a Diagon byla získána rovnice přímky $y = 1,37x - 0,46$; $R = 0,98$. Při porovnání reagensy firem Diagnostica Stago a Grifols byla získána rovnice přímky $y = 1,2184x - 0,1546$; $R = 0,99$.

Přes poměrně dobrou korelaci dává reagenzie firmy Diagon u delších koagulačních časů většinou vyšší hodnoty než reagenzie zbylých 2 výrobců.

Výhodou reagenzie firmy Diagon je, že je již naředěná výrobcem, takže odpadá riziko chybného naředění v laboratoři. Po vytemperování v přístroji je reagenzie ihned použitelná k měření. Reagenzie firmy Diagon je jako jediná rekombinantní, v ostatních 2 případech se jedná o králičí tromboplastiny. Výhodou této reagenzie je také nejdelší stabilita reagenzie v přístroji. Co se týká ceny, vychází nejméně výhodněji reagenzie firmy Diagon, reagenzie firmy Diagnostica Stago je nejdražší.

7. Diskuze

Výsledky této práce ukazují, že zkoušené reagencie na vyšetření protrombinového testu od všech tří uvedených výrobců dávají srovnatelné výsledky, tudíž mohou být všechny bez problémů použity v klinických laboratořích. Nejlépe spolu korelují reagencie firem Diagnostica Stago a Grifols.

Reagencie firmy Diagon dává nepatrně vyšší hodnoty v oblasti dlouhých koagulačních časů, ale vzhledem k tomu, že rozdíl není výrazný, může být tato reagencie používána. Hodnoty v oblasti fyziologických hodnot se prakticky neliší. Je otázka, zda by toto mohlo být způsobeno tím, že se jedná o rekombinantní tromboplastin, nebo nějakým nedostatkem během výroby reagencie.

Výhodou reagencie firmy Diagon je, že je již naředěná výrobcem, takže odpadá riziko chybného naředění v laboratoři. Po vytemperování v přístroji je reagencie ihned použitelná k měření.

Srovnáme-li cenu a stabilitu těchto reagencí, tak vychází nejlépe reagencie firmy Diagon. Je nejlevnější a má nejdelší stabilitu v zásuvce přístroje. Naopak nejdražší je reagencie firmy Diagnostica Stago. Nejkratší stabilitu v reagenční zásuvce přístroje má reagencie firmy Grifols.

8. Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
APC	aktivovaný protein C
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
C-1 INH	C-1 inhibitor
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CRP	C- reaktivní protein
D-dimery	štěpné produkty fibrinu/fibrinogenu
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
EPCR	endoteliální receptor proteinu C
F	koagulační faktor
FDP	fibrin/fibrinogen degradaní produkty
GP	glykoproteiny
HEP	heparin
HMWK	vysokomolekulární kininogen
INR	mezinárodní normalizovaný poměr u antikoagulační léčby
ISI	International Sensitivity Index
LIS	laboratorní informační systém
MFS	monocyтомakrofágový systém
MW	molekulová hmotnost
NO	oxid dusnatý
PAF	platelet-activating factor
PAI-1	inhibitor aktivátorů plazminogenu
PC	protein C
PCI	inhibitor aktivovaného proteinu C
PGI ₂	prostacyklin
PIVKA	neaktivní koagulační faktory
PS	protein S
PT	protrombinový čas (Quickův test)
TAFI	trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TM	trombomodulin

t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
u-Pa	urokináza
TX A2	tromboxan A2
vWF	von Willebrandův faktor

9. Seznam použité literatury

Blombäck, B., Fibrinogen and fibrin- proteins with complex roles in haemostasis and thrombosis. *Thromb. Res.*, 83, 1996, s. 31-41.

Bounameux, H., de Moerloose, P., Perrier, A., Reber, G., Plasma measurement of D-dimer as diagnostic aid in suspected venous thromboembolism: an overview. *Throm. Haemostas.* 71, 1994, s.1-6.

Heimark, R. L., Kurachi, K., Fujikawa, K., Davie, E. W., Surface activation of blood coagulation, fibrinolysis and kinin formation. *Nature* 286, 1980, s. 456-460.

Hemker, H. C., Ecnouf, M. P., Hemker, P. W., Swart, A. C., MacFarlane, R. G., Formation of prothrombin converting activity. *Nature* 215, 1967, č. 98, s. 248-251.

Hosseson, M., Fibrinogen and fibrin polymerization: Approval of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin clot assembly. *Blood Coagul. Fibrinol.* 8, 1997, s. 257.

<http://www.biolab-kt.cz/slp/HVEZDAABDL.htm> (6. 3. 2011)

<http://www.biology.estranky.cz/clanky/hematologie/koagulacni-vysetreni.html>
(25. 2. 2011)

http://cs.wikipedia.org/wiki/Faktor_V (21. 3. 2011)

http://cs.wikipedia.org/wiki/Faktor_IX (15. 3. 2011)

http://cs.wikipedia.org/wiki/Faktor_X (15. 3. 2011)

http://cs.wikipedia.org/wiki/Faktor_XII (15. 3. 2011)

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Plazmin> (15. 3. 2011)

http://cs.wikipedia.org/wiki/Protrombinov%C3%BD_%C4%8Das#Historie
(15. 3. 2011)

http://cs.wikipedia.org/wiki/Sr%C3%A1%C5%BEen%C3%AD_krve (16. 2. 2011)

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Trombin> (21. 3. 2011)

<http://www.fno.cz/laboratorni-prirucky/ustav-klinicke-hematologie/ZAVINACLH.htm>
(3. 4. 2011)

<http://www.imalab.cz/clanek/186-quick-protrombinovy-cas-pt.aspx> (6. 3. 2011)

<http://www.labtestsonline.cz/tests/INR.html?tab=3> (5. 4. 2011)

http://www.labtestsonline.cz/understanding/testy_doma.html (5. 4. 2011)

<http://www.physiome.cz/atlas/hemostaza/01/> (15. 3. 2011)

http://www.roche-diagnostics.cz/produkty/primarnipece/coaguchek_faq.aspx#8
(26. 3. 2011)

http://www.skarpety.slask.pl/earty/?title=Quick%C5%AFv_test (28. 2. 2011)

<http://www.stefajir.cz/?q=warfarin> (27. 3. 2011)

http://www.thrombosis.cz/sources/Guidelines-Monitoring_antikoagulace_STH_III062.pdf (26. 3. 2011)

<http://www.tribune.cz/clanek/12471> (8. 4. 2011)

Laboratorní příručka DIA-GON MP, spol. s r. o., Cheb

McKee, P. A., Schwartz, M. L., Pizzo, S. V., Hill, R. L., Cross-linking of fibrin by fibrin

stabilizing faktor. Ann. N. Y. Acad. Sci 202, 1972, s.127.

Nečas, E. a spol., Patologická fyziologie orgánových systémů, část I, Nakladatelství Karolinum, Praha 2003, ISBN 80-246-0615-1

Nemerson, Y., Tissue factor and hemostasis. Blood 71, 1988, s. 1-8.

Nemerson, Z., The tissue factor pathway of blood coagulation. Sem. Hematol, 29, č. 3, 1992, s. 170-176

Neuwirth, J. a kol., Klinická propedeutika oboru Ošetrovatelství II., Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1988

Pecka, M., Laboratorní hematologie v přehledu, Fyziologie a patologie hemostázy, Vydavatelství Finidr, Český Těšín, 2004, ISBN 80-86682-03-X

Penka, M., Buliková, A., Matýsková, M., Zavřelová, J., Hematologie I - Neonkologická hematologie, Nakl. Grada Publishing, 2001, ISBN 80-247-0023-9

Příbalová informace RecombiPlasTin 2G, firma Comesa

Rapaport, S. I. a Vijaya Mohan Rao, L., The tissue factor pathway: How it has become a „prima ballerina“. Thromb. Haemost. 74, 1995, č. 1, s. 7-17.

Rosypal, S. a kol., Nový přehled biologie, vydala Scientia v roce 2003, ISBN 80-7183-268-5

Schoesser, M., Zeerlender, S., Lutze G. et al., Mutations in the Human Factor XII Gene. Blood 90, 1997, č. 10, s. 3967-3977.

Thompson, R. E., Mandle, R., Kaplan, A. P., Association of factor XI and high-molecular-weight kininogen in human plasma. J. Clin. Invest. 60, 1977, s. 1376.

Vehar, G. A., Keyt, B., Eaton, D., Structure of human F VIII. Nature 312, 1984, s.337.

Vojáček, J., Malý, M. a kol., Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi Nakl. Grada Publishing, 2004, ISBN 80-247-0501-X