

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

**Přehled vývoje antikoagulační léčby a možnosti jejího
monitorování**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Praha 2011

Kohoutová Simona

Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem čerpala, řádně cituji. Rovněž tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

Datum:

Podpis:

Ráda bych touto cestou poděkovala svým vedoucím bakalářské práce prof. MUDr. Janu Kvasničkovi, DrSc. a Mgr. Iloně Fátorové za pomoc při zpracování této práce. Poděkování za pomoc a podporu patří všem mým kolegyním a kolegovi, zvláště pak Ing. Ludmile Landové, PhD, která mi pomohla při závěrečných úpravách. Čeho si cením nejvíce, je trpělivost a pochopení ze strany mé rodiny, která mě podporovala po celou dobu studia.

Obsah:

Obsah:	6
Abstrakt	10
1. Úvod	11
2. Zadání bakalářské práce - cíl práce	12
3. Teoretická část	13
3.1. Fyziologie hemostázy	13
3.2. Mechanismus srážení	13
3.2.1. Primární hemostáza	13
3.2.2. Sekundární hemostáza - plasmatický systém	14
3.2.3. Koagulační faktory	15
3.2.4. Fibrinolytický systém	17
3.2.5. Inhibitory hemostázy	18
3.3. Patofyziologie hemostázy	19
3.3.1. Krvácivé stavy	19
3.3.2. Trombotické stavy	20
3.3.2.1. Antitrombotická léčba	22
3.3.2.2. Antikoagulační léčiva	22
3.3.2.3. Nejpoužívanější léčebné formy a indikace	23
4. Experimentální část	30
4.1. Definice souborů	30
4.1.1. Pacienti léčení Warfarinem	30
4.1.2. Pacienti léčení nízkomolekulárním heparinem (LMWH), enoxaparin	30
4.2. Odběr a zpracování vzorků	31
4.2.1. Odběr pro koagulační vyšetření	31
4.2.2. Odběr pro vyšetření krevního obrazu	31
4.2.3. Odběr pro měření proteinů akutní fáze	31
4.3. Metodika použitých stanovení	31
4.3.1. Protrombinový čas (PT)	31
4.3.2. Měření jednotek inhibice anti-Xa	33
4.3.3. Trombin generační čas (TGT)	34
4.4. Analyzátoři	35
4.4.1. BCS XP	35
4.4.2. Ceveron Alpha	36
4.5. Kontrola kvality	36
4.5.1. Vnitřní kontrola kvality	36
4.5.2. Externí kontrola kvality	37
4.6. Grafické znázornění - pacienti užívající Warfarin	38
4.6.2. Pacienti užívající nízkomolekulární heparin v profylaktické dávce	40
4.6.3. Průběh generace trombinu metodou TGT	41
4.7.1. Porovnání výsledků warfarinizovaných pacientů získaných měřením TGT na analyzátoru Ceveron a hodnot INR získaných měřením protrombinového času na analyzátoru BCS XP	42
4.7.2. Porovnání výsledků heparinizovaných pacientů získaných měřením trombin generačního času na analyzátoru Ceveron a hodnot anti-Xa získaných měřením na analyzátoru BCS xp	44
5. Diskuse	46
6. Závěr	48
7. Seznam literatury	49
8. Přílohy	52

Abstrakt

Trombotickými komplikacemi více či méně trpěli lidé už od pradávna. Bylo pouze otázkou času odhalení přesných mechanismů jejich vzniku a léčby.

Objev preparátu s antikoagulačním účinkem, heparinu, bylo velkým přínosem pro medicínské disciplíny. Následován orálními preparáty na bázi kumarinů, pelentanem a později warfarinem napomohl snížení úmrtnosti, zvláště v období pooperační péče. Objevení způsobu frakcionace heparinu a posléze jeho syntetická příprava v podobě pentasacharidů, znamenala průlom v profylaktické a léčebné péči téměř ve všech oborech. Současným trendem se jeví orálně podávaná antitrombotika s minimálními vedlejšími účinky „v ideálním případě“ bez nutnosti monitorování.

Výběrem dvou skupin osob s rozdílným druhem terapie, jejíž odezvu v organizmu jsme měřili různými metodami a na různých analyzátoch, jsme chtěli poukázat na vhodnost a důležitost výběru stanovení pro daný druh léku a nutnost kontroly INR nebo inhibičních jednotek anti-Xa, díky kterým může lékař aktuálně upravit dávku preparátu.

Na závěr jsme chtěli zdůraznit, že laboratoř se od počátku podílela a stále podílí na kontrole podávané léčby a pro lékaře je spolehlivým ukazatelem účinnosti.

Abstract

Thrombotic complications suffered more or less people since time immemorial. It was only a matter of time reveals the exact mechanisms of their formation and treatment. The discovery of a preparation with anti-coagulant effect of heparin, has been of great benefit for medical discipline. Followed by oral medication on the basis of coumarins: Warfarin, Pelentan and later helped to reduce mortality, particularly in the postoperative care. The discovery of fractionation of the heparin and then its preparation in the form of synthetic pentasacharide, meant a breakthrough in prophylactic and therapeutic treatment in almost all fields. The current trend appears to be orally administered antithrombotic agents with minimal side effects "in the ideal case" without monitoring.

Choosing two groups with different kind of therapy, the response in the body were measured by different methods and different analyzers, we wanted to point out the relevance and importance of the choice setting for the type of medication and the need for INR control or inhibition of factor Xa units which enable the doctor current change in dosage. Finally, we wanted to underline that the laboratory is involved from the beginning and is still involved in the development and always has been and will be for the doctors reliable marker of efficiency.

1. Úvod

Lidské tělo je dokonalý funkční celek, který už v okamžiku svého zrodu disponuje řadou obranných mechanismů, které mu pomáhají přežít v kritických situacích. Jednou z nich je i schopnost srážení krve, s cílem zamezit její ztrátě při poranění. Účinnost spočívá v součinnosti několika složek a při jakémkoliv porušení křehké rovnováhy mezi nimi, je organismus ohrožen buď krvácením, nebo zvýšenou tvorbou sraženin.

V dřívějších letech se zdála být populace více ohrožena poruchami hemostázy vedoucími ke krvácivým projevům, v poslední době je tomu naopak. Jsou to právě trombotické a tromboembolické komplikace, které nejvíce ohrožují civilizaci na životě. Uzávěr cévy způsobuje ischemii, iktus, infarkt či náhlou koronární smrt, proto je v zájmu medicínském i ekonomickém, co nejúčinněji předcházet jejich vzniku, případně zajistit efektivní léčbu, tím zmírnit potrombotické následky a zabránit recidivě. Je pravda, že po zavedení profylaxe heparinem (UHF) a jeho frakcionovanými deriváty (LMWH) se procento výskytu trombóz značně snížilo. Stále však existují medicínské obory, kde je primární profylaxe nedostatečná. Úkolem farmaceutických firem je tedy neustálý vývoj a hledání nových možností v oblasti antikoagulačních resp. antitrombotických a protidestičkových léčiv která by byla více selektivní, bezpečná a finančně nenáročná vzhledem k jejich dlouhodobému užívání.

Nezastupitelnou úlohu v tomto procesu má i hematologická laboratoř. Řadou laboratorních testů je schopna měřit a ve spolupráci s lékaři zpracovávat soubory dat pacientů při testování léčiv. Má k dispozici řadu metod zaměřených na kontrolu odpovědi organismu na podávaná antikoagulantia., pro zajištění optimálního dávkování v každém konkrétním případě, protože i přes bouřlivý farmakologický rozvoj v této oblasti, jsou profylakticky a léčebně nejčastěji podávána antikoagulantia s úzkým terapeutickým rozmezím, u kterých je nutná přesná laboratorní kontrola. Tímto přispívá k zajištění komplexní péče při profylaxi a léčbě hospitalizovaných nebo ambulantních nemocných.

2. Zadání bakalářské práce - cíl práce

Cílem práce je přehled nejpoužívanějších antikoagulačních léků a jejich kombinací, k dosažení co nejlepšího léčebného efektu v každém konkrétním případě, pojatý především z laboratorního hlediska. Cílem je zjistit, jak důležitou úlohu laboratoře mají při monitorování preventivně a léčebně podávaných látek, pomocí graficky zpracovaných hodnot, naměřených u dvou skupin pacientů užívajících dva různé typy antikoagulační léčby (experimentální část).

3. Teoretická část

3.1. Fyziologie hemostázy

Plynulý krevní tok systémem neporušených cév a v případě hrozby krvácení lokální vytvoření krevní sraženiny a spuštění hojících procesů, je známkou správné funkce jednoho z obranných mechanismů organismu- hemostázy.

Tato schopnost prochází vývojem a změnami od fetálního vývoje až do dospělosti. A i přesto, že se v mnoha ohledech liší, důležitým, společným rysem všech období je stav rovnováhy mezi pozitivně a negativně působícími mechanismy tohoto komplexního děje:

Cévní stěnou, tkáňovými strukturami, krevními destičkami a plasmatickým systémem.¹

3.2. Mechanismus srážení

3.2.1. Primární hemostáza

Je prvním krokem při zástavě krvácení. Podílí se na ní poraněná céva stažením a krevní destičky. Ty pomocí bivalentních proteinů vWF a fibronektinu a vlastních povrchových receptorů, přilnou (adherují) ke kolagenní vrstvě. Tím je spuštěna jejich aktivace, jejímž výsledkem je změna tvaru (kulovitý s výběžky) a sekrece chemických látek, ze zásobních granulí. V první fázi je to ADP uvolněné z porušených buněk a tkání, které způsobuje spojování destiček (primární agregace), v další fázi je to ADP a TX₂ uvolněný z granulí, které stimulují destičky k dalšímu vzájemnému kontaktu a změně struktury. Odkrytím vazebných míst dojde k těsnějšímu spojení přes fibrinogen, vitronektin a vWF. Nastává sekundární agregace, jejíž nevratnost zajišťují stabilizující můstky tvořené trombospondinem. Postupným zesilováním těchto dějů přibývá aktivovaných destiček, které se postupně formují do zátky (bílý trombus), uzavírající poraněné místo.¹

3.2.2. Sekundární hemostáza - plasmatický systém

Představuje děje, které přeměňují bílý trombus na nerozpustnou sraženinu.¹ Hlavními činiteli této fáze jsou vzájemně se aktivující koagulační faktory vnitřního a zevního systému. Enzymatické štěpení je vyvoláno jakýmkoliv poškozením buňky obsahující tkáňový faktor (TF). Změna membránových fosfolipidů vede k jeho odkrytí a aktivaci. Vzniklý komplex (TF, F VIIa, kalciové ionty) kolující v plasmě, je výchozím bodem proteolýzy faktorů zevního systému (F VII, F V) i vnitřního systému (F VIII, F IX, F XI).

Ty následně aktivují protrombinázový komplex (F Xa . F Va), což vede k přeměně protrombinu na trombin.² Trombinu vzniká nejprve jen malé množství (tzv. *zahajovací fáze*) na povrchu buněk s odkrytým TF. Aby došlo ke spuštění účinné hemostázy, pokračuje proces kaskádovitým zesílením jednotlivých kroků (tzv. *amplifikační fáze*) na povrchu trombinem aktivovaných destiček, které ve fázi primární hemostázy adherovaly k poškozené tkáni. Faktory V, VIII a XI zde působí jako katalyzátory.

V tzv. *propagační fázi* je primární signál rozšířen na povrchy dalších buněk (monocyty) a natolik zesílen aktivací ostatních koagulačních faktorů (F II, F IX, F X, F XI) a jejich kofaktorů (F V, F VIII), že množství vzniklého trombinu (F IIa) je dostatečné k přeměně fibrinogenu (F I) na fibrin (F Ia), do jehož síťovité struktury se zachytávají leukocyty a erytrocyty a vzniká tak „červený trombus“.

Za vytvoření stabilní, nerozpustné a pevné zátky, odpovídá F XIIIa (rovněž aktivovaný trombinem) spolu s kalciovými ionty, a za konečné hojení a obnovení průtoku, retrakční schopnost krevních destiček a fibrinolytický systém.²

Tato teorie nahrazuje původní představu kaskády s účastí zevního systému aktivovaného tkáňovým faktorem a systému vnitřního, jehož spouštěčem byl označován FXII⁴. Jak se však ukázalo, nemá pro aktivaci hemostázy větší význam, proto jeho nedostatek prodlužuje koagulační testy, ale nezpůsobuje krvácení.

3.2.3. Koagulační faktory

Většina je syntetizována v játrech, některé vyžadují přítomnost vitamínu K (F II, F V, F VII, FIX, F X, protein C a S). Jedná se o glykoproteiny, které v krvi kolují v neaktivním stavu ve formě koenzymů nebo kofaktorů. Mají schopnost navzájem se aktivovat proteolytickým štěpením. Jejich nedostatek v plasmě nebo snížená funkce způsobuje koagulopatii s krvácivými projevy (kromě F XII).¹

F I (Fibrinogen)

Tvoří ho dimerická molekula složená ze třech párů polypeptidových řetězců, obsahujících několik vazebných míst. Může být štěpen plasminem, trombinem a trombinu podobnými látkami, jako jsou hadí jedy. Napomáhá agregaci trombocytů a je ukazatel akutních stavů, hyperkoagulace nebo činnosti jater.

F II (Protrombin)

Skládá se z více jak 500 aminokyselin. Je to proenzym klíčového faktoru hemostázy – trombinu. Tato jeho aktivní forma působí na mnoha úrovních koagulační kaskády, včetně účasti při zánětu a procesu hojení.

F III (Tkáňový faktor, tromboplastin)

Jde o extrakt z tkáně, nejvíce obsažený v placentě, mozku a plicích. Chemicky se jedná o glykoprotein, který se snadno váže na fosfolipidové membrány. Aktivuje se kontaktem s krví, má tedy úlohu signálního receptoru. Má také vliv na vznik hyperkoagulačních a trombotických stavů.

F IV (Kalcium)

Kalciové ionty napomáhají řadě reakcí. Jsou součástí komplexů tenáz a molekul faktorů závislých na vitamínu K.

F V (Proakcelerin)

Jedná se o glykoprotein, který se nachází v α -granulích trombocytů a snadno se váže na membránové povrchy. Je aktivován trombinem nebo F Xa.

F VI

Představuje destičkový faktor 3 a 4.

F VII (Prokonvertin)

Jednořetězcový glykoprotein, který jako jediný koluje v plasmě v malém množství v aktivní formě. Toto množství se s věkem zvyšuje. Jeho plná enzymatická aktivita se projevuje až ve spojení s tkáňovým faktorem, kdy jako součást zevní tenázy uskutečňuje aktivaci F IX a X.

F VIII (Antihemofilický faktor A)

Strukturně se podobá F V, má také funkci kofaktoru a v aktivní formě tvoří součást vnitřní tenázy [VIIIa . IXa . PL . Ca²⁺]. V plasmě cirkuluje vázaný na von Willebrandův faktor (vWF), čímž je chráněn před proteolytickým štěpením. Z této vazby je uvolněn až po kontaktu s trombinem. Nadbytek tohoto faktoru působí prokoagulačně a jako ukazatel zánětu, infekce nebo stresu, naopak jeho defekt se projevuje těžkými krvácivými stavy (hemofilie A).

F IX (Christmas faktor)

Jednořetězcový glykoprotein, tvořící se v játrech v přítomnosti vitamínu K. Je také součástí komplexu vnitřní tenázy, která aktivuje přeměnu F X na F Xa. Závažný je jeho nedostatek, známý jako hemofilie B.

F X (Faktor Stuarda-Prowerové)

Faktor závislý na vitamínu K, je uváděn jako klíčový. Jeho aktivace je možná zevní i vnitřní tenázou v místě těžkého řetězce. Současně se odštěpí i aktivační glykopeptid. Hlavní funkcí F Xa je ve formě komplexu protrombinázy [FXa . F Va . PL . Ca²⁺], štěpit protrombin na trombin.

F XI (Plasma tromboplastin antecedent – PTA)

V plasmě jako zymogen, vázaný na vysokomolekulární kininogen (HMWK). Vykazuje zde vysokou přilnavost k záporně nabitým povrchům během kontaktní fáze, kdy je aktivován F VII a trombinem přímo na povrchu destiček.

F XII (Hagemanův faktor)

Je to glykoprotein syntetizující se v játrech. Nachází se v plasmě i séru v neaktivní formě. Štěpení při aktivaci probíhá v přítomnosti aktivního povrchu (subendoteliální vrstvy, ale i sklo, celit nebo kaolin) v místě F XII α působením kalikreinu. Nedostatek tohoto faktoru nezpůsobuje krvácení, protože aktivace F XI na něm není závislá.

F XIII (Transglutamináza)

Jeho neaktivní forma se vyskytuje v plasmě v tetramerní podobě a na některých buňkách ve formě dimeru, můžeme ho najít i v placentě a játrech. Jeho hydrolytické štěpení iniciuje trombin a podporuje vzniklý fibrin. Úkolem aktivované formy je stabilizace fibrinové zátky za vzniku nerozpustné sraženiny. Uplatňuje se při hojení ran a je důležitý pro udržení těhotenství.¹

3.2.4. Fibrinolytický systém

Představuje řadu aktivačních kroků, které tvoří protiváhu krevnímu srážení,³ jejichž úkolem je rozpuštění a odstranění koagula a rekanalizace lokálního úseku, ve kterém proběhla hemokoagulace.²

Klíčový glykoprotein **plasminogen** je aktivován působením vnitřních, v plasmě přítomných aktivátorů (F XIIa, prekalikrein a HMWK) a vnějších, uvolněných z porušené tkáně (t-PA, u-PA), současně se spuštěním hemostázy. První vytvořená fibrinová vlákna poskytují vhodný povrch pro navázání vzniklého komplexu [t-PA . plasminogen] a napomáhají jeho přeměně na proteolytický enzym plazmin, který je vlastním aktérem rozpouštění koagula.

Postupným štěpením nerozpustného fibrinu na stále menší fragmenty (vysokomolekulární X, Y a nízkomolekulární D, E), které jsou vycytávány monocytomakrofágovým systémem, je nakonec céva uvedena do původního stavu. Jedná se o několika hodinový proces, který za fyziologických podmínek neprobíhá, proto stanovení nejmenších fragmentů D (**D - dimery**) nejlépe odráží lytickou aktivitu, která je typická pro trombotické stavy.¹

3.2.5. Inhibitory hemostázy

Proces srážení nemůže probíhat nekontrolovaně a kdekoliv. K tomuto účelu je plasmatický koagulační systém vybaven skupinou látek, které celý proces brzdí a směřují do konkrétního místa, kde došlo k poškození.²

Skupinu získaných inhibitorů tvoří serpiny a kuniny, přítomné v tělních tekutinách, které inhibují serinové proteázy vyvázáním do komplexu.¹

Mezi nejdůležitější přirozené inhibitory řadíme **antitrombin (ATIII)**, **systém proteinu C**, a nově protein produkovaný placentou - **annexin V**, které se uplatňují v plasmě. **Inhibitor tkáňového faktoru (TFPI)** zasahuje na povrchu endotelu. V systému fibrinolýzy významně působí **trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI)**, který vytváří propojení mezi prokoagulačně působícími faktory, inhibitory a fibrinolýzou.

Antitrombin (ATIII)

Jaterní glykoprotein, který významně ovlivňuje složky koagulačního systému. Působí samostatně, jestliže je v komplexu s heparinem, jeho účinek se mnohonásobně zvyšuje a umožňuje mu inaktivovat (vyvazovat do komplexu) kromě trombinu a F Xa i ostatní serinové proteázy (plazmin, kalikrein, F IX, F XI, F XII, [TF . F VIIa]). Laboratorně se prokazuje aktivita i antigen a jeho nedostatek způsobuje trombofilní riziko.¹

Systém proteinu C

Další účinný inhibiční systém je tvořen **proteinem C**, **S** a **trombomodulinem**. Jejich syntéza je závislá na vitamínu K.⁵ Specifický receptor (EPCR) váže protein C na povrch endotelu, kde je aktivován komplexem trombin-trombomodulin. Tato aktivní forma (APC) proteolytickým štěpením inaktivuje F Va a F VIIIa v přítomnosti kalciových iontů.¹

Protein S má v tomto systému funkci kofaktoru, pouze jeho volná forma usnadňuje vazbu APC k fosfolipidovým povrchům. Volný vykazuje i vlastní inhibiční aktivitu vůči F Va, a F VIIIa, ne však v takové míře, jako PS vázaný na složku komplementu C4-bBP. Celý tento inhibiční systém má za úkol zpomalit nebo úplně zastavit vznik tenázy a protrombinázy a tím potlačit aktivní proces hemostázy.¹

Inhibitor tkáňového faktoru (TFPI)

Je vázaný na frakce cholesterolu a do oběhu je uvolňován atakovanými endotelovými buňkami.³ Významně inhibuje proces zahajovací fáze po vyplavení i jen nepatrného množství tkáňového faktoru, tím že tvoří neaktivní komplex [TFPI . TF . F VIIa . F Xa] nebo v přítomnosti heparinu inhibuje přímo F Xa.¹

Trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI)

Tento inhibitor má důležitou úlohu v systému koagulace, inhibice a fibrinolýzy. Je aktivován komplexem trombin/trombomodulin (TM), což umožňuje propojení inhibičního vlivu TAFI (nízká koncentrace TM) s profibrinolytickým účinkem APC (vysoká koncentrace TM).¹

3.3. Patofyziologie hemostázy

3.3.1. Krvácivé stavy

Jsou projevy zvýšené krvácivosti neúměrné klinickému stavu a podnětu, které krvácení vyvolaly.¹ Příčiny vyvolávající tento stav mohou být získané nebo vrozené a mohou se vyskytovat na úrovni cévní výstelky (purpury), destiček, (trombocytopenie, trombocytopatie) plasmatického systému (koagulopatie), fibrinolýzy nebo kombinací všech.

Koagulopatie představují skupinu poruch, vznikajících na základě nedostatečného množství nebo snížené funkční aktivity daného faktoru (vrozené koagulopatie), případně celé řady faktorů (koagulopatie získané). Projevy bývají mírnější nebo těžší v závislosti na stupni poškození.

Z vrozených koagulopatií se nejčastěji vyskytuje hemofilie. (A a B).⁵ Hladina faktoru se během života nemění a léčba je možná vhodnou substitucí. Získané vznikají většinou přechodně, jako následek jiného primárního poškození (snížená funkce jater, malabsorpční syndrom, otravy, těžké stavy, způsobující syndrom-DIC ad.) a vhodnou terapií počáteční příčiny většinou vymizí.¹

3.3.2. Trombotické stavy

Jsou charakterizované jako patologické a nadměrné srážení uvnitř cévního řečiště. Představují protipól krvácivým projevům, způsobený zvýšenou aktivitou hemostatických pochodů, které vedou ke vzniku trombů a následné tromboembolické nemoci. Z pohledu příčin vzniku rozlišujeme trombózy žilní (ŽT) a arteriální (AT).

Rizikové faktory

Příčiny vzniku ŽT souvisí s životním stylem, stárnutím a zvýšenou nemocností populace. Věk nad 45 let, obezita, kouření, hypertenze, zvýšená hladina lipidů nebo hormonální antikoncepce jsou obecně známé faktory.

Příčiny vzniku AT jsou spojeny většinou s aterosklerotickými změnami arteriálních stěn. Tvorba trombů (aterosklerotických plátů) v této oblasti je příčinou akutních koronárních syndromů (IM, angina pectoris) a jejich odloučení silným prouděním způsobuje embolii.²

Patogeneze

Otázka obecné příčiny vzniku trombembolismu byla částečně objasněna již v roce 1856.¹ Z Wirchowovy trády je známo, že na vzniku ŽT se podílí porucha nesmáčivého povrchu, zpomalení až zástava krevního toku (stáza) a odchylky v aktivaci plasmatických faktorů (hyperkoagulace).¹¹ Zánětlivé poškození endotelu cévní stěny (ateroskleróza) podporuje uvolnění TF, který zvyšuje přilnavost a agregabilitu krevních destiček k aterosklerotickému plátu. Množství aktivací vzniklého fibrinu je pak úměrné stabilitě a velikosti nástěnného trombu, který vzniká převážně v tepenném řečišti (AT).¹

Stáza

Stagnace krve v cévách může v některých místech zvýšit koncentraci zánětlivých činitelů (cytokiny uvolněné z leukocytů), které v součinnosti se zvýšenou koncentrací plasmatických faktorů a vzniklou ischemií, působí značně protrombogenně.² Omezené proudění může mít řadu příčin: mechanické překážky v žilním řečišti, komprese cév v blízkosti cyst, nádorů nebo dilatovaných orgánů⁹, dlouhotrvající nehybné sezení nebo upoutání na lůžko, změna reologických vlastností při leukemické proliferaci nebo dlouhodobé dehydrataci atd.¹⁰ Cévní stěna dlouhodobě vystavená této zátěži pak podléhá patologickým změnám.

Hyperkoagulace

Hyperkoagulační stavem je nazývána neregulovaná aktivace koagulačního systému, způsobená nedostatečností v systému inhibitorů a fibrinolýzy nebo zvýšenou prokoagulační schopností krve (*trombofilii*), která může být geneticky podmíněná nebo získaná.

Trombofilie

Představuje vrozený nebo získaný defekt složek koagulačního systému nebo destiček, který je možnou příčinou zvýšeného sklonu k trombóze. Obecně se trombofilie projevuje opakovanými trombotickými příhodami v mladém věku nebo v netypických lokalizacích, u více rodinných členů a v blízkém příbuzenstvu nebo u žen opakovanými spontánními potraty.¹¹ K projevení příznaků je většinou nutná přítomnost více rizikových faktorů současně, takže u osob s rodinným výskytem tromboembolické nemoci (TEN) je možné současně prokázat i jiné defekty, jedná se tedy o onemocnění multifaktoriální.^{5,24}

A/ Trombofilie primární (vrozené)

Jedná se o faktory podmíněné genetickými mutacemi, spojené se zvýšeným rizikem vzniku trombózy:

- *Homocysteinemie*
- *Dysfibrinogenemie*
- *APC rezistence* (defekt spojený s bodovou mutací F V Leiden)
- *Deficit AT III*
- *Deficit proteinu C a S*
- *Mutace protrombinu*
- *Ostatní polymorfismy (GPIa, TFPI, PAI-1), způsobující trombózu*¹²

B/ Trombofilie sekundární

Obvykle se objevují v souvislosti s jiným onemocněním a patologickými stavy např. jaterní poškození, různé typy nádorů, nefrotický syndrom, DIK, dále pak úrazy, imobilizace, antikoncepce nebo antifosfolipidový syndrom.¹¹ Do této skupiny řadíme také graviditu, která sama o sobě představuje hyperkoagulační stav, který organizmus dokáže zvládnout.

Trombofilní riziko představuje pro ženu až ve spojení s jiným prokázaným, vrozeným nebo získaným defektem.

3.3.2.1. *Antitrombotická léčba*

Antitrombotickou léčbou nazýváme léčebné postupy, uměle navozující nerovnováhu mezi jednotlivými složkami hemostázy. Její užití má za úkol zamezit zvětšování trombu a dalšímu shlukování destiček, případně rozpustit trombus již vzniklý a snížit hyperkoagulabilitu.¹ Podle místa a povahy vzniklé poruchy je volen typ preparátu a léčba je zaměřena konkrétním směrem.⁶:

- Antikoagulační léčba způsobuje změny v plasmatickém systému, potlačením tvorby trombinu
- Antiagregační léčba působením na krevní destičky ovlivňuje primární hemostázu
- Antitrombotická léčba s aktivitou anti Xa
- Trombolytická léčba, masivní zásah s cílem rychlého rozpuštění trombu
- Substituční léčba s náhradou spotřebovaných inhibitorů (ATIII, PC)⁷
- Kombinovaná léčba s použitím dvou a více možností u komplikovaných případů⁸

3.3.2.2. *Antikoagulační léčiva*

Jsou látky různého složení a původu, které mají schopnost potlačovat nadměrné srážení, ovlivněním procesu sekundární hemostázy. Z postavení aktivovaného F Xa (součást protrombinázy), trombinu a antitrombinu (multipotentní aktivátor a inhibitor) v hierarchii koagulační kaskády, je patrný jejich klíčový význam při fyziologickém průběhu hemostázy. Z toho důvodu možnost ovlivnění této fáze byla a je s úspěchem využívána v léčebné oblasti. Dalšími oblastmi, které se „uměle“ podařilo ovlivnit farmaky, je syntéza serinových proteáz závislých na vitamínu K, inhibice tkáňového faktoru a F VII, inhibice F XIII a stimulace fibrinolytických a koagulačních mechanismů.¹³

Používaná a zaváděná antikoagulancia

- nepřímé inhibitory trombinu (hepariny UHF, LMWH, sulodexid-Vessel Due F působící na mnoha úrovních jako přímý i nepřímý inhibitor trombinu)
- přímé inhibitory trombinu (hirudin, bivalirudin, lepirudin, desidurin)
- nepřímé inhibitory F Xa (pentasacharid-Fondaparinux, Indaparinux)
- inhibitory faktorů závislých na vitamínu K (Pelentan, Warfarin, Lavarin)
- nové přípravky (dabigatran etexilát, Pradaxa a rivaroxaban, Xalerto)¹³

Ve zkušebním režimu se však nachází mnoho dalších synteticky nebo rekombinačně vyrobených a většinou selektivně zaměřených preparátů, které čekají na svoji příležitost a klinické využití.

3.3.2.3. *Nejpoužívanější léčebné formy a indikace*

Heparin UHF (nefrakcionovaný)

Za první a nejdéle používaný lék je považován heparin. Byl izolován ze psích jater dvěma studenty a od třicátých let, kdy proběhly klinické testy, se stal nejpoužívanějším intravenózním preparátem.^{14,23}

Jako přirozený mukopolysacharid se získává ze sliznice prasat a skotu. V klinické praxi má podobu směsi řetězců, z nichž pouze část odpovídá za antikoagulační antitrombinovou aktivitu. Hepariny působí nepřímo, vazbou přes ATIII nebo heparinový kofaktor II, proto je hladina antitrombinu pro jejich působení klíčová.

Standardní, nefrakcionovaný je jako léčebný prostředek využíván od roku 1937. Oblibu si získal především díky zkušenostem nasbíraných během let jeho používání, poměrně rychlému nástupu účinku a přijatelné ceně. Využívá se většinou k léčbě akutních případů. K profylaxi trombózy u ambulantních pacientů jen zřídka, vzhledem k nutnosti kontinuální žilní aplikace.¹³ Ta se vzhledem k současným nárokům jeví jednou z jeho nevýhod, stejně jako nepředvídatelná odpověď na podanou dávku, což je způsobeno vazbou heparinu na jiné proteiny (endotelie, makrofágy, vWF) a zvýšeným rizikem krvácení.

Laboratorní kontrola

Vzhledem k individuálnímu antikoagulačnímu efektu, je nutná přesná laboratorní kontrola účinku pro případnou úpravu podávaných dávek. Pro získání přesného výsledku je nezbytný standardně a správně provedený odběr žilní krve.

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) je rychlá, přesná a dobře standardizovatelná metoda pro měření času tvorby koagula v přítomnosti faktorů vnitřního systému. Časy získané v sekundách nebo hodnotách Ratio (poměr času pacienta k času kontroly) vypovídají o antikoagulační aktivitě UHF heparinu podávaného v šesti nebo dvanácti hodinových intervalech.

Podle naměřených hodnot je upraveno dávkování. V ideálním případě je terapeutického účinku dosaženo při 1,5-2 násobném prodloužení normálního času nebo je dosaženo hodnoty $R = 2,0-2,5 / 16/$

Trombinový čas (TT), je vhodným testem doplňujícím měření aPTT, který reaguje na změny v konečné fázi koagulace (zvýšená inhibice trombinu antitrombinem při heparinizaci) prodloužením času srážení (laboratorní hodnoty >20s.). Pro odhalení přítomnosti heparinu ve vzorku a odlišení předávkování od koagulopatie je vhodné použití *reptilásového času* (RT). Využívá schopnosti enzymu hadího jedu (Batroxobin) přímo aktivovat přeměnu fibrinogenu na fibrin. Je-li čas, měřený od aktivace do vytvoření koagula normální (< 22s) vzorek obsahuje heparin, v opačném případě se jedná o kvalitativní nebo kvantitativní poruchu fibrinogenu.¹⁶

Trombin generační test (TGT) jeden z globálních testů, které by bylo možné k monitorování použít. Ze záznamu křivky tvorby trombinu po přidání aktivátoru a z výpočtu endogenního trombinového potenciálu je možné zhodnotit míru inhibice při heparinové terapii.

Trombelastografie (TEG) je metoda, která měří viskoelastické vlastnosti krve během tvorby koagula a kvalitativně i kvantitativně ho hodnotí. Její využití je vhodné především při monitorování heparinu podávaného během a po srdeční operaci s použitím mechanické srdeční podpory nebo při transplantaci.¹⁵ Menší, přenosná podoba přístroje se dá využít k monitorování přímo u lůžka, stejně jako další test.

Aktivovaný koagulační test (ACT) je rychlým, ale jen orientačním ukazatelem odezvy dávkování UHF heparinu. Čas srážení, které probíhá ve speciálních modulech, je přímo úměrný inhibiční aktivitě komplexu AT III/ heparin. Díky své jednoduchosti je tato metoda využívána přímo u lůžka (většinou na kardiologii)¹⁹

Protrombinázou indukovaný koagulační čas (PiCT.)¹⁸ Tímto testem je možné pomocí inhibičních jednotek anti-Xa, také vyjádřit míru antikoagulačního účinku UHF heparinu. Je citlivý k antitrombinové i anti-Xa aktivitě AT III. Po přidání aktivátoru (F Xa, fosfolipidy a enzym hadího jedu RVV-V, který umožní aktivaci srážení nezávisle na endogenním trombinu.), je měřen koagulační čas, který se prodlužuje se stoupající hladinou heparinu.

Heparin LMWH (nízkomolekulární)

Pokrok v technologii, který na konci 20. století umožnil kontrolovanou frakcionaci standardního heparinu na kratší polysacharidové jednotky, znamenal posun v léčbě a profylaxi. Kratší cukerný řetězec se minimálně váže na bílkoviny plasmy (i trombin), trombocyty i endotelie a reakcí s ATIII vytváří účinný komplex k cílené inhibici F Xa.⁷

Mezi nejpoužívanější nízkomolekulární hepariny patří enoxaparin (Clexane), dalteparin (Fragmin), nadroparin (Fraxiparin) a bemiparin (Zibor) atd. Můžeme sem zařadit i syntetický pentasacharid fondaparinux, který také už našel klinické uplatnění (bohužel ne v takové míře, jakou by si zasloužil). Jednotlivé hepariny se liší délkou frakcí a tím i svými farmakokinetickými vlastnostmi, takže pro klinickou praxi nejsou zcela zastupitelné a při jejich aplikaci je nutné se řídit doporučeními, získanými praktickými zkušenostmi a studiiemi nebo doporučeními od výrobce.^{17,21}

Indikace

Hodí se k léčbě hluboké žilní trombózy, nestabilní anginy pectoris i IM. Pro svoji prověřenou bezpečnost je jako prevence trombembolismu využíván skoro ve všech medicínských oblastech.(interní, infekční a onkologická onemocnění, dialýza, chirurgie, ortopedie, porodnictví).²⁴

Výhody

Předvídatelnost účinku, (podle doporučení výrobce není nutná laboratorní kontrola, zkušenost je opačná) přímé působení na F Xa, dobrá biologická dostupnost, injekční podání (možná ambulantní i domácí aplikace), delší biologický poločas (podání 1-2×/denně s maximem 4 hod. po aplikaci), menší riziko krvácen a vzniku trombocytopenie²⁵

Monitorování

Stanovení inhibičních jednotek anti-Xa je považováno za nejvhodnější metodou pro monitorování LMWH heparinů. Chromogenní metoda je rychlá a spolehlivě vypovídá o přímé inhibiční aktivitě na F Xa. Je to metoda flexibilní, použitelná po provedení manuální kalibrace, na kterýkoliv z dostupných heparinů, k přesnému odečtení jejich jednotek (standardně je prováděna firemními kalibrátory na enoxaparin (Clexane).

PiCT, jednotky inhibice anti-Xa je možné stanovit také koagulační metodou Nakalibrováním na podávaný antikoagulační preparát (LMWH, pentasacharid nebo danaparoid) získáme kalibrační křivku, ze které podle získaných časů odečteme koncentrace antikoagulantu, v příslušných jednotkách (IU/ml) v závislosti na typu použitého léku.¹⁸

TGT je možnou použitelnou metodou jako v případě UHF heparinu (viz. experimentální část).

Heparany sulodexid (Vessel Due F) a danaparoid (Organan)

Pro úplnost jsou zde uvedeny antikoagulanty, které leží na rozhraní přímých a nepřímých inhibitorů trombinu. Jsou tvořeny směsí degradačních produktů heparinu, což umožňuje jejich působení na několika úrovních. Jsou využívány více jako prostředky podporující endoteliální funkce a fibrinolytický systém. V sekundární profylaxi nezaznamenaly významnějších úspěchů.⁷

Jejich monitorování je možné pomocí *inhibičních jednotek anti-Xa*.

Kumariny

Řadíme mezi nepřímá perorální antikoagulantia s opožděným nástupem účinku. Podávají se v případě dlouhotrvající (měsíce, roky) preventivní léčby u pacientů po prodělané ŽT nebo embolisaci. Výjimku tvoří krátkodobé podávání kumarinů spolu s LMWH u ortopedických pacientů nebo v kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou (ASA) u pacientů po IM

Jejich farmakologický účinek spočívá v ireverzibilní inhibici cirkulace hydrochinonové formy vitamínu K, který je nutný pro syntézu některých faktorů. Tím je omezena tvorba jejich účinných forem a hromadí se formy neúčinné tzv. PIVKA.¹³

Pelentan

Je to dnes již nepoužívaný kumarinový derivát s kratším biologickým poločasem a rychlejším nástupem než warfarin. Byl indikován pro dlouhodobou profylaxi především po chirurgických zákrocích a zavedení umělých chlopní. Pro velké množství nežádoucích komplikací se přestal používat.

Warfarin

Historie objevu warfarinu se datuje do dvacátých let minulého století. Látka byla izolována ze zkažené píče jednoho druhu jetele. Později byla syntetizována a zdokonalována. Po registraci v padesátých letech začaly klinické studie, které vyloučily toxicitu a warfarin se stal na dlouhou dobu jediným perorálním antikoagulačním lékem.⁴

Vyráběné preparáty jsou směsí dvou enantiomerů, z nichž jeden je několikrát účinnější než druhý a i jejich aktivita a metabolismus jsou rozdílné. V současné době je známo několik mutací a polymorfismů genu pro cytochrom P450 2C, jejichž přítomnost ovlivňuje antikoagulační odpověď na podávaný warfarin.¹³

Indikace

Je indikován u osob s vysokým rizikem ŽT a TEN, většinou jako pokračující prevence po předchozí léčbě hepariny. Režim užívání je individuálně nastaven dle aktuálního stavu. Jeho užívání je spjato s přísnými pravidly, takže je důležitý zodpovědný přístup pacienta, aby nedocházelo k nežádoucím kontraindikacím. Kromě warfarinu je u nás k dispozici celá řada dalších preparátů s odlišným biologickým poločasem (Sintrom /8hod./, Coumadine, Lawarin /72 hod./, Marcoumar /160h/).⁸ Při léčbě ICHS (ischemická choroba), je často využívána kombinace s antiagregačními léky (kys. acetylsalicylová), jako prevence vysokého rizika recidivy.

Laboratorní kontrola

Vzhledem k úzkému terapeutickému rozmezí a riziku krvácení, vyžaduje podávání kumarinů, laboratorní kontrolu, v případě předávkování bude pacient ohrožen krvácením, při podávkování recidivou trombózy.

Účinná dávka je rovněž ovlivňována příjmem vitamínu K, interakcí s léky, individuálním metabolismem jedince, již zmíněnou přítomností polymorfismu a zodpovědným přístupem pacienta.⁷

Protrombinový test (PT) dříve tromboplastinový (Quickův) test, je všeobecně uznávanou metodou pro kontrolu léčby kumarinovými preparáty. Pomocí mezinárodní normalizované hodnoty INR (viz. experimentální část), je možné celkem rychle a spolehlivě informovat o síle antikoagulačního účinku, bez ohledu na kvalitu použitého tromboplastinu. Při střední intenzitě blokady by se INR mělo pohybovat v rozmezí 2,0 - 3,0 při intenzivní mezi 3,0 - 4,0.

Přesné monitorování léčby je výhradně laboratorní záležitost, což klade velké nároky na starší nebo špatně kompenzovatelné pacienty. Alternativou pro tyto případy, by mohl být selfmonitoring pomocí přístroje.

Koagu-check XS PT. Jedná se o malý, přenosný přístroj, jednoduše použitelný i v domácím prostředí, který vyšetřením kapilární krve na testovacích prouzcích změří protrombinový čas a vypočte INR. Po konzultaci s lékařem je možná aktuální úprava dávkování.²⁰

TGT je také dobře použitelnou metodou. Snížení generace trombinu v závislosti na čase zhodnocené pomocí všech naměřených hodnot přesně vypovídá o kvalitě antikoagulační léčby. Nevýhodou je časová prodleva vyšetření a cena. (viz. experimentální část)

Komplikace a rizika antikoagulační léčby

Krvácení je komplikací i rizikem, se kterým se musí v případě podávání antikoagulační léčby počítat. Některá malá krvácení nemocného neohrožují, velká vždy vyžadují hospitalizaci a okamžité řešení, většinou vysazení léku případně jeho neutralizaci (heparin pomocí protaminu, warfarin podáním kanavitu-vitamin K, protromplexu - preparát s obsahem faktorů zevního systému nebo mražené plasmy). Kožní nekrózy představují nepříjemnou komplikaci při užívání warfarinu, při jejich výskytu je nutné lék vysadit a nahradit nízkomolekulárním nebo nefrakcionovaným heparinem, stejně jako v případě gravidity³ Při podávání heparinů je jednou z možných nevýhod vznik HIT (heparinem indukovaná trombocytopenie). Jedná se závažnou komplikací autoimunitní povahy s rozvojem trombocytopenie a recidivou trombózy. Indikace jiného typu antitrombotika (hirudiny) významně přispěje ke zlepšení prognózy.

Hirudin

Krevní sraženina získala svůj název již ve starém Řecku a díky lékaři Galénovi (130-200) ji uměli léčit pomocí pijavic, u kterých si ověřili antitrombotický účinek.² Později (19. století) se zjistilo, že látkou s tímto účinkem v těle pijavic je hirudin. Dnes je znám jako nejsilnější přímý přirozený inhibitor trombinu, který ovlivňuje řadu pochodů v krvi, cévní stěně i v diagnostice.¹ Pro klinické účely byly připraveny rekombinací preparáty proteinové povahy s lepšími vlastnostmi, bivalirudin, lepidurin a desirudin.

Jejich účinek je srovnatelný s účinkem nízkomolekulárního heparinu, který mohou plně nahradit v případě vzniku heparinem indukované trombocytopenie (HIT).⁷

Vzhledem k finanční náročnosti těchto preparátů se jejich používání zatím klinicky příliš neprosadilo.

Ecarinový test je v praxi nejpoužívanější pro stanovení hladiny hirudinu. S využitím extraktu hadího jedu (*Echis Carinatus*), který je schopen aktivovat konečnou fázi koagulace bez přítomnosti kalcia a fosfolipidů, je měřen čas srážení, který je přímo úměrný množství hirudinu ve vzorku. Stanovení by bylo možné i *ELISA* analýzou nebo *chromogenně*, jejich provedení je však zdlouhavé.¹⁹

Nová perorální antikoagulancia

Vzhledem k menším či větším nedostatkům dosavadně užívaných léků, je v obecném zájmu hledání nových „ideálně“ působících. Po úspěšně proběhnutých klinických studiích, byla skupina antitrombotik obohacena o další dva preparáty. Jedním z nich je přímý inhibitor faktoru Xa *rivaroxaban* (Xarelto) a druhým *dabigatran etexilát* (Pradaxa) přímý inhibitor trombinu. Oba nové preparáty jsou malé selektivně působící molekuly, které po navázání do aktivního místa koagulačních enzymů, způsobí jejich inhibici a zpomalí koagulační proces.

S jejich využitím se počítá při předcházení vzniku HŽT u ortopedických pacientů po náhradě kyčelního nebo kolenního kloubu. Ve studii byly oba léky porovnány s enoxaparinem a výsledky přímých inhibitorů byly srovnatelné. Pro léčebné použití je důležité prokázané menší riziko krvácení, perorální podání a záruka farmakokinetické předvídatelnosti bez nutnosti laboratorní kontroly.¹⁹

4. Experimentální část

4.1. Definice souborů

4.1.1. Pacienti léčení Warfarinem^a

Soubor 10-ti ambulantních pacientů Trombotického centra VFN. Všichni dlouhodobě užívali Warfarin v dávce 5mg/den z důvodu prodělané trombotické příhody. U všech byla dodatečně zjištěna trombofilní mutace FV Leiden nebo F II Protrombin v heterozygotní nebo homozygotní konstituci.

Spolu s hodnotou INR byly u nich kontrolovány i ostatní koagulační parametry (aPTT, TT, Fbg, ATIII, DD), počet trombocytů (Plt) a proteiny akutní fáze (PAF). Získané hodnoty se vztahují k období: září 2010 – duben 2011 (viz. přílohy – tabulka č. 5).

4.1.2. Pacienti léčení nízkomolekulárním heparinem (LMWH), enoxaparin^b

Soubor 10-ti ambulantních pacientů Trombotického centra VFN. Jednalo se převážně o těhotné ženy, které si v prostředí domova aplikovaly injekce nízkomolekulárního heparinu ve startovací profylaktické dávce 0,4 ml/den. S monitorováním jednotek inhibice anti-Xa byly měřeny koagulační parametry, počet trombocytů a proteiny akutní fáze. Odběry probíhaly v pravidelných časových intervalech, závislých na době aplikace (viz. přílohy – tabulka č. 6). Důvodem užívání antikoagulační léčby u těchto žen bylo ohrožení průběhu těhotenství v důsledku prokázaného (vrozeného nebo získaného) trombofilního rizika.

^{a,b} U posledního odběru u každého pacienta z obou souborů byl použit vzorek, pro měření trombin generačního času. Získaná data jsme použili ke komparaci jednotlivých metod.

4.2. Odběr a zpracování vzorků

4.2.1. Odběr pro koagulační vyšetření

Žilní krev odebraná do citrátu sodného 0,129 mol/l v poměru 1:9. Následná centrifugace (3000 ot./min. po dobu 15min.), pro získání bezdestičkové plasmy. Většina odběrů byla provedena nalačno v ranních hodinách, výjimku tvořily těhotné ženy, které byly odebírány 4 hod. po aplikaci LMWH.

4.2.2. Odběr pro vyšetření krevního obrazu

Pro zjišťování počtu trombocytů na krevních analyzátoch, byla odebrána nesrážlivá krev do zkumavek s K₃EDTA.

4.2.3. Odběr pro měření proteinů akutní fáze

Vyšetření se provádí ze séra, proto byly použity zkumavky bez protisrážlivého činidla. Gel ve zkumavkách zajistil při centrifugaci (3000 ot./min., 15 min) dokonalé oddělení séra od krevního koláče.

4.3. Metodika použitých stanovení

Kromě metod vhodných pro monitorování příslušného antikoagulačního léku, byly u sledovaných skupin měřeny další parametry: aktivovaný parciální test (aPTT), trombinový čas (TT), fibrinogen (Fbg), antitrombin III (ATIII), D-dimer (DD), byl sledován počet trombocytů (PLT) a hodnoty proteinů akutní fáze (α 1 acid glykoprotein, transferin a C-reaktivní protein). Jedná se o ukazatele komplexního stavu hemostázy.

4.3.1. Protrombinový čas (PT)

Slouží jako rychlý, screeningový test poruch zevního systému (faktory II, V, VII, X). Z důvodu vysoké citlivosti k těmto faktorům je určen:

- *pro kontrolu antikoagulační terapie*
- *pro záchyt geneticky podmíněného nebo získaného nedostatku koagulačních faktorů zevního systému*
- *pro posouzení schopnosti jejich syntézy při jaterních poruchách*

Reagencie

Jako aktivátor se používá lidský nebo zvířecí čištěný tromboplastin obsahující kalcium, který se přidává k vyšetřované plasmě.

Pro tato měření byl použit Tromborel S (Siemens, SRN) obsahující lidský placentární tromboplastin, chlorid vápenatý, stabilizátory a konzervační prostředek.

Princip metody

Po přidání aktivátoru k vyšetřované plasmě vytemperované na 37°C, je měřen čas do vytvoření fibrinového koagula. Při použití fotometrických koagulometrů je možné z nárůstu zákalu získat i orientační informaci o koncentraci fibrinogenu (derivovaný fibrinogen).

Vyhodnocení

Výsledky měření se udávají v sekundách, v procentech normy, v prothrombin ratio (PR) nebo v International Normalisiert Ratio (IR).

Při monitorování antikoagulační léčby, je (PR) za použití International Sensitivity Index (ISI), přepočteno na mezinárodně srovnatelné hodnoty a tím se získá International Normalised Ration (INR):

Reakční doba vzorku (s)

PR = -----

Reakční doba normální plasmy (s)

$INR = PR^{ISI^c}$

^c Hodnota ISI je uvedena v tabulce hodnot u každé šarže. Vyjadřuje kvalitu daného tromboplastinu, ideální je hodnota 1,00.

4.3.2. Měření jednotek inhibice anti-Xa

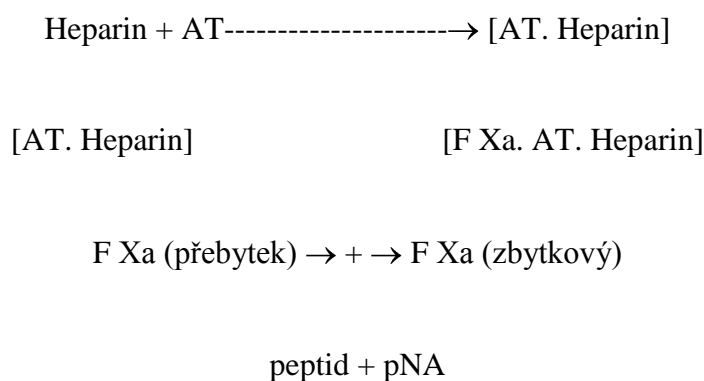
Přítomnost nízkomolekulárního heparinu výrazně zvyšuje inaktivační schopnost antitrombinu vůči koagulačnímu faktoru Xa. Proto jsou typy frakcionovaných polysacharidů, s úspěchem využívány jako terapeutická antitrombotika. Jejich inhibiční vliv po podání příslušné dávky, se využívá k monitorování terapie těmito preparáty.

Reagencie

Pro měření byl použit Coamatic Heparin firmy Chromogenix. Jedná se o chromogenní test pro stanovení inhibiční aktivity, obsahující chromogenní substrát s detergentem a hovězí lyofilizovaný F Xa s obsahem pufru, kalcia, dextran sulfátu a hovězího albuminu.

Princip

Faktor Xa se přidává, ke směsi neředěné plasmy a chromogenního substrátu, v nadbytku. Během inkubace je inaktivován antitrombinem III, za přispění heparinu přítomného ve vyšetřované plasmě. Po proběhlé inhibici F Xa komplexem [AT.Heparin] reaguje zbytkový F Xa se substrátem za vzniku peptidu a p-nitroanilinu (pNA), jehož nárůst absorbance je měřen v kinetickém testu při 405 nm. Dextran sulfát snižuje vliv antagonistů heparinu.



Vyhodnocení

Hladina heparinu ve vzorku je nepřímě úměrná množství vzniklého pNA, proto se vyjadřuje pomocí inhibičních jednotek anti-Xa (IU/ml) a teoreticky by měla odpovídat množství jednotek subkutánně podaných. Pro co nejpřesnější stanovení hladiny LMWH a následný odhad podávané dávky, je nutné provádět odběry vždy 4 hod. po aplikaci.

4.3.3. Trombin generační čas (TGT)

Použitý typ testu: TECHNOTHROMBIN TGA RC High (Ceveron alpha)

Princip metody

Test je založen na monitorování formace trombinu s fluorogenním substrátem při aktivaci koagulační kaskády tkáňovým faktorem.

Reagencie

Set obsahuje trombin ve dvou koncentracích low a high, aktivátor s tkáňovým faktorem a kalcium.

Vyhodnocení

Při sledování generace trombinu se vyhodnocuje pět parametrů křivky:

- Lag phase (= **t lag**)

Čas do začátku generace trombinu (min)

- Time to Peak (= **t Peak**)

Čas dosažení max. formace trombinu (min)

- Peak (= **Peak trombin**)

Maximální koncentrace formace trombinu (nM)

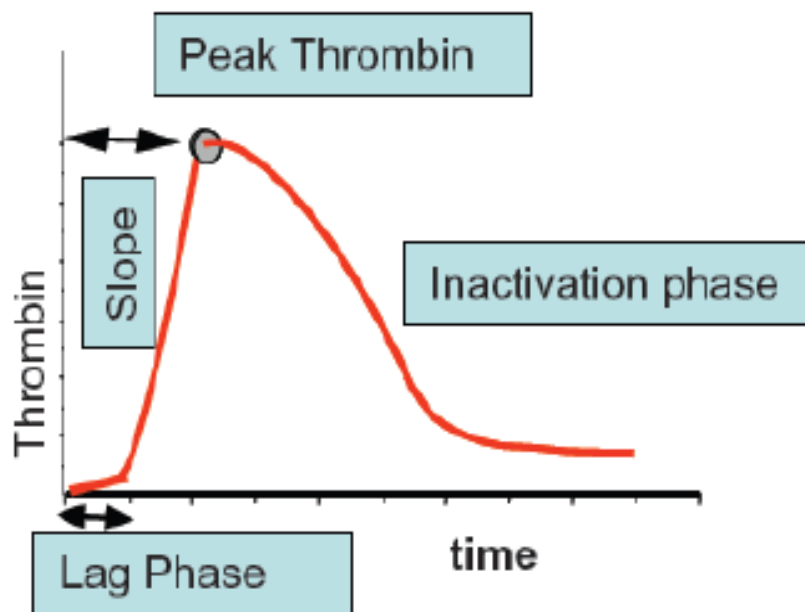
- Slope (= **VI**)

Rychlost formace trombinu za min.

Velocity Index (nM/s) = $\frac{\text{peak thrombin}}{t \text{ Peak} - t \text{ lag}}$

- **AUC** = ETP (Endogenní trombinový potenciál)

Graf č. 1: Generace (množství) trombinu v závislosti na čase



4.4. Analyzátoary

4.4.1. BCS XP

(Behring Coagulation System) je vysokokapacitní plně automatický koagulometr vhodný pro kvantitativní testy koagulačních parametrů. Detekce je možná v oblasti různých vlnových délek (nejčastěji 405 nebo 570 nm) na principu turbidimetrie nebo nefelometrie, proto lze používat testy chromogenní, koagulační i aglutinační.

Chromogenní metody využívají barevné reakce p-nitroanilinu, je měřena změna barevné intenzity v závislosti na čase. Vyhodnocení je provedeno odečtením z kalibrační křivky, která se provádí při změně šarže použité reagensie.

Koagulační metody zaznamenávají hodnotu času při změně intenzity prošlého světla v okamžiku vzniku fibrinového koagula.

Imunochemické metody využívají reakce antigen – protilátka, kdy síla vzniklé aglutinace je zaznamenána změnou intenzity záření, způsobenou rozptylem světla. Otevřený systém umožňuje validaci procedur i instalaci vlastních aplikačních protokolů. Byl použit pro měření protrombinového času a anti-Xa.

4.4.2. Ceveron Alpha

Analyzátor firmy Technoclone GmbH je kompaktní, plně automatický přístroj měřící koagulaci z hlediska celé koagulační kaskády. Měří generaci trombinu v čase kontinuálně na základě aktivace koagulační kaskády lidským tkáňovým faktorem.

Princip metody je založen na měření fluorescence produktu aminomethylkumadinu, který vzniká přeměnou fluorogenního substrátu působením trombinu. Fluorescenci vyvolává dopadající monochromtické záření o vlnové délce 360 nm, které vyvolá emisi záření o vlnové délce 460 nm, která je snímána detektory. Fluorogenní signál není úměrný aktivitě trombinu (závisí na spoustě faktorů jako je např. barva plazmy, se snižující se koncentrací substrátu klesá rychlost jeho přeměny, apod.), proto je nutné při měření používat trombinový kalibrátor, což je modifikovaný trombin schopný přeměňovat fluorogenní substrát. Tento modifikovaný trombin se neúčastní koagulační kaskády a není inhibován plazmatickými inhibitory. Výstupem tohoto testu je trombogram, který popisuje koncentraci trombinu v čase ve srážející se plazmě a je tedy obecným funkčním testem tromboticko-hemostatického systému.

4.5. Kontrola kvality

Zajištění správného měření analytických metod se provádí pravidelnou kontrolou a vyhodnocením naměřených hodnot kontrolních plasem.

4.5.1. Vnitřní kontrola kvality

Protrombinový čas, aPTT, fibrinogen, trombinový čas, antitrombin: každý den se provádí kontrolní měření dvou hladin firemních kontrol Control Plasma N (normální hodnoty) a Control Plasma P (patologické hodnoty).

Hladina anti-Xa: každý den se provádí kontrolní měření dvou hladin firemních kontrol Control Plasma Low (nižší hodnoty) a Control Plasma High (vyšší hodnoty).

Hodnoty TGT: s každou sérií se provádí kontrolní měření dvou hladin firemních kontrol Control Plasma Low (nižší hodnoty) a Control Plasma High (vyšší hodnoty).

4.5.2. Externí kontrola kvality

Externí kontrola kvality je zajištěna mezinárodní institucí INSTAND, certifikát udělený pro PT a aPTT má platnost 6 měsíců, pro fibrinogen, trombinový čas, antitrombin a anti-Xa má platnost 12 měsíců.

Všechny výše uvedené metody jsou akreditovány dle ISI 15 189, zdravotnická laboratoř č. 8041 akreditovaná ČIA.

Pro měření TGT dosud není zařazen kontrolní cyklus.

Tabulka č.1: Normální hodnoty a hodnoty požadované

Měřený parametr	Normální hodnoty	Profylaktická léčba	Léčebná dávka
anti-Xa (IU/ml)	0-0,02	0,2-0,6 2,0-3,0 venózní trombóza, embolie,	0,5-1,2
PT (INR)	1-1,25	IM 3,0-4,5 umělá chlopeč, 2,5-3,5 recidivující trombóza	
aPTT (s)	25,0-40,0	2-3 násobek normálu (R = 1,5-2,5)	
TT (s)	12,0-18,0		
Fbg (g/l)	2,0-4,0		
ATIII (%)	60-120		
DD [*] (ug/l)	0-190		
PLT ^{**} (10 ⁹ /l)	140-320		
TRF ^{***} (g/l)	2,00-3,60		
A ₁ AG [∇] (g/l)	0,50-1,20		
CRP [•] (mg/l)	0,00-10,00		

* D – dimery; ** Trombocyty; *** Transferin; ∇ Alpha 1 acid aglykoprotein, • C - reaktivní protein

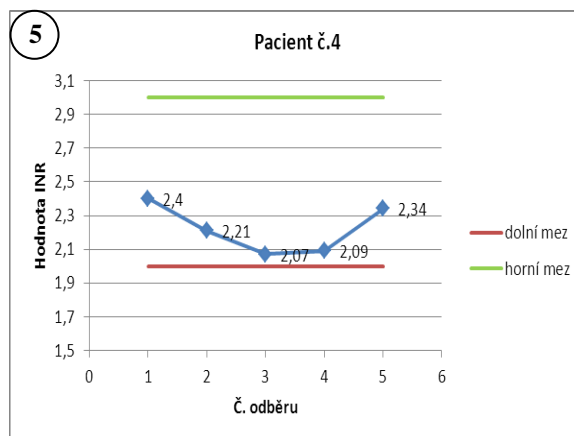
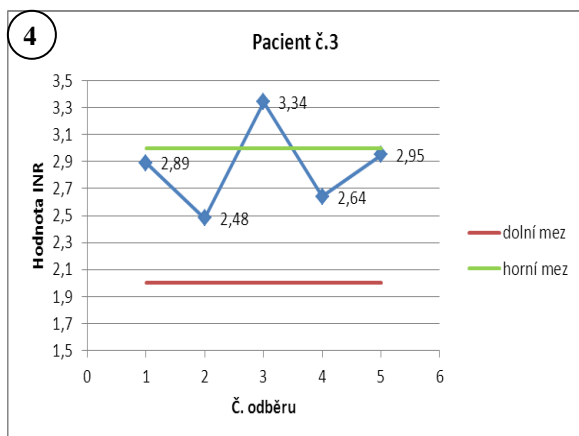
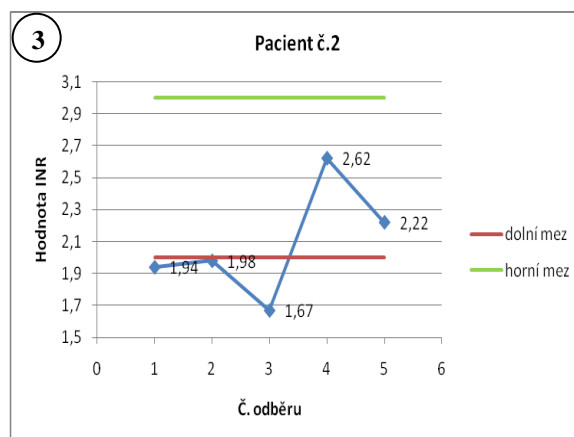
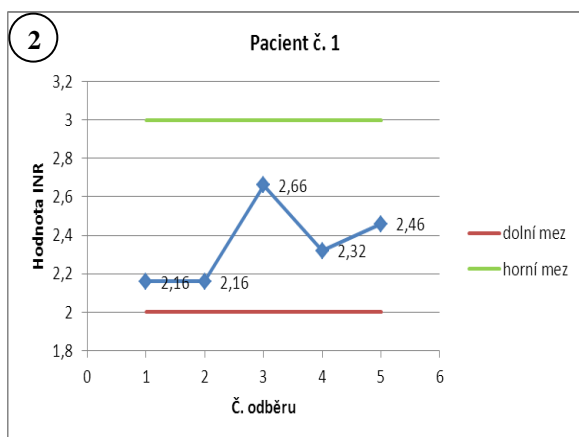
4.6. Zpracování dat

Naměřená data byla zpracována systémem Microsoft Office Excel 2007. Naměřená data byla statisticky zpracována v programu *Statistica 9*.

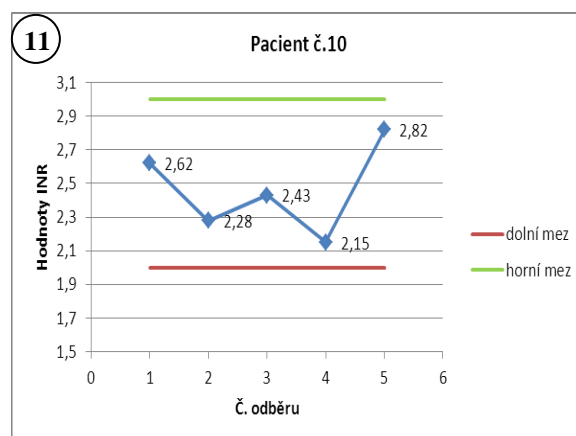
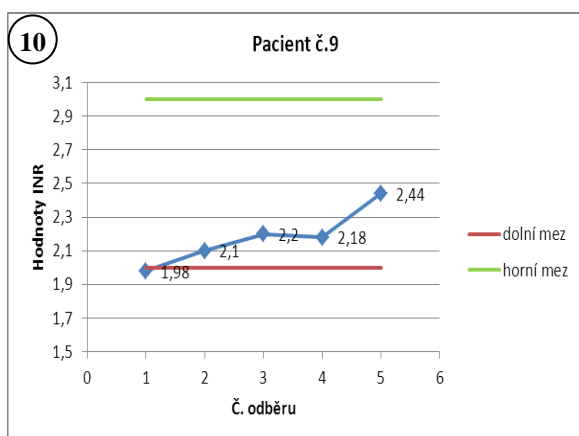
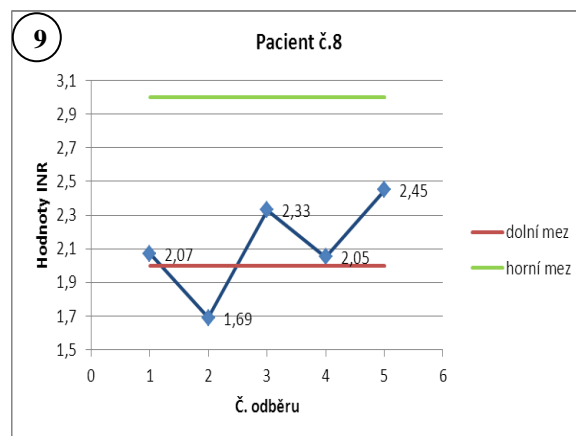
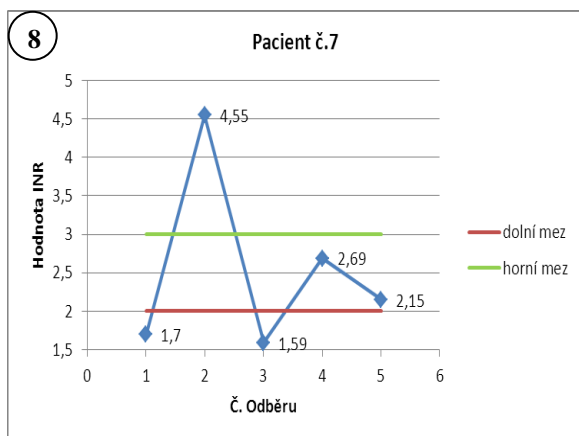
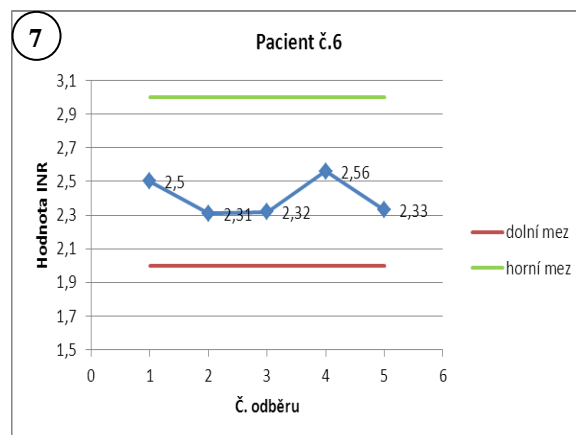
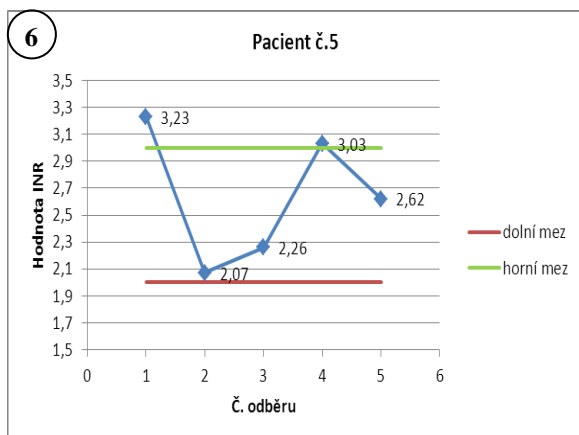
4.6.1. Grafické znázornění - pacienti užívající Warfarin

Sledování adekvátní odpovědi na podanou léčebnou dávku Warfarinu a LMWH ve vymezeném časovém období. Dlouhodobá indikace vyžaduje udržovat hodnoty INR v rozmezích 2,0 - 3,0 (dolní a horní mez).

Graf č. 2, 3, 4, 5: Hodnota INR u jednotlivých pacientů v závislosti na čase

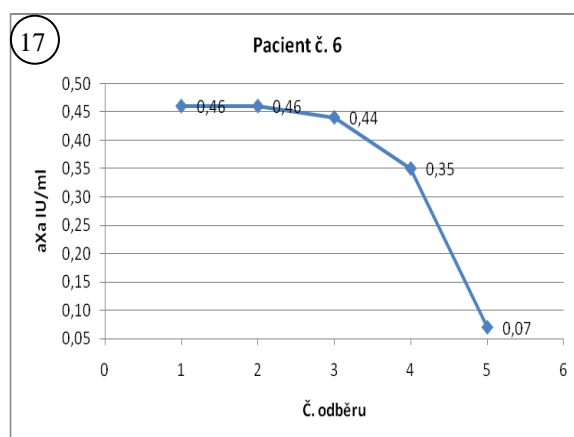
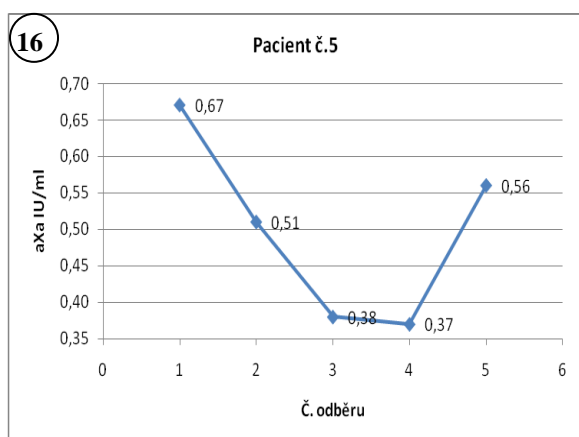
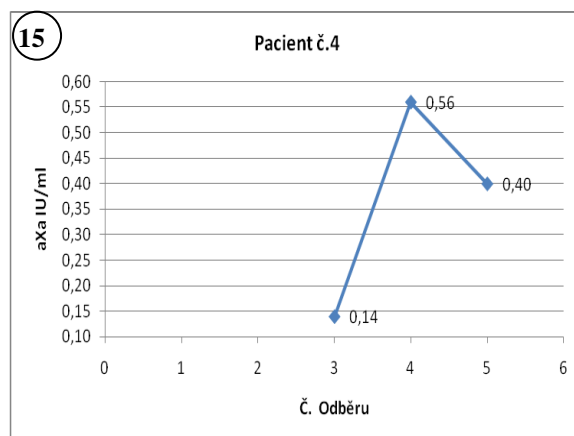
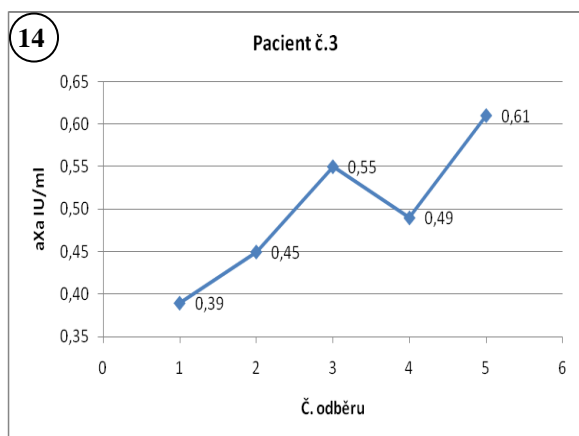
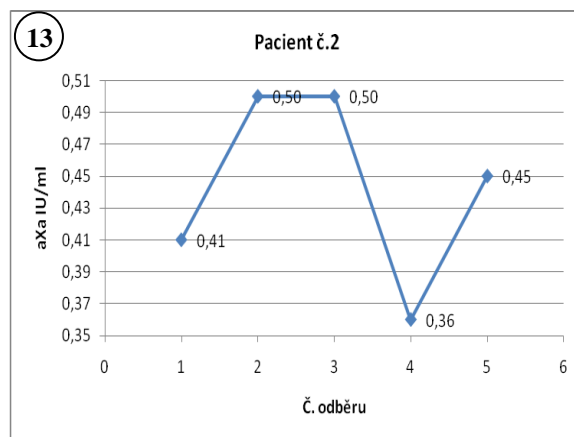
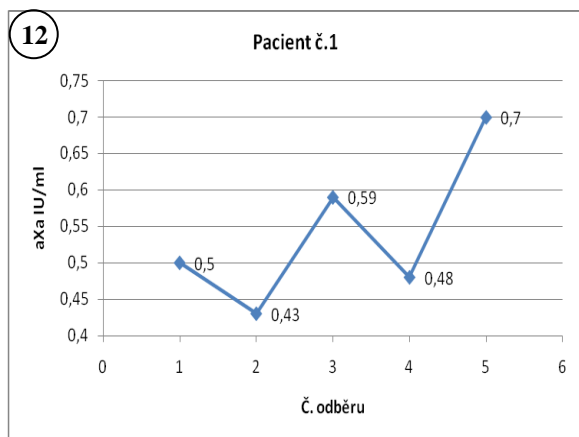


Grafy č. 6, 7, 8, 9, 10, 11: Hodnota INR u jednotlivých pacientů v závislosti na čase-pokračování



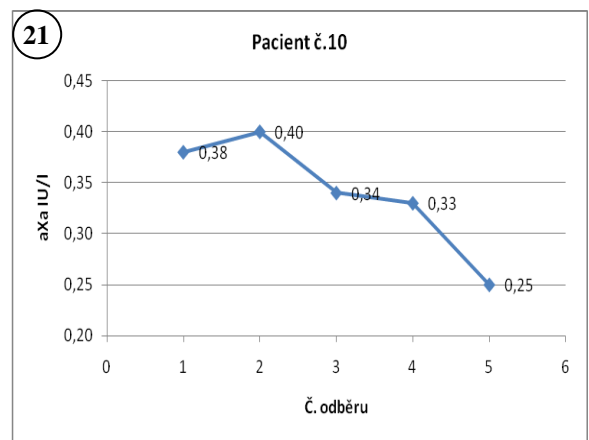
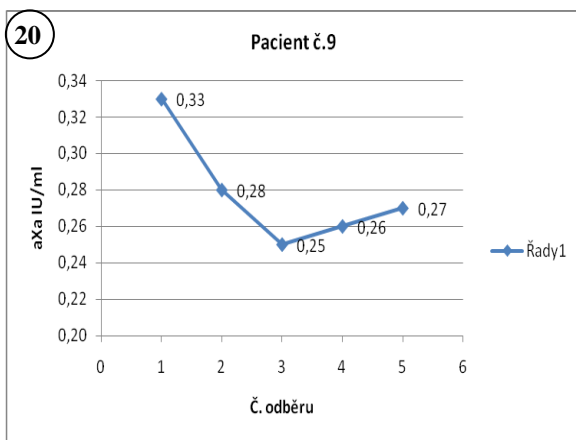
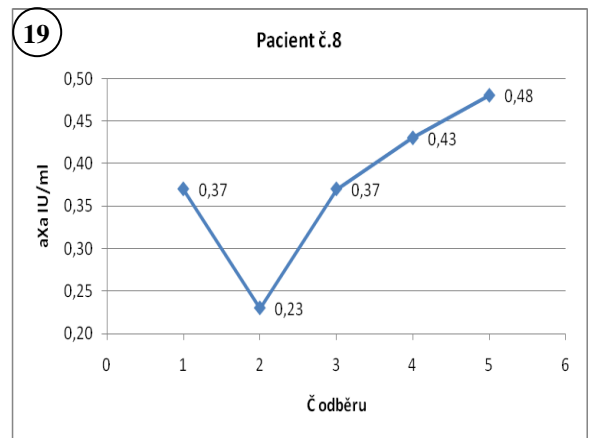
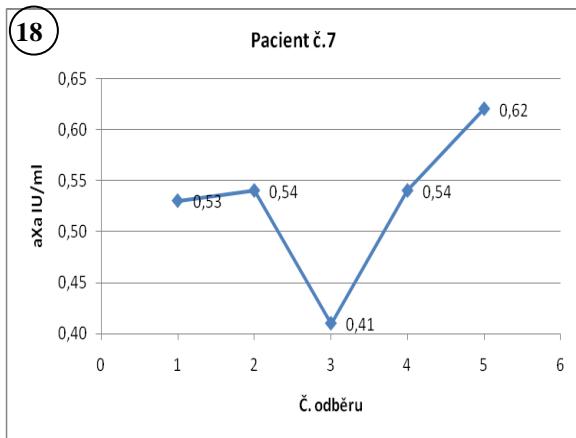
4.6.2. Pacienti užívající nízkomolekulární heparin v profylaktické dávce^d

Graf č. 12, 13, 14, 15, 16, 17: Hodnota INR u jednotlivých pacientů v závislosti na čase



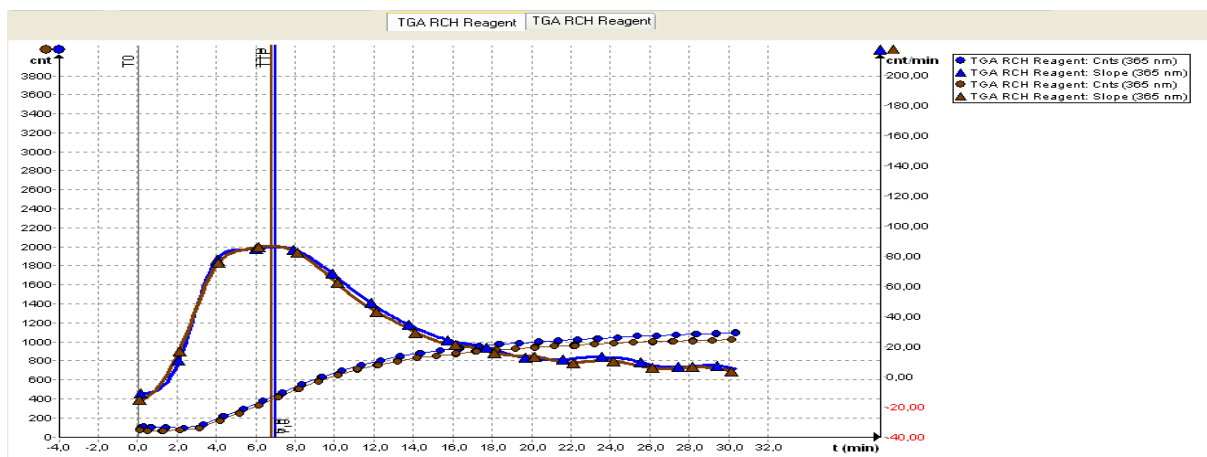
^d Profylaktické rozmezí 0,2-0,6 IU/ml.

Graf č. 18, 19, 20, 21: Hodnota INR u jednotlivých pacientů v závislosti na čase

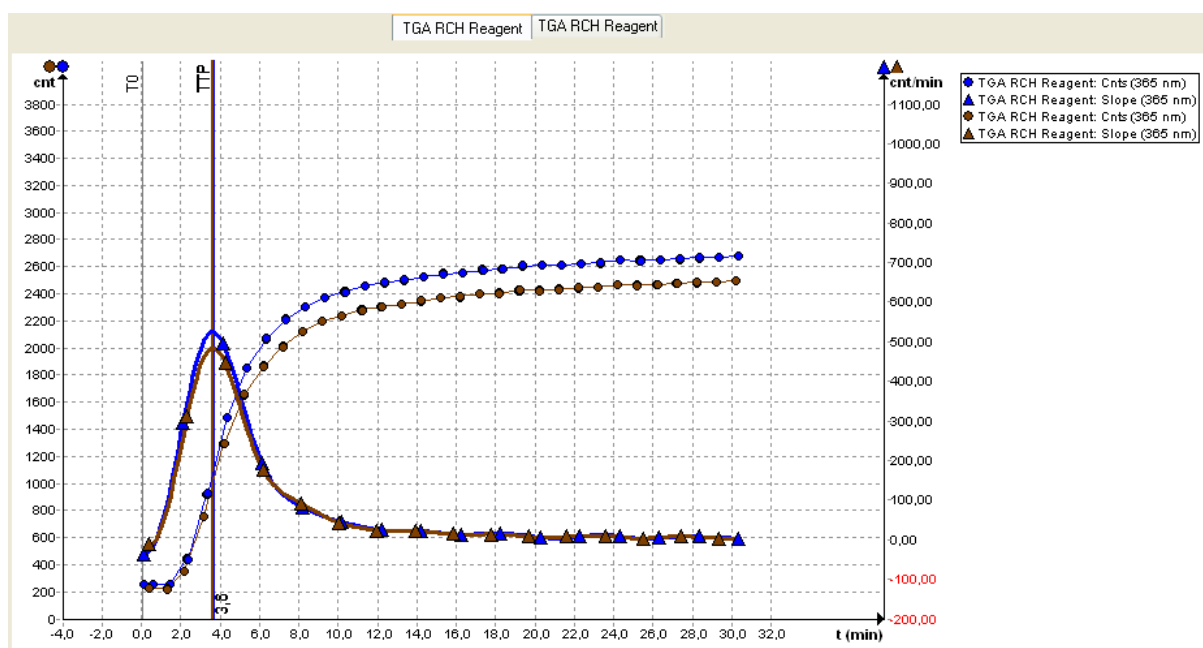


4.6.3. Průběh generace trombinu metodou TGT

Graf č. 22: Průběh generace trombinu u warfarizovaného pacienta



Graf č. 23: Průběh generace trombinu u pacienta s heparinem



4.7. Porovnání metod

4.7.1. Porovnání výsledků warfarinizovaných pacientů získaných měřením TGT na analyzátoru Ceveron a hodnot INR získaných měření protrombinového času na analyzátoru BCS XP

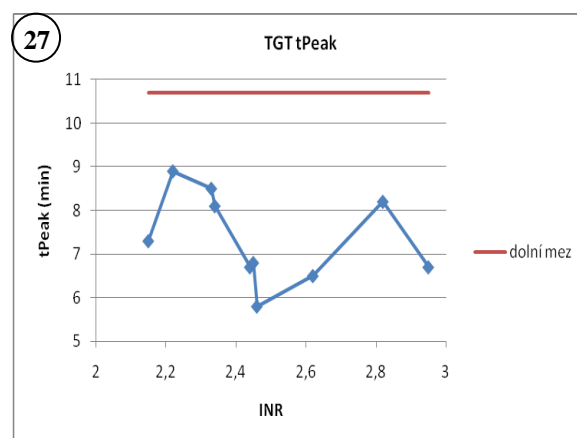
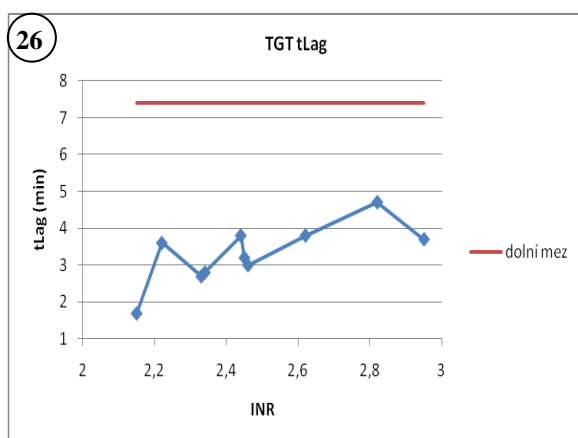
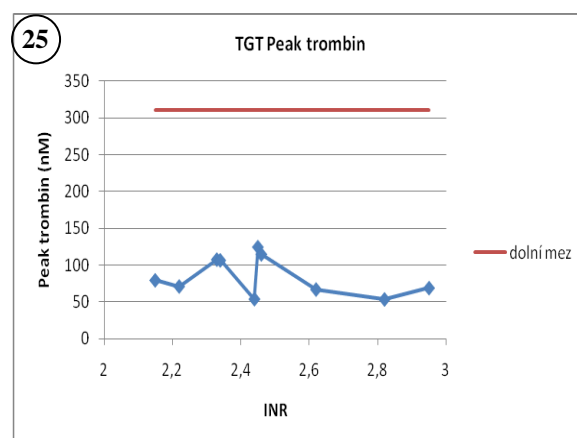
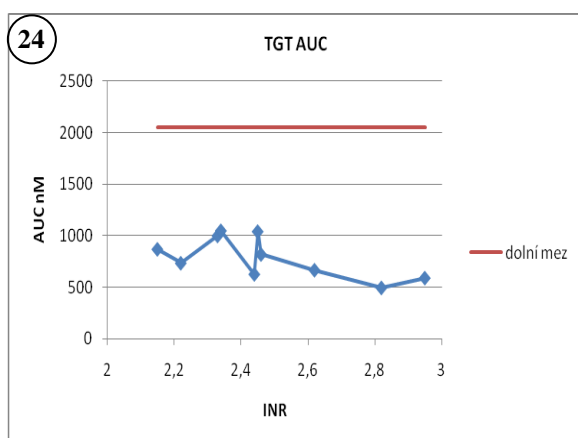
Tabulka č. 2: Normální hodnoty pro vyšetření RC high (analyzátor Ceveron Alpha)

Parametry	Průměr	Medián	Dolní mez	Horní mez	Sm.odch.
t Lag (min)	8,7	8,5	7,4	10,0	2,0
t Peak (min)	12,4	12,3	10,7	14,0	2,7
Peak (nM)	409,6	395,1	310,7	483,7	120,1
VI (nM/min)	125,0	115,2	71,0	164,6	62,6
AUC (nM)	2271,1	2245,7	2048,2	2520,0	330,5

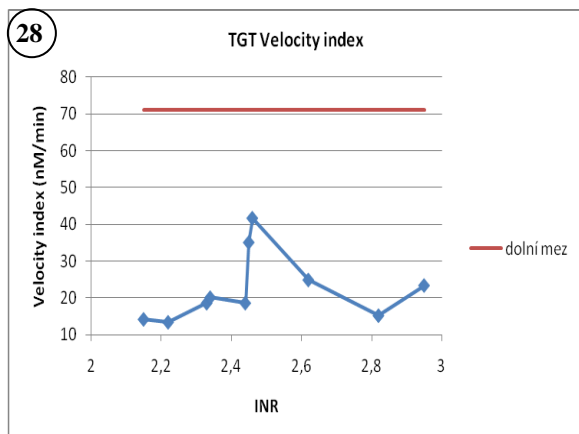
Tabulka č. 3: Výsledky trombin generačního času warfarizovaných pacientů

Č. pacienta	t Lag	t Peak	Peak	VI	AUC	INR
1	3	5,8	114,8	41,7	819,4	2,46
2	3,6	8,9	71	13,4	734,5	2,22
3	3,7	6,7	68,8	23,4	590,6	2,95
4	2,8	8,1	106,6	20,1	1048,9	2,34
5	3,8	6,5	66,9	24,9	667	2,62
6	2,7	8,5	107,6	18,6	999,5	2,33
7	1,7	7,3	79,4	14,2	869,8	2,15
8	3,2	6,8	124,6	35,1	1041,4	2,45
9	3,8	6,7	53,8	18,6	627,1	2,44
10	4,7	8,2	53,4	15,2	495,4	2,82

Grafy č. 24, 25, 26, 27: Grafické znázornění výsledků trombin generačního času warfarizovaných pacientů v závislosti na hodnotě INR



Graf č. 28: Grafické znázornění velocity indexu warfarizovaných pacientů v závislosti na hodnotě INR

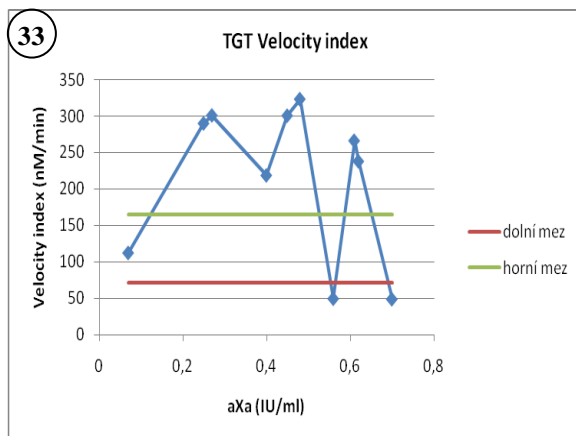
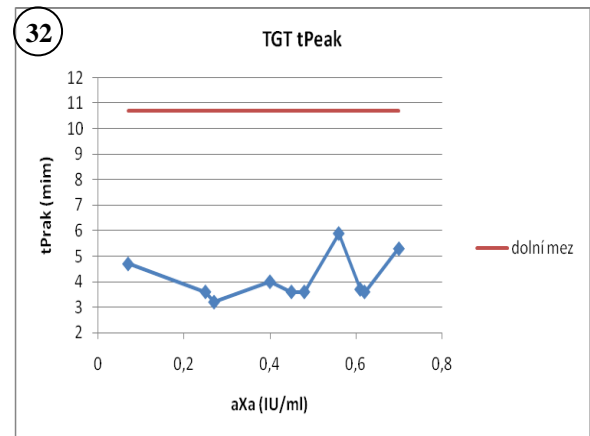
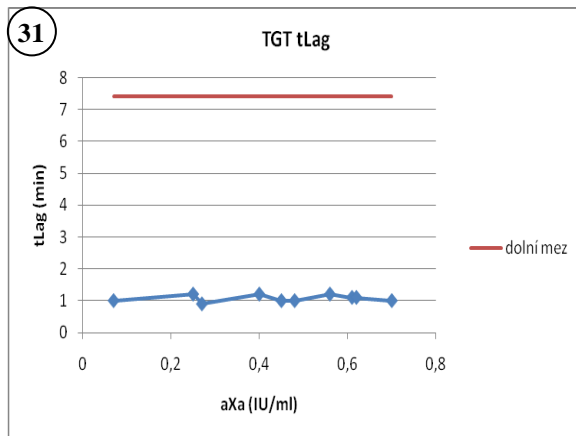
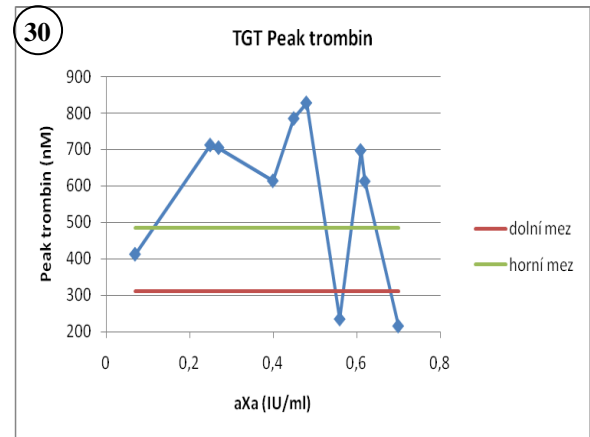
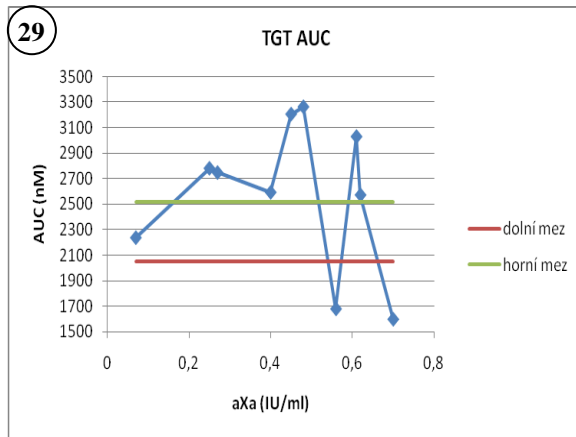


4.7.2. Porovnání výsledků heparinizovaných pacientů získaných měřením trombin generačního času na analyzátoru Ceveron a hodnot anti-Xa získaných měřením na analyzátoru BCS xp

Tabulka č. 4: Výsledky trombin generačního času u pacientů s heparinem

Č. pacienta	tLag	tPeak	Peak	VI	AUC	Anti Xa
1	1	5,3	214,5	49	1600,5	0,7
2	1	3,6	784,6	300,8	3203,5	0,45
3	1,1	3,7	696,7	266,4	3028,1	0,61
4	1,2	4	613,4	218,8	2592,5	0,4
5	1,2	5,9	233,7	49,7	1681,7	0,56
6	1	4,7	411,7	112,5	2238,2	0,07
7	1,1	3,6	612	238,2	2572	0,62
8	1	3,6	827,4	323,4	3261,1	0,48
9	0,9	3,2	704,5	301,1	2747,2	0,27
10	1,2	3,6	711,6	290,2	2780,1	0,25

Grafy č. 29, 30, 31, 32, 33: Grafické znázornění výsledků trombin generačního času u pacientů s heparinem v závislosti na hodnotě anti-Xa (IU/ml)



5. Diskuse

V teoretické části práce jsme provedli výčet antikoagulační léčby od historie až do současné doby a uvedli příklady možnosti kontroly podávané léčby. V praktické části jsme uvedli příklady monitorování nejčastěji podávané antikoagulační léčby a posoudili možnost monitorování další metodou.

V časovém období září 2010 – duben 2011 jsme sledovali dvě skupiny jedinců, kterým byly podávány dva typy antikoagulační léčby. Do každé skupiny bylo zařazeno 10 osob, kterým byl v uvedeném časovém období pětkrát proveden kontrolní odběr s kontrolou účinnosti antikoagulační léčby a kontrolou ostatních parametrů, které by mohly mít vliv na účinek antikoagulační léčby.

V první skupině, která užívala kumarinový preparát warfarin v dávce 5 mg/den, jsme pro hodnocení účinnosti antikoagulační léčby sledovali hodnoty INR a následně porovnávali s jednotlivými parametry křivky generace trombinu.

U pacienta č. 1, 3, 4, 5, 6 a 10 se pohybovaly hodnoty INR v doporučeném rozmezí. U pacienta č. 2 byly dvě hodnoty INR hraniční a jedna nižší. U pacienta č. 7 byly dvě hodnoty nižší, u pacienta č. 8 jedna hodnota nižší a u pacienta č. 9 jedna hodnota hraniční. Všechny snížené hodnoty INR byly nahlášeny lékaři trombotického centra a individuálně byla upravena dávka warfarinu. Při posledních kontrolních odběrech se u všech pacientů hodnota INR pohybovala v požadovaném rozmezí a z tohoto odběru jsme prováděli i měření trombin generačního času.

U všech parametrů TGT je vidět jasný vliv účinku warfarinu na sníženou generaci trombinu, proto je také uváděna pouze dolní mez normálního rozmezí stanoveného laboratoří. Dobrou korelaci vykazují pouze dva parametry AUC ($r = 0,882$) a Peak trombin ($r = 0,637$), ostatní parametry nekorelují.

Ve druhé skupině, které byl aplikován nízkomolekulární heparin Clexane s.c. v dávce 0,4 ml/den jsme pro hodnocení účinnosti antikoagulační léčby sledovali hodnoty anti-Xa a následně porovnávali s jednotlivými parametry křivky generace trombinu.

U pacienta č. 2, 3, 5, 7, 8, 9 a 10 se pohybovaly hodnoty anti-Xa v doporučeném rozmezí. U pacienta č. 1 byla jedna hodnota vyšší. U pacienta č. 4 byla jedna hodnota nižší a dvě hodnoty nebyly měřeny, protože nebyl dodržen čas odběru 4 hodiny po aplikaci Clexane. U pacienta č. 6 byla jedna hodnota nízká. Pravděpodobně nebyl také dodržen čas odběru 4 hodiny po aplikaci Clexane. Všechny hodnoty anti-Xa byly nahlášeny lékaři Trombotického centra a individuálně byla upravena dávka Clexane. Při posledních kontrolních odběrech se u devíti pacientů hodnota

anti-Xa pohybovala v požadovaném rozmezí. Ze vzorku poslední kontroly jsme prováděli i měření trombin generačního času a zařadili jsme i vzorek s nízkou hodnotou anti-Xa.

U parametrů TGT není vidět prokazatelný vliv účinku LMWH na snížení generace trombinu. U parametrů AUC, Peak trombin a VI jsou uváděny obě meze normálních hodnot, protože výsledky prolínají i toto rozmezí. U parametrů tLag a tPeak jsou snížené hodnoty, proto je uváděna pouze dolní mez normálních hodnot. Dobrou korelaci vykazují parametry AUC ($r = 0,984$) a Peak trombin ($r = 0,991$) a VI ($r = 0,884$), ostatní parametry nekorelují.

Výsledky kompletních vyšetření zde nejsou hodnoceny, jsou pouze doloženy v příloze. Výsledky nevykazují velké odchylky.

6. Závěr

I přes pokroky ve vývoji antikoagulancií, zůstávají heparin a warfarin nejpoužívanějšími léčivy při léčbě i prevenci. Vzhledem k tomu, že jejich působení má velmi úzké rozmezí, spolupráce z laboratoří je nutná. Laboratoř provádí trombofilní screening a monitoring aplikovaných dávek. Rychlým dodáním výsledků pomáhá při nastavení dávky antikoagulační léčby, při řešení krvácivých nebo trombotických příhod a umožňuje včasné odhalení komplikovaných případů a neadekvátně reagujících pacientů, kterým je následně nutné léčbu změnit.

Při porovnání skupin se dvěma typy antikoagulační léčby jsme si ověřili, že pro monitorování léčby warfarinem je rychlé a spolehlivé vyjádření výsledků v INR. Metoda je jednoduchá, dobře standardizovatelná a je proveditelná i na jednodušších typech koagulometru. Warfarin vykazuje vliv na sníženou generaci trombinu, takže by se pomocí TGT mohl vliv léčby sledovat. Metoda ale zatím není běžně dostupná v laboratořích a provedení a vyhodnocení je obtížnější než koagulační stanovení protrombinového času.

Při podávání LMWH je spolehlivou metodou měření aktivity anti-Xa a při správně provedeném odběru může lékař nastavit dávku LMWH podle získaného výsledku. Metoda je jednoduchá, dobře standardizovatelná, ale je proveditelná pouze na koagulometrech s chromogenním kanálem. Nízkomolekulární heparin nevykazuje výrazný vliv na sníženou generaci trombinu, takže tato metoda není vhodná na sledování vlivu léčby.

Tak jako farmaceutické firmy vyvíjely a vyvíjí nová antikoagulantia, zdokonalují se i metody ke kontrole jejich účinnosti a laboratoř zůstane v této oblasti pro lékaře spolehlivým pomocníkem a partnerem.

7. Seznam literatury

1. PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu, Fyziologie a patofyziologie hemostázy*, Český Těšín, FINIDR, 2004 , s. 237, ISBN 80-86682-03-X.
2. KVASNIČKA, J. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*, Praha, Grada Publishing a.s., 2003, s. 299, ISBN 80-7169-993-4.
3. COLLEGE, D. *Role of the plasminogen system in fibrin – homeostasis and tissue remodeling*, Hematology 2001. American society Education Program Blood, ISSN 1520-4391, Orlando Florida, 2001, s 1-9.
4. HOFFMAN M., MONDE, D. M. *A Cell – based model of hemostasis*. *Tromb. Haemost.*,85, 2001, s. 958-965.
5. WALKER, F. J., FAY, P. J. *Regulation of blood coagulation by the protein C system*. *FASEB J.G*, 1992, s.2561 – 2567.
6. KVASNIČKA, T. *Trombembolismus a antikoagulační terapie, přehled perspektivy*, pub. 8.9.2010, [http:// www.zdn.cz/clanek/ postgraduální-medicína](http://www.zdn.cz/clanek/postgraduální-medicína), (tisk 8.3.2011).
7. BULTAS, J., KARETOVÁ, A. *Protidestičková a antikoagulační léčba*, II. Interní klinika 1. LF UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, pub. 2. 10. 2003, <http://www.remedia.cz>. /(tisk 8.3.2011).
8. PENKA, M.,BULIKOVÁ, A., MATÝŠKOVÁ, M., ZAVŘELOVÁ, J., *Hematologie I, Neonkologická hematologie*, GRADA Publishing, spol.s.r.o.,2001, 204+10, s.ISBN 80-247-0023-9.
9. PUCHMAYER, V., ROZTOČIL, K. *Praktická angiologie*, Praha, Triton, 2000, s.191.
10. EUROPEAN CONSENZUS STATEMENT, *Preventive of venus tromboembolism*. Windsdor, 1991, UK, London, Med-Orion Publ. Co., 1993, s. 20.
11. HIRSH, J.,et al.*The antitrombotic and thrombolytic therapy*, American College of Chest Physicians Evidence – Based Clinikal Guideliness (8 th Edition). Chest, 2008, 133, s. 6.

12. CHLUMSKÝ a kolektiv., *Antikoagulační léčba*, Grada Publishing, a.s., 2005, 220 s. ISBN 80-247-9061-0.
13. KELLER, P. *Léčba orálními antikoagulancii*, Hematologicko transfúzní oddělení, Okresní nemocnice, Pelhřimov, Praha, 2000, 2.vydání, 64 s., ISBN 80-238-6017-8.
14. VOJÁČEK, J., MIKLÍKOVÁ, M., ŠEVČÍKOVÁ, H., ŠEVČÍK, R. *Antitrombotická léčba a její klinické monitorování-pohled kardiologa* 1. interní klinika LF UK v Hradci Králové a FN Hradec Králové, Bloky přednášek, X a XI Česko-Slovenská konference laboratorní hematologie s mezinárodní účastí.
15. HÁJEK, R., ZEŽULA, R., FLUGER, I., RŮŽIČKOVÁ, J. *Význam trombelastografie pro monitorování hemostázy v kardiochirurgii*, Kardiochirurgická klinika FN Olomouc, Inter. Akut. Kardiol., 2005, 4: 244-228.
16. SOP klinických laboratoří ÚKBLD, VFN a 1. LF UK, Praha 2009.
17. SOP- ÚKBLD-CHLTC-KOA-27, PiCT.
18. KVASNIČKA, J. *Doporučení společnosti pro trombózu a hemostázu, Prevence žilní tromboembolické nemoci v ortopedii*, 2009, wwwtrombosis.cz.
19. PECKA, M., a kolektiv, *Praktická hematologie, Laboratorní metody*, Afinity art, s.r.o., Český Těšín, 2010, první vydání, 343s., ISBN 978-80-903871-9-5.
20. GEBAUEROVÁ, M., *Antikoagulační léčba, prevence trombózy, warfarin, kontrola účinnosti, selfmonitoring, Coagu-check S*, Nové směry v kontrole účinnosti antikoagulační léčby, <http://www.remedia.cz/tisk> 8. 3. 2011.
21. SANDSETH, P. M., BENDZ, B. HANSEN, J. B. *Phhysiological fiction of tissue factor pathway inhibitor and interaction with heparins*. Hemostasis, suppl. 2, 2002, s. 48-46.
22. ROSENDAAL, F. R., *Venous thrombosis: a multicausal disease*. Lancet, 3. 4. 1999, 353(9159):1167-73.
23. KVASNIČKA J., *Heparin a nízkomolekulární hepariny v prevenci a léčbě hyperkoagulačních stavů*. Farmakoterapeutické informace. Praha, SÚKL, 5, 1999, s. 1-4, ISSN: 1211-0647

24. HEROLD, G. Et al., *Vnitřní lékařství 2000: systematické vnitřní lékařství pro studenty i lékaře*, Praha, Petr Dlouhý, 2000, s. 735, ISBN 80-238-6356-8

25. DRÁBKOVÁ D., KOHOUTOVÁ S., *Monitorování léčby heparinem*, Florence: časopis moderního ošetrovatelství, číslo 04/2010, 6/9–11

8. Přílohy