

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

## **Bakalářská práce**

**Vyšetření trombofilních stavů v oblasti Ústeckého  
kraje a monitorování léčby**

2011

Jana Šklíbová

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

**Vyšetření trombofilních stavů v oblasti Ústeckého kraje a  
monitorování léčby**

(Bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Odborný školitel: Mgr. Petr Sadílek

Ústí nad Labem, 2011

Jana Šklíbová

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum: 10. 8. 2011

Podpis:

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce panu proděkanovi PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za pomoc a cenné rady. Mému školiteli Mgr. Petru Sadílkovi z FN Hradec Králové za připomínky a pomoc při zpracování této práce. Poděkování patří mé rodině za velikou podporu po celou dobu mého studia.

## Obsah:

1. Úvod .....	9
2. Zadání - cíl práce.....	10
3. Teoretická část .....	11
3.1. Hemostáza .....	11
3.2. Poruchy hemostázy .....	12
3.3. Trombofilní stavy.....	12
3.3.1. Vrozené trombofilní stavy .....	13
3.3.2. Získané trombofilní stavy.....	15
3.4. Trombóza.....	16
3.4.1. Žilní trombóza.....	17
3.4.2. Arteriální trombóza .....	17
3.5. Indikace vyšetření trombofilních stavů .....	17
3.6. Význam znalosti trombofilních stavů v prevenci venózního tromboembolismu (VTN).....	18
3.7. Léčba trombofilních stavů .....	18
3.7.1. Antikoagulační léčba a její monitorování .....	18
3.7.2. Antiagregační léčba .....	21
3.7.3. Trombolytická léčba .....	21
3.7.4. Substituční léčba.....	22
4. Metody, materiál a přístroje .....	23
4.1. Principy použitých metod.....	23
4.1.1. Stanovení počtu krevních destiček (Plt) na analyzátoru krevních buněk.....	23
4.1.2. Stanovení protrombinového testu (PT).....	23
4.1.3. Stanovení aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (APTT).....	23
4.1.4. Stanovení funkční aktivity antitrombinu (AT) .....	24
4.1.5. Stanovení funkční aktivity proteinu C (PC).....	24
4.1.6. Stanovení funkční aktivity proteinu S (PS) .....	24

4.1.7.	Stanovení rezistence na aktivovaný protein C (APC-R) .....	24
4.2.	Fyziologická rozmezí použitých metod.....	25
4.3.	Použitý materiál.....	25
4.3.1.	Charakteristika souboru pacientů .....	25
4.3.2.	Vyšetřovaný materiál .....	26
4.4.	Použité reagensie a kontrolní materiály .....	26
4.5.	Stabilita použitých reagensí a kontrolních materiálů.....	27
4.6.	Použité přístroje a pomocná zařízení .....	28
4.6.1.	Automatický analyzátor krevních buněk LH 750, Beckman Coulter .....	28
4.6.2.	Automatický koagulometr STA-R, Diagnostica Stago .....	28
4.6.3.	Pomocná zařízení.....	29
5.	Praktická část.....	29
5.1.	Pracovní postup.....	29
5.2.	Tabulky s naměřenými hodnotami a grafické výstupy .....	30
5.3.	Statistické vyhodnocení naměřených dat .....	43
6.	Diskuze.....	44
7.	Závěr .....	45
8.	Seznam zkratek.....	46
9.	Seznam literatury .....	48

## **Abstrakt**

**Jana Šklíbová:**

### **Vyšetření trombofilních stavů v oblasti Ústeckého kraje a monitorování léčby**

Tato práce se zabývá trombofilí – vrozenou nebo získanou poruchou hemostatického mechanismu, která vede ke zvýšenému výskytu trombóz a tromboembolismu (TEN). Včasnou diagnostikou a včasným zahájením preventivní léčby je však možné vzniku trombózy zabránit.

Náplní bakalářské práce bylo změřit vybraná hematologická laboratorní vyšetření trombofilních markerů - počtu krevních destiček, protrombinového testu, aktivovaného parciálního tromboplastinového testu, funkční aktivity antitrombinu, proteinu C, proteinu S a rezistenci na aktivovaný protein C u dvou skupin pacientů a jedné kontrolní skupiny. Do první skupiny byli zařazeni pacienti, kteří dosud trombózu neprodělali, ale měli rizikové faktory jejího vzniku (např. pozitivní rodinnou anamnézu, opakované ztráty plodu, komplikace v těhotenství a další). Do druhé skupiny byli zařazeni pacienti po prodělané hluboké žilní trombóze. Naměřená data byla statisticky vyhodnocena s cílem zjistit, zda se od sebe soubory statisticky významně liší.

Ke statistickému vyhodnocení byly použity statistické testy D'Agostino k testování normality rozdělení hodnot a párový t-test či Mann Whitneyův test ke srovnání jednotlivých parametrů obou souborů pacientů. Pro žádný z parametrů jsme nezískali p-hodnotu menší než 0,05, z čehož vyplývá, že se soubory pacientů s trombózou a bez trombózy statisticky významně neliší.

## **Abstract**

**Jana Šklíbová:**

### **The Occurrence of Prothrombotic States in the Ústí n. L. Region and Their Treatment Monitoring**

This thesis deals with thrombophilia - either an inherent or acquired defect in haemostasis mechanisms which causes heightened inclination to thromboembolism. Early recognition of prothrombotic states as well as general risk markers in patients and an early treatment can reduce the occurrence of thrombosis and thromboembolism, thus saving many a life.

The focus of this Bachelor Thesis has been on performing selected thrombophilic marker tests - a blood-platelet count, prothrombin test, activated partial thromboplastin time test [aPTT], antithrombin test, protein C test, protein S test and activated protein C test) on 2 groups of patients and a control group. The first group consisted of people who had not yet suffered from thrombosis, but demonstrated symptoms of risk factor presence (e.g. a family history, repeated miscarriages, pregnancy complications, etc.). The second group included patients who had recently had deep vein thrombosis. The data obtained from the tests have been evaluated statistically in order to find out whether the two sets of subjects are significantly different from each other.

For the statistical evaluation, D'Agostino method for testing normality of value distribution, a paired t-test and Mann Whitney test have been used to compare the two groups of patients. The p-value obtained in each parameter has not been lower than 0.05, which suggest a conclusion that the two sets of patients – one with and the other without thrombosis – are not statistically different.



# 1. Úvod

Na následky tromboembolismu (TEN) umírá ve světě i v České republice stále velké množství lidí. Tyto počty by mohly být výrazně nižší, kdyby byla trombofilie včas odhalena a léčena.

K včasnému odhalení trombofilie se provádějí zejména základní hematologická vyšetření, nejčastěji stanovení počtu krevních destiček (Plt), protrombinového testu (PT), aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (APTT), funkční aktivity antitrombinu (AT), koncentrace fibrinogenu (FBG) a D-dimerů. Ze speciálních hemokoagulačních vyšetření se stanovuje protein C (PC), protein S (PS), rezistence na aktivovaný protein C (APC-R), vyšetření protilátek typu lupus antikoagulans (LA) a funkční aktivity faktoru VIII.

K odhalení trombofilních stavů se dnes využívají také metody molekulární biologie, např. průkaz Leidenské mutace faktoru V, mutace protrombinu, mutace methylen-tetrahydrofolát reduktázy (MTHF). Z biochemických a imunologických vyšetření se stanovuje zejména hladina homocysteinu, C-reaktivního proteinu (CRP), antikardiolipinových (ACLA) a antifosfolipidových protilátek (APA).

Léčba trombofilních stavů musí být monitorována, aby nedocházelo ke krvácení v důsledku předávkování, nebo aby nebyla naopak nedostatečná. K monitorování léčby jsou opět používána základní hematologická vyšetření.

## **2. Zadání - cíl práce**

Cílem této práce bylo vyšetřit vybrané trombofilní markery - počet krevních destiček, protrombinový test, aktivovaný parciální tromboplastinový test, funkční aktivitu antitrombinu, proteinu C, proteinu S a rezistenci na aktivovaný protein C u dvou skupin pacientů a jedné kontrolní skupiny zdravých osob. První skupinu pacientů tvořili jedinci, kteří dosud trombózu neprodělali, ale měli rizikové faktory jejího vzniku, např. pozitivní rodinnou anamnézu, opakované ztráty plodu, komplikace v těhotenství a další. Do druhé skupiny byli zařazeni pacienti po prodělané hluboké žilní trombóze. Kromě samotného vyšetření trombofilních markerů bylo cílem práce naměřené výsledky statisticky vyhodnotit a zjistit, zda existují alespoň u některých vyšetření mezi těmito dvěma skupinami statisticky významné rozdíly.

## 3. Teoretická část

### 3.1. Hemostáza

Hemostáza je složitý děj, který vede k zástavě krvácení při poranění. Účastní se ho cévní stěna, buněčné součásti krve a enzymatické kaskády spolu s jejich inhibitory. Po utvoření krevní sraženiny probíhá fibrinolýza a hojení rány. Jednotlivé procesy krevního srážení musí být v rovnováze. Pokud dojde k jejímu vychýlení na stranu hyperkoagulace nebo hypokoagulace, může dojít k vážným zdravotním problémům nebo komplikacím.

Cévní stěna se na procesu hemostázy podílí několika způsoby. Hladká svalovina ve stěně cév způsobí vazokonstrikci, cévní endotel je místem interakcí jednotlivých složek hemostázy a zdrojem či zásobárnou některých důležitých látek účastnících se zástavy krvácení. (1)

Hlavním činitelem v procesu tzv. primární hemostázy jsou krevní destičky (trombocyty) a adhezivní proteiny (von Willebrandův faktor, fibronektin, vitronektin), které produkuje cévní endotel. Trombocyty se účastní procesu výstavby primární "destičkové" zátky. Nejprve dochází k aktivaci trombocytů, dále k jejich adhezi a změně tvaru s uvolňovací reakcí, následuje agregace trombocytů a vytvoření destičkového trombu. Krevní destičky také poskytují svůj fosfolipidový povrch k vazbě a reakci některých koagulačních faktorů. Také se účastní posledního děje primární hemostázy a to retrakce (smrštění koagula) a tím podporují uzavření rány. (2)

Dalším důležitým činitelem při srážení krve je plazmatický koagulační systém, který představuje komplexní enzymatický děj, při kterém dochází k postupné aktivaci koagulačních faktorů, což vede k tvorbě trombinu a posléze fibrinu. Výsledkem je vytvoření nerozpustné fibrinové sítě s cílem zástavy krvácení.

Tvorba trombinu musí být regulována, protože kdyby se trombinu vytvářelo příliš, mohlo by docházet k nadbytečné tvorbě fibrinu s následkem trombotických komplikací. Tuto funkci zabezpečují fyziologické inhibitory koagulace – hlavně antitrombin (AT), protein C (PC) a protein S (PS).

Hemokoagulační systém je dále regulován fibrinolytickým systémem, jehož hlavním úkolem je zabránit nadměrnému pokračování krevního srážení, které by mohlo vyústit v tvorbu nitrocévního koagula s následným uzavřením cévy. (3)

## 3.2. Poruchy hemostázy

Narušení rovnováhy výše popsaných prokoagulačních, antikoagulačních a fibrinolytických mechanismů může vyústit na jedné straně v trombofilní stavy s tendencí ke vzniku krevních sraženin v cévním řečišti a na straně druhé ve stavy krvácivé s rizikem hemoragie různé intenzity. Poruchy hemostázy mohou být vrozené i získané. Krvácivé stavy jsou charakteristické spontánními krvácivými projevy nebo krvácením, které je neúměrné stavům nebo podnětům, které jej vyvolaly. Vrozené defekty koagulačních faktorů se většinou vyskytují velice vzácně a většinou se týkají jen jednoho faktoru. Nejčastějšími vrozenými koagulopatiemi jsou hemofilie A, hemofilie B a von Willebrandova choroba. (4)

## 3.3. Trombofilní stavy

Jako trombofilní stav označujeme:

- žilní trombózy ve věku pod 45 let
- recidivující trombofilní příhody
- neobvyklou lokalizaci trombózy
- tepenné trombózy před 35. rokem života
- pozitivní rodinnou anamnézu
- opakované předčasné ukončení gravidity (5)

Trombofilní stavy jsou vrozené nebo získané predispozice ke vzniku krevních sraženin v cévním řečišti, které vznikají narušením hemostatické rovnováhy z důvodu poruchy některého z hemostatických mechanismů. Uplatňují se zde jak faktory vrozené, tak i získané. Vznik trombofilních komplikací většinou podmiňuje kombinace několika rizikových faktorů. Mezi získané rizikové faktory patří obezita, kouření, hormonální léčba, rozsáhlé operace v chirurgii a ortopedii, imobilizace, varixy, záněť a těhotenství. Mezi vrozené rizikové faktory můžeme zařadit mutace faktoru V (např. Leidskou mutaci), mutace protrombinu, dysfunkci fibrinogenu, abnormality fibrinolýzy, vysokou hladinu homocysteinu, deficit antitrombinu (AT), deficit proteinu C (PC), proteinu S (PS) a vysokou hladinu faktoru VIII. Další možné rizikové faktory jsou stáza krve, patologie cévní stěny či poruchy koagulačních faktorů a inhibitorů.

Příčinou trombofilních stavů jsou většinou výše zmíněné kombinace rizikových faktorů. (5)

### **3.3.1. Vrozené trombofilní stavy**

Riziko trombofilních komplikací v případě vrozených trombofilních stavů závisí na tom, zda se mutace vyskytují v homozygotní nebo heterozygotní formě. U homozygota je riziko vzniku trombózy mnohem vyšší než u heterozygota.

#### **3.3.1.1. Rezistence na aktivovaný protein C (APC-R)**

Rezistencí na aktivovaný protein C vzniká nedostatečná odpověď na aktivovaný protein C. Vrozená APC-R je nejčastěji vyvolána jednobodovou mutací genu pro koagulační faktor V, tzv. Leidenskou mutací. Vlivem APC-R dochází ke snížení rychlosti štěpení FVa a tím k jeho pomalé inaktivaci. Důsledkem je delší stabilita protrombinového komplexu s možností rozvinutí hyperkoagulačního stavu a s rizikem vzniku trombózy. (6) Leidenská mutace faktoru V se v naší zdravé populaci vyskytuje nejčastěji ze všech dědičných poruch, které způsobují trombofilii. Její incidence je asi 25 % a klinickým obrazem jsou žilní trombózy. Riziko tromboembolických komplikací se u heterozygotní formy Leidenské mutace zvyšuje přibližně 5 až 10 krát a u homozygotní formy asi 50 až 100 krát oproti zdravé populaci. (7)

Dalším příkladem jednobodové mutace faktoru V je mutace Cambridge, která je méně významná než Leidenská mutace, neboť se v naší populaci vyskytuje velmi vzácně. (4)

#### **3.3.1.2. Mutace protrombinu G20210A**

Mutace protrombinu (faktoru II) může způsobit zvýšení hladiny protrombinu v plazmě a ta může být příčinou žilní trombózy s incidencí 1-2 %, u osob bez dosud prodělané trombózy, u pacientů s prodělanou žilní trombózou je to 2 až 20 %. Tato mutace je možným rizikovým faktorem i pro arteriální trombózu. (8)

#### **3.3.1.3. Deficit antitrombinu (AT)**

Antitrombin (AT) je nejsilnějším přirozeným inhibítorem trombinu a ostatních serinových proteáz, faktorů XIIa, XIa, Xa, IXa a komplexu tkáňového faktoru a faktoru VIIa. Jeho syntéza probíhá především v játrech a hlavní funkcí AT je inhibice volného

trombinu a FXa, dále je kofaktorem pro heparin, který je bez účasti AT neúčinný. Vrozený nedostatek antitrombinu rozdělujeme na dva typy:

- Deficit antitrombinu I. typu – snížená funkční aktivita je provázena zároveň sníženou hladinou antigenu antitrombinu
- Deficit II. typu – dysfunkce antitrombinu – prokazuje se normální hladina antigenu, ale snížená funkční aktivita.

Výskyt vrozeného defektu AT je asi u 0,02 % osob a riziko vzniku hluboké žilní trombózy se zvyšuje oproti zdravé populaci asi 10 krát. (9)

Klinickým projevem deficitu antitrombinu jsou nejčastěji hluboké žilní trombózy nebo plicní embolie, vzácně může docházet k tepenným příhodám. K trombózám dochází většinou u pacientů do věku 35 let. (10)

#### **3.3.1.4. Defekty systému proteinu C**

Systém proteinu C je tvořen proteinem C, proteinem S a trombomodulinem. Je schopen inaktivovat štěpením aktivované koagulační faktory V a VIII.

Z klinického hlediska lze defekt systému proteinu C rozdělit:

- Typ I – nízká funkční aktivita proteinu C (resp. proteinu S) je provázena nízkou hladinou antigenu proteinu C (resp. proteinu S)
- Typ II – dysfunkce systému proteinu C - nízká funkční aktivita při normální hladině antigenu proteinu (9)

Klinickým projevem poruchy systému PC jsou žilní i arteriální trombózy. Zvláštním syndromem je purpura fulminans, která může končit smrtí u novorozenců a u homozygotů. Tento syndrom může často vyvolat tzv. kumarinovou nekrózu při zavádění léčby perorálními antikoagulancii. Za příčinu se považují mikrotrombózy kapilár, které mohou poškodit cévní stěnu. (11) U osob s nedostatkem PC se zvyšuje riziko žilní trombózy asi 8-10 krát oproti osobám s normální hladinou. Je to vrozené autozomálně dominantní onemocnění s prevalencí v populaci 1/500 obyvatel a může se klinicky projevit již v dětství, ale nejčastěji mezi 20. až 50. rokem. Defekt proteinu S je způsoben mutacemi genu, kterých je známo přibližně 70. Vrozený deficit PS, rovněž spojený se žilním tromboembolismem, se vyskytuje v 1 až 5 % u nemocných

se žilní trombózou. Heterozygot s deficitem PS má 5-10 krát vyšší tendenci k žilní trombotizaci než jedinci s normální hladinou. Prevalence defektu PS v normální populaci je méně než 0,13 %. (9)

### 3.3.1.5. Prevalence trombofilii

Prevalence nejvýznamnějších geneticky podmíněných trombofilních poruch se výrazně liší u jednotlivých etnik. Příklady prevalencí některých trombofilii v evropské populaci u pacientů s tromboembolickou nemocí jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tab. 1. Prevalence trombofilii u pacientů s tromboembolickou nemocí (TEN). (12)

<b>TROMBOFILIE</b>	<b>PREVALENCE U PACIENTŮ S TEN</b>
<b>zvýšená hladina faktoru VIII</b>	25 %
<b>mutace faktoru V LEIDEN</b>	20 %
<b>hyperhomocysteinemie</b>	10 %
<b>mutace protrombinu</b>	7,1 %
<b>deficit proteinu S</b>	2,3 %
<b>deficit proteinu C</b>	3,7 %
<b>deficit antitrombinu</b>	3,0 %

### 3.3.2. Získané trombofilní stavy

Mezi klinicky nejvýznamnější získané trombofilní stavy patří antifosfolipidový syndrom, rezistence na aktivovaný protein C, která nevznikla mutací genu pro faktor V, myeloproliferativní onemocnění, stavy po prodělané trombóze, malignity, závažná respirační onemocnění, autoimunitní choroby, gravidita a šestinedělí, léčba estrogeny, chronické střevní záněty, septické stavy, srdeční insuficience a další. (8)

#### 3.3.2.1. Antifosfolipidový syndrom (APS)

Antifosfolipidový syndrom je autoimunitní onemocnění, které se projevuje přítomností a tvorbou antifosfolipidových protilátek. Současně se vyskytují klinické projevy, nejčastěji tromboembolické stavy v arteriálním nebo žilním řečišti (mikrotrombotizace). Při nálezů antifosfolipidových protilátek a v přítomnosti klinického projevu trombofilního stavu se jedná o antifosfolipidový syndrom (APS).

U APS rozlišujeme dva typy antifosfolipidových protilátek – protilátky typu lupus antikoagulans (LA) a antikardiolipinové protilátky (ACLA). Protilátky typu lupus antikoagulans jsou nejčastěji tvořeny imunoglobuliny třídy IgG nebo IgM a jsou přítomny zejména u nemocných se systémovým lupus erythematoses (SLE). Jejich přítomnost lze rozpoznat prodlouženým koagulačním testem APTT. Tyto protilátky se vyskytují i u jiných systémových chorob pojiva. Jejich tvorba může být vyvolána i některými léky, dále u nemocných s maligními lymfomy a u některých infekčních chorob. (13)

### **3.3.2.2. Získaný typ APC-R**

Tento typ je podmíněný dysbalancí mezi prokoagulačními a antikoagulačními proteiny. Získaný typ APC-R je provázen stejnými klinickými projevy a zvýšeným rizikem trombózy jako je tomu u vrozeného typu. (8)

### **3.3.2.3. Zvýšená koncentrace faktoru VIII**

Riziko hluboké žilní trombózy (VTE) se zvyšuje přímo úměrně se stoupající hladinou F VIII. U některých jedinců, kteří mají hladinu FVIII nad 150 % se zvyšuje riziko VTE až 6 krát oproti zdravé populaci. Koncentrace FVIII se může zvyšovat např. v těhotenství či užíváním perorální antikoncepce, zvyšuje se také s přibývajícím věkem. (6)

## **3.4. Trombóza**

Etiologie trombózy je multifaktoriální, podílí se na ní interakce genové, vliv prostředí, věk a kombinace dalších rizikových faktorů. Vytvořená překážka v žilním řečišti (trombus) zapříčiní zpomalení toku krve až úplnou stázu krve s poruchou prokrvení se všemi jejími důsledky (ischemizace, nekróza). Kromě místních poruch prokrvení může dojít k embolizaci trombu (embolu) např. do plicního řečiště s fatálními následky.

Při hluboké žilní trombóze (VTE) se v žilách, zpravidla dolních končetin, tvoří krevní sraženiny. Klinicky se stav projevuje otokem, pocitem napětí, změnou barvy, citlivostí, objevují se klaudikační potíže. Vznik nebo průběh trombózy zhoršují další rizikové faktory jako dehydratace, nikotin, polyglobulie. Podle výskytu vzniku krevní sraženiny můžeme trombózy dělit na arteriální a žilní. (14)



### **3.4.1. Žilní trombóza**

Hluboká žilní trombóza (VTE) je závažné onemocnění, které v České republice ročně postihne až 20 000 nových pacientů. Příčinou vzniku VTE je stáza krve a aktivace koagulace s tvorbou červeného fibrinového trombu. Stáza krevního proudu zvyšuje lokálně koncentraci koagulačních plazmatických faktorů a leukocyty začnou uvolňovat zánětlivé cytokiny, které spolu s ischemií, ke které dochází při stagnaci neokysličené krve, přispívají k protrombotické aktivaci buněk žilní výstelky. Vznik žilní trombózy také podporuje zhoršení reologických poměrů např. při relativním zvýšení hematokritu po dehydrataci. (9)

### **3.4.2. Arteriální trombóza**

Na vzniku arteriální trombózy se podílejí především dva mechanismy - dysfunkce cévního endotelu, která je většinou způsobená ateromatózními změnami a zvýšenou aktivací trombocytů. Aterosklerotický plát vzniká za účasti procesu přestavby cévní stěny, což je vícestupňový proces, ve kterém dominuje ukládání tukových látek. (14) Tvorba trombu na porušeném cévním endotelu je hlavním mechanismem vzniku např. akutních koronárních syndromů (AKS) nebo mozkových cévních příhod. Mezi AKS řadíme infarkt myokardu (IM) a nestabilní anginu pectoris. Krevní destičky se podílejí na vzniku tzv. bílého trombu, který tvoří vzájemným shlukováním mezi sebou. Propojení mezi destičkami zajišťuje fibrinogen nebo von Willebrandův faktor (vWF). (4) Mezi rizikové faktory arteriosklerózy patří hyperlipoproteinemie, diabetes mellitus, arteriální hypertenze, kouření, ateroskleróza, obezita, pozitivní rodinná anamnéza arteriálních cévních příhod v mladém věku, hyperhomocysteinemie a mutace methylen-tetrahydrofolát reduktázy (MTHFR). (14)

## **3.5. Indikace vyšetření trombofilních stavů**

Vyšetření trombofilních stavů jsou prováděna na specializovaných pracovištích, která diagnostikují komplexní poruchy hemostázy. Vyšetření trombofilních stavů jsou indikována u pacientů s již prodělanou trombotickou příhodou, plicní embolií nebo prokazatelnou rodinnou zátěží. Tato vyšetření by měla být provedena zejména u žen s pozitivní rodinnou anamnézou před zahájením substituční hormonální terapie nebo před podáváním hormonální antikoncepce, eventuelně u pacientů před rozsáhlými např. ortopedickými operacemi. Před laboratorním vyšetřením trombofilních stavů je vždy velmi důležitá řádně provedená

rodinná a osobní anamnéza. Klinické projevy u pacienta jsou velmi významné pro správnou diagnostiku. (7) Detekce trombofilních stavů se skládá z vyšetření genetického, koagulačního, imunologického a biochemického.

### **3.6. Význam znalosti trombofilních stavů v prevenci venózního tromboembolismu (VTN)**

Znalost rizikových faktorů a trombofilních markerů trombózy je klíčová v rámci prevence vzniku VTN. (15) Jednou z prevencí vzniku trombóz je profylaxe a můžeme jí rozdělit na primární (u osob, které ještě trombózu neprodělaly) a sekundární (po již prodělané trombóze). U primární profylaxe jsou důležitá preventivní opatření např. brzká mobilizace pacienta v nemocnicích po operacích, cvičení s dolními končetinami, používání kompresivních punčoch, dostatečná hydratace organismu. Důležitou úlohu má podávání vhodné farmakologické profylaxe, zvláště v rizikových situacích, jako je např. rozsáhlá ortopedická operace, chirurgické břišní operace apod. Nejvíce doporučovaná je profylaxe nízkomolekulárními hepariny (např. Clexane, Fraxiparine, Fragmin atd.). Sekundární profylaxe spočívá ve farmakologické léčbě po již prodělané trombóze a nejčastěji se doporučují antagonisté vitamínu K, léky Warfarin nebo Lawarin. Někteří jedinci mají užívání Warfarinu kontraindikováno, proto se u nich i pro sekundární profylaxi používají nízkomolekulární hepariny. Délka užívání profylaxe je velice individuální a je závislá na vzniku a rozsahu trombózy, na počtu recidiv, trvání spouštěcího faktoru (např. aktivní nádor) atd. (6)

### **3.7. Léčba trombofilních stavů**

Terapie trombofilních stavů je zaměřena na potlačení hyperkoagulačního stavu, který nastal v důsledku nerovnováhy hemostatických mechanismů. Léčbu můžeme rozdělit podle účinných látek, které působí na určitou část hemostázy. Při antikoagulační léčbě jsou užívána antikoagulancia (hepariny, kumariny); proti účinku krevních destiček jsou užívány např. inhibitory cyklooxygenázy a léčba se nazývá protideštičková (antiagregační).

#### **3.7.1. Antikoagulační léčba a její monitorování**

V případě prokázání a stanovení diagnózy trombofilního stavu se podávají antikoagulační preparáty, které mají zabránit zvýšené tendenci ke krevnímu srážení,

eventuelně dalšímu rozvoji trombu již vzniklého. Antikoagulancia jsou indikována jak v rámci prevence tak i jako léčba trombóz a tromboembolických komplikací. Antikoagulancia se dělí podle mechanismu účinku na přímá a nepřímá.

### **3.7.1.1. Přímá antikoagulancia**

Přímá antikoagulancia blokují trombin či další aktivované koagulační faktory. Jejich účinek je okamžitý po jejich podání, proto jsou indikována u urgentních případů. V klinické praxi jsou k dispozici dva základní léčebné přístupy, které se navzájem doplňují:

- nepřímé inhibitory trombinu např. heparin a jeho frakcionované formy, pentasacharidy
- přímé inhibitory trombinu např. hirudin, gatrany, xabany (8)

#### **3.7.1.1.1. Nepřímé inhibitory trombinu a FXa**

Heparin patří mezi nepřímé inhibitory trombinu. Jedná se o přirozený glykosaminoglykan, který společně s antitrombinem (AT) inhibuje trombin a indukuje uvolňování přirozeného inhibitoru tkáňového faktoru (TFPI). Rozlišujeme 2 typy heparinu. (16)

Nefrakcionovaný heparin (UFH) - unfractionated heparin potence inhibici aktivovaného trombinu (má anti-FIIa aktivitu), zároveň inhibuje aktivovaný FX (FXa) po vazbě s antitrombinem. UFH je indikován např. u žilní trombózy, akutního tepenného uzávěru, nestabilních ateromatózních plátů a podává se v intravenózní formě s pravidelnou kontrolou léčby prostřednictvím APTT, cca v 6 hodinovém intervalu, s cílem dosáhnout prodloužení APTT na 1,5 až 2 násobek normy. UFH lze podávat i preventivně např. u pooperačních stavů. V současnosti je tato možnost nahrazována nízkomolekulárními hepariny (LMWH). Výhodou terapie UFH je existence antidota protamin sulfátu (chloridu) – 1 mg neutralizuje asi 100 IU heparinu. Nevýhodou heparinu oproti LMWH je častý výskyt alergie, osteoporózy a heparinem indikované trombocytopenie (HIT). (10)

Nízkomolekulární hepariny (LMWH) – low-molecular weight heparin jsou preparáty připravované frakcionací klasického heparinu a působí zejména na FXa. Dnes je dáována přednost LMWH před UFH pro jednoduchou subkutánní aplikaci a

Ize je tedy využít i v ambulantní praxi se srovnatelnými antitrombotickými účinky a minimem nežádoucích účinků. Faktem je, že není třeba laboratorních kontrol, ale výjimkou jsou pacienti s renální insuficiencí, obezitou či gravidní ženy. Laboratorní monitorování léčby lze provádět stanovením anti-Xa aktivity, v průběhu aplikace by měly být kontrolovány počty trombocytů. Využití LMWH je obdobné jako u UFH, uplatňují se také v léčbě AKS, IM, trombóz mozkových tepen, u hemodialyzovaných pacientů. Preventivně lze užít téměř ve všech chirurgických oborech, v graviditě (ženy s trombofilií), po prodělané TEN. Užívají se také v kombinaci s protidestičkovými léky. Výhodou oproti UFH je jejich dobrá předvídatelnost účinku, lepší biologická dostupnost, déletrvající účinek (cca 24 hodin), menší vliv na agregaci trombocytů a menší výskyt trombocytopenie. (10)

Do této skupiny patří také pentasacharidy, které působí zprostředkovaně přes antitrombin a selektivně blokují FXa. Jejich výhodou je jednoduché dávkování, dlouhodobý účinek, který je předvídatelný. Nevýhodou je neexistence antidota. Mezi syntetické pentasacharidy patří Fondaparinux a Idraparinux. Fondaparinux se aplikuje subkutánně jednou denně a používá se k léčbě embolie, AKS a k prevenci VTE po ortopedických a břišních operacích. Jeho výhodou je dobrá biologická dostupnost a není nutné laboratorní monitorování. Idraparinux se také podává subkutánně jednou denně. Jeho problémem je opožděná eliminace s rizikem krvácivých komplikací a opět neexistuje antidotum. (15)

#### **3.7.1.1.2. Přímé inhibitory trombinu a FXa**

Mezi přímé inhibitory trombinu a FXa patří hirudin, gatrany a xabany. Hirudin je přírodní antikoagulační peptid produkovaný pijavicemi (*Hirudo medicinalis*). Je to přirozený specifický inhibitor trombinu, který nepůsobí prostřednictvím antitrombinu. Preparáty se podávají k prevenci a k léčbě žilních trombóz. Gatrany působí přímou inhibicí trombinu, mají rychlý nástup a dlouhotrvající účinek. Používají se v profylaxi tromboembolické nemoci, fibrilace síní a v ortopedických indikacích. Xabany působí přímou inhibicí FXa a používají se např. při léčbě fibrilace síní. Jejich výhodou je perorální způsob podání, není nutné provádět laboratorní kontrolu.

Mezi nová antikoagulantia patří Rivaroxaban, Apixaban a Dabigatran etexilát. Rivaroxaban je selektivní inhibitor FXa, který má relativně dlouhý biologický poločas (1 až 2 dny) a používá se k prevenci TEN a po totální endoprotéze (TEP) kyčle nebo

kolene. Apixaban je neselektivní syntetická látka zacílená na aktivní místo FXa. Inhibuje FXa vazbou na komplex protrombinázy i vazbou na volný enzym. Dabigatran etexilát je přímý inhibitor trombinu a aplikuje se jednou denně ve formě tablety. Jeho využití je především při ortopedických operacích. (15)

### **3.7.1.2. Nepřímá antikoagulancia**

Nepřímá antikoagulancia působí inhibicí jaterní syntézy koagulačních faktorů, které jsou závislé na přítomnosti vitamínu K a vedou ke vzniku nefunkčních faktorů krevního srážení, proto mají opožděný účinek (až několik dní po prvním podání). Patří sem perorální kumarinové preparáty, které ireverzibilně inhibují vitamin K (antagonisté vitamínu K). Nejužívanějšími léky této skupiny jsou Warfarin a Lawarin. Tyto preparáty se podávají ke krátkodobému či dlouhodobému, eventuelně trvalému užívání dle diagnózy a přidružených rizikových faktorů. Účinek léčby musí být monitorován protrombinovým testem (PT), přičemž terapeutická hodnota INR by se měla pohybovat mezi 2 – 3,5. Antidotem je vitamin K, čerstvě zmražená plazma či koncentrát protrombinového komplexu. Léčba Warfarinem má jasné indikace např. profylaxi a léčbu tromboembolických chorob. Kontraindikací jsou krvácivé stavy, vředová choroba gastroduodenální, poškození CNS, infekční endokarditida, těžké poškození jater a ledvin. Nevýhodou kumarinových antikoagulancií jsou často nepředvídatelné interakce s některými léky a potravinami. (9)

### **3.7.2. Antiagregační léčba**

Je to terapie ovlivňující primární hemostázu, která má význam především u tepenných uzávěrů. Cílem léčby je narušení výstavby primární "destičkové" zátky se zamezením agregace trombocytů. Sem se řadí léky typu kyseliny acetylsalicylové (ASA), která nevratně inhibuje cyklooxygenázu (COX) a brání tak vzniku tromboxanu A<sub>2</sub> (TX A<sub>2</sub>). Dalším zástupcem je např. ticlopidin a clopidogrel inhibující ADP indukovanou agregaci trombocytů. Mírnější účinek má indobufen inhibující destičkovou COX. Laboratorní kontrolu antiagregační léčby lze provést vyšetřením agregability krevních destiček. (17)

### **3.7.3. Trombolytická léčba**

Tato léčba potencuje přeměnu plazminogenu na plazmin a tím vystupňovává fibrinolytickou aktivitu. Jedná se o nejinvazivnější přístup ze všech zmiňovaných antitrombotických postupů. Trombolytika dělíme na přímá a nepřímá. Mezi přímá

trombolytika patří tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA), který má vazebné místo pro fibrin a katalytické místo, které konvertuje plazminogen na plazmin. Streptokináza či urokináza patří mezi nepřímá trombolytika. Streptokináza nemá vlastní proteolytickou aktivitu a aktivuje fibrinolytický systém nepřímo. Vytváří komplex s plazminogenem, tento komplex pak aktivuje další molekuly plazminogenu na plazmin. Urokináza se používá k rozpouštění velkých např. plicních embolů. K rozpuštění čerstvých trombů nebo embolů se používá nejčastěji t-PA nebo kombinace t-PA se streptokinázou. Trombolytická léčba má svá rizika např. krvácení, alergie a další, proto je uplatňována pouze za podmínek splnění přísných indikačních kritérií. (16)

Monitorování trombolytické léčby se provádí pomocí trombinového testu (TT) a to pouze u kontinuálního podávání trombolytika. U jednorázového podání se monitorování neprovádí. (18)

#### **3.7.4. Substituční léčba**

Tato terapie je indikována k doplnění snížené hladiny inhibitorů krevního srážení. Jedná se např. o suplementaci antitrombinu nebo proteinu C v případě „purpury fulminans“ u novorozenců s homozygotním defektem.

## 4. Metody, materiál a přístroje

### 4.1. Principy použitých metod

#### 4.1.1. Stanovení počtu krevních destiček (Plt) na analyzátoru krevních buněk

Počet krevních destiček je změřen v rámci vyšetření krevního obrazu na analyzátoru krevních buněk LH 750 firmy Beckman Coulter impedančně. Jako výsledek se vydává počet krevních destiček v jednom litru.

#### 4.1.2. Stanovení protrombinového testu (PT)

K citrátové plazmě se přidá tkáňový tromboplastin obsahující vápenaté ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Sleduje se koagulační čas do vytvoření prvních fibrinových vláken. Výsledek se vydává jako poměr R času vyšetřované osoby ku času normální kontrolní plazmy u neléčených, nebo jako INR u pacientů léčených kumarinovými preparáty.

$$\text{PT-R} = (t_n/t_k)$$

$$\text{INR} = (t_n/t_k)^{\text{ISI}}$$

$t_n$  - čas vyšetřované osoby

$t_k$  - čas normální kontrolní plazmy

ISI - index citlivosti tromboplastinu

#### 4.1.3. Stanovení aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (APTT)

V přítomnosti purifikovaných fosfolipidů destičkového typu (nař. kefalín), vápenatých iontů a povrchového aktivátoru na bázi křemičitanů dochází v plazmě chudé na destičky k aktivaci mediátorů vnitřní cesty přeměny protrombinu na trombin. Vzniklý trombin aktivuje následně přeměnu fibrinogenu na fibrin a posléze na nerozpustný fibrin. Výsledek se vydává jako poměr R času vyšetřované osoby ku času normální kontrolní plazmy.

$$\text{APTT-R} = \frac{\text{Čas vyšetřované osoby}}{\text{Čas normální kontroly}}$$

#### 4.1.4. Stanovení funkční aktivity antitrombinu (AT)

Testovaná plazma je v přítomnosti heparinu inkubována při 37 °C s přebytem aktivovaného faktoru X. AT přítomný ve vyšetřované plazmě vytvoří s heparinem a faktorem Xa trimerní komplex. Zbytkový FXa v dalším kroku reaguje se substrátem a uvolňuje z něj žlutě zbarvený chromofor (p-nitroanilin). Intenzita zabarvení je nepřímo úměrná koncentraci AT v plazmě a je detekována spektrofotometricky při 405 nm. Jako výsledek se vydává hodnota funkční aktivity AT v %, odečtená z kalibrační křivky.

#### 4.1.5. Stanovení funkční aktivity proteinu C (PC)

K ředěné vyšetřované plazmě je přidán specifický aktivátor proteinu C (extrakt z jedu hada *Agkistrodon C. contortrix*). Po inkubaci je ke směsi přidán specifický chromogenní substrát. Aktivovaný protein C štěpí substrát za vzniku žlutě zbarveného chromoforu. Intenzita zabarvení je přímo úměrná aktivitě proteinu C ve vyšetřované plazmě. Jako výsledek se vydává hodnota funkční aktivity PC v %, odečtená z kalibrační křivky.

#### 4.1.6. Stanovení funkční aktivity proteinu S (PS)

Ředěná vyšetřovaná plazma je inkubována s protein S deficitní plazmou, aktivovaným proteinem C a aktivovaným faktorem V. Aktivovaný protein C společně s proteinem S (kofaktor) inhibuje faktor Va. Po přidání vápenatých iontů se sleduje stupeň prodloužení koagulačního času způsobený inaktivací faktoru Va. Prodloužení koagulačního času je přímo úměrné aktivitě proteinu S ve vyšetřovaném vzorku plazmy. Jako výsledek se vydává hodnota funkční aktivity PS v %, odečtená z kalibrační křivky.

#### 4.1.7. Stanovení rezistence na aktivovaný protein C (APC-R)

Sleduje se prodloužení APTT indukované aktivovaným proteinem C, který je přidáván s vápenatými ionty jako startovací reagentie. U každého vyšetřovaného



vzorku se změří dva časy: První čas = klasické APTT a druhý čas = APTT s přidavkem aktivovaného proteinu C (APC). Vyšetřují se vzorky, které jsou předředené plazmou deficitní na faktor V, kde jsou ostatní koagulační faktory v nadbytku. Koagulační časy s APC jsou prodloužené díky inhibičnímu účinku APC. Je-li přítomna Leidenská mutace faktoru V, aktivovaný protein C nemůže dostatečně projevit svoji inhibiční aktivitu (hodnoty APC ratio jsou pod 2). Jako výsledek se vydává poměr času vyšetřované osoby s přidavkem APC ku času vyšetřované osoby bez přidavku APC.

## 4.2. Fyziologická rozmezí použitých metod

Tab. 2 Fyziologické meze používaných metod

Metoda	Fyziologické meze	Léčba	Jednotky
PT-R	0,80 – 1,20	2,0 – 4,0	INR
APTT-R	0,9 – 1,1	2,0 – 4,0	ratio
AT	80 - 120		%
PC	70 - 140		%
PS	65 - 140		%
APC-R	>2		ratio
PLT	120 - 350		$\times 10^9/l$

## 4.3. Použitý materiál

### 4.3.1. Charakteristika souboru pacientů

Skupina 1 = soubor pacientů bez trombózy s rizikovými faktory pro vznik trombózy, je tvořen 25-ti jedinci (10 mužů a 15 žen).

Skupina 2 = soubor pacientů po první prodělané trombóze, je tvořen 25-ti jedinci (9 mužů a 16 žen).

Skupina 3 = kontrolní soubor, je tvořen 25-ti zdravými jedinci (11 mužů a 14 žen).

### 4.3.2. Vyšetřovaný materiál

Jako vyšetřovaný materiál jsem použila krev odebranou do  $K_3EDTA$  pro stanovení počtu trombocytů a citrátovou plazmu pro stanovení koagulačních parametrů od vybraných pacientů z hematologické poradny Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem.

Pro koagulační vyšetření je nutné dodržet správný poměr mezi krví a antikoagulačním činidlem, zkumavka musí být naplněna přesně po vyznačenou rysku. Dále je nezbytné ihned po odběru odebranou krev promíchat s antikoagulačním činidlem opakovaným převrácením odběrové zkumavky. Odebraný materiál je potřeba co nejrychleji dopravit do laboratoře, nejdéle do dvou hodin od odběru. Při příjmu vzorku laboratoří je identifikovaný materiál polepen čárovými kódy a zadán do laboratorního informačního systému (LIS). Vzorky citrátové krve jsou ihned centrifugovány 15 minut při 3800 ot./min.

### 4.4. Použité reagensie a kontrolní materiály

Pro koagulační vyšetření byly použity komerčně dostupné reagensie a kontrolní materiály od firmy Diagnostica Stago. Pro stanovení počtu krevních destiček byly použity roztoky od firmy Beckman Coulter.



Obr. 1 a 2 Použité reagensie od firmy Diagnostica Stago

## 4.5. Stabilita použitých reagensů a kontrolních materiálů

Tab. 3. Reagencie, kontrolní materiály a jejich stabilita

Metody	Reagencie	Stav	Teplota	Stabilita
Kontrola	Coag Norm	naředěné	15 -19 °C	4 hodiny
Kontrola	Coag Path	naředěné	15 -19 °C	4 hodiny
Kontrola	System Control N+P	naředěné	15 -19 °C	8 hodin
Kalibrace	Unicalibrator	naředěné	15 -19 °C	4 hodiny
Ředící roztok	Owren-Koller	po otevření	15 -19 °C	3 dny
Čistící roztok	Desorb U	po otevření	15 -19 °C	5 dny
Startovací reagencie	STA-CaCl <sub>2</sub> 0,025 M	po otevření	15 -19 °C	3 dny
PT	Neoplastine CI Plus 10	naředěné	15 - 25 °C	48 hodin
APTT	PTT Automate 10	naředěné	15 - 25 °C	24 hodin
AT	Stachrom ATIII	naředěné	15 -19 °C	7 dní
PC	Stachrom PC	naředěné	15 -19 °C	21 dní
PS	Staclot PS	naředěné	15 -19 °C	4 hodiny
APC-R	APC/CaCl <sub>2</sub>	naředěné	2 - 8°C	5 dní
APC-R	APTT reagens	po otevření	2 - 8°C	1 měsíc
APC-R	V-DEF. plazma	naředěné	2 - 8°C	24 hodin

## 4.6. Použité přístroje a pomocná zařízení

### 4.6.1. Automatický analyzátor krevních buněk LH 750, Beckman Coulter

Ke stanovení počtu krevních destiček na analyzátoru LH 750 firmy Beckman Coulter byl použit impedanční princip - naředěná suspenze krevních částic je pod tlakem nasávána do měřicí apertury. Vně a uvnitř apertury je polarizované stejnosměrné elektrické pole. Vnikne-li částice do apertury, změní se měrný odpor prostředí a vzniká napěťový impuls. Počet impulsů odpovídá počtu buněk prošlých aperturou a amplituda impulsu odpovídá objemu buňky.



Obr. č.3. a č.4. LH 750 a STA-R  
v laboratoři ÚL

### 4.6.2. Automatický koagulometr STA-R, Diagnostica Stago

Ke stanovení koagulačních parametrů byl použit automatický koagulometr STA-R firmy Diagnostica Stago. Tento mechanický koagulometr pracuje na dvou základních principech – koagulačním a optickým.

U koagulačního principu kmitá kulička pomocí magnetického pole v kyvetě a vlivem koagulačního procesu (tvorbou fibrinového vlákna) se zpomaluje její pohyb až dojde k jejímu úplnému zastavení, které se projeví změnou magnetického pole a

vybuzený elektrický impuls zastaví ukazatel času. (Citace, asi 4?) Takto stanovujeme protrombinový test, aktivovaný parciální tromboplastinový test, protein S a rezistenci na aktivovaný protein C.

Optický princip je založen na měření změny absorbance monochromatického světla při průchodu kyvetou při vlnové délce 405 nm. Takto stanovujeme funkční aktivitu antitrombinu a proteinu C.

#### **4.6.3. Pomocná zařízení**

Valivá třepačka, výkyvná plošina k promíchání vzorků, hlubokomrazicí box, lednice, laboratorní centrifuga Express.

## **5. Praktická část**

### **5.1. Pracovní postup**

1. Začala jsem přípravou reagensí, kalibrátoru a kontrolních plazem. Postupovala jsem dle doporučení výrobce (viz příbalové letáky). Po vytemperování lyofilizovaných reagensí na laboratorní teplotu jsem všechny naředila vodou pro injekce. Po naředění jsem nechala reagenii stát 30 min. při laboratorní teplotě a poté jsem je jemně promíchala.

2. Poté jsem provedla identifikaci reagensí načtením čárových kódů (na lahvičkách) a vložila je do přístroje. Veškeré reagenie musí být před měřením vytemperované na teplotu reagenční zásuvky přístroje (15 – 19 °C).

3. Provedla jsem kalibraci antitrombinu, proteinu C a proteinu S na kalibrační plazmu. V našem případě jsem použila Unicalibrator firmy Diagnostica Stago. Koagulometr vytvoří kalibrační křivky automaticky, zadávají se pouze hodnoty výchozích koncentrací kalibrační plazmy deklarované výrobcem.

4. Po kalibraci jsem provedla kontrolu správnosti pomocí atestovaných kontrolních plazem s deklarovaným rozmezím hodnot (System Control N+P, Diagnostica Stago). Pro denní kontrolu přesnosti jsem v dalších dnech používala normální a patologickou neatestovanou kontrolní plazmu (Coag Norm a Coag Path, Diagnostica Stago).

5. Následoval příjem vzorků do LIS. Po identifikaci materiálu a polepení žádanek i zkumavek čárovými kódy jsem vzorky zadala do laboratorního informačního systému a ten jim přiřadil identifikační čísla laboratoře.

6. Přijmutou citrátovou krev jsem centrifugovala 15 minut při 3800 ot./min. Poté je plazma připravena ke koagulačním vyšetřením. Krev odebraná do K<sub>3</sub>EDTA k vyšetření počtu krevních destiček se pouze promíchá na valivé třepačce a je připravena k vyšetření.

7. Zkumavku s vyšetřovanou plazmou jsem vložila do koagulometru, který si načel čárový kód na zkumavce a komunikací s LIS požadavky na vyšetření. Používá se neředěná plazma, ředění Owren-Kollerovým pufrem je automaticky provedeno v přístroji. Krev odebranou do K<sub>3</sub>EDTA jsem vložila do analyzátoru krevních buněk.

8. Koagulometr provedl změření vzorků plazem. K naměřenému koagulačnímu času resp. změně absorbance analyzátor z kalibrační křivky odečetl příslušnou koncentraci proteinu S resp. proteinu C a antitrombinu v plazmě. U ostatních testů vydal koagulometr naměřené koagulační časy, případně vypočítal poměry R či INR u protrombinového testu. Analyzátor krevních buněk vydal hodnotu krevních destiček vztaženou na litr krve.

9. Naměřené hodnoty byly vyneseny do tabulek a statisticky zpracovány.

## **5.2. Tabulky s naměřenými hodnotami a grafické výstupy**

Naměřené hodnoty byly vyneseny do tabulek. Pro každou skupinu pacientů byl navíc pro každý parametr vypočítán průměr a medián a zaznamenána nejnižší a nejvyšší hodnota (viz tabulky 8 – 11). Pro každý parametr byly hodnoty všech 3 skupin pacientů vyneseny do bodového grafu, sloupcové grafy vyjadřují četnost normálních, snížených a zvýšených hodnot jednotlivých parametrů v jednotlivých skupinách pacientů.

Tab.4. Soubor pacientů bez trombózy – skupina 1

Číslo	P.	Věk	Anam.	PLT	PT-R	APTT-R	AT	PC	PS	APC-R
1.	Ž	53	ne	235	0,99	0,97	130	299	132	2,6
2.	Ž	24	ne	305	0,98	1,14	94	172	92	2,9
3.	M	52	ne	210	0,99	0,94	102	148	96	1,8
4.	Ž	38	ne	275	0,98	1,14	97	124	60	2,5
5.	Ž	41	ne	267	1,11	0,91	111	146	126	1,7
6.	M	49	ne	228	0,96	1,08	89	121	126	2,6
7.	Ž	35	ne	184	1,11	1,02	92	113	79	2,3
8.	M	47	ne	276	0,99	1,15	126	133	99	3,1
9.	Ž	32	ne	301	1,01	0,89	92	116	69	1,8
10.	Ž	22	ne	130	1,02	1,01	110	173	72	2,5
11.	M	68	ne	304	1,01	0,82	82	159	91	1,6
12.	M	36	ne	220	1,01	1,11	106	120	117	2,4
13.	Ž	32	ne	236	1,01	0,97	87	126	53	3,2
14.	Ž	67	ne	175	0,99	1,01	101	123	121	2,7
15.	Ž	28	ne	198	0,94	1,09	90	115	86	2,8
16.	Ž	26	ne	310	0,98	1,05	95	145	56	2,4
17.	Ž	51	ne	247	0,98	0,93	111	123	102	2,5
18.	M	33	ne	290	1,01	1,14	84	129	90	2,7
19.	M	51	ne	189	1,02	1,01	91	183	101	3,01
20.	Ž	22	ne	201	1,01	1,01	87	100	54	2,5
21.	Ž	29	ne	350	1,01	0,87	110	142	60	2,9
22.	M	34	ne	209	1,02	0,84	137	254	149	3,4
23.	Ž	21	ne	130	1,11	1,16	107	150	72	2,6
24.	M	58	ne	272	1,11	0,91	92	154	92	2,6
25.	M	34	ne	308	1,01	0,93	94	114	59	2,5

Tab. 5. Soubor pacientů s trombózou – skupina 2

Číslo	P.	Věk	Anam.	PLT	PT-R	APTT-R	AT	PC	PS	APC-R
26.	M	69	trombóza	171	0,99	0,82	81	129	74	1,8
27.	Ž	20	trombóza	158	0,96	1,09	92	100	75	2,9
28.	Ž	69	trombóza	225	0,99	0,94	102	130	80	2,3
29.	Ž	86	trombóza	207	1,06	1,06	116	142	97	2,6
30.	Ž	21	trombóza	220	1,61	0,97	111	137	78	2,6
31.	M	44	trombóza	192	0,99	0,91	101	145	116	1,6
32.	Ž	45	trombóza	172	0,98	1,11	96	167	72	1,6
33.	Ž	45	trombóza	211	0,99	1,01	77	109	68	3,1
34.	Ž	30	trombóza	200	1,01	1,02	102	134	88	2,2
35.	Ž	42	trombóza	222	1,02	1,11	106	150	107	3,1
36.	Ž	45	trombóza	268	1,01	1,17	106	176	141	2,8
37.	Ž	64	trombóza	158	1,51	1,26	74	54	72	2,3
38.	Ž	37	trombóza	345	1,71	1,40	97	150	95	2,3
39.	Ž	47	trombóza	188	1,91	1,26	103	175	86	2,1
40.	M	36	trombóza	256	0,94	1,05	126	163	150	2,2
41.	Ž	51	trombóza	280	0,98	0,92	90	104	87	1,6
42.	Ž	48	trombóza	109	0,98	1,02	91	157	109	2,9
43.	M	37	trombóza	222	1,01	3,02	107	127	145	2,2
44.	M	56	trombóza	187	1,02	1,24	80	125	140	2,7
45.	M	66	trombóza	212	1,01	1,01	104	143	114	2,1
46.	M	59	trombóza	314	1,01	2,11	110	146	115	2,5
47.	M	47	trombóza	259	2,11	1,14	76	125	94	1,6
48.	M	58	trombóza	225	1,11	0,90	78	120	126	2,3
49.	Ž	42	trombóza	268	1,71	1,17	90	125	105	1,7
50.	Ž	35	trombóza	182	1,01	0,84	99	127	65	2,7



Tab. 6. Kontrolní soubor zdravých osob – skupina 3

Číslo	P.	Věk	A.	PLT	Q-R	A-R	AT	PC	PS	APC-R
51.	Ž	30	Z.	223	0,98	1,12	89	99	103	2,4
52.	Ž	35	Z.	352	0,92	1,04	91	116	92	2,4
53.	Ž	32	Z.	272	0,99	1,02	104	124	93	2,6
54.	Ž	38	Z.	290	1,02	0,98	95	126	102	2,4
55.	Ž	41	Z.	315	0,94	0,98	90	125	96	2,5
56.	M	25	Z.	241	0,97	1,02	97	111	95	2,7
57.	M	21	Z.	238	1,02	1,08	96	90	131	2,3
58.	M	45	Z.	293	0,91	1,01	120	132	94	2,5
59.	M	38	Z.	298	0,94	1,08	90	123	82	2,4
60.	M	31	Z.	355	0,92	1,15	91	127	97	2,3
61.	Ž	45	Z.	338	1,01	0,96	111	125	100	2,3
62.	Ž	28	Z.	207	0,97	1,05	93	130	94	2,4
63.	M	30	Z.	222	1,01	0,91	90	119	96	2,4
64.	Ž	33	Z.	200	0,99	1,11	127	121	93	2,4
65.	Ž	38	Z.	208	0,91	1,01	94	126	96	2,4
66.	Ž	35	Z.	289	1,02	1,08	90	128	108	2,5
67.	M	25	Z.	252	1,02	1,01	98	100	88	2,4
68.	M	38	Z.	309	1,11	0,96	93	130	107	2,4
69.	M	34	Z.	290	1,02	0,96	99	128	97	2,5
70.	M	35	Z.	315	1,02	0,96	110	133	107	2,5
71.	Ž	41	Z.	265	0,98	0,98	100	100	101	2,6
72.	Ž	20	Z.	340	0,98	0,93	93	137	112	2,6
73.	Ž	18	Z.	285	1,01	0,98	96	120	126	2,7
74.	Ž	22	Z.	221	1,02	1,01	94	133	119	2,8
75.	M	32	Z.	310	1,02	0,97	101	131	116	2,6

Tab. 7. Rozdělení pacientů dle věku a pohlaví

<b>Věk</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Průměr</b>	<b>Medián</b>	<b>Pohlaví M/Ž</b>
<b>Skupina 1</b>	19	68	39	35	10/15
<b>Skupina 2</b>	20	86	48	45	9/16
<b>Skupina 3</b>	18	45	34	33	11/14

Tab. 8. Základní statistická data souboru pacientů bez trombózy – skupina 1

<b>Metody</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Průměr</b>	<b>Medián</b>
<b>PLT</b>	130	350	242	236
<b>PT-R</b>	0,94	1,11	1,02	1,01
<b>APTT-R</b>	0,82	1,16	1,00	1,01
<b>AT</b>	82	137	101	95
<b>PC</b>	100	299	147	133
<b>PS</b>	53	149	90	91
<b>APC-R</b>	1,60	3,40	2,54	2,60

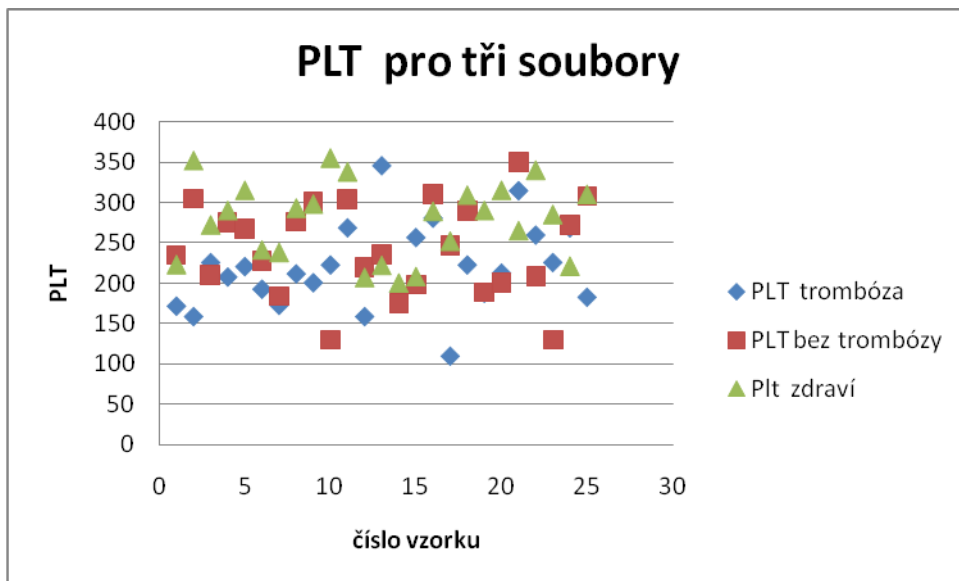
Tab. 9 Základní statistická data souboru pacientů s trombózou – skupina 2

<b>Metody</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Průměr</b>	<b>Medián</b>
<b>PLT</b>	109	345	218	212
<b>PT-R</b>	0,94	2,11	1,19	1,01
<b>APTT-R</b>	0,82	3,02	1,18	1,06
<b>AT</b>	74	126	97	99
<b>PC</b>	54	176	134	134
<b>PS</b>	65	150	100	95
<b>APC-R</b>	1,60	3,10	2,31	2,30

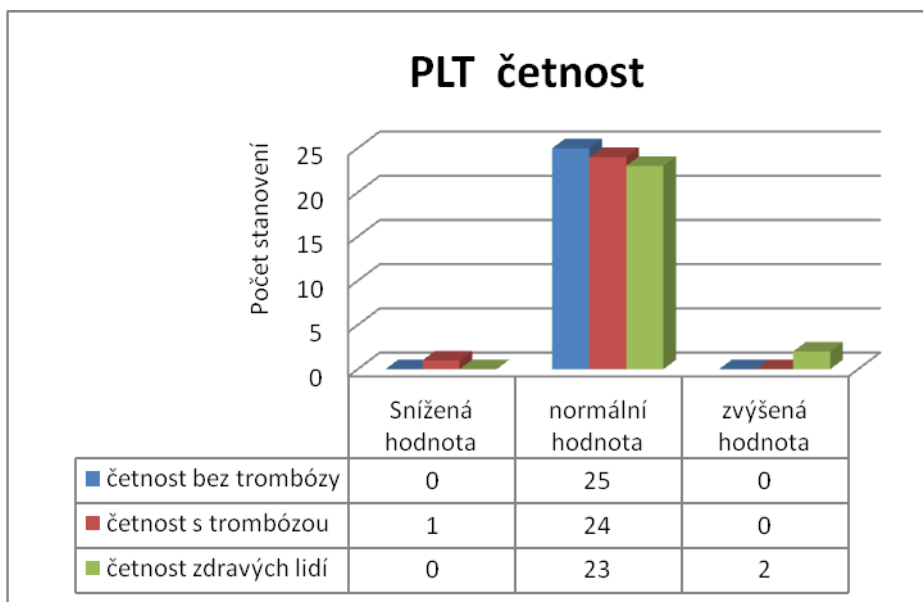
Tab. 10 Základní statistická data kontrolní skupiny zdravých osob – skupina 3

<b>Metody</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Průměr</b>	<b>Medián</b>
<b>PLT</b>	200	355	277	289
<b>PT-R</b>	0,91	1,11	0,99	0,99
<b>APTT-R</b>	0,90	1,15	1,01	1,01
<b>AT</b>	89	127	98	95
<b>PC</b>	90	137	121	125
<b>PS</b>	82	131	101	97
<b>APC-R</b>	2,30	2,80	2,48	2,40

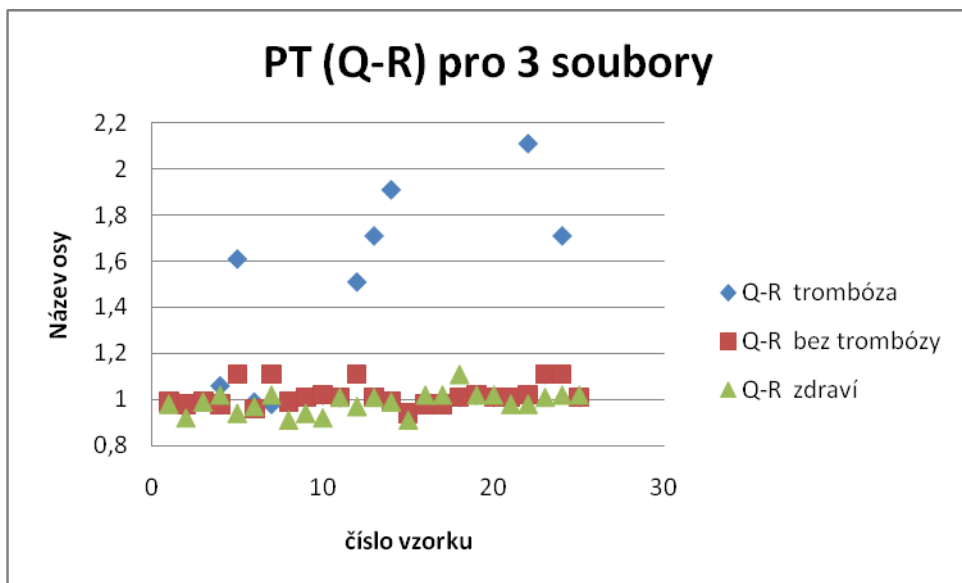
**Grafické hodnocení naměřených výsledků dle jednotlivých parametrů**



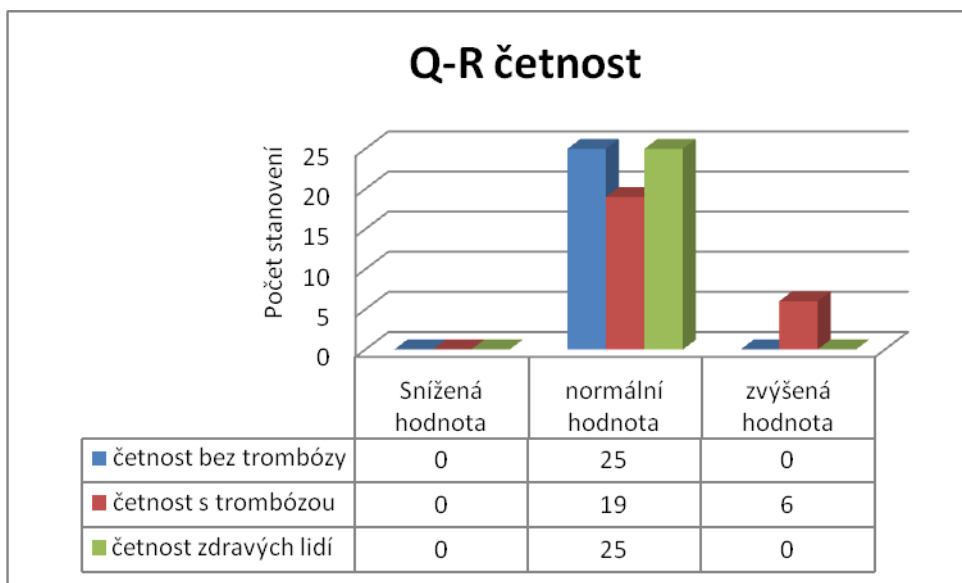
Graf č. 1 Naměřené hodnoty počtu trombocytů (Plt)



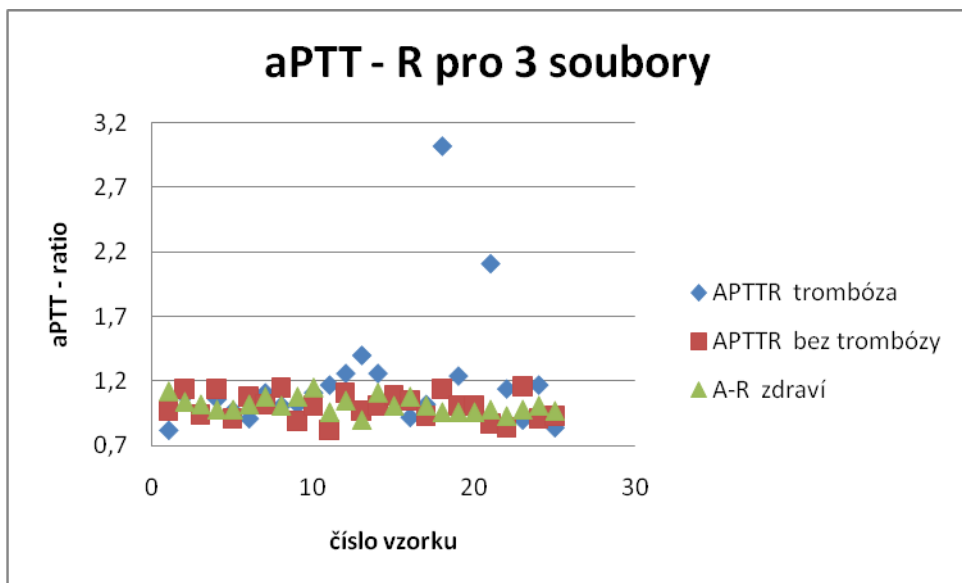
Graf č. 2 Sloupcové vyjádření četnosti hodnot počtu trombocytů (Plt)



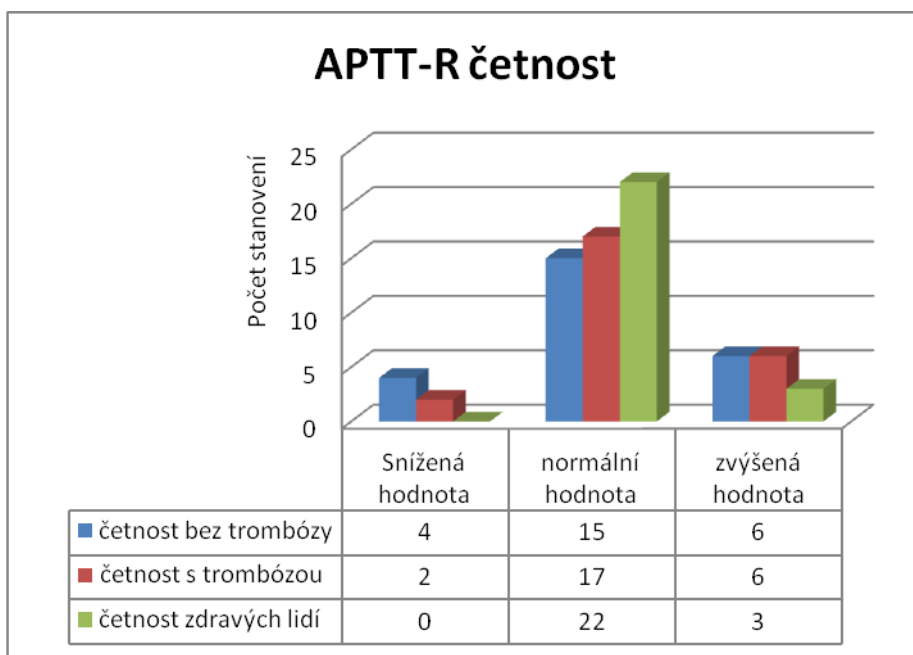
Graf č. 3 Naměřené hodnoty PT-R



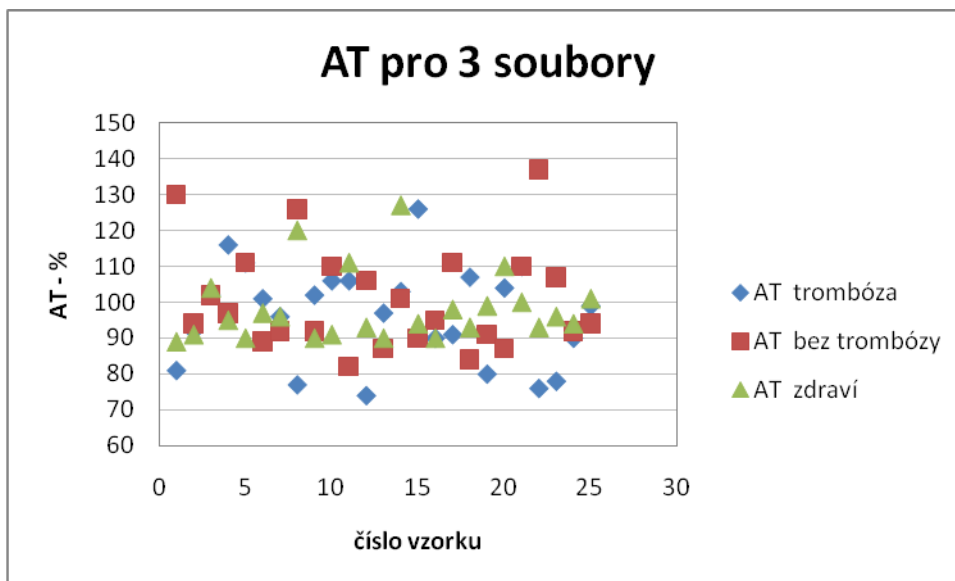
Graf č. 4 Sloupcové vyjádření četnosti hodnot PT-R



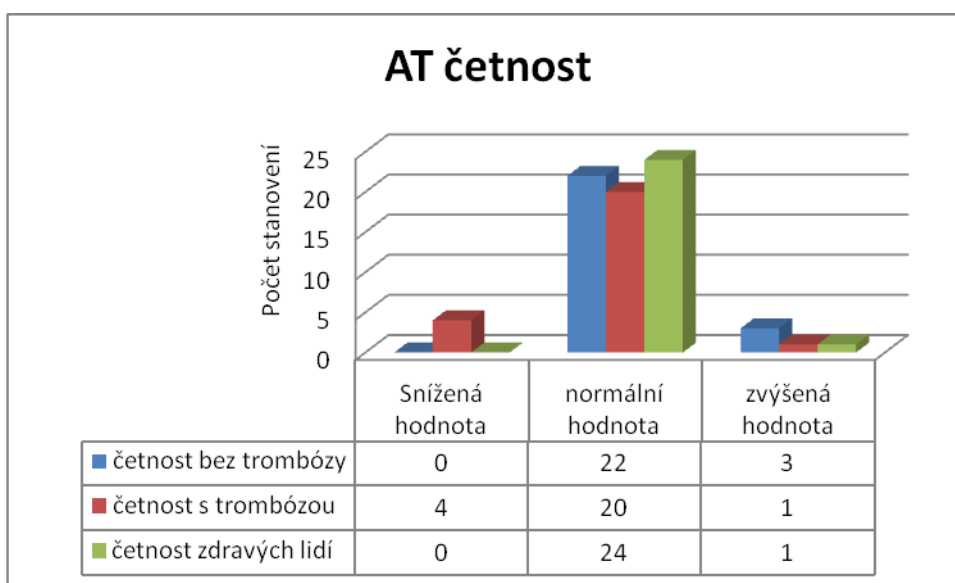
Graf č. 5 Naměřené hodnoty APTT-R



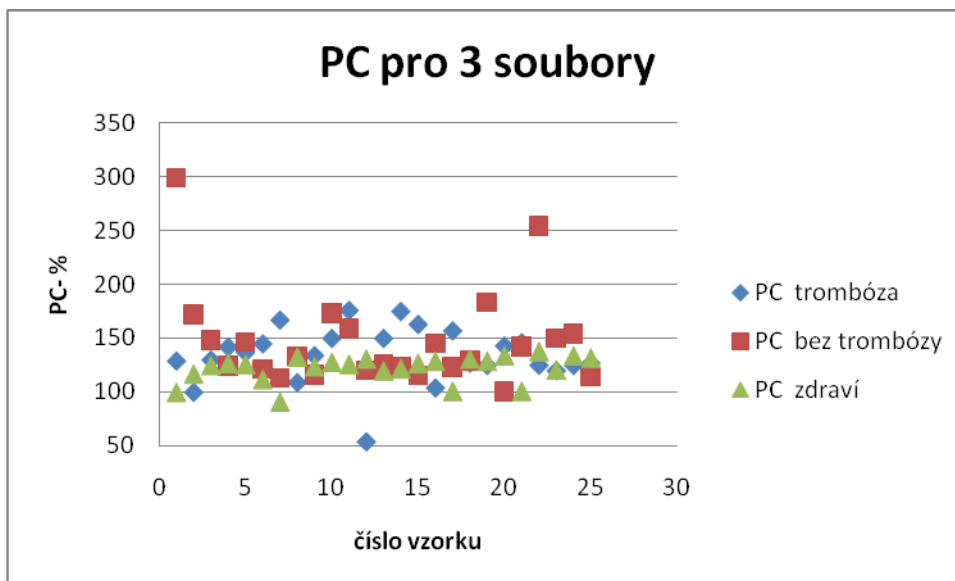
Graf č. 6 Sloupcové vyjádření četnosti hodnot APTT-R



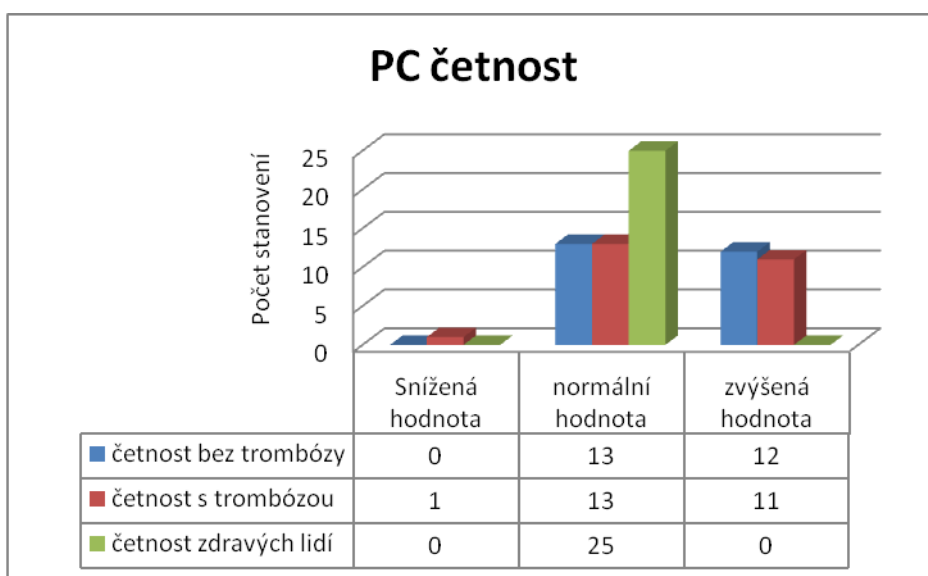
Graf č. 7 Naměřené hodnoty funkční aktivity antitrombinu (AT)



Graf č. 8 Sloupcové vyjádření četnosti hodnot funkční aktivity antitrombinu

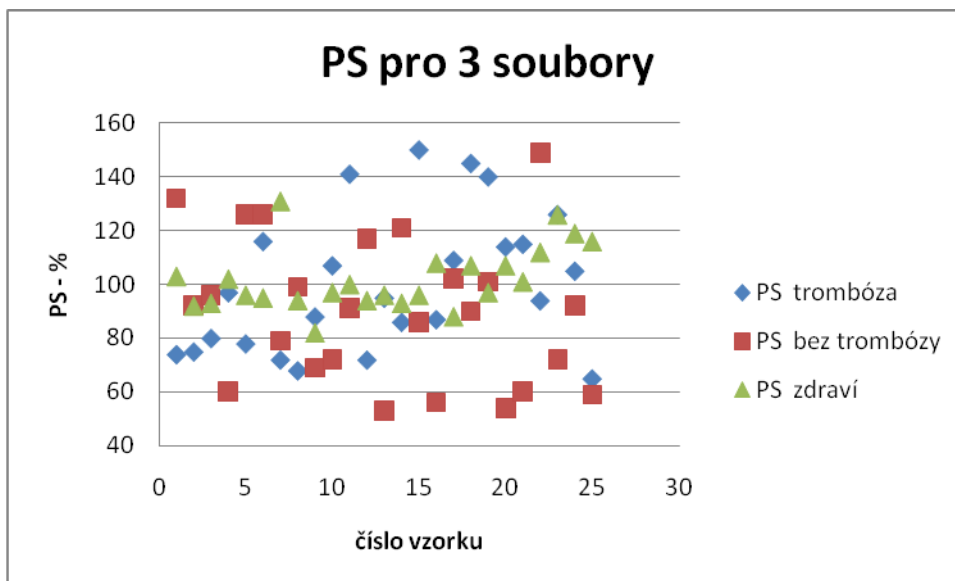


Graf č. 9 Naměřené hodnoty funkční aktivity proteinu C (PC)

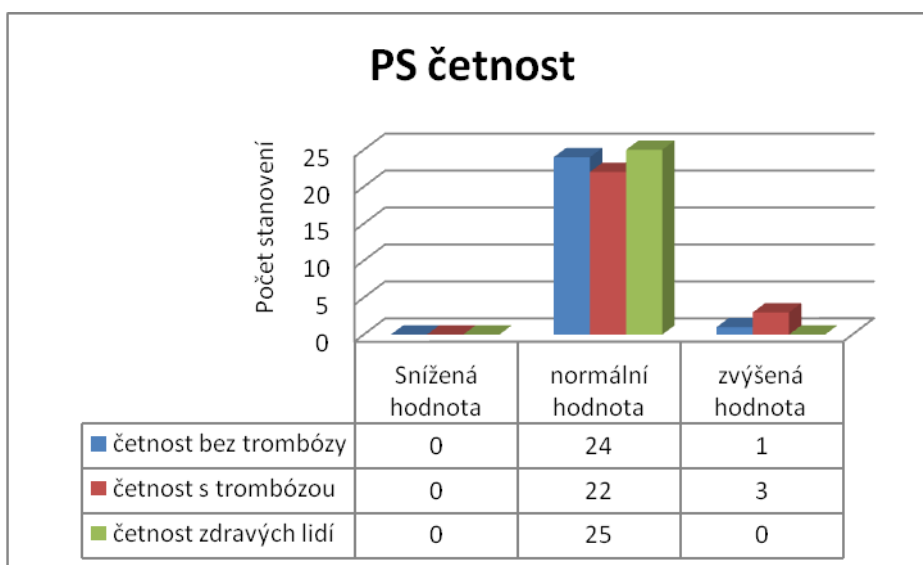


Graf č. 10 Sloupcové vyjádření četnosti hodnot funkční aktivity proteinu C

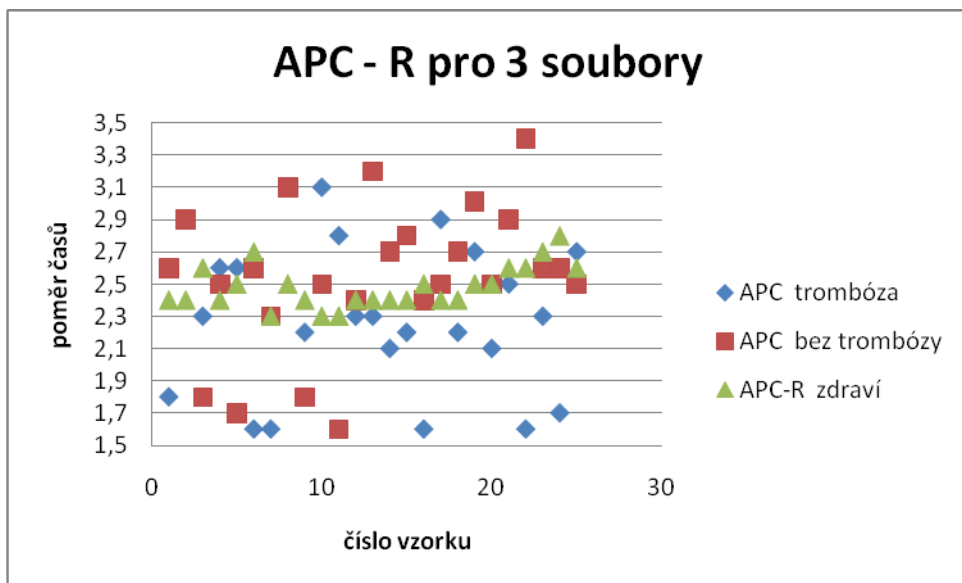




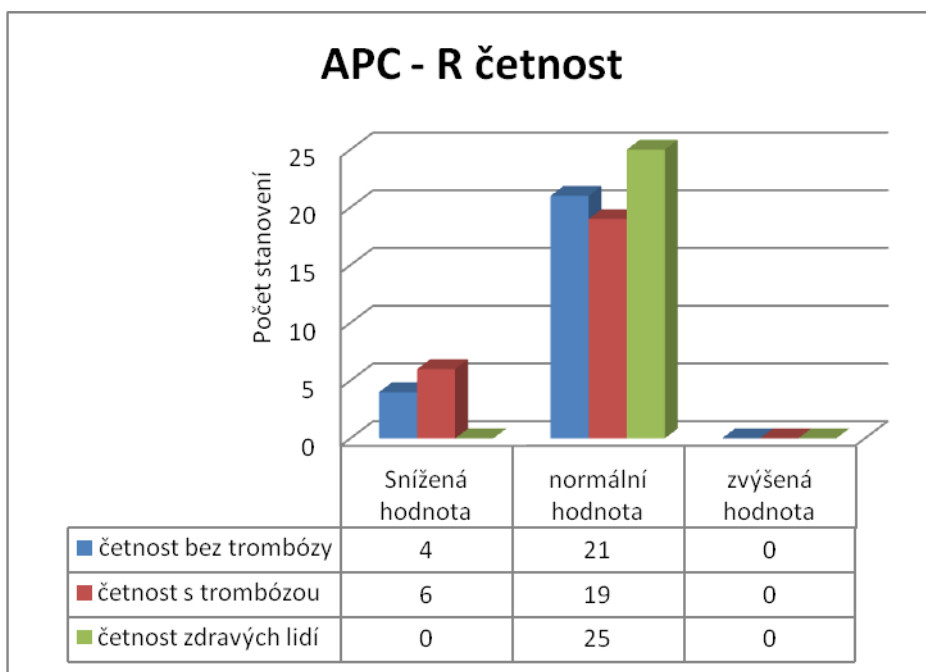
Graf č. 11 Naměřené hodnoty funkční aktivity proteinu S (PS)



Graf č. 12 Sloupcové vyjádření četnosti hodnot funkční aktivity proteinu S



Graf č. 13 Naměřené hodnoty APC-R



Graf č. 14 Sloupcové vyjádření četnosti hodnot APC

### 5.3. Statistické vyhodnocení naměřených dat

Ke zjištění, zda mezi souborem pacientů bez trombózy a souborem s již prodělanou trombózou existují statisticky významné rozdíly, byly použity následující statistické testy - test D'Agostino sloužil k určení, zda se jedná o normální rozdělení hodnot v jednotlivých souborech u jednotlivých parametrů. U parametrů s normálním rozdělením hodnot se dále používal párový t-test, u parametrů, u kterých se nejednalo o normální rozdělení hodnot, se hodnocení provádělo Mann Whitneyovým testem.

Tab. č. 12 Statistické vyhodnocení jednotlivých koagulačních testů

	Plt		PT-R		APTT-R		AT		PC		PS		APC-R	
D'Agostino (p- hodnota)	Trombóza		Trombóza		Trombóza		Trombóza		Trombóza		Trombóza		Trombóza	
	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne
	0,628	0,288	1,68. 10 <sup>-9</sup>	0,002	1,47. 10 <sup>-6</sup>	0,984	0,950	0,026	0,037	1,00. 10 <sup>-4</sup>	0,233	0,373	1,000	0,271
Závěr	Normální rozdělení		Nemá normální rozdělení		Nemá normální rozdělení		Nemá normální rozdělení		Nemá normální rozdělení		Normální rozdělení		Normální rozdělení	
t-test (p- hodnota)	0,130										0,197		0,071	
Závěr	Soubory se neliší										Soubory se neliší		Soubory se neliší	
Mann Whitney test (p- hodnota)			0,102		0,077		0,516		0,884					
Závěr			Soubory se neliší		Soubory se neliší		Soubory se neliší		Soubory se neliší					

## 6. Diskuze

Výsledky práce jsou pro mě překvapivé. Předpokládala jsem, že mezi souborem osob s vysokým rizikem vzniku trombózy a souborem pacientů s již prodělanou trombózou bude, alespoň u některých vyšetření, statisticky významný rozdíl. Tento předpoklad se však nepotvrdil, u žádného ze sledovaných parametrů nebyla p-hodnota statistického testu použitého k hodnocení nižší než 0,05.

U počtu krevních destiček, funkční aktivity proteinu S a rezistence na aktivovaný protein C se jedná o normální rozdělení hodnot u pacientů v souboru s trombózou i v souboru bez trombózy. V následném srovnání souborů pomocí párového t-testu byly dosaženy p-hodnoty 0,130 pro počet krevních destiček; 0,197 pro funkční aktivitu proteinu S a 0,071 pro rezistenci na aktivovaný protein C, což dokazuje, že se soubory navzájem statisticky neliší. Nejvíce se hraniční hodnotě  $p = 0,05$  blíží hodnota  $p$  u rezistence na aktivovaný protein C, což potvrzuje častý výskyt této trombofilie v evropské populaci, zejména v souboru s již prodělanou trombózou.

U ostatních sledovaných parametrů (PT-R, APTT-R, funkční aktivity antitrombinu a proteinu C) se nejedná o normální rozdělení hodnot, proto byly soubory porovnány Mann Whitneyovým testem. I zde byly p-hodnoty všech uvedených parametrů větší než 0,05, soubory se tedy opět neliší. Nejvíce se hodnotě 0,05 blíží p-hodnota u APTT-R (0,077), u PT-R je p-hodnota 0,102, u AT 0,516 a u PC 0,884. To dokazuje, že defekty antitrombinu a proteinu C jsou v evropské populaci opravdu vzácné.

Pro lepší názornost byly pro jednotlivé parametry vyneseny naměřené hodnoty všech souborů do bodových grafů, ze kterých jsou dobře patrné drobné rozdíly mezi jednotlivými soubory, i když nejsou statisticky významné. Patrné je to zejména na grafu č. 13 pro APC-R a částečně na grafech č. 3 pro PT-R a č. 11 pro PS.

## 7. Závěr

Fakt, že se žádný ze sledovaných parametrů v souborech neliší, může být způsoben např. léčbou. Pokud by byly osoby s rizikem vzniku trombózy vyšetřeny v době záchytu trombofilního stavu, tedy ještě před léčbou, měly by jistě jiné výsledky než když byly vyšetřovány až v průběhu preventivní terapie.

Je pravdou, že výsledky této práce mohou být ovlivněny poměrně malým počtem vyšetřených pacientů. Pro potřeby bakalářské práce však nemohl být větší soubor pacientů z finančních důvodů vyšetřen.

Otázkou také zůstává, jaké by byly výsledky dalších koagulačních vyšetření, např. D-dimerů, funkční aktivity faktoru VIII, koncentrace fibrinogenu, monitorování anti-Xa aktivity při terapii nízkomolekulárními hepariny, aktivovaný parciální tromboplastinový test citlivý na lupus antikoagulans a další, pokud by byly vyšetřeny.

## 8. Seznam zkratek

ACLA	antikardiolipinové protilátky
ADP	adenosindifosfátem
AIM	akutní infarkt myokardu
ASA	acetylsalicylová kyselina
AKS	akutní koronární syndrom
APA	antifosfolipidové protilátky
APS	antifosfolipidový syndrom
APC	aktivovaný protein C
APC-R	rezistence na aktivovaný protein C
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
AT	antitrombin
CNS	centrální nervový systém
COX	cyklooxygenáza
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
Fbg	fibrinogen
FV	faktor V
FVa	aktivovaný faktor V
FVIIIa	aktivovaný faktor VIII
FXa	aktivovaný faktor X
HIT	heparinem indikovaná trombocytopenie
HUS	hemolyticko-uremický syndrom (Gasserův)
ITP	idiopatická trombocytopenická purpura
IM	infarkt myokardu
IU	international units (mezinárodní jednotky)
KO	krevní obraz
LA	lupus antikoagulans
LIS	laboratorní informační systém
LMWH	nízkomolekulární heparin
MTHFR	methylen–tetrahydrofolát reduktáza

NIS	nemocniční informační systém
PAI	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PC	protein C
PS	protein S
PT	protrombinový test
PLT	platelet (trombocyty)
STK	streptokináza
TAFI	trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TAT	komplex trombin-antitrombin
TEN	tromboembolická nemoc
TEP	totální endoprotéza
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TM	trombomodulin
TT	trombinový test
TX A2	tromboxan A2
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
UHF	nefrakcionovaný heparin
vWF	von Willebrandův faktor
VTE	hluboká žilní trombóza
VTN	venózní tromboembolismus

## 9. Seznam literatury

1. MERKUNOVÁ, A., OREL, M., *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*, Praha, Grada Publishing a. s., 2008, s. 302, ISBN 978-80-247-1521-6
2. LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J., *Biochemie pro studující medicíny: II. Díl*, Praha, Nakladatelství Karolinum, 2004, s. 281 ISBN 978-80-246-1415-1
3. MATOUŠ, B., et al., *Základy lékařské chemie a biochemie*, Praha, Galén, 2010, s. 540
4. PECKA, M., *Laboratorní hematologie v přehledu, Fyziologie a patofyziologie hemostázy*, Český Těšín, FINIDR s.r.o., 2004, s. 237, ISBN 80-86682-03-X
5. MATÝŠKOVÁ, M., ŠLECHTOVÁ, M., *Vrozená a získaná predispozice k tvorbě trombóz*, Lékařské listy, Roč. 59, č. 4 (2010) s. 16-18
6. DULÍČEK, P., *Venózní tromboembolizmus – rizikové faktory a prevence*, Causa subina, Roč. 13, č. 1 (2010), s. 22-25. ISSN: 1212-0197
7. MATÝŠKOVÁ, M., ŠLECHTOVÁ, M., PENKA, M., *Jak vyšetřit trombofilní stav a interpretovat výsledky?*, Interní medicína pro praxi, Roč. 11, č. 7-8 (2009), s. 355-357. ISSN: 1803-5256.
8. INDRÁK, K., et al., *Hematologie*, Praha, Triton, 2006, s. 278, ISBN 80-247-9061-0
9. KVASNIČKA, J., *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*, Praha, Grada Publishing a. s., 2003, s. 299, ISBN 80-7169-993-4
10. CHLUMECKÝ, J., et al., *Antikoagulační léčba*, Praha, Grada Publishing a. s., 2005, s. 215, ISBN 80-247-9061-0
11. PENKA, M., BULIKOVÁ, A., MATÝŠKOVÁ, M., et al., *Hematologie I, Neonkologická hematologie*, Praha, Grada Publishing, 2001, s. 204, ISBN 80-247-023-9
12. POUL, H., KESSLER, P., *Trombofilní stavy: význam pro prevenci a léčbu žilního tromboembolizmu*, Vnitřní lékařství, Roč. 55, č. 3 (2009), s. 242-252. ISSN: 1801-7592.
13. GREER, J., FOERSTER, J., RODGERS, G.M., PARAXEVAS, F., GLADER, B., ARBER, D.A., MEANS, R. T.: *Wintrobe's Clinical Hematology*, 12. edice, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2009, s. 3232, ISBN: 978-0-7817-6507-7



14. VOJÁČEK, J., MALÝ, M., et al., *Arteriální a žilní trombózy v klinické praxi*, Praha, Grada Publishing a. s., 2004, s. 276, ISBN-10:80-247-0501-X
15. KARETOVÁ, D., *Prevence tromboembolické nemoci dle posledních doporučení*, *Medicína po promoci*, Roč. 10, č. 5 (2009), s. 75-81. ISSN: 1212-9445
16. LINCOVÁ, D., FARGHALI, H., et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2. vydání, Praha, Galén, 2007, s. 672, ISBN 978-80-7262-373-0
17. PECKA, M., et al., *Praktická hematologie, Laboratorní metody*, Český Těšín, FINIDR s.r.o., 2010, s. 343, ISBN 978-80-903871-9-5
18. PECKA, M., MALÝ, J., DEJMKOVÁ, J., *Přehled Laboratorní hematologie III, Hemostáza, Imunohematologie*, Praha, Galén, 1998, s. 151, ISBN 80-85824-89-2