

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

Laboratorní diagnostika SPS
(Bakalářská práce)

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

Datum: 13.dubna 2013

Podpis

Poděkování

Chtěla bych především poděkovat svému školiteli RNDr. Aleně Rosenauerové a odbornému garantovi Mgr. Iloně Fátorové za pomoc a cenné rady při vypracování bakalářské práce.

Velké poděkování patří i prim. MUDr. Petrovi Kesslerovi za poskytnutí osobních zkušeností s laboratorní diagnostikou syndromu lepičných destiček.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala také svému manželovi, mým dvěma synům a rodičům, za jejich nekonečnou trpělivost a velkou podporu při studiu.

Obsah

Obsah.....	4
Použité zkratky.....	6
Souhrn.....	7
Summary.....	8
Úvod	9
Zadání bakalářské práce - cíl práce	10
I. Teoretická část.....	11
1. Hemostáza	11
1.1 Cévní stěna	11
1.2 Trombocyty.....	12
1.3 Systém plazmatických faktorů.....	15
1.3.1 Koagulační faktory.....	15
1.3.2 Přirozené Inhibitory	15
1.3.3 Faktory fibrinolýzy.....	16
1.4 Úloha trombocytů v hemostáze.....	16
1.4.1 Adheze a aktivace destiček	17
1.4.2 Uvolňovací reakce.....	17
1.4.3 Agregace.....	18
1.4.4 Retrakce.....	18
2. Syndrom lepivých destiček	19
2.1 Incidence a etiopatogeneze	19
2.2 Typy SPS	21
2.3 Klinické projevy	21
2.4 Diagnostika SPS.....	24
2.5 Referenční meze SPS – literární zdroje	25
2.6 Léčba.....	26
II. Experimentální část.....	28
3. Laboratorní vyšetření SPS	28
3.1 Použitý materiál	28
3.1.1 Vyšetřovaný materiál	28
3.1.2 Laboratorní pomůcky	28
3.1.3 Přístroje.....	28
3.1.4 Reagencie.....	31

3.2	Charakteristika sledovaného souboru.....	31
3.3	Odběr vzorku.....	32
3.3.1	Příprava vzorku.....	33
3.3.2	Úprava počtu trombocytů.....	34
3.4	Příprava reagensů ADP a EPI.....	34
3.4.1	Příprava nízkých koncentrací ADP.....	35
3.4.2	Příprava nízkých koncentrací EPI.....	35
3.5	Vlastní měření.....	35
3.6	Hodnocení výsledků agregačních křivek.....	37
3.6.1	Fyziologická agregace s EPI.....	37
3.6.2	Patologická agregace s EPI.....	37
3.6.3	Fyziologická agregace s ADP.....	38
3.6.4	Patologická agregace s ADP.....	38
3.7	Stanovení referenčního rozmezí.....	39
3.7.1	Nepřímá parametrická metoda odhadu referenčních mezí.....	39
3.7.2	Referenční meze stanovené naší laboratoří.....	41
3.8	Úprava počtu trombocytů.....	41
3.9	Prodleva mezi odběrem a měřením vzorku.....	42
3.10	Centrifugace.....	43
4.	Výsledky.....	44
4.1	Vybrané kazuistiky.....	46
5.	Diskuse.....	49
6.	Závěr.....	51
7.	Přílohy.....	53
8.	Použitá literatura.....	54

Použité zkratky

ADP	adenosin difosfát
APC	aktivovaný protein C
AQUA	aqua per injectione
ASA	kyselina acetylsalicylová
Ca ²⁺	vápenaté ionty
CMP	cévní mozková příhoda
EPI	epinefrin (adrenalin)
FR	fyzilogický roztok
Gas6	Gas6 protein
GP	glykoprotein
LMWH	nízkomolekulární heparin
Ma	maximální amplituda
PC	protein C
PLT	trombocyty, krevní destičky
PPP	platelet poor plasma – plazma chudá na destičky
PRP	platelet rich plasma – plazma bohatá na destičky
PS	protein S
SPS	sticky platelet syndrome - syndrom lepivých destiček
TM	trombomodulin
VT	venózní trombóza
VWF	von Willebrandův faktor

Souhrn

Tato práce se zabývá metodikou vyšetřování hyperagregability destiček po přidání nízkých koncentrací induktorů ADP a epinefrinu., tzv. syndromu lepivých destiček (SPS).

V teoretické části jsme popsali dosavadní poznatky o syndromu lepivých destiček, příčiny vzniku SPS a jeho důsledky na zdraví pacienta, jednotlivé typy SPS, jeho diagnostiku a léčbu.

V praktické části jsme provedli standardizaci vyšetřovací metody agregace destiček, úpravu počtu destiček ve vyšetřované plazmě, zkrácení doby mezi odběrem vzorku a jeho vlastním měřením a úpravu podmínek centrifugace vzorku.

Ke stanovení referenčních rozmezí jsme vyšetřili skupinu 60 zdravých dárců. Námi stanovené referenční meze byly ve shodě s referenčními rozmezími udávanými Bartošovou et al. (2011a).

Vlastní vyšetřování hyperagregability jsme provedli na skupině 16 pacientů, převážně mladých žen s opakovanými aborty a jednoho muže s opakovanými venózními trombózami v nízkém věku.

U 44 % (7 pacientů) jsme shledali agregaci destiček v normě. U 56 % (9 pacientů) jsme našli hyperagregabilitu destiček. SPS typu I jsme diagnostikovali u 2 pacientů, SPS typu II u 7 pacientů. Raritní SPS typu III jsme zatím nezachytili.

Summary

This thesis deals with methodology of platelets hyperagregability testing after low concentrations of inductores ADP and epinefrine are added, so called sticky platelet syndrome (SPS).

Theoretical part describes existing knowledge of sticky platelet syndrome, cause of its genesis and its effect on patient health, SPS types, its diagnostics and treatment.

We performed standardization of platelets agregation testing method in practical part, as well as modification of number of platelets in tested plasma, time shortening between taking a blood sample and its measurement and condition adjustment of sample centrifugation.

We tested a group of 60 healthy blood donors to set referential range. Our referential range corresponds with referential range given by Bartošová et al. (2011a).

Testing of hyperagregability was performed in a group of 16 patients, mostly young women with recurrent aborts and one man with recurrent venous thrombotics in young age.

We found normal platelets agregation at 44% (7) of patients and platelets hyperagregability at 56% (9) of patients. SPS type I was diagnosed at 2 patients and SPS type II at 7 patients. We have not diagnosed rare SPS type III yet.

Úvod

Syndrom lepivých destiček (SPS) představuje vrozenou, autozomálně dominantně dědičnou trombocytopenii, která se klinicky projevuje zvýšeným sklonem k trombózám u pacientů v mladém věku a ke spontánním abortům. Pro SPS je charakteristická hyperagregabilita trombocytů se třemi nízkými koncentracemi induktorů - adenosin difosfátu (ADP) a epinefrinu (EPI), přičemž agregace s ostatními induktory je fyziologická.

Etiologie SPS není dosud plně objasněna. Předpokládá se výskyt abnormálních glykoproteinových receptorů na povrchu membrány trombocytů. Jejich polymorfismus zřejmě vede k hyperagregabilitě destiček. Léčba SPS spočívá v podávání kyseliny acetylsalicylové (ASA), která u většiny pacientů normalizuje hyperfunkci destiček a chrání je před opakovanými trombotickými komplikacemi.

Pro laboratorní vyšetření syndromu lepivých destiček (SPS) dosud neexistuje standardizovaná metoda. Různé laboratoře provádějí vyšetření SPS různým způsobem. Rozdílů jsou například v rozdílném časovém intervalu mezi odběrem vzorku a jeho měřením, v jiném způsobu přípravy plazmy bohaté na trombocyty (PRP), v rozdílné prodlevě mezi odběrem krve a centrifugací, v odlišné délce centrifugace a nastavení otáček, v různém počtu trombocytů po úpravě PRP, ale i v odlišné délce měření agregace přístrojem. Výše uvedené důvody jsou dostatečným důvodem pro standardizaci metody a zvyšují naléhavost stanovení vlastních referenčních mezí. Proto jsme se rozhodli touto metodikou více zabývat, odstranit problémy a pokusit se ji zpřesnit tak, aby mohla být zařazena mezi rutinně prováděné metody na našem oddělení.

Hlavním podnětem pro výběr tématu laboratorní diagnostiky syndromu lepivých destiček (SPS) byl případ pacientky z naší ústecké hematologické ambulance, která byla poslána po prodělání 4 nevysvětlitelných spontánních abortů na vyšetření SPS na Oddělení hematologie a transfuziologie v Pelhřimově. Zde jí byl diagnostikován pozitivní SPS a po následné léčbě kyselinou acetylsalicylovou (ASA) pacientka postupně porodila dvě zdravé děti.

Zadání bakalářské práce - cíl práce

Cílem naší práce je zavést a standardizovat metodiku pro laboratorní vyšetřování hyperagregability destiček po přidání nízkých koncentrací ADP a epinefrinu. Dále vyšetřit skupinu zdravých dárců s normálním nálezem pro výpočet referenčních hodnot a následně provést laboratorní vyšetření u vybraných pacientů, zejména u pacientek s opakovanými aborty, u kterých byly dříve vyloučeny hormonální, chromozomální a anatomické příčiny i jiná trombofilní rizika, a získané výsledky vyhodnotit.

I. Teoretická část

1. Hemostáza

Fyziologická hemostáza je schopnost organismu zajistit plynulý průtok tekuté krve neporušenými cévami a zároveň zastavit případné krvácení při poranění. Přesná regulovatelnost tohoto složitého procesu umožňuje zastavit krvácení pouze v místě poranění. Při narušení hemostázy může dojít k vychýlení této rovnováhy k jedné straně. Následkem toho pak snadno dochází při snížené srážlivosti krve k patologickému krvácení nebo naopak při zvýšené srážlivosti k intravaskulárním trombózám. Na udržení fyziologické hemostázy se podílí především cévní stěna, trombocyty a plazmatické faktory - koagulační faktory, jejich inhibitory a systém fibrinolýzy (Váleková, 2005).

1.1 Cévní stěna

Důležitým faktorem hemostázy je integrita cévního systému. Endotelové buňky cévní stěny zaujímají poměrně velký povrch 700 - 1 000 m², kde jsou v přímém kontaktu s krví. Endoteliální systém zastává v hemostáze dvojí úlohu dle momentální potřeby organismu, stimulace a naopak inhibice hemostázy (Penka et al., 2011).

V inhibici hemostázy se uplatňuje především neporušený endotel, který má fyziologicky antitrombotický účinek. Endotel nese na svém povrchu záporný náboj, čímž potlačuje samovolnou adhezi negativně nabitých trombocytů. Endotelové buňky produkují enzym ADP-ázu, která štěpí aktivátor trombocytů adenosin difosfát (ADP). Dále produkují cyklický guanozin monofosfát, který se podílí na tvorbě vazodilatátoru - oxidu dusného. Mezi další antikoagulační produkty endotelových buněk patří inhibitory trombinu – heparansulfát a trombomodulin. Všemi těmito mechanismy je při neporušeném cévním řečišti udržována krev v tekutém stavu.

Pokud dojde k poranění cévy, je naopak žádoucí zahájení dějů - stimulací hemostázy, směřujících k zástavě krvácení. Při poškození céva reaguje reflexní vazokonstrikcí, kdy dochází ke snížení průtoku krve a tím ke

zmírnění krvácení. Obnažený subendotel je velmi trombogenní a umožňuje okamžitou aktivaci ostatních systémů hemostázy. Mezi hlavní hemostatické složky subendotelu patří tkáňový faktor a kolageny. Na povrchu negativně nabitého kolagenu dochází k aktivaci "vnitřní cesty" koagulační kaskády. Jedním z důležitých hemostatických produktů endotelových buněk je von Willebrandův faktor (VWF). Vazbou mezi kolagenem, VWF a receptory na povrchu krevní destičky dochází k adhezi destiček na subendotel. Dalšími hemostatickými složkami jsou například faktor aktivující destičky, adhezivní proteiny, fibronektin a trombospondin.

1.2 Trombocyty

Tvorba trombocytů, krevních destiček (PLT), probíhá v kostní dřeni, uvolňováním z megakaryocytů. Trombocyty jsou malé bezjaderné, tzv. neúplné buňky. Průměr krevní destičky se pohybuje okolo 3,5 μm , objem 8 - 12 fl. Krevní destička přežívá v periférii přibližně 7 - 10 dní. Fyziologické rozmezí počtu je udáváno mezi $150\text{-}350 \times 10^9 / \text{l}$ (Penka et al., 2011).

Membrána trombocytů

Na samotném povrchu krevní destičky se nachází **glykokalyx**. Je to buněčný obal se silně negativním nábojem. Elektronegativita obalu brání samovolné adhezi destiček na cévní stěnu a na ostatní krevní buňky. V glykokalyxu jsou zabudovány glykolipidy, povrchové adhezivní glykoproteinové (GP) receptory (integriny) GP IIb/IIIa a GP Ia/IIa, dále receptory pro aktivátory trombocytů, například trombin, kolagen, ADP, epinefrin a receptory pro agregační inhibitory prostacykliny a prostaglandiny.

Četné vchlípeniny do nitra destičky tvoří **otevřený kanálkový systém**. Kanálky jsou vzájemně propojeny a současně propojeny s denzním tubulárním systémem. Otevřený kanálkový systém zvětšuje povrch krevní destičky pro hemokoagulační děje a jeho prostřednictvím se vyplavuje obsah z granulí.

Membrána trombocytů se skládá z **dvojvrstvy fosfolipidů a cholesterolu**. Destička v klidovém stavu má negativně nabitě fosfolipidy fosfatidyletanolamin a fosfatidylserin uloženy na vnitřní straně membrány. Při aktivaci destičky dojde k přetočení dvojvrstvy fosfolipidů, tzv. flip-flop fenomén

(Pecka, 2006), takže na povrchu se objeví fosfolipidy se záporným nábojem. Toto přetočení zajišťuje enzym lipidová skrambláza.

Cytoskelet

Krevní destička obsahuje četné vláknité struktury, mikrotubuly a mikrofilamenta, které tvoří kontraktilní aparát.

Podstatnou část cytoskeletu tvoří **mikrofilamenta**. Jejich hlavní součástí je monomer aktin, který po aktivaci destičky polymeruje. Komplex hexameru myozin s aktinem vede při aktivaci destičky ke kontrakci mikrofilament a tím ke změně tvaru na kulovitý. Zároveň dochází k vytvoření pseudopodií. Mezi další proteiny mikrofilamentozní sítě patří spektrin, tropomyozin, kaldesmon, talin a α -aktinin.

Základní stavební jednotkou **mikrotubulů** je tubulin. Jejich hlavní úlohou je udržení klidového diskoidního tvaru destičky a uchycení zanořené části transmembránových receptorů. Při aktivaci destičky se mikrotubuly podílejí na přesunu sekrečních granul do blízkosti otevřeného kanálkového systému a následné sekreci jejich obsahu.

Denzní tubulární systém

Jedná se o membránový systém, odvozený od endoplazmatického retikula megakaryocytů. Je spojen s otevřeným kanálkovým systémem. Obsahuje enzymy cyklu kyseliny arachidonové - ATP-ázu a cyklooxygenázu, které jsou potřebné k tvorbě prostaglandinů. Je hlavní zásobárnou vápenatých iontů (Ca^{2+}).

Mitochondrie

Mitochondrie tvoří energetický aparát trombocytu. Probíhá v nich tvorba některých destičkových proteinů, například destičkového faktoru 4 (PF4), β -tromboglobulinu a destičky aktivujícího faktoru.

Sekreční granula

V krevních destičkách se nachází čtyři typy sekrečních granul s různým obsahem a funkcí.

α -granula jsou v destičkách zastoupena v počtu 10-15. Vznikají v Golgijho komplexu. Na membráně α -granulí se nacházejí receptorové glykoproteiny, například GPIb/V, GPIIb/IIIa a destičkové endotelové adhezivní molekuly. Obsah α -granul tvoří vWF, destičkový faktor 4, β -tromboglobulin, plazminogen, α 2-antiplazmin, inhibitor aktivátoru plazminogenu 1, α 1-antitrypsin, α 2-makroglobulin, fibrinogen, trombospodin, fibronektin, imunoglobuliny a další. Obsah granul se vylévá přes otevřený kanálkový systém.

δ -granula, nebo-li denzní granula, jsou v destičkách obsažena v počtu 2-8. Jsou to hustá tělíška, dobře viditelná v elektronovém mikroskopu. Na povrchu jejich mebrány se vyskytuje GPIIb/IIIa (obdobně jako na α -granulech) a P-selektin. Obsah δ -granul tvoří ADP, ATP, katecholaminy a serotonin. Granula jsou napojena na destičkovou membránu a proto při aktivaci krevní destičky dochází k vypuštění obsahu granul přímo do jejího okolí.

Lysozomy obsahují enzymy kyselou fosfatázu, β -glukuronidázu a arylsulfatázu. Tyto enzymy jsou uplatňovány při aktivaci destiček při kontaktu s cévní stěnou, kolagenem nebo trombinem. **Peroxisomy** obsahují enzym glutathionperoxidázu.

Receptory trombocytů

Glykoproteinové receptory (GP) patří mezi adhezivní molekuly integriny, které jsou zabudovány do membránové fosfolipidové dvojvrstvy trombocytů. Nacházejí se na otevřeném kanálkovém systému, ale i na membráně α -granul a δ -granul.

Receptorem pro adhezi je **glykoproteinový komplex GPIb/V/IX**, který váže vWF a trombin. Klíčový receptor pro agregaci je **glykoproteinový komplex GPIIb/IIIa**, který váže fibrinogen. Receptory pro ADP zahrnují dvě skupiny. První skupinou jsou **receptory P2X**. Tyto jsou vstupní ligandové kanály, které urychlují vstup Ca^{2+} a následnou změnu tvaru krevní destičky. Pro agregaci indukovanou ADP mají význam **receptory druhé skupiny P2Y**, které aktivují GPIIb/IIIa. Další jsou **receptory pro trombin**, které podobně jako receptory pro ADP, aktivují GPIIb/IIIa. **Receptory pro prostaglandiny** vážou prostaglandinové metabolity, tím dochází ke zvýšení koncentrace cyklického

adenosin monofosfátu, který naopak inhibuje agregaci destiček (Sakalová et al., 2010).

1.3 Systém plazmatických faktorů

Plazmatické faktory dělíme dle jejich hlavní funkce na koagulační faktory, přirozené inhibitory a faktory fibrinolýzy.

1.3.1 Koagulační faktory

Pro úspěšnou zástavu většího krvácení je nutná aktivace hemokoagulačního systému, jehož součástí jsou koagulační faktory. Jsou to proteiny, které působí jako enzymy a kofaktory hemokoagulace. Jejich biosyntéza probíhá v játrech. Patří sem faktory krevního srážení, označené římskými číslicemi. Hemokoagulační děj probíhá na povrchu aktivovaných trombocytů a subendotelu. K vazbě koagulačních faktorů na negativně nabitý povrch trombocytů je zapotřebí Ca^{2+} .

Po spuštění hemokoagulačního systému dochází k postupnému sledu reakcí, tzv. koagulační kaskádě. Neaktivní formy koagulačních faktorů (proenzymy) jsou postupně štěpeny na aktivní formu. Aktivní forma enzymu - produkt předcházející reakce, štěpí neaktivní proenzym v reakci následující. Podle způsobu aktivace se hemokoagulační kaskáda dělí na tzv. vnitřní a tzv. vnější cestu. Obě cesty se sbíhají při štěpení faktoru X na Xa. Nakonec dochází k vytvoření trombinu, který štěpí fibrinogen na monomery, které polymerizují za vzniku fibrinové sítě. Vlivem působení faktoru XIIIa vzniká nerozpustný fibrin.

1.3.2 Přirozené Inhibitory

Po ukončení procesu krevního srážení je nutno zneutralizovat aktivní formy koagulačních faktorů, aby nedocházelo k nekontrolovatelnému srážení krve i v jiných lokalitách cévního systému. K tomu slouží přirozené inhibitory koagulace.

Antitrombin je syntetizován v játrech a v endotelových buňkách. Blokuje trombin a formování fibrinu. Regulace syntézy antitrombinu je propojena s regulací syntézy fibrinogenu. Při štěpení fibrinogenu na fibrin dochází ke

zvýšení syntézy fibrinogenu a zároveň ke zvýšení syntézy antitrombinu. Účinek antitrombinu je mnohonásobně posílen vlivem heparinu.

Systém proteinu C je složen z plazmatických proteinů C (PC), S (PS) a trombomodulinu (TM). Protein C je syntetizován v játrech a endotelovými buňkami. Protein S je obsažen v α -granulech a v endotelu. Trombomodulin je neustále přítomen na povrchu endotelu. Aktivace proteinu C na aktivovaný protein C (APC) probíhá na povrchu endotelií. Kofaktorem této aktivace je TM, který váže vzniklý trombin. Trombin po vazbě na TM již není schopen koagulační aktivity. APC společně s PS inaktivuje FVIIIa a FVa a blokuje tak tvorbu dalšího trombinu.

Dalšími inhibitory koagulace jsou například inhibitor tkáňového faktoru, heparin kofaktor II, protein Z, α 2-makroglobulin a α 1-antitrypsin.

1.3.3 Faktory fibrinolýzy

Po zhojení rány je zapotřebí krevní sraženinu odstranit, aby došlo k úplnému zprůchodnění cévy a ke znovuobnovení hladkého průtoku krve. Toto se děje za pomoci fibrinolýzy. Fibrinolytický systém zahrnuje aktivátory i inhibitory fibrinolýzy, které jsou vzájemně regulovány mnohočetnými zpětnými vazbami.

Hlavním aktérem fibrinolýzy je plazmin, který vzniká aktivací plazminogenu. Na štěpení plazminogenu se podílí především tkáňový aktivátor plazminogenu. Plazminogen je také aktivován po podání urokinázy, čehož se využívá při trombolytické léčbě. Vzniklý plazmin štěpí fibrin na menší jednotky - fibrin degradační produkty a dále na D-Dimery, které jsou přímým důkazem štěpení nerozpustného fibrinu. Po ukončení fibrinolýzy je nadbytečný plazmin odstraněn přirozenými inhibitory aktivátoru plazminogenu a α 2-antiplazminem. Plazmin navázaný na fibrin je chráněn před účinkem α 2-antiplazminu.

1.4 Úloha trombocytů v hemostáze

Trombocyty mají nezastupitelnou funkci v primární, ale i sekundární hemostáze. Hlavní funkcí krevní destičky je výstavba primární hemostatické zátky – destičkového agregátu, který zacelí narušenou integritu cévní stěny.

Kontaktem krevních destiček s poškozenou cévní stěnou dojde nejprve k jejich aktivaci a vzápětí k adhezi. Děj pokračuje uvolňovací reakcí a následnou agregací. Výsledkem je vytvoření primární hemostatické zátky. Posledním krokem je retrakce, kdy dochází ke zpevnění krevní sraženiny. Celý tento děj by neměl fyziologicky trvat déle než 5 minut (Penka et al., 2011).

1.4.1 Adheze a aktivace destiček

Při adhezi krevní destičky přilnou na obnažený subendotel poškozené cévy. Adhezi zprostředkovává VWF vazbou mezi receptory kolagenu poraněné cévy a GPIIb/IIIa na povrchu trombocytu. Na adhezi krevních destiček se může také podílet fibronektin, vytvářením vazeb mezi GPIIb/IIIa a VWF. Míra adheze je dále ovlivněna počtem destiček, množstvím a viskozitou krve, velikostí a tvarem cév (Pecka, 2006).

Současně s adhezí probíhá aktivace destiček pomocí agonistů ADP, epinefrinem, trombinem a kolagenem, které se vážou na příslušné specifické receptory. Dochází k aktivaci fosfolipázy C a přesunu Ca^{2+} , tím dojde k uvolnění kyseliny arachidonové, k inhibici cAMP a k uvolnění proteinkinázy. Výsledkem je během několika sekund změna diskoidního tvaru destičky na kulovitý a vytvoření pseudopodií, čímž dochází až k desetinásobnému zvětšení povrchu krevní destičky.

Při aktivaci destiček současně dochází prostřednictvím enzymu skramblázy k přetočení záporně nabitých membránových fosfolipidů na povrch (Sakalová et al., 2010). Negativně nabitý povrch je nezbytný pro interakci plazmatických faktorů, účastnících se sekundární hemostázy.

1.4.2 Uvolňovací reakce

Při uvolňovací reakci dochází k přesunutí sekrečních α -granul do centra trombocytu, poblíž otevřeného kanálkového systému. Nejprve dojde k sekreci obsahu α -granul, zejména VWF, destičkového faktoru 4, β -tromboglobulinu a fibrinogenu. Poté následuje uvolnění ADP z δ -granul. Vazbou ADP na receptor dochází prostřednictvím mezibuněčných signálů k aktivaci dalších destiček a tím k posílení aktivace GPIIb/IIIa.

1.4.3 Agregace

Samotná agregace vzniká vytvořením můstků vazbou fibrinogenu mezi receptory GPIIb/IIIa dvou sousedních destiček. Na jedné neaktivované destičce je přes 40 tisíc vazebných míst pro molekulu fibrinogenu a na aktivované až 80 tisíc. (Kvasnička, Kvasnička jr., 2003). Nejprve dochází k reverzibilní primární agregaci, která je vyvolána uvolněním malého množství ADP z poškozené tkáně. Destičky jsou spojeny mezi sebou pouze prostřednictvím receptorů na svých výběžcích. Receptory GPIIb/IIIa se v tuto chvíli na povrchu vyskytují jen v malém počtu, proto i spojení destiček je pouze částečné. Při slabém působení induktoru může dojít k rozpojení destiček - deagregaci.

Při dostatečně silném působení induktoru dojde k sekreci většího množství ADP z δ -granul a sekreci obsahu α -granul, trombospodinu a fibronektinu. Trombospodin se podílí na stabilizaci fibrinogenových můstků. Na povrchu destičky dojde k expresi mnohem většího počtu receptorů GPIIb/IIIa. Destičky se vzájemně spojují mnohem těsněji, dochází k ireverzibilní sekundární agregaci. Vytváří se bílý destičkový trombus – primární hemostatická zátka.

Agregace fyziologicky následuje po adhezi, ale lze ji snadno vyvolat přímým působením induktorů, například ADP, epinefrinem, kolagenem, trombinem nebo tromboxanem 2. Za normálních okolností epinefrin vyvolává agregaci destiček pouze v dávkách, dalece převyšujících jeho fyziologickou koncentraci. Naopak zvýšená agregabilita destiček při několikanásobném ředění ADP a epinefrinu bývá popisována při syndromu lepičích destiček.

1.4.4 Retrakce

Další velmi významnou funkcí krevních destiček je schopnost retraktability, čili smrštění destičkové zátky. Na retrakci koagula se podílí GPIIb/IIIa navázaný na fibrinovou síť a cytoskelet destičky s kontraktilním aparátem. Důvodem kontrakce koagula je obnovení průchodnosti poraněné cévy.

2. Syndrom lepivých destiček

Syndrom lepivých destiček (Sticky platelet syndrome – SPS) poprvé popsal v roce 1983 Holiday (1983) na mezinárodní konferenci o náhlých mozkových příhodách a mozkové cirkulaci v Arizoně. Jedná se dědičnou trombocytopenií s častým výskytem arteriálních a žilních trombóz a spontánních abortů u pacientů bez zjevných rizikových faktorů pro trombotická onemocnění. Projevuje se hyperagregabilitou trombocytů, vyvolanou podprahovými koncentracemi induktorů adenosin difosfátem (ADP) a/ nebo epinefrinem (EPI), přičemž agregace s jinými induktory je fyziologická.

SPS je po rezistenci na aktivovaný protein C druhou nejčastější vrozenou trombofilií. Ve spojitosti s arteriální trombózou se řadí SPS na první místo. Některé kliniky, například Univerzitní nemocnice Martin, již zahrnují vyšetření SPS do skríninku trombofilních onemocnění u pacientů s prodělanou arteriální trombózou mladších 35 let (Bartošová et al., 2011a).

2.1 Incidence a etiopatogeneze

Syndrom lepivých destiček je dědičné, autozomálně dominantní onemocnění s poměrně častým výskytem v populaci. SPS se u pacienta nemusí nijak klinicky projevit, jedná se daleko více o vrozenou dispozici k trombózám, nežli o její přímou příčinu. Nicméně pokud dojde ke klinickým projevům, vyskytují se většinou u mladších dospělých do 45 let. Dokonce byl popsán i případ SPS u 5-ti letého chlapce s masivním mozkovým infarktem (Mammen, 1995).

Onemocnění je způsobené poruchou funkce destiček, přesná příčina není dosud zcela objasněna. Bylo zjištěno, že trombózy vznikají i v jinak zdravých arteriích, bez známek aterosklerózy. Arteriální trombózy bývají často dávány do souvislosti s emočním stresem (Malý et al., 2007). Při stresu dochází k vyplavení většího množství epinefrinu (epinefrin = adrenalin), který způsobuje agregaci destiček. Ke klinickým projevům SPS může docházet i v těhotenství, kdy je přechodně zvýšená srážlivost krve. Možnou příčinou hyperagregability se v poslední době ukazují polymorfizmy některých povrchových destičkových glykoproteinů. K průkazu glykoproteinů se využívá průtoková cytometrie.

PLA1/A2 polymorfismus GPIIIa

Jedná se o defekt glykoproteinového receptoru IIIa, který je součástí komplexu GPIIb/IIIa. Tento komplex se nachází na povrchu trombocytů a je odpovědný za jejich agregabilitu. Polymorfismus PLA1/A2 GPIIIa je způsoben záměnou aminokyselin leucinu za prolin. Následkem tohoto defektu může docházet ke zvýšené citlivosti receptorů pro ADP, a tím následně k hyperagregabilitě destiček i při podprahových koncentracích ADP a epinefrinu. Klinicky polymorfismus GPIIIa může znamenat zvýšené riziko arteriálních trombóz a infarktů myokardu (Kubisz et al., 2006).

C807T polymorfismus GPIa

Lze uvažovat i o polymorfismu GPIa. Jedná se o defekt receptoru GPIa/IIa, který je odpovědný za adhezi destiček na kolagen I. typu v subendotelu cévní stěny. C807T polymorfismus GPIa vzniká záměnou aminokyseliny cytozinu za tymidin. Výsledkem je zvýšená exprese GPIa/IIa a tím i zvýšená adhezivita destiček (Bartošová et al., 2011a).

Gas6 protein

Gas6 protein (Gas6) je obsažen v α -granulech a náleží k proteinům vitamin K dependentním. Jeho struktura je vysoce homologní ke struktuře přirozeného inhibitoru proteinu S. Gas6 protein se zdá se být odpovědným za formování trombu. U SPS typu II byl prokázán vyšší výskyt protrombogenní alely G. Při pokusech na myších s přeneseným Gas6 byla prokázána zvýšená agregabilita destiček i při nízkých koncentracích ADP a epinefrinu.

Deficit Gas6 u druhé skupiny pokusných myší sice nesnižuje schopnost agregability, nicméně brání následné stabilizaci trombocytárních agregátů a částečně redukuje sekreci destičkových granul. Myši s deficitem Gas6 netrpí žádným spontánním krvácením. Z těchto důvodů by mohla být vyvolaná inhibice Gas6 další možností antitrombotické léčby (Kubisz et al., 2010).

P-selektin

Nedávno byla prokázána jistá souvislost SPS s výskytem glykoproteinu P-selektinu (CD62). P-selektin je obsažen v membráně α -granul a v endotelových buňkách cévní stěny. Ve skupině pacientů se SPS byla pomocí

průtokového cytometru prokázána významně vyšší exprese P-selektinu (CD62), než ve srovnávací skupině zdravých osob (Staško et al., 2011).

Nicméně, přímý vztah všech těchto polymorfizmů v souvislosti s výskytem SPS se stále nepodařilo jednoznačně prokázat a jsou nutné další studie.

2.2 Typy SPS

Typ SPS je klasifikován podle typu induktoru, který vyvolává hyperagregabilitu destiček. Existují tři typy SPS.

- SPS typu I
 - Hyperagregabilita po ADP i epinefrinu.
 - Výskyt ve 26,7 % z celkového počtu SPS.
- SPS typu II
 - Hyperagregabilita pouze po epinefrinu.
 - Nejčastější výskyt v 71,3 % z celkového počtu SPS.
- SPS typu III
 - Hyperagregabilita pouze po ADP.
 - Raritní výskyt pouze ve 2 % z celkového počtu SPS (Mammen, 1995).

2.3 Klinické projevy

Syndrom lepivých destiček je jednou z vrozených dispozicí k trombózám, neznamená to tedy, že se nutně klinicky projeví. Pro SPS je charakteristický opakovaný výskyt arteriálních a žilních trombóz, nestabilní angina pectoris, dále infarkty myokardu, cévní mozkové příhody, opakované ztráty plodu, trombóza retinálních arterií, familiární výskyt migrén, mentální anorexie a nefrotický syndrom. Opakované trombotické komplikace u SPS vznikají i navzdory antikoagulační léčbě heparinem (Sand, Mann, 2009).

První případ SPS

Poprvé byl diagnostikován SPS v roce 1982 u 24-leté ženy, která prodělala v 7. měsíci těhotenství akutní infarkt myokardu. Koronární artérie byly bez jakýchkoliv známek aterosklerózy. Veškeré v té době dostupné hemokoagulační testy byly v normě. Matka pacientky prodělala dříve v těhotenství také infarkt myokardu a bratr měl v 18-ti letech opakované záchvaty anginy pectoris, u kterých nebyly zjištěny žádné ischemické změny. Agregáční testy s nařaděnými koncentracemi ADP a epinefrinu vykazovaly u všech tří osob opakovaně vysokou hyperagregabilitu (Mammen, 1995).

Arteriální a venózní trombózy

Bick (1998) uskutečnil na klinice v Dallasu studii, která zahrnovala vyšetření 153 pacientů s nevysvětlitelnými venózními a arteriálními trombózami. Na základě této studie bylo zjištěno, že SPS může být příčinou hlubokých žilních trombóz ve 13,2 %, a arteriálních trombóz až ve 21 %. Při studii nebyly prokázány žádné korelující souvislosti mezi konkrétním typem SPS (I, II, III) a typem trombózy, venózní nebo arteriální.

Infarkty myokardu, angina pectoris, cévní mozkové příhody

Mammen (1999) provedl studii skupiny 41 pacientů po překonaném infarktu myokardu a s anginou pectoris. U všech pacientů byly jednoznačně zjištěny patologické agregace s ADP a EPI. Všem pacientům byla nasazena léčba ASA. Pouze jeden pacient, navzdory léčbě ASA, prodělal fatální infarkt myokardu, ostatní byli již bez klinických projevů.

Při další studii pacientů mladších 45 let s cévní mozkovou příhodou byla prokázána podobná hyperagregabilita destiček s ADP a EPI. U těchto pacientů nebyly zjištěny žádné rizikové faktory, nicméně v rodinné anamnéze byl prokázán vyšší výskyt infarktu myokardu a cévních mozkových příhod. Na dědičnost SPS ukazuje laboratorně nalezená stejná hyperagregabilita destiček u většiny rodinných příslušníků těchto pacientů (Mammen, 1999).

Spontánní aborty

Až 63 % samovolných potratů je způsobeno poruchami hemostázy, z toho 20 % zapříčiňuje SPS. Po antifosfolipidovém syndromu je SPS druhou nejčastější příčinou ztráty plodu. Samovolné potraty se nejpravděpodobněji

vyskytují v prvním trimestru právě proto, že na počátku těhotenství jsou cévy dělohy a placenty mnohem menší a vzniklý trombus je velice snadno zneprůchodní.

Bick a Hoppensteadt (2005) uskutečnili studii, které se zúčastnilo 351 žen s opakovanými samovolnými potraty. Předem byly vyloučeny pacientky s anatomickými, hormonálními a chromozomálními defekty. U 312 žen byla diagnostikována různá trombofilní onemocnění. Antifosfolipidový syndrom byl zjištěn u 60 %, SPS u 20 %, MTHFR mutace u 12 %, faktor V-Leiden u 3,7 %, u ostatních byl pak prokázán polymorfismus inhibitoru aktivátoru plazminogenu, deficit antitrombinu, PC a PS nebo heparin-kofaktoru II. Po nasazení léčby ASA v kombinaci s heparinem nebo nízkomolekulárním heparinem se podařilo 94 % z 312 žen úspěšně ukončit graviditu porodem zdravého novorozence.

Retinální trombózy

U pacientů s nevysvětlitelnými retinálními trombózami byl prokázán výskyt SPS až v 50 % (Loeffelbein et al., 2010). Randhawa a Van Stavern (2007) uvedli kazuistiku 15-ti letého chlapce, který po absolvování běžického maratónu zaznamenal ztrátu zraku v pravém oku. Anamnéza pacienta i jeho hemokoagulační vyšetření (lupus antikoagulans, PC a PS, faktor V-Leiden, tkáňový aktivátor plazminogenu), dále mutace protrombinu, homocystein a antikardiolipinové protilátky, byly bezvýznamné. Vyšetření SPS bylo opakovaně patologické. Podobný případ 40-ti letého muže se ztrátou zorného pole levého oka s patologickým SPS popsali i Mears a Van Stavern (2009).

Posttransplantační trombózy

SPS může být pravděpodobně příčinou vzniku trombóz po transplantaci. Mühlfeld et al. (2007) zdokumentoval tři případy do té doby asymptomatických pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledvin a záhy poté se u nich rozvinula arteriální nebo venózní trombóza. V jednom případě došlo k infarktu přímo transplantované ledviny, a to i navzdory kontinuálnímu podávání heparinu.

Všechny laboratorní testy, zahrnující PC, PS, antitrombin, antifosfolipidové protilátky, Leidenskou mutaci FV, MTHFR mutaci, destičkový faktor 4 a počet trombocytů, byly v normě. Po vzniku postransplantační trombózy byl u všech tří pacientů diagnostikován SPS typ II. Z těchto důvodů by

mělo být vyšetření SPS zahrnuto do předtransplanatačních testů (El-Amm et al., 2008).

AIDS

SPS je také často diagnostikován u pacientů s AIDS, kteří podstupují antiretrovirovou léčbu. U velké části těchto pacientů se vyskytují nevysvětlitelné kardiovaskulární komplikace. Lopez et al. (2008) provedl studii, kdy byl prokázán výskyt SPS u 73 % pacientů s AIDS s antiretrovirovou léčbou.

2.4 Diagnostika SPS

U pacienta s tromboembolickou příhodou se doporučuje nejprve vyšetřit všechny běžné rizikové faktory: aktivita faktoru VIII, mutace faktoru V Leiden a faktoru II, PC a PS, antitrombin, homocystein a antifosfolipidové protilátky. Pokud není přidružená jiná trombofilie, bývají tyto testy v normě. Nakonec je vhodné provést vyšetření agregace destiček. Metoda se provádí podle Mammena se třemi nízkými koncentracemi induktorů ADP a epinefrinu. Vyšetření se opakuje s minimálním odstupem 3 týdnů (Mammen et al., 1988).

Diagnostická kritéria SPS:

- Překonaná trombóza a hyperagregabilita ve dvou koncentracích stejného induktoru.
- Překonaná trombóza a hyperagregabilita v jedné koncentraci obou induktorů.
- Suspektní SPS - překonaná trombóza a hyperagregabilita pouze v jedné koncentraci jednoho induktoru.

Vyšetření rodinných příslušníků

Protože se jedná o dědičné onemocnění, doporučuje se při patologickém nálezu provést diagnostiku i u dalších rodinných příslušníků.

Kubisz et al. (2011) popsal výskyt SPS v rodině u 29-leté pacientky (dvě děti) s přechodnou ischemickou atakou a se suspektní cévní mozkovou příhodou (CMP). Matka pacientky prodělala v mladém věku CMP, stejně tak její babička a prababička (úmrtí ve 28 letech). Starší sestra pacientky podstoupila

několik neúspěšných těhotenství, které skončily spontánním potratem. Nejstarší sestra byla bez klinických příznaků (dvě děti).

U pacientky a všech výše zmíněných osob včetně dětí byl diagnostikován SPS typ I nebo typ II. Po zahájení léčby ASA jsou všichni dosud bez jakýchkoliv trombotických komplikací. Nejstarší sestře pacientky se podařilo úspěšně porodit zdravého novorozence.

2.5 Referenční meze SPS – literární zdroje

Doporučuje se stanovení vlastních referenčních mezí danou laboratoří.

- Referenční meze - Národní centrum hemostázy a trombózy v Martine

Induktor	Koncentrace induktoru	Referenční meze
ADP	2,3 $\mu\text{mol/l}$	20 – 60 %
	1,2 $\mu\text{mol/l}$	11 – 23 %
	0,6 $\mu\text{mol/l}$	3 – 10 %
Epinefrin	11 $\mu\text{mol/l}$	20 – 60 %
	1,1 $\mu\text{mol/l}$	11 – 30 %
	0,55 $\mu\text{mol/l}$	8 – 15 %

(Bartošová et al., 2011a)

- Referenční meze dle Bicka (2002)

Induktor	Koncentrace induktoru	Referenční meze
ADP	2,34 $\mu\text{mol/l}$	7,5 – 55 %
	1,17 $\mu\text{mol/l}$	2 – 36 %
	0,58 $\mu\text{mol/l}$	0 – 12 %
Epinefrin	11 $\mu\text{mol/l}$	39 – 80 %
	1,1 $\mu\text{mol/l}$	15 – 27 %
	0,55 $\mu\text{mol/l}$	9 – 20 %

2.6 Léčba

Antikoagulační léčba hepariny nebo kumariny není účinná při prevenci trombózy způsobené SPS. Je nutno použít antiagregancia. Léčba by měla být celoživotní. Při přerušení léčby dochází s novou generací trombocytů k opětovné hyperagregabilitě destiček a eventuálním klinickým projevům SPS.

Kannan et al. (2008) popsali kazuistiku mladého muže (17 let), který prodělal infarkt myokardu a následně arteriální trombózu dolní končetiny. Měsíc po zahájení léčby Warfarinem byl pacient znovu přijat, tentokrát s cévní mozkovou příhodou, přičemž naměřená hodnota INR byla 2,7. Teprve nyní, po stanovení diagnózy SPS typ I (zvýšená agregace po ADP i EPI), byl Warfarin nahrazen ASA. Po dobu 3 let byl pacient bez jakýchkoliv komplikací, dokud svévolně nepřerušil léčbu ASA. Po 14 dnech bez léčby ASA byl znovu přijat do nemocnice s masivním mozkovým infarktem, který skončil fatálně.

Blokace enzymů cyklu kyseliny arachidonové

Lékem první volby při léčbě SPS je kyselina acetylsalicylová (ASA). Vlivem účinku ASA dochází k blokaci enzymů cyklu kyseliny arachidonové, významně se podílejících na aktivaci krevních destiček. Konkrétně ASA ireverzibilně inhibuje cyklooxygenázu po celou dobu životnosti destiček (7 - 10 dní). Inhibicí cyklooxygenázy dochází ke snížení tvorby tromboxanu A₂ a dalších prostaglandinů. ASA má velmi krátký poločas rozpadu – asi 20 minut, nicméně i během této krátké doby dojde k ovlivnění funkce v podstatě všech krevních destiček. Předpokládá se, že ASA dokáže inhibovat i mladé destičky přítomné ve zralých megakaryocytech (Pecka, 2004).

ASA se obvykle podává v malé dávce 100 mg denně. Tato dávka většinou normalizuje hyperagregabilitu a slouží jako ochrana proti trombotickým recidivám. Malé procento pacientů na nízkou dávku 100 mg ASA nereaguje, je tedy zpočátku nutná opakovaná kontrola léčby. Dávku lze postupně zvyšovat až na 325 mg denně. Pokud i poté nalézáme u pacienta hyperagregabilitu, může se jednat o rezistenci na ASA a je nutno nasadit jiné antitrombocytární léky, například clopidogrel a jiné (Kubisz, 2006).

Blokace membránových receptorů pro ADP

V případě rezistence na ASA se podávají inhibitory ADP receptorů, clopidogrel, ticlopidin. Tyto inhibitory nevratně inhibují ADP receptory P2Y, čímž je znemožněna agregace pro stimulaci ADP, ale proces změny tvaru destičky při její aktivaci ovlivněn není.

Blokace receptorů GPIIb/IIIa

Další možností léčby je užití inhibitorů abciximab nebo tirofiban, které zablokují funkci GPIIb/IIIa obsazením jejich receptorových míst a tím následně znemožní navázání fibrinogenových můstků mezi sousedními destičkami. Tato protideštičková léčba je v současnosti nejúčinnější (Pecka, 2004).

Léčba v těhotenství

Těhotná pacientka se SPS by měla být sledována v hematologické ambulanci. Pokud je průběh těhotenství normální, lze podávat preventivní dávku ASA 100 mg denně. V posledním měsíci před porodem je vhodné pacientku převést na nízkomolekulární heparin (LMWH), aby se zamezilo případným krvácivým komplikacím při porodu. Po 2 týdnech po porodu opět podáváme ASA (Bartošová, et al., 2008) U pacientek se SPS a předchozími rekurentními aborty je indikována léčba kombinace ASA a LMWH po celou dobu gravidity (Kessler, 2006).

Nestandardní situace při léčbě

Pokud se u pacienta vyskytuje SPS zároveň s jiným trombofilním onemocněním, je vhodné nasadit léčbu ASA současně s LMWH, například fraxiparinem. ASA a LMWH se doporučuje užívat i při dlouhodobém cestování (nad 6 hodin), imobilizaci pacienta, nebo při předoperační přípravě (Bartošová et al., 2011b).

II. Experimentální část

3. Laboratorní vyšetření SPS

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Vyšetřovaný materiál

Jako vyšetřovaný materiál jsme použili krev odebranou do zkumavky s protisrážlivým činidlem citrátem sodným. Poměr protisrážlivého činidla a krve je 1:10 (1 díl roztoku + 9 dílů krve).

3.1.2 Laboratorní pomůcky

- Zkumavka Vacutainer 4,5 ml, sodium citrate 0,109 M, modrý uzávěr.
- Jehla Fine-Ject, velikost 0,9 x 40 mm, žlutá.
- Pipeta Finnpiquette pro objem 10 µl, 20 µl, 25 µl a 50 µl.
- Pipeta Vitrum, nastavitelný objem 100 µl – 1000 µl.
- Pipetovací špičky typ Eppendorf, bílá 10 µl, žlutá 200 µl a modrá 1000 µl.
- Mikrozskumavky typ Eppendorf 1,5 ml, sterilní zkumavky Gama 15 ml.
- Silikonizované kyvety Helena Laboratories, velikost 8 mm x 60 mm.
- Magnetická míchadla.
- Centrifuga Hettich, poloměr rotoru 15 cm.

3.1.3 Přístroje

3.1.3.1 AggRAM™ Helena Laboratories

AggRAM™ Helena Laboratories (obr.1) je čtyřkanálový agregometr. Pracuje na principu turbidimetrie. Jako zdroj světla slouží laserové diody. Přístroj měří při vlnové délce 650 nm. Součástí přístroje je termoblok, který temperuje inkubační a měřicí jamky na teplotu 37°C. Vyšetřovaná plazma s

induktory je promíchávána pomocí magnetických míchadel. AggRAM™ Systém Software využívá platformu Microsoft® Windows® XP.

Princip metody

Metoda je založena na principu turbidimetrie. Postupná tvorba destičkových agregátů v plazmě bohaté na destičky (PRP - platelet rich plasma) způsobuje vzestup transmise světelného paprsku kyvetou. Plazma bohatá na destičky s induktory reprezentuje 0 % agregaci, plazma chudá na destičky (PPP – platelet poor plasma) reprezentuje 100 % agregaci. Vznikající destičkové agregáty jsou strhávány magnetickým míchadlem ke dnu kyvety, tím dochází k postupnému vyčeření původně zkalené PRP plazmy. Čím více trombocytů agreguje, tím je propustnost světla vyšší. Tato změna transmise je graficky zaznamenávána.

Výsledkem je agregační křivka, ze které AggRAM™ provádí automatické vyhodnocení několika parametrů: Ma (maximální amplituda) je dána výškou agregační křivky a udává procento agregovaných trombocytů za časovou jednotku, dále je hodnocen parametr slope (sklon křivky) [%/min] a parametr T/50, který nám udává, za jakou časovou jednotku zagreguje polovina všech destiček. Pro vyšetření SPS využíváme pouze parametr Ma – maximální amplitudu (www.helena.com).



Obr.1 Agregometr AggRAM™ Helena Laboratories

3.1.3.2 LH 750 Coulter Beckman

LH 750 Coulter Beckman (obr.2) je automatický hematologický analyzátor počtu krevních buněk. Jeho součástí je zdrojová jednotka, vlastní analyzátor, DMS stanice Windows 2000 (Data Management System) – s obousměrným propojením na laboratorní informační systém. Každý parametr krevního obrazu je měřen třikrát a jako výsledek se používá vážený průměr. Analyzátor pracuje v uzavřeném i otevřeném systému náběru vzorků (www.immunotech.cz).

Princip metody

Metoda je založena na impedančním principu. Do měřicí kyvety je pomocí vakua postupně vháněna suspenze krevních buněk. Vně i uvnitř kyvety se nachází polarizované stejnosměrné elektrické pole. Při vniknutí částice do vstupního otvoru dojde ke změně měrného odporu prostředí. Částicí vyvolaná změna napětí je měřena voltmetrem. Velikost napěťového impulsu je pak přímo úměrná objemu měřené částice. Každá částice vyvolá jeden napěťový impuls, čímž je možno zaznamenat jejich počet (Pecka et al., 2010).



Obr.2 LH 750 Coulter Beckman

3.1.4 Reagencie

- ADP reagent 2 x 1 ml, adenosin difosfát, koncentrace po rekonstituci je 20 $\mu\text{mol/l}$, Helena Laboratories (ADP)
- Epinefrin reagent 2 x 1 ml, lyofilizovaný preparát adrenalinu, koncentrace po rekonstituci je 300 $\mu\text{mol/l}$, Helena Laboratories (EPI)
- Chlorid sodný 0,9 % roztok, B-Braun, fyziologický roztok (FR)
- Aqua per injectione B-Braun (AQUA)



Obr.3 Reagencie epinefrin a ADP

3.2 Charakteristika sledovaného souboru

Pro stanovení referenčního rozmezí jsme provedli vyšetření agregace destiček se třemi nízkými hodnotami ADP a EPI u 60 zdravých dobrovolníků a dárců, nekuřáků. Jednalo se o 30 mužů a 30 žen ve věku od 21 do 40 let s věkovým průměrem 32 let a mediánem 31 let. Dárce jsme vyšetřovali v období od září 2011 do června 2012.

Skupinu 16 vyšetřovaných pacientů tvořily převážně mladé ženy ve věkovém rozmezí 28 - 34 let a jeden muž ve věku 37 let. Průměrný věk pacientů byl 34 let, medián 33 let. Pacienti pocházeli z naší hematologické ambulance a z blízkého centra asistované reprodukce. Jednalo se o ženy s opakovanými aborty v prvním trimestru těhotenství a muže s opakovanými venózními trombózami dolní končetiny. Soubor pacientů pochází z období od září 2012 do března 2013.

Vyšetření SPS u pacientů jsme zopakovali s odstupem 3 týdnů. V případě, že se výsledky druhého vyšetření lišily od prvního, bylo nutné provést i třetí odběr.

3.3 Odběr vzorku

Na odběr krve pro vyšetření SPS se pacient dostaví do hematologické ambulance po předchozím objednání, při kterém obdrží pokyny pro odběr na vyšetření SPS (příloha č.1). Alespoň 10 dní před odběrem je nutná absence léků a potravin ovlivňující funkci destiček. Mezi léky způsobující dysfunkci destiček řadíme anopyrin (ASA), ale i ibuprofen, β -laktámová antibiotika, nitroglycerin, nitroprusid a antidepresiva. Mezi potraviny inhibující funkci destiček patří také různé bylinné čaje, ryby, ginkgo biloba, česnek, cibule, kmín a indický šafrán (Shen, Frenkel, 2007).

Odběr se provádí nalačno, nejlépe v dopoledních hodinách. Je vhodné se zdržet stresu a námahy bezprostředně před odběrem. Pro vyšetření postačí 9 ml plné krve. Je nutné dodržet správný poměr mezi krví a protisrážlivým roztokem, zkumavka musí být naplněna až po vyznačenou rysku. Po odběru je nutno krev ve zkumavce jemně promíchat s protisrážlivým roztokem pěti až deseti násobným převrácením.

Z důvodu případné nežádoucí aktivace trombocytů se nedoporučuje použít odběr pomocí vakua a zatažení paže turniketem při odběru. Ze stejného důvodu je ideální provádět odběr co možná nejbližší laboratoři, kde bude vzorek následně zpracován a v přítomnosti laborantky (Malý, 2005). Pokud toto není možné, je nutné zajistit co nejrychlejší a nejšetrnější transport vzorku do laboratoře. V žádném případě se nedoporučuje použití potrubní pošty.

- Vpich jsme provedli žlutou jehlou, povolili turniket a krev jsme nechali volně nakapat (obr.4) až po rysku do dvou otevřených zkumavek Vacutainer s modrým uzávěrem na 4,5 ml s citrátem sodným. Zkumavky jsme bezprostředně po odběru opět uzavřeli a opatrně promíchali.



Obr.4 Odběr krve pro vyšetření SPS

3.3.1 Příprava vzorku

Protože u krevních destiček velice snadno dochází k jejich aktivaci, veškerá manipulace se vzorkem a jeho promíchávání se provádí velmi opatrně. Je nutno destičky udržet v neaktivním stavu až do okamžiku vlastního vyšetření. Vyšetřovaná plazma se pipetuje výlučně modrou špičkou s velkým otvorem ze stejného důvodu.

- Po odběru jsme zkumavky opatrným převrácením promíchali a následně centrifugovali 10 minut při 1 000 ot/min (167 g). Na centrifuze jsme nastavili funkci šetrného brždění SOFT.
- Z obou zkumavek jsme odebrali vrchní část plazmy bohaté na destičky (PRP – platelet rich plasma) do sterilní zkumavky Gama 15 ml a jemně promíchali.
- Pro přípravu bezdestičkové plazmy (PPP – platelet poor plasma) jsme zbylý vzorek znovu centrifugovali 15 minut při 3 800 ot/min. (2 421 g).

3.3.2 Úprava počtu trombocytů

Počet trombocytů v PRP je nutno upravit naředěním na počet $250 \times 10^9/l$. K ředění se používá PPP.

- Nejprve jsme změřili počet trombocytů v PRP na analyzátoru LH 750.
- Vypočítali jsme, kolik ml PPP potřebujeme přidat k 1 ml PRP, abychom získali požadovaný počet trombocytů (PLT).

Výpočet:

$$\text{Množství PPP} = \frac{\text{naměřený počet PLT v PRP} \times 10^9/l}{\text{požadovaný počet PLT } 250 \times 10^9/l} - 1$$

Příklad: naměřená hodnota PLT = $550 \times 10^9/l$

$$\text{Množství PPP} = \frac{550}{250} - 1 = \mathbf{1,2 \text{ ml}}$$

K 1 ml PRP jsme přidali 1,2 ml PPP.

- Oba díly PRP a PPP jsme vložili do další sterilní zkumavky Gama a opatrně promíchali.

3.4 Příprava reagensí ADP a EPI

- Při přípravě jsme postupovali podle pokynů výrobce v příbalovém letáku.
- Reagencie jsme nechali vytemperovat na laboratorní teplotu po dobu 30 minut.
- Přidali jsme 1 ml AQUA, nechali rekonstituovat 30 minut při laboratorní teplotě a poté jemně promíchali.
- Takto připravené reagencie mají při $2 - 8 \text{ }^\circ\text{C}$ stabilitu 1 týden a při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 měsíce.

3.4.1 Příprava nízkých koncentrací ADP

Podle následující tabulky 1 jsme připravili do mikrokumavek typ eppendorf, za použití fyziologického roztoku (FR), tři nízké koncentrace ADP.

Tab.1 Příprava nízkých koncentrací ADP

ADP 20 $\mu\text{mol/l}$		
Ředění		Výsledná koncentrace
1:8	20 μl ADP + 140 μl FR	2,5 $\mu\text{mol/l}$
1:20	20 μl ADP + 380 μl FR	1,0 $\mu\text{mol/l}$
1:40	150 μl ADP 1:20 + 150 μl FR	0,5 $\mu\text{mol/l}$

3.4.2 Příprava nízkých koncentrací EPI

Obdobným způsobem jsme připravili tři nízké koncentrace EPI podle tabulky 2.

Tab.2 Příprava nízkých koncentrací EPI

EPINEFRIN 300 $\mu\text{mol/l}$		
Ředění		Výsledná koncentrace
1:30	10 μl EPI + 290 μl FR	10,0 $\mu\text{mol/l}$
1:300	50 μl EPI 1:30 + 450 μl FR	1,0 $\mu\text{mol/l}$
1:600	200 μl EPI 1:300 + 200 μl FR	0,5 $\mu\text{mol/l}$

3.5 Vlastní měření

Zpracování vzorku a jeho měření by mělo být ukončeno maximálně do 60 minut po odběru krve. Z tohoto důvodu nelze vyšetřovat více vzorků najednou, je nutno pacienty odebírat a vyšetřovat postupně.

- Do jedné silikonizované kyvety jsme napipetovali 250 μl PPP.

- Do čtyř silikonizovaných kyvet jsme napipetovali á 225 μl vyšetřované PRP (obr.5) a vložili na 2 minuty do inkubačních jamek v přístroji (37 °C).
- Nejprve jsme provedli měření PPP ve všech čtyřech měřících kanálech.
- Poté jsme do měřících kanálů vložili kyvety s PRP a přidali magnetická míchadla. Rychlost míchání je v přístroji standardně nastavena na 600 ot./ min.
- Jako první jsme provedli měření s induktorem EPI. Do kyvety v prvním kanálu jsme přidali 25 μl reagentie EPI o výchozí koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$. Do kyvet ve třech ostatních kanálech jsme přidali 25 μl reagentie EPI s postupně se snižující koncentrací induktoru 10,0; 1,0 a 0,5 $\mu\text{mol/l}$.
- Na monitoru jsme po chvíli mohli sledovat tvořící se jednotlivé agregační křivky.
- Měření agregace s EPI jsme prováděli po dobu 10 minut.
- Poté jsme obdobným způsobem provedli měření pomocí induktoru ADP. Použili jsme reagentii ADP o koncentraci 20; 2,5; 1,0 a 0,5 $\mu\text{mol/l}$.
- Měření agregace s ADP jsme prováděli po dobu 5 minut.
- Po skončení měření jsme zaznamenané agregační křivky s výsledky vytiskli a vyhodnotili.



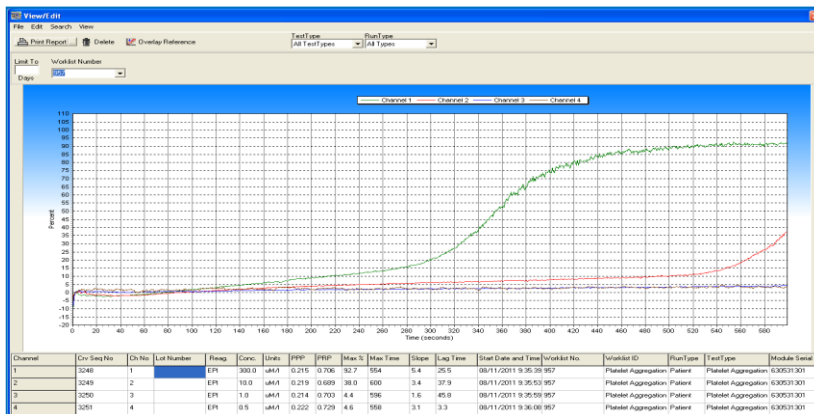
Obr.5 Pipetování PRP do silikonizovaných kyvet.

3.6 Hodnocení výsledků agregačních křivek

Přístroj zaznamenává procento agregovaných trombocytů, čím více trombocytů agreguje, tím vyšších hodnot dosahuje maximální amplituda (Ma) agregační křivky.

3.6.1 Fyziologická agregace s EPI

Na obr.5 je patrný vzestup zelené agregační křivky s výchozí koncentrací EPI 300 $\mu\text{mol/l}$. Ma křivky dosahuje 92,7 %. Ostatní agregační křivky s nízkými koncentracemi EPI (10,0; 1,0 a 0,5 $\mu\text{mol/l}$) dosahují Ma pouze 38,0 %, 4,4 % a 4,6 %.



Obr.5 Fyziologický výsledek agregace s EPI

3.6.2 Patologická agregace s EPI

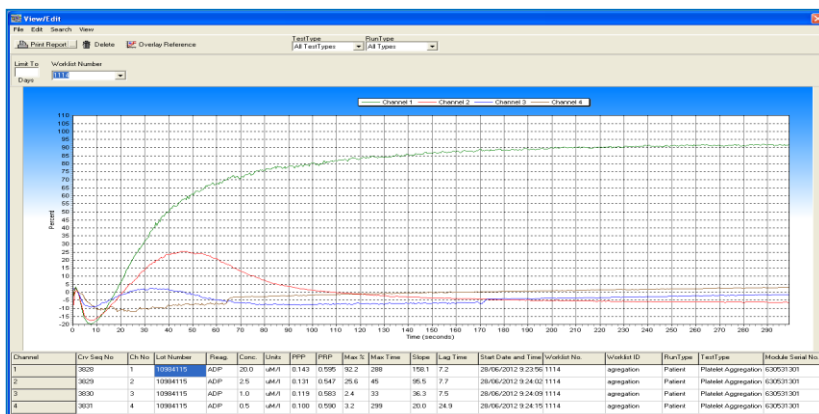
Na obr.6 můžeme vidět agregační křivky s nízkými koncentracemi EPI (10,0; 1,0 a 0,5 $\mu\text{mol/l}$), které dosahují vysokých hodnot Ma 92,0 %, 89,0 % a 91,8 %.



Obr.6 Patologický výsledek agregace s EPI

3.6.3 Fyziologická agregace s ADP

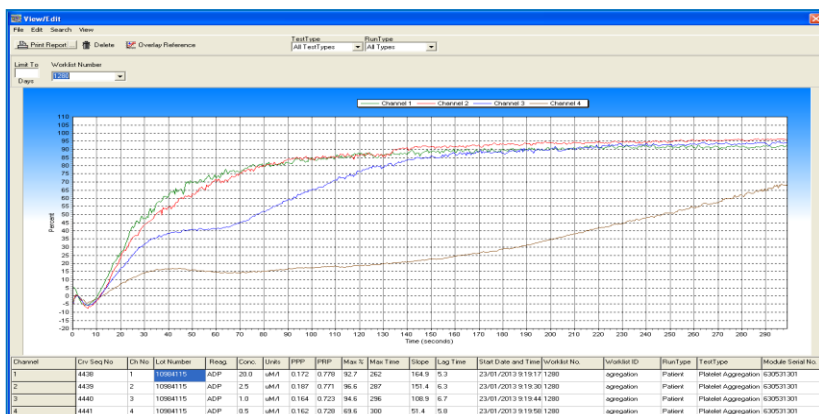
Na obr.7 je patrný vzestup zelené agregační křivky s výchozí koncentrací ADP 20 $\mu\text{mol/l}$. Ma křivky dosahuje 92,2 %. Ostatní agregační křivky s nízkými koncentracemi ADP (2,5; 1,0 a 0,5 $\mu\text{mol/l}$) dosahují Ma pouze 25,6 %, 2,4 % a 3,2 %.



Obr.7 Fyziologický výsledek agregace s ADP

3.6.4 Patologická agregace s ADP

Na obr.8 můžeme vidět agregační křivky s nízkými koncentracemi ADP (2,5; 1,0 a 0,5 $\mu\text{mol/l}$), které dosahují vysokých hodnot Ma 96,6 %, 41,1 % a 17,0 %. U obou dvou nejnižších koncentrací (modrá a černá křivka) je patrná první i druhá vlna agregace. Při vyšetření SPS hodnotíme u agregace s ADP Ma pouze u první vlny agregační křivky - primární agregace destiček.



Obr.8 Patologický výsledek agregace s ADP

3.7 Stanovení referenčního rozmezí

Stanovení referenčního rozmezí jsme provedli nepřímou parametrickou metodou (Racek et al., 2006).

3.7.1 Nepřímá parametrická metoda odhadu referenčních mezí

Tato metoda se používá bez ohledu na typ rozložení výsledků, tedy i v případě, že měřený parametr nemá v populaci normální rozložení četnosti a nelze jej graficky vyjádřit Gaussovou křivkou.

Naměřené hodnoty v % jsme seřadili do tabulky 3 podle velikosti od nejmenší hodnoty po největší. Pro zachování 95 % všech výsledků uvnitř referenčního rozmezí jsme odřízli 2,5 % výsledků dole i nahoře.

Výpočet dolní a horní referenční meze

Dolní (k_d) i horní (k_h) mez určuje k -tá hodnota ze seřazeného výběru.

$$k_d = 0,025 (n + 1) \quad k_d = 0,025 (60 + 1) = \underline{2}$$

$$k_h = 0,975 (n + 1) \quad k_h = 0,975 (60 + 1) = \underline{59}$$

Tab.3 Naměřené hodnoty agregace destiček zdravých osob v %

Dárci	ADP			EPI		
	2,5 $\mu\text{mol/l}$	1 $\mu\text{mol/l}$	0,5 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$	1 $\mu\text{mol/l}$	0,5 $\mu\text{mol/l}$
1	11	0	0	7	2	0
2	17	0	0	7	4	2
3	21	0	0	10	4	2
4	23	0	0	11	4	2
5	25	0	0	11	4	2
6	25	0	0	13	4	2
7	26	1	0	13	5	2
8	26	1	0	13	5	2
9	28	1	0	17	5	2
10	31	1	0	17	6	2
11	31	1	0	18	7	4
12	31	2	1	18	7	4
13	32	2	1	22	7	4
14	32	2	1	23	7	5
15	34	2	1	24	7	5

pokračování tab.3 na další straně

pokračování tab.3 z předchozí strany

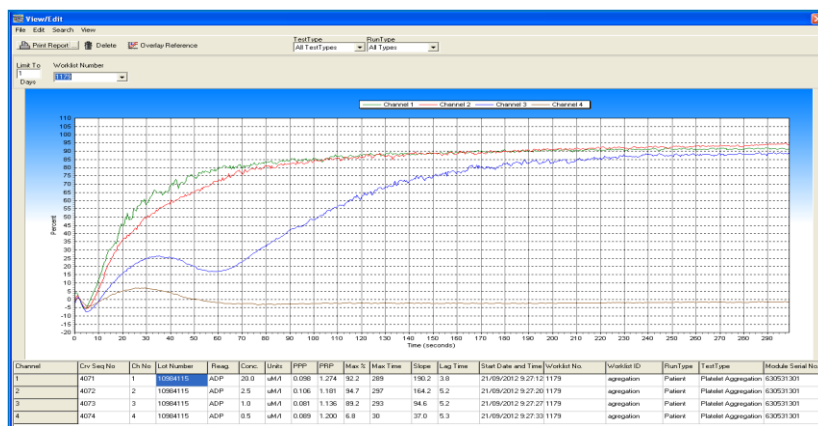
Dárci	ADP			EPI		
	2,5 µmol/l	1 µmol/l	0,5 µmol/l	10 µmol/l	1 µmol/l	0,5 µmol/l
16	34	3	1	24	7	5
17	34	3	1	29	8	6
18	34	5	1	34	10	6
19	35	5	2	38	10	6
20	35	5	2	38	10	6
21	35	5	2	46	10	7
22	36	6	2	54	10	7
23	36	6	2	59	10	7
24	37	6	2	67	10	7
25	38	7	2	68	11	7
26	40	7	2	72	11	8
27	40	8	2	74	12	8
28	40	8	2	75	12	8
29	40	8	2	75	12	8
30	41	9	2	75	13	8
31	41	9	2	77	13	8
32	41	10	2	78	13	9
33	43	10	3	79	14	9
34	44	10	3	79	14	9
35	45	10	3	79	14	10
36	45	11	3	80	14	10
37	46	11	3	80	14	10
38	47	12	3	80	15	10
39	47	12	3	80	15	10
40	48	13	3	80	16	12
41	50	13	3	80	16	12
42	50	14	4	80	16	12
43	50	14	4	80	16	12
44	50	14	4	80	18	12
45	50	15	4	80	19	13
46	50	15	5	80	19	13
47	52	15	5	80	19	13
48	53	17	5	80	19	13
49	54	17	5	80	20	14
50	55	17	5	80	20	14
51	55	18	5	81	20	14
52	58	19	6	81	20	14
53	59	22	6	81	23	15
54	60	22	10	81	24	15
55	60	22	10	81	26	15
56	60	22	10	81	26	15
57	60	23	11	81	27	17
58	62	23	11	81	28	18
59	62	23	15	82	29	19
60	65	25	19	82	32	21

3.7.2 Referenční meze stanovené naší laboratoří

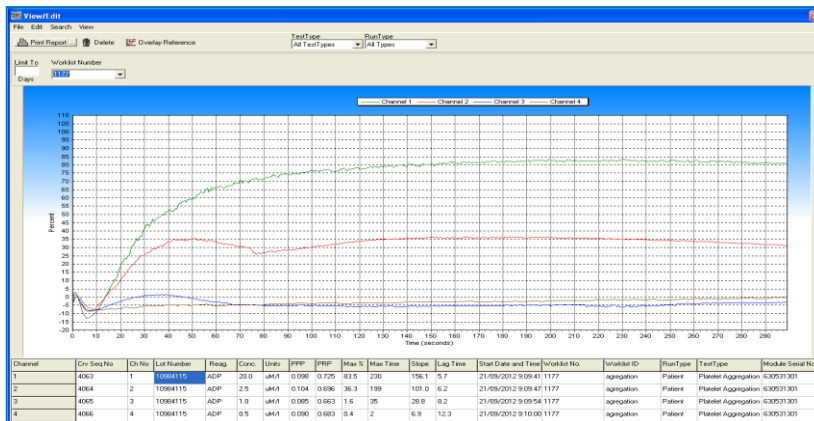
Induktor	Koncentrace induktoru	Referenční meze
ADP	2,5 µmol/l	17 – 62 %
	1 µmol/l	0 – 23 %
	0,5 µmol/l	0 – 15 %
Epinefrin	10 µmol/l	7 – 82 %
	1 µmol/l	4 – 29 %
	0,5 µmol/l	2 – 19 %

3.8 Úprava počtu trombocytů

Počet trombocytů v PRP jsme z počátku z důvodu co nejšetrnější manipulace s plazmou neupravovali, nicméně agregační křivky byly velkým množstvím destiček ($400-500 \times 10^9/l$) značně ovlivněné (obr.8). Proto jsme upravili množství destiček v PRP na $250 \times 10^9/l$ dle doporučení Yee et al. (2005). Průběh agregační křivky byl pak již charakteristický (obr.9).



Obr.8 Agregace s ADP ovlivněná vysokým počtem PLT = $523 \times 10^9/l$

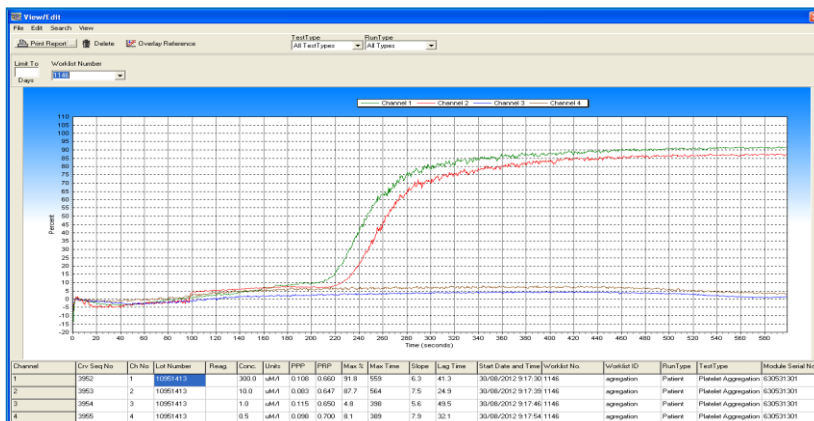


Obr.9 Agregace s ADP s upraveným počtem PLT = $250 \times 10^9/l$ (stejný vzorek)

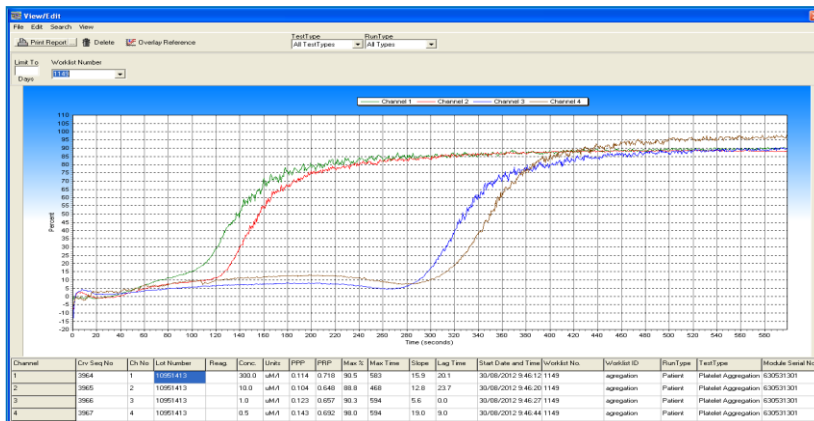
3.9 Prodleva mezi odběrem a měřením vzorku

V prvních etapách zavádění metody jsme začali dárce odebírat a vyšetřovat po 2 - 3 najednou s tím, že série vyšetření byla ukončena do 2 hodin po odběru. Hned na začátku jsme zaznamenali poměrně četný výskyt patologických agregací po epinefrinu, převážně u dárců vyšetřených ve druhém nebo třetím pořadí. Provedli jsme několik experimentálních měření, kdy jsme opakovali agregaci ze stejného vzorku po epinefrinu s odstupem 30 minut.

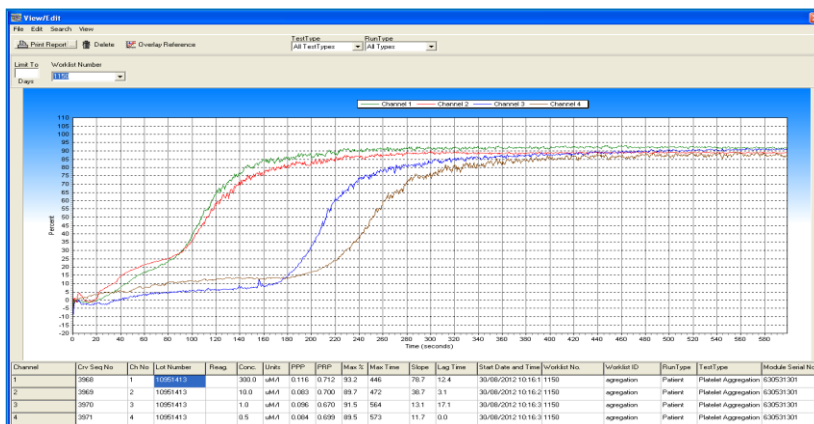
Z přiložených agregačních křivek (obr.10, 11, 12) vyplývá, že se vzrůstající prodlevou mezi odběrem vzorku a jeho měřením, vzrůstá i agregabilita destiček po epinefrinu. Agregabilita po ADP se v závislosti na čase výrazněji nemění.



Obr.10 Agregace s EPI, počátek měření 30 minut po odběru



Obr.11 Agregace s EPI, počátek měření 60 minut po odběru



Obr.12 Agregace s EPI, počátek měření 90 minut po odběru

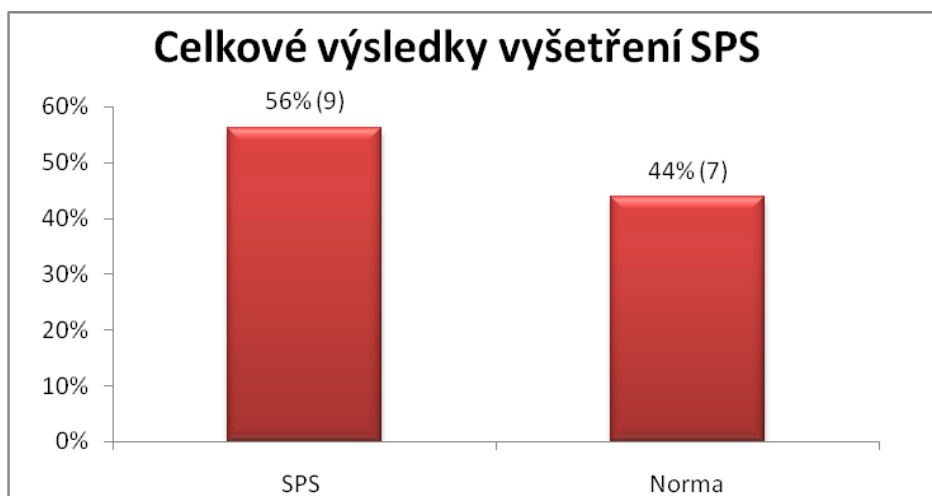
3.10 Centrifugace

Dalším problémem, který jsme řešili, bylo množství odebíraného materiálu. Odebírali jsme 2 zkumavky na 4,5 ml krve. Nejprve jsme vzorky centrifugovali 10 minut při 960 ot./min. (154 g), ale získané množství plazmy nám často nestačilo pro kompletní vyšetření.

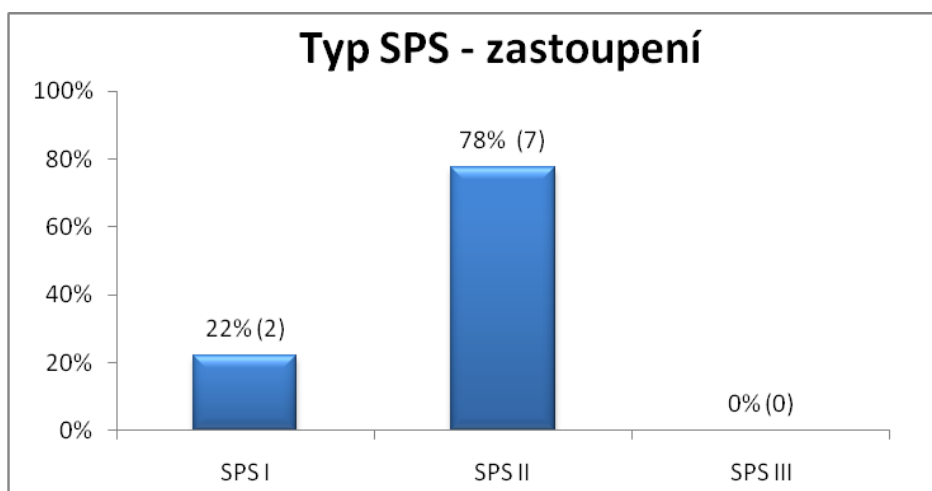
Odběr krve nakapáváním přes jehlu do otevřené zkumavky je nestandardní a pro pacienta ne zcela příjemný. Možnost odebírat další zkumavku navíc jsme proto zavrhli. Zkusili jsme zvýšit počet otáček při centrifugaci na 1 000 ot./min. (167 g). Množství získané PRP plazmy pak již stačilo, až na ojedinělé případy, pro kompletní vyšetření SPS.

4. Výsledky

Jak znázorňuje graf 1, u 44 % (7 pacientů) z celkového počtu 16 vyšetřených pacientů byla agregace destiček v normě. SPS byl diagnostikován v 56 % (9 pacientů). Graf 2 ukazuje četnost výskytu jednotlivých typů SPS. V naší laboratoři jsme diagnostikovali SPS typu I v 22 % (2 pacienti), SPS typu II ve 78 % (7 pacientů). Raritní SPS typ III jsme zatím nezachytili. Veškerá data vyšetřených pacientů (věk, pohlaví, počet samovolných abortů, výsledky vyšetření, typ SPS) jsou uvedena v tabulce č. 4.



Graf 1 Celkové výsledky vyšetření SPS u 16 pacientů v naší laboratoři



Graf 2 Jednotlivé typy SPS – zastoupení v naší laboratoři

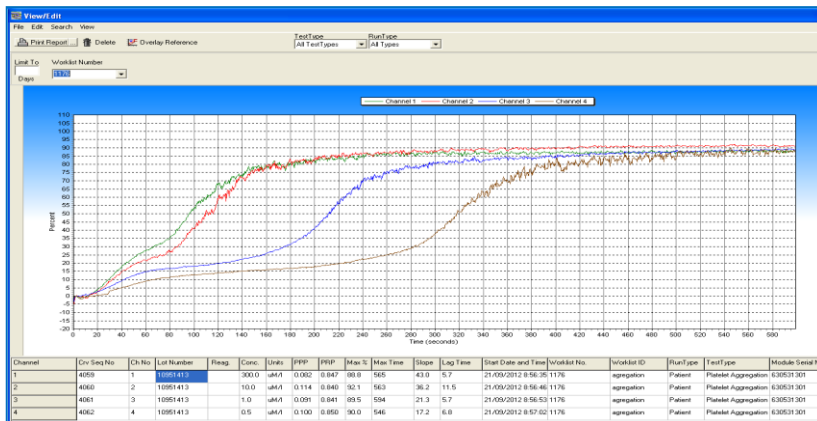
Tab.4 Výsledky vyšetření SPS u pacientů

	Pacient	Věk	Abort / VT (venózní trombóza)	žena /muž	ADP			EPI			Typ SPS
					2,5 μmol/l	1 μmol/l	0,5 μmol/l	10 μmol/l	1 μmol/l	0,5 μmol/l	
1	Z.L.	30	2	ž	21	2	2	7	7	2	-
					na 2.odběr se pacientka nedostavila						
2	W.M.	43	3	ž	104	23	1	95	78	8	II
					35	8	0	85	73	12	
3	Š.D.	37	2	ž	31	1	0	86	12	9,5	-
					40	7	2	90	78	17	
					40	5	2	93	27	21	
4	T.P.	34	2	ž	12	0	0	81	12	15	-
					34	1	0	81	11	12	
5	O.J.	28	3	ž	50	9	0	85	4	6	II
					53	14	0	87	62	11	
					x	x	x	84	48	12	
6	K.P.	30	3	ž	26	0	1	88	7	7	II
					32	6	2	83	70	14	
					36	2	0	94	53	8	
7	P.L.	37	opakované VT	m	98	23	10	92	90	90	II
					94	20	7	94	89	87	
8	P.Z.	30	2	ž	34	1	1	10	2	2	-
					35	1	1	54	5	2	
9	Č.B.	39	2	ž	48	10	2	88	23	13	-
					na 2.odběr se pacientka nedostavila						
10	N.M.	38	2	ž	55	11	2	90	77	28	II
					78	7	13	37	3	2	
					x	x	x	91	73	14	
11	Š.R.	44	4	ž	106	37	17	100	105	100	I
					98	32	15	96	98	90	
12	Ž.J.	32	3	ž	34	0	0	79	6	2	-
					málo materiálu			68	8	8	
13	T.K.	31	2	ž	47	2	3	91	88	39	II
					40	3	2	91	92	84	
14	Č.P.	28	2	ž	58	19	2	22	18	14	-
					55	17	4	79	48	17	
					50	6	0	67	13	15	
15	B.P.	38	4	ž	80	33	12	92	66	19	II
					60	14	1	88	86	84	
					55	22	4	34	14	12	
16	W.P.	29	1	ž	97	40	17	92	93	93	I
					63	25	10	88	81	85	

4.1 Vybrané kazuistiky

Muž P.L. 37 let

Vyšetřen v naší hematologické ambulanci po prodělání opakované venózní trombózy dolní končetiny po zaoceánském letu. Vyšetření PC, PS, APC rezistence, Leidenské mutace a mutace protrombinu bylo v normě. Opakované vyšetření hyperagregability destiček ukázalo patologie ve všech koncentracích epinefrinu - odpovídá **SPS II** typu (obr.13).



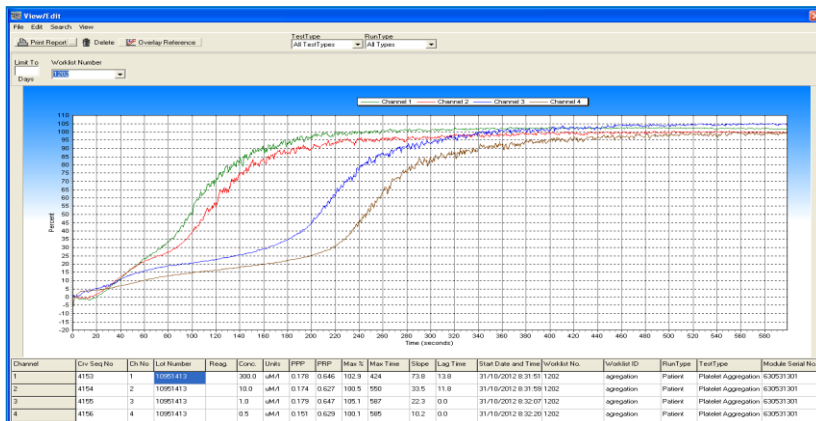
Obr.13 Muž P.L. 37 let – SPS II typ, agregace s EPI

Žena Š.R. 44 let

Pacientka poslána k vyšetření z centra asistované reprodukce pro 4 opakované aborty v prvním trimestru těhotenství. Vyšetření PC, PS, APC rezistence, Leidenské mutace a mutace protrombinu bylo v normě. Při opakovaném vyšetření hyperagregability destiček byly prokázány patologie po epinefrinu a ADP - odpovídá **SPS I** typu (obr.14 a 15).



Obr.14 Žena Š.R. 44 let – SPS I typ, agregace s ADP



Obr.15 Žena Š.R. 44 let – SPS I typ, agregace s EPI

Po nasazení léčby ASA jsme po 14 dnech provedli kontrolní vyšetření agregace k posouzení účinnosti léčby ASA. Provedli jsme také kontrolní měření s nízkými koncentracemi ADP a EPI. Na obr.16 a 17 je patrný vliv ASA, agregační křivky se normalizovaly.



Obr.16 Žena Š.R. 44 let – SPS I typ, agregace s ADP při léčbě ASA



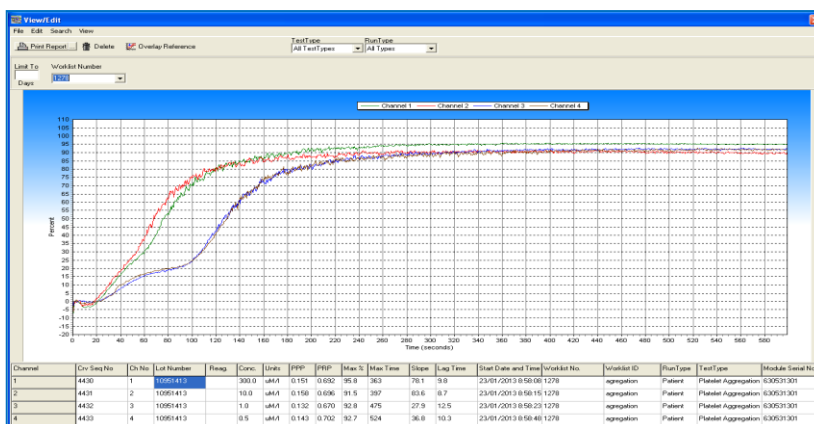
Obr. 17 Žena Š.R. 44 let – SPS I typ, agregace s EPI při léčbě ASA

Žena W.P. 29 let

Pacientka vyšetřena v naší hematologické ambulanci po prodělání 2 samovolných abortů. Vyšetření PC, PS, APC rezistence, Leidenské mutace a mutace protrombinu bylo v normě. Při opakovaném vyšetření hyperagregability destiček byly prokázány patologie po epinefrinu a ADP - odpovídá **SPS I** typu (obr.18 a 19).



Obr.18 Žena W.P. 29 let – SPS I typ, agregace s ADP



Obr.19 Žena W.P. 29 let – SPS I typ, agregace s EPI

5. Diskuse

Podařilo se nám standardizovat metodu tím, že jsme upravili počet destiček v PRP na optimální hodnoty $250 \times 10^9/l$, zkrátili jsme časovou prodlevu mezi odběrem a samotným vyšetřením na 30 minut z důvodu vzrůstající hyperagregability po epinefrinu a zvýšili jsme otáčky při centrifugaci na 1 000 ot./min. pro získání většího množství PRP. Ukázalo se, že je nutné dárce/pacienty odebírat a vyšetřovat jednotlivě a agregaci s epinefrinem začít provádět jako první, ideálně 30 minut od odběru.

Rovněž jsme vyzorovali, že u dárců/pacientů s minimálním nebo i žádným příjmem tekutin ráno před odběrem, byl získaný objem plazmy velmi malý právě z důvodu určité dehydratace, oproti dárcům/pacientům s normálním pitným režimem. Z těchto důvodů pacientům v našich pokynech před odběrem zdůrazňujeme, že je vhodné ráno před odběrem vypít dostatečné množství obyčejné vody (viz příloha č.1).

Zapotřebí byla i trpělivost pacientů, protože testy byly prováděny ze dvou, při neodpovídajících výsledcích měření i ze tří odběrů, s minimálně 3-týdenními intervaly. Pacienti se vždy museli dostavit k odběru krve do naší hematologické ambulance. Ukázalo se, že je vhodné krev odebírat v místě, kde proběhne bezprostřední zpracování a měření vzorku. Ideální je i přítomnost laborantky při odběru krve, aby „dohlédla“ na správný postup odběru a šetrné zacházení se vzorkem.

Na souboru 60 mladých zdravých dobrovolníků/dárců jsme stanovili referenční rozmezí pro agregaci indukovanou podprahovými koncentracemi ADP a adrenalinu (str. 41). Při porovnání námi stanovených mezí jsme byli ve shodě s referenčními hodnotami udávanými v literatuře. Nejvíce se přibližujeme referenčním rozmezím udávaným Bartošovou et al. (2011a), viz str. 25.

Laboratorní diagnostiku SPS jsme provedli u vybrané skupiny 15 pacientek s opakovanými aborty a u 1 muže s opakovanými venózními trombózami v mladém věku. Ačkoliv jsme z časových důvodů neměli možnost vyšetřit větší počet pacientů, zaznamenali jsme v naší laboratoři podobnou četnost výskytu jednotlivých typů SPS, jaká je udávána v literatuře (Mammen,

1995). Nejčastějším typem SPS v naší skupině pacientů je SPS typu II (zvýšená agregabilita trombocytů po epinefrinu) v 78 %, méně často SPS typu I (zvýšená agregabilita trombocytů po ADP i epinefrinu) ve 22 %, poslední raritní SPS typ III (zvýšená agregabilita trombocytů po ADP) jsme zatím nezachytili.

6. Závěr

V naší laboratoři jsme již měli určité zkušenosti s laboratorní diagnostikou syndromu lepkavých destiček. Nicméně bylo zřejmé, že je třeba ještě řešit některé problémy, se kterými jsme se dosud setkávali.

Laboratorní vyšetření SPS jako takové je v literatuře popisováno velice zřídka, převahu našich literárních zdrojů tvoří spíše zahraniční odborné články. Diagnostiku SPS provádí v ČR velice málo pracovišť, takže i výměna zkušeností byla skoro nemožná. Proto jsme uvítali v počátcích spolupráci s Oddělením hematologie a transfuziologie v Pelhřimově.

Metodika vyšetření SPS je vysoce citlivá, a přestože někdy bývá zpochybňována, je velmi dobře standardizovatelná za předpokladu, že jsou dodržena pravidla pro preanalytickou fázi. Důležité je pečlivé odebírání anamnézy, důkladné poučení pacienta před odběrem a rychlost dopravy odebraného biologického materiálu do laboratoře. Je nutné počítat i s tím, že nejen léky, ale i potravinové doplňky mohou sehrát roli v ovlivnění výsledku agregace. Osvědčily se nám i dodatečné dotazy pacientům při nesouhlasném výsledku opakovaného měření. U jedné pacientky jsme při prvním vyšetření prokázali zvýšenou hyperagregabilitu, při druhém vyšetření byly agregační křivky naopak velmi nízké. Na naše dotazy pacientka uvedla, že dle pokynů před odběrem na bolesti hlavy neužívala Ibalgin ani Anopyrin, ale „pouze Aspirin“. Vyšetření bylo nutné zopakovat ještě potřetí.

Protože se laboratorní vyšetření SPS provádí na poloautomatickém přístroji, je nezbytná i profesní erudice zdravotního laboranta, bez níž nelze dosáhnout validních výsledků.

Po stanovení diagnózy SPS a následném nasazení léčby kyselinou acetylsalicylovou z původního počtu 8 pacientek s prokázaným SPS otěhotněly dvě pacientky, bohužel obě těhotenství skončila spontánním abortem v 1. trimestru. V tuto chvíli není gravidní žádná pacientka.

Vyšetření SPS by mohlo být velkým přínosem pro pacientky s opakovanými spontánními aborty z nejasných příčin a pro pacienty s nevysvětlitelnými trombózami v mladém věku. Za velmi pozitivní považuji i

jednoduchý, ekonomicky nenáročný způsob léčby SPS kyselinou acetylsalicylovou, která může v mnoha případech výrazně snížit riziko rekurence trombotických komplikací.

7. Přílohy

- Příloha č.1 Pokyny před odběrem pro vyšetření SPS

Vyšetření syndromu lepkavých destiček (SPS)

Pokyny před odběrem

Vyšetření provádíme po předchozím telefonickém objednání na tel. čísle:

477 112 482 nebo 477 112 489

K odběru krve se dostavte **nalačno**.

Od půlnoci nekouřit, nepít kávu a čaj, ale **dostatečně se napít vody**.

Před samotným odběrem vyloučit fyzickou námahu a stres.

10 dní před vyšetřením:

- Neužívat léky obsahující kys.acetylsalicylovou (Anopyrin, Aspirin, Acylpyrin, Godasal).
- Neužívat léky proti bolestem kloubů (Ibuprofen, Ibalgin, Ibumax, Diclofenac, Voltaren).
- Neužívat antibiotika – penicilin a antidepresiva.
- Nejíst v nadměrné míře ryby, česnek, nepít odvary z bylin.
- Neužívat ginkgo biloba.
- Při nedodržení těchto pokynů mohou být výsledky vyšetření falešně negativní.

Kontakt:

Oddělení klinické hematologie, budova C, 4.podlaží

Masarykova nemocnice

Sociální péče 12A

401 13 Ústí nad Labem

8. Použitá literatura

BARTOŠOVÁ, L., DOBROTOVÁ, M., HOLLÝ, P., IVANKOVÁ, J., STAŠKO, J., KUBISZ, P.: Syndrom lepivých doštičiek – jeho diagnostika a liečba, *Lék Obz*, 56, 2008, č. 7-8, s. 512-513. Převzato od Bick a Hoppensteadt (2005)

BARTOŠOVÁ L., PLAMEŇOVÁ I., IVANKOVÁ J., KUBISZ, P.: Vrodené trombofilné poruchy krvných doštičiek, *Vask.med.*, 2011a, 3 (1), s. 18-20.

BARTOŠOVÁ, L., PLAMEŇOVÁ I., KUBISZ, P.: Syndróm lepivých doštičiek, *Interná med.*2011b, 11 (4), s. 197-200.

BICK, R.L.: Sticky platelet syndrome: A common cause of unexplained arterial and venous thrombosis, *Clin Appl Thromb Hemost*, 4, 1998, č.2, s. 77-81.

BICK, R.L.: Disorders of Thrombosis and Hemostasis: Clinical and Laboratory Practice, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2002, s. 80.

BICK, R.L., HOPPENSTEADT, D.: Recurrent miscarriage syndrome and infertility due to blood coagulation protein/platelet defects: a review and update. *Clin Appl Thromb Hemost*, 11, 2005, č.1, s. 1-13.

EL-AMM, J-M., ANDERSEN, J., GRUBER, S.A.: Sticky Platelet Syndrome: A Manageable Risk Factor for Posttransplant Thromboembolic Events, *American Journal of Transplantation* 2008; 8:465.

Holiday P.L., Mammen E., Gilroy J.: Sticky platelet syndrome and cerebral infarction in young adults. The Ninth International Joint Conference on Stroke and Cerebral Circulation. Phoenix, Arizona 1983.

KANNAN, S., Dhanasegaran, RAJI, V.: Recurrent arterial thrombosis in a young male: Sticky platelet syndrome, *The Internet Journal of Hematology*, vol.4, no.1, 2008.

KESSLER, P.: Trombofilní stavy, *Interní Med.* 2006; 9, s.374–379.

KVASNIČKA, J., KVASNIČKA, J. jr.: Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi, Grada Publishing a.s., Praha, 2003, s. 299.

KUBISZ, P., STAŠKO, J. a kolektiv: Hematol6gia a transfuziol6gia, Grada Publishing a.s., Praha, 2006, s. 159-214, ISBN 80-247-1779-4.

KUBISZ, P., IVANKOVÁ, J., HOLLÝ, P., STAŠKO, J., MUSIAL, J.M.: The glycoprotein IIIa PLA1/A2 polymorphism – a defect responsible for Sticky platelet syndrome? Clin Appl Thromb Hemost, 12, 2006, 6.1, s. 117-119.

KUBISZ, P., BARTOŠOVÁ, L., IVANKOVÁ, J., HOLLÝ, P., STAŠKO, J., ŠKEREŇOVÁ, M., PULLMAN, R.: Is Gas6 protein associated with sticky platelet syndrome?, Clin Appl Thromb Hemost, 2010, 16(6), s. 701-704.

KUBISZ, P., KOTULIČOVÁ, D., CHUDÝ, P., BARTOŠOVÁ, L., DOBOROTOVÁ, M., IVANKOVÁ, J.: Sticky platelet syndrome in a patient with transitory ischemic attack and the family. A case report, Rev Hematol Mex 2011;12(2):99-104.

LOEFFELBEIN, D.J., BAUMANN, C.M., MÜCKE, T., WOLFF, K.D., HOLZLE, F., KESTING, M.R.: Sticky platelet syndrome as a possible cause for free flap failure - a case report, 2010, Wiley-Liss, Inc. Microsurgery 30:466–468.

LOPEZ, H.C., CISNEROS, L.N., PEREZ, S.T., RODRIGUEZ, J.C., CRUZ, A.M.: Sticky platelet syndrome in patient with AIDS: a cross-sectional study, J Int AIDS Soc 2008, 11, s. 104.

MALÝ, J.: Vyšetření aktivity destičkových funkcí se vztahem k rezistenci na kyselinu acetylsalicylovou – editorial, Vnitřní lékařství, 2005, 51(2), s. 157-162.

MALÝ, J., DULÍČEK, P., BLAŽEK, M., MALÝ, R., PECKA, M., ŠIMKOVIČ, M.: Trombofilní stavy – laboratorní a klinická diagnostika, Interv akut kardiol 2007, 6 (Suppl.B): B11-B16.

MAMMEN, E.F., BARNHART M.I., SELIK N.R., GILROY J., KLEPACH G.I.: “Sticky platelet syndrome”: A congenital platelet abnormality predisposing to thrombosis?, Folia Haematol, Leipzig 115, 1988, s. 361-365.

MAMMEN, E.F.: Ten Year’s Experience with the „Sticky Platelet Syndrome“, Clin Appl Thromb Hemost, 1(1), 1995, s. 66-72.

MAMMEN, E.F.: Sticky platelet syndrome, Seminars in thrombosis and hemostasis, vol. 25, no 4, s. 361-365, 1999.

MEARS, K.A., VAN STAVERN, G.P.: Bilateral simultaneous anterior ischaemic optic neuropathy associated with Sticky Platelet Syndrome, Br J Ophthalmol July 2009 Vol 93 No 7.

MÜHLFELD, A.S., KETTELER, M., SCHWAMBORN, K., EITNER, F., SCHNEIDER, B., GLADZIWA, U., KNÜCHEL, R., FLOEGE, J.: Sticky Platelet Syndrome: An Underrecognized Cause of Graft Dysfunction and Thromboembolic Complications in Renal Transplant Recipients, American Journal of Transplantation 2007; 7: s.1865–1868.

PECKA, M.: Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie hemostázy, Finidr, s.r.o., Český Těšín, 2004, s. 237, ISBN 80-86682-03-X.

PECKA, M.: Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie krevní buňky, Finidr, s.r.o., Český Těšín, 2006, s. 304, ISBN 80-86682-02-1.

PECKA, M., BLÁHA, M., FÁTOROVÁ, I., KRATOCHVÍLA, J., MĚŘIČKA, P., PEŠKOVÁ, E., SADÍLEK, P., VÁCHOVÁ, M., VOKURKOVÁ, D., VRBACKÝ, F.: Praktická hematologie: Laboratorní metody, Nakladatelství Infiniti art, s.r.o., Český Těšín, 2010, s. 343, ISBN 978-80-903871-9-5.

PENKA, M., TESAŘOVÁ, E. et al.: Hematologie a transfuzní lékařství I, Grada publishing a.s., Praha, 2011, s. 421, ISBN 978-80-247-3459-0.

RAC, M.W.F., CRAWFORD, N.M., WORLEY K.C.: Extensive Thrombosis and First Trimester Pregnancy Loss Caused by Sticky Platelet Syndrome, The by The American College of Obstetricians and Gynecologists, 2011, vol. 117, no. 2, part 2, s. 501-503.

RACEK, J., EISELT, J., FRIEDECKÝ, B., HOLEČEK, V. et al.: Klinická biochemie, Nakladatelství Galén, Praha, 2006, s. 329, ISBN 80-7262-324-9.

RANDHAWA, S., VAN STAVERN, G.P.: Journal compilation © 2007 Royal Australian and New Zealand College of Ophthalmologists.

SAKALOVÁ, A., BÁTOROVÁ, A., MISTRÍK, M., HRUBIŠKO, M. et al.: Klinická hematológia, Vydavateľstvo Osveta, spol.s.r.o., Martin, 2010, s. 205, ISBN 978-80-8063-324-0.

SAND, M., MANN, B.: Sticky Platelet Syndrome type II presenting with arterial microemboli in the fingers, Thrombosis Research 124 (2009) s. 244.

SHEN, Y-M.P., FRENKEL, E.P.: Acquired Platelet Dysfunction, Hematol Oncol Clin N Am 21 (2007) s.647–661.

STAŠKO, J., BARTOŠOVÁ, L., MÝTNÍK, M., KUBISZ, P., Are the platelets activated in sticky platelet syndrome?, Thrombosis research 128, 2011, s. 96-97.

VÁLEKOVÁ, L.: Poruchy zrážania krvi, Via pract., 2005, roč. 2 (7–8), s. 311–315.

YEE, D., L., SUN, C., W., BERGERON, A., L., DONG, J., BRAY, P., F. : Aggregometry detects platelet hyperreactivity in healthy individuals, Blood, 2005, volume 106, number 8.

Internetové zdroje

<http://www.helena.com> (dostupné 2.3.2013)

<http://www.immunotech.cz> (dostupné 2.3.2013)