

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Zdravotnická bioanalytika



Laboratorní hodnocení trombofilních stavů  
DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové

Duben 2008

Šárka Studená

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat panu doc. RNDr. Miroslavu Peckovi, CSc. za odborné vedení, přístup a trpělivost v průběhu zpracování této diplomové práce. Vedoucím laborantkám na úsecích koagulace a speciálních metod, paní Nekolové a Dytrychové za ochotu a pomoc při řešení otázek, stejně jako Mgr. Sadílkovi.

Dále bych chtěla poděkovat všem na oddělení Klinické hematologie za trpělivost. Díky patří neméně panu Mgr. Bláhovi a paní Mgr. Vlačihovské za pomoc s úpravami v mé Diplomové práci.

Speciální poděkování patří panu doc. Mudr. Petru Dulíčkovi, PhD. za počáteční spolupráci a nabídku původního tématu ke zpracování.

“Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

## SOUHRN

Práce pojednává o výskytu trombofilních stavů a o možnostech jejich diagnostiky u žen s rekurentními spontánními aborty. Ve studii byl zpracován soubor žen vedených v hematologické poradně II. Interní kliniky – Oddělení klinické hematologie FN a LFUK v Hradci Králové v letech 1995 - 2007. U dříve vyšetřovaných žen jsem použila archivní data. Vyšetřování žen, které byly zařazeny do sestavy v posledních letech, jsem se sama aktivně zúčastnila.

Při zpracování sledovaného souboru byla použita následující kritéria, která by podle našich představ vycházejících z literárních pramenů, měla posoudit závažnost trombofilního stavu, případně zaznamenat zvýšenou incidenci jeho záchytu:

- věk – v této části jsme použili medián věku žen ze sledovaného souboru
- počet prodělaných abortů – tento parametr má poměrně značnou výpovědní hodnotu, ale je nutné přihlížet k celkové délce těhotenství, po jejímž uplynutí k abortu dochází (v prvním trimestru se považuje za významný až prodělaný třetí abort a v druhém trimestru prodělaný druhý abort).
- počet narozených dětí - riziko spontánního abortu se s každým dalším narozeným dítětem zvyšuje
- doba užívání antikoncepce – užívání antikoncepce může již v mladém věku odhalit sklon k trombofilnímu stavu. S délkou užívání by se riziko spontánního abortu u žen se sklonem k trombofilii mohlo zvyšovat
- výskyt trombofilních mutací – ženy, u nichž byly zjištěny některé mutace plazmatických koagulačních faktorů (zejména protrombinové nebo F V Leiden) trpí rekurentními aborty v prvním trimestru z důvodu trombofilie.

Jednotlivé části byly statisticky vyhodnoceny a výstupy převedeny do tabulek a názorných grafů. Ve zjištěných údajích se promítla většina dnes známých souvislostí trombofilního stavu a spontánního potrácení. I když u jednotlivých sledovaných ukazatelů byly zjištěny určité rozdíly, nepotvrdila se statistická významnost těchto rozdílů. To může být ovlivněno i poměrně malým zastoupením sledovaného parametru v daném souboru.

## SUMMARY

The thesis describes the occurrence of thrombophilic attacks and about their diagnostic possibilities in women with recurrent spontaneous abortions. In the study, the sample of women tested were the ones who subscribed for treatment in the 2<sup>nd</sup> internal disease clinic – Department of clinical hematology of Faculty hospital and Medical faculty University Karlovy in Hradec Kralove in years 1995-2007. I have also used the materials from archive whilst investigating some samples from past. I was actively involved in this investigation in last couple of years.

During writing conclusion of the knowledge gained, following criteria from the literature of our choice and search were used based on the described importance of thrombophilic attacks with rising incidence of its capture:

- age – in this part we used the median of age from the observed sample
- number of undertaken abortions – this parameter has a great significance, however it is needed to overview whole period of pregnancy, after which the abortions arose (in first trimester is crucial third abortion and in second trimester the second abortion has been under the count)
- number of newborn children – the risk of spontaneous abortion is rising with every child
- the period of using contraception – the usage of contraceptives can in an early stage show the possibility of thrombophilic attacks. With the length of using, the risk of spontaneous abort can be higher.
- the occurrence of thrombophilic mutations – women, who were investigated and in whom certain mutations of plasma coagulative factors (such as prothrombin or F V Leiden). These women suffer from recurrent first trimester attacks due to thrombophilia.

All parts of study were statistically investigated and the solutions were attached within tables and graphs. In investigated data, all the recent known relations of thrombophilic attacks and states of spontaneous abortions were involved. However, in individual gained data and markers were found some disagreements, the statistic credibility of this correlation was not clarified. This can be the result of small number of observed parameter in the investigated file.

# OBSAH

<b>OBSAH</b> .....	<b>6</b>
<b>1 ÚVOD A CÍL PRÁCE</b> .....	<b>8</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
2.1 <i>Trombofilní stavy (TS)</i> .....	10
2.1.1 Vrozené (kongenitální) trombofilní stavy .....	10
2.1.2 Získané (sekundární) trombofilní stavy .....	11
2.1.3 Rizikové faktory vrozených trombofilních stavů .....	11
2.1.4 Rizikové faktory získaných trombofilních stavů .....	17
2.1.5 Prevalence a incidence trombofilních stavů .....	18
2.1.6 Laboratorní vyšetření trombofilních stavů .....	20
2.1.7 Trombofilní stavy a těhotenství .....	26
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>28</b>
3.1 <i>Vyšetřovaný soubor</i> .....	28
3.2 <i>Materiál a přístrojové vybavení</i> .....	32
3.2.1 Odběr vzorku .....	32
3.2.2 Příprava PPP dvojitou centrifugací .....	32
3.2.3 Filtrace trombocytárními filtry .....	33
3.2.4 Skladování materiálu před vyšetřením .....	33
3.2.5 Rozmražení vzorku .....	33
3.2.6 Přístrojové vybavení .....	34
3.3 <i>Použité metody</i> .....	34
3.3.1 Aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT) .....	34
3.3.2 APTT citlivý na protilátky lupus antikoagulans (APTT– LA) .....	35
3.3.3 Protrombinový test (PT) .....	36
3.3.4 Diluční test s jedem Russelovy zmiže (DRVVT) .....	37
3.3.5 Rezistence na aktivovaný protein C (APC – R) .....	38
3.3.6 Funkční vyšetření proteinu C .....	40

3.3.7 Funkční vyšetření proteinu S.....	41
3.3.8 Antitrombin - AT.....	42
3.3.9 Fibrinogen (metoda podle Clausse) .....	43
3.3.10 D-Dimery - imunoturbidimetrie .....	44
3.3.11 Stanovení funkční aktivity F VIII .....	46
<i>3.4 Výsledky .....</i>	<i>47</i>
3.4.1. Zastoupení trombofilních mutací ve sledovaném souboru .....	47
3.2.2 Mutace a trombofilní parametry .....	48
3.2.3 Věk a trombofilní parametry.....	49
3.2.4 Orální antikoncepce a trombofilní parametry .....	50
3.2.5 Prodělané aborty a trombofilní parametry .....	51
3.2.6 Rozdělení souboru podle počtu narozených dětí.....	52
<b>5 GRAFY .....</b>	<b>54</b>
<b>6 DISKUZE .....</b>	<b>69</b>
<b>7 POUŽITÉ ZKRATKY .....</b>	<b>73</b>
<b>8 LITERATURA.....</b>	<b>75</b>

# 1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

U žen v těhotenství dochází fyziologicky ke zvýšení aktivity koagulačního systému. Hladina některých koagulačních faktorů (fibrinogenu, F IX, F VIII) s pokračujícím těhotenstvím lineárně stoupá. Současně dochází k poklesu hladin důležitých inhibitorů (proteinů C a S, antitrombinu). Ženy se získanou APC-R, nebo sníženým fibrinolytickým potenciálem (poklesem t-PA, zvýšením PAI-1, PAI-2) jsou vystaveny zvýšenému riziku vzniku tromboembolické komplikace.

Kromě změn hemostázy se projevují i reologické změny, které jsou vyvolány útlakem žilního řečiště gravidním uterem nebo distenzí žil způsobenou změnou hladiny ženských hormonů. Organismus ženy se tak brání nadměrným ztrátám krve při porodu. S pokračujícím stupněm těhotenství stoupá riziko venózního tromboembolismu, placentárního infarktu, špatného prokrvení placenty trombózou umbilikální žíly.

Gravidita a šestinedělí patří mezi fyziologické trombofilní stavy a riziko venózního tromboembolismu (VTE) je v graviditě 4x – 6x větší. Pravděpodobnost výskytu VTE se zvyšuje v přítomnosti některých dalších rizikových faktorů. U vrozených trombofilních stavů kromě rizika VTE hrozí i další komplikace během porodu. Jedním z příčin opakovaných abortů u žen v prvním trimestru těhotenství jsou právě vrozené nebo získané trombofilní stavy. Proto včasná diagnostika těchto stavů a racionální profylaktická opatření mohou minimalizovat výskyt VTE a porodnických komplikací (*Dulíček, 2006*).

Cílem mé práce bylo zmapovat situaci u žen s prodělanými 2 až 3 aborty v prvním trimestru těhotenství. Použila jsem retrospektivní soubor 98 žen s neobjasněnou příčinou abortů, vedených v hematologické poradně II. Interní kliniky – Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové od roku 1995 do roku 2007, u kterých byly vyšetřeny parametry, které ukazují na zvýšenou aktivitu koagulačního systému a případně prokazují vrozené predispozice ke vzniku trombofilního stavu.

Tyto parametry jsem u nověji zařazených žen sama vyšetřovala a celý



soubor hodnotila ve vztahu k zastoupení jednotlivých mutací (faktor V Leiden, protrombinová mutace) a dále k věku, době užívání orální antikoncepce, k počtu prodělaných abortů a počtu dětí. Rovněž jsem se pokusila prokázat, zda vznik abortu u souboru těchto žen může být v přímé souvislosti s výskytem trombofilního stavu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Trombofilní stavy (TS)

Trombofilní stav znamená predispozici ke vzniku trombózy. Jedná se o stavy, u kterých dochází ke změnám ve složkách hemostatických mechanismů, jež mohou vést ke zvýšené incidenci trombotických příhod. Nejčastějším projevem spojeným s trombofilním stavem je venózní trombóza.

Rozlišujeme vrozené a získané trombofilní stavy. Vrozené trombofilní stavy mají zvýšené riziko první tromboembolické příhody v nižších věkových kategoriích, zatímco vliv na rekurenci tromboembolických příhod u těchto stavů není zřejmý (Erlebacher, 2004; Salmon, 2004; Homburg, 2003).

V pojmech odlišujeme trombofilní stav, což je predispozice k trombózám od trombotického stavu, což je histo - patologický stav s výskytem trombu v krevním řečišti. (Pecka, 2006)

#### 2.1.1 Vrozené (kongenitální) trombofilní stavy

Jedná se o trombofilní stavy vyvolané mutacemi některých složek hemostatického systému, jejichž změněná funkce může vést k tromboembolické příhodě.

Klinicky významné kongenitální TS:

1. rezistence na aktivovaný protein C (APC - R) – je způsobena zpřevážně přítomnosti F V Leiden
2. mutace protrombinu G20210A
3. deficit proteinu C
4. deficit proteinu S
5. deficit antitrombinu - AT
6. dysfibrinogémie
7. hyperhomocysteinémie
8. syndrom lepivých destiček (sticky platelet syndrom) - SPS

9. deficity a polymorfismy F XII, trombomodulinu, TFPI, plazminogenu (vyskytují se méně často)

Za významné trombofilie smíšené etiologie považujeme:

- A. zvýšenou hladinu F VIII, podmíněnou familiárně, asociovanou s krevní skupinou jinou než 0, či jako protein akutní fáze - PAF
- B. hyperhomocysteinémií, jež může být podmíněna mutací MTHFR C677T či A1298C, nedostatkem vitamínu B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> či kyseliny listové
- C. zvýšenou hladinu fibrinogenu, který je proteinem akutní fáze
- D. zvýšenou hladinu F IX

( *Kvasnička, 2003; Poul, 2006* )

### 2.1.2 Získané (sekundární) trombofilní stavy

Jedná se o stavy spojené s vyšším věkem, faktory prostředí a životosprávy. U rizikových skupin je možné těmto stavům předcházet prevencí.

### 2.1.3 Rizikové faktory vrozených trombofilních stavů

#### 2.1.3.1 APC – R způsobená mutací F V Leiden

APC-R je vyvolána deficitem v antikoagulačním systému proteinu C a vede k nedostatečné odpovědi systému na aktivovaný protein C (*Dählbeck, 1993*). Systém proteinu C se skládá s proteinu C, proteinu S, trombomodulinu a EPCR. Pokud je protein C aktivován způsobuje v systému s proteinem S jako kofaktorem rychlou inaktivaci faktorů Va a VIIIa.

APC – R je způsobena bodovou mutací F V (G→A v nukleotidu 1691, v exonu 10, při které dochází záměně argininu za glutamin v pozici 506). Mutací vzniká koagulačně pozměněný faktor, který je rezistentní k aktivovanému proteinu C - F V Leiden (*Bertina, 1994*). Dědičnost této mutace je autozomálně dominantní. Jsou možné i další mutace: F V Cambridge (Arg→Thr) nebo homozygotní forma HR<sub>2</sub> haplotypu v genu F V či mutace F

V Hong-Kong (Arg 306→ Gly). Tyto mutace však nevedou k vyvolání venózní trombózy (Dulíček, 2006).

Častěji se jedná o získanou APC – R, která se vyskytuje v souvislosti s těhotenstvím, při užívání OC, u nádorových onemocnění, akutních zánětů, u stavů s cirkulujícími protilátkami typu LA či u nemocných s akutní trombotickou příhodou.

### 2.1.3.2 Mutace protrombinu G20210A

Další popsanou mutací, která predisponuje jedince k VTE je mutace protrombinu – G20210A, popsaná v roce 1996 Poortem (Poort, 1996). Protrombinová mutace G20210A se vyskytuje v kavkazské populaci kolem 2 % v závislosti na geografické distribuci (vyšší prevalence na jihu Evropy než na severu) a jedinci s touto mutací mají 2x – 3x větší relativní riziko VTE. Tato mutace byla nalezena v 18 % mezi jedinci s VTE mezi selektovanými nemocnými s familiárním výskytem VTE a v 6,2 % u jedinců (v neselektovaném výběru) s první VTE příhodou. V tabulce – dle Bertiny jsou shrnuty údaje o prevalenci trombofilních stavů (včetně F V Leiden), které jsou odvozeny z Leidenské trombofilní studie.

Tab. č. 1 – Prevalence ( v % ) trombofilních stavů (Bertina, 2001)

Rizikový faktor	Kontrolní skupina	Jedinci s I. VTE	Familiární VTE
F V Leiden	3	20	45
F II 20210A	2,3	6,2	18
deficit proteinu C	0,8	3,1	5,7
deficit proteinu S	1,3	1,1	5,7
deficit AT	0,2	1,1	4,3

#### 2.1.3.3 Deficit proteinu C

Protein C je syntetizován v játrech a jedná se o vitamín K<sub>1</sub> - dependentní protein s biologickým poločasem 5 - 7 hod. Je aktivován na povrchu endotelu komplexem [F IIa. TM]. Aktivovaný protein C selektivní proteolýzou štěpí faktory Va a VIIIa. PC patří mezi významné inhibitory plazmatického koagulačního systému (*Griffin, 1981*). Riziko vzniku trombózy je v případě deficitu tohoto faktoru 10 – 15x větší, než u populace bez deficitu (*Kvasnička, 2003*).

#### 2.1.3.4 Deficit proteinu S

Je to vitamín K - dependentní protein, který působí jako kofaktor v systému aktivovaného proteinu C. Je syntetizován v játrech s biologickým poločasem 48 hod. V plasmě se vyskytuje buď ve volné formě anebo vázaný na složku komplementu C4bBP ( asi 60 %). Tato složka nemá kofaktorovou aktivitu (*Schwarz, 1984*).

Podle „Leiden Thrombophilia study“ je stanoveno pro určení prevalence výskytu deficitu PS měření antigenu volného PS. Ve zmíněné studii byl nalezen deficit u 3 % pacientů s VTE, ale také 1,3 % v kontrolní skupině, z toho vyplývá, že riziko VTE zvyšuje deficit PS jen asi 2x.

deficity přirozených inhibitorů koagulace v homozygotní formě znamenají značné protrombotické riziko. U proteinu PC, PS se manifestuje deficit již po narození jako neonatální purpura fulminans, později jako recidivující VTE a warfarinem navozené kožní nekrózy. Deficity AT, PC, PS se diagnostikují v 5 – 10 % všech pacientů s VTE (*Kvasnička, 2003*)

#### 2.1.3.5 Hyperhomocysteinémie

Studie některých autorů z posledních let naznačují, že mírně zvýšená hladina plazmatického homocysteinu (12-30 μmol/l), zvyšuje riziko vzniku ICHM nebo kardiovaskulárních onemocnění. Homocystein nepříznivě ovlivňuje endoteliální povrch i koagulační faktory.

Zvýšená hladina může být způsobena buď vrozenými defekty v chemické struktuře enzymů, které zasahují do jeho metabolismu např. MTHFR (metylen tetrahydrofolát reduktázy) nebo CBS (cystathion-β-synthetázy).

Hyperhomocysteinemie je primárně vyvolána mutací genu pro cystathion-β-synthetázu, nebo genu pro reduktázu methylen-tetrahydrofolátu (MTHFR). Dysfunkce obou enzymů pak vede k blokování jak metabolismu methioninu, tak i homocysteinu. Odhaduje, že mutace MTHFR se záměnou cytosinu 677 thyminem (C677T) se v homozygotní formě vyskytuje až u 8 – 10 % osob (*Sela, 1995*).

Druhotné zvýšení hladiny homocysteinu v krvi je možné pozorovat i u osob s chronickým deficitem vitamínu B<sub>12</sub>, kyseliny listové nebo vitamínu B<sub>6</sub> (pyridoxinu), vyvolané jejich nedostatkem v potravě. Hyperhomocystein je dále jako jeden z uremických toxinů nalézán u osob s renální insuficiencí. Homocystein potencuje uvolňování tkáňového faktoru, dále produkci inhibitoru fibrinolýzy PAI-1 a aktivitu faktorů XII a V. V poslední době se ukazuje, že tento faktor není pro vznik TEN tak významný, jak se původně předpokládalo.

#### 2.1.3.6 Deficit antitrombinu - AT

AT je významným inhibitorem trombinu a ostatních serinových proteáz – faktorů VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa. Inhibici potencuje přítomnost heparinu. AT je syntetizován v játrech a jeho biologický poločas se pohybuje kolem 48 hod. Je přítomen v plazmě i mimo cévy ve tkáních. Normální aktivita v plazmě dospělých je 0,8 – 1,2 (80 – 120 %). U novorozenců je nižší 0,5 – 0,7 (50 – 70 %). Tato nižší aktivita je kompenzována vyšší hladinou alfa-2-makroglobulinu. Aktivita kritická z hlediska trombofilie je 0,5 (50 %) a u těhotných žen je tato hranice vyšší a pohybuje se kolem 0,8 (80 %).

Vrozený deficit AT má v populaci prevalenci 1 : 2000 – 1 : 5000 a patří mezi stavy s malou frekvencí výskytu, ale značného trombofilního efektu. Relativní riziko VTE u jedinců s vrozeným deficitem AT je 25 – 50x větší než

u jedinců bez těchto deficitů. Rozlišujeme dva typy tohoto deficitu:

Typ I – nízká hladina antigenu, nízká inhibiční aktivita

Typ II – normální hladina antigenu, nízká inhibiční aktivita

#### Deficit antitrombinu I. typu

Dochází k němu nejčastěji následkem konzumpce AT po výrazné aktivaci koagulačního systému. Nejčastěji se nachází u DIC; ke konzumpci dochází i při terapii heparinem či při sepsích. AT nepůsobí jen inhibičně, ale také zvyšuje uvolňování PGI<sub>2</sub> z endotelií a redukuje orgánové poškození indukované uvolněním cytokinů. Deficit může mít dále tyto příčiny:

- snížená syntéza při jaterním onemocnění
- zvýšená ztráta při nefrotickém syndromu
- vrozený deficit (asi 0,02 % populace)
- léčba estrogyeny

Homozygotní forma deficitu AT - I. typu, je neslučitelná se životem.

#### Deficit antitrombinu II. typu

- deficit spočívající v poruše schopnosti vázat aktivované faktory
- deficit spojený s dysfunkční vazbou heparinu
- pleiotropní defect – kombinovaná vada

#### 2.1.3.7 Dysfibrinogemie a hyperfibrinogemie

Normální hladina fibrinogenu se pohybuje mezi 1,5 – 4,5 g/l. Zvýšená hladina fibrinogenu (hyperfibrinogemie) je prognostickým rizikovým faktorem u řady onemocnění včetně kardiovaskulárních onemocnění. Stále není přesně známo, jak dalece přispívá vysoká hladina fibrinogenu k etiologii onemocnění a jak dalece je pouze následkem patologického procesu. Hyperfibrinogemie způsobuje hyperkoagulační stav a je většinou asociována se zvýšenou agregací destiček a hyperviskozitou. Důsledkem je redukce

krvního toku a ischemie. U hematologických pacientů je hyperfibrinogenémie častým průvodním nálezem v rámci základního onemocnění, hlavně v souvislosti se septickými komplikacemi. Fibrinogen je mnohem citlivější tvořit oxidativní modifikaci ve srovnání s ostatními plasmatickými bílkovinami (*Křížová, 2003*)

Stejně jako hyperfibrinogenémie může i dysfibrinogenémie vést k aterosklerotickým příhodám. Kongenitální dysfibrinogenémie může být vyvolána mutacemi ve třech genech řetězce A  $\alpha$ , B  $\beta$  a  $\gamma$ , které dohromady tvoří molekulu fibrinogenu. Na základě funkčních testů s trombinem je hladina fibrinogenu (např. dle Clauss) při dysfibrinogenemii snížena, ale kvantitativní testy (koncentrace antigenu fibrinogenu, nebo tepelný test na průkaz fibrinogenu) jsou v normě. Zatím bylo nalezeno 260 různých druhů kongenitální dysfibrinogenémie a u 100 z nich byla zjištěna mutace DNA, přepisu mRNA, nebo syntézy proteinu. Z nich je asi 55 % asymptomatických, 25 % vyvolává u svých nositelů krvácení a u 20 % byl naopak zjištěn sklon k trombotizaci (*Marchi, 2000*).

#### 2.1.3.8 Deficit plasminogenu

Bez většího klinického dopadu jsou ojediněle se vyskytující kongenitální poruchy funkce fibrinolytického systému (deficit plasminogenu či deficit tkáňového aktivátoru plasminogenu t-PA). Zatím je nejvíce prozkoumán polymorfismus inserce, delece Ala v intronu mezi 8.–9. exonem genu pro t-PA. Ten však bazální sekreci t-PA z endotelu neovlivňuje (*Ejinden-Schrauwen, 1995*).

#### 2.1.3.9 Deficity dalších faktorů

Deficit, nebo dysfunkce Hagemanova faktoru (F XII). Je známo, že Hagemanův faktor se v koagulaci in vivo prakticky vůbec neuplatňuje. Proto jeho deficit není provázen krvácením. Může však být spojen s žilním tromboembolizmem. Hagemanův faktor je důležitý pro aktivaci fibrinolýzy



tzv. vnitřní cestou a jeho nedostatek vede k snížení fibrinolýzy.

Nestabilitu fibrinové sraženiny, spojenou s vyšším rizikem embolizace, může způsobit i dysfunkce F XIII. Fibrin stabilizující F XIII je transglutamináza o velikosti 320 kD, skládající se z tetrameru dvou jednotek A a dvou jednotek B. Zatím bylo popsáno asi 20 mutací genu pro jednotku A spojených s deficitem F XIII, u kterých byl zjištěn sklon ke krvácení. S žilní trombofilií je však spojen jen polymorfismus F XIII (Val – 34 Val). Jiný polymorfismus F XIII (Val 34 Leu) vyvolává naopak protekci proti žilní trombóze. Souvisí však také s nestabilitou žilního trombu a s jeho snadnou embolizací.

#### 2.1.3.10 Syndrom lepivých destiček

Syndrom lepivých destiček (Sticky Platelet syndrom) je vrozená porucha trombocytů projevující se jejich zvýšenou agregabilitou po aktivaci adrenalinem (epinefrinem) nebo ADP. Příčina není zcela jasná, mohlo by jít o poruchu destičkových glykoproteinových receptorů. V laboratorních podmínkách destičky pacientů s SPS vykazují hyperagregabilitu už při nepatrných hladinách adrenalinu nebo ADP. Podle toho, jaký typ agregace je potlačen rozlišujeme tři podtypy tohoto syndromu.

Klinicky se SPS manifestuje jako cerebrovaskulární, retinální, hluboká venózní nebo akutní koronární trombóza. SPS může být také příčinou opakovaných abortů. Léčba heparinem, warfarinem ani ASA nezabírá a nesnižuje riziko trombózy u takto postižených pacientů. K trombóze může dojít i při optimální antikoagulační léčbě či antitrombotické léčbě (*Pecka, 2006*).

#### 2.1.4. Rizikové faktory získaných trombofilních stavů

Mezi získané trombofilní stavy patří myeloproliferativní stavy (zejména trombocytémie), stavy po prodělané trombóze, malignity, srdeční nedostatečnosti NYHA III a IV, závažná respirační onemocnění, autoimunitní choroby, gravidita a šestinedělí, léčba estrogény, PNH, APC-R nevyvolaná

přítomností faktoru V Leiden, nefrotický syndrom, věk > 60 let, chronické střevní záněty, obezita, kouření, varixy DK, paréza končetin. Z klinického hlediska má největší význam antifosfolipidový syndrom.

#### 2.1.4.1 Antifosfolipidový syndrom

Vyvolávají jej autoprotilátky proti koagulačním faktorům, které se váží na fosfolipidy, případně autoprotilátky, které se vážou na komplexy těchto proteinů s fosfolipidy. APA působí na více úrovních, především na úrovni endotelu, v systému PC a mají významný vliv na průběh primární hemostázy.

Mezi antifosfolipidové protilátky se řadí protilátky typu „lupus anti-koagulans“ (LA) nebo antikardiolipinové protilátky. LA jsou tvořeny buď imunoglobuliny třídy IgG, nebo IgM, či jejich kombinací (IgG + IgM). Vyskytují se zejména u žen s SLE (asi u 30 % nemocných), nebo s jinými systémovými chorobami pojiva. Často se také nachází u nemocných s maligními lymfomy

Klinické projevy antifosfolipidového syndromu jsou značně heterogenní povahy. Většinou jde o trombotické příhody (asi v 60 % jde o žilní trombózy, ve 30 % jde o cévní mozkové příhody a v 10 % o jiné arteriální trombózy).

Mezi faktory, které mohou zkomplikovat průběh trombofilního stavu nebo jej i vyvolat patří zejména věk, obezita, užívání OC nebo HRT, imobilizace, chirurgické a ortopedické operace, maligní a myeloproliferativní choroby. Prodělání VTE nebo varixy na dolní končetině patří také mezi samotné predispoziční faktory rekurence VTE (*Bulíková;Penka, 2005*).

#### 2.1.5. Prevalence a incidence trombofilních stavů

Pro účelnou klinickou interpretaci je důležité znát indikační kritéria. U trombofilních stavů se zvažují tato kritéria:

- VT pod 45 let věku (u AT pod 35 let),
- pozitivní rodinná anamnéza výskytu VT pod 50 let věku
- vznik VT po velmi malém podnětu

- vzniklá VT v neobvyklé lokalizaci (v portální, slezinné, renální, dolní duté žíle apod.)
- vznikající kumarinové nekrózy na kůži (při deficitu PC a PS)
- vznik rekurentních trombóz i přes odpovídající antikoagulační léčbu
- nedostatečná odpověď na léčbu heparinem

Kongenitálním trombofilním stavům je věnována v současné době značná pozornost. Patří totiž mezi nejrozšířenější kardiovaskulární choroby společně s ICHS a CMP. V posledních letech se stanovením incidence zabývaly studie:

- Andersonova - 107 prokázaných VT/100000 jedinců (*Anderson, 2003*)
- Nordström v prospektivní studii v Malmö - 1,6/1000 jedinců (*Nordström, 1992*)
- studie v USA - 1/1000 jedinců (*Heit, 2006*)

Incidence ovšem závisí také na věku. Před 40 rokem je 1 VT/10 000 jedinců a po 75. roce už 1 VT/100 jedinců (*Dulíček, 2006*).

Klinický obraz akutní plicní embolie a hluboké žilní trombózy je málo výrazný a specifický a má relativně malý význam při stanovení správné diagnózy. Nejběžnějšími příznaky jsou dušnost, pleurální bolest, neklid a kašel. Při fyzikálním vyšetření můžeme pozorovat zrychlené dýchání, tachykardii, akcentaci druhé ozvy nad plicnicí a inspirační chrůpky. Pleurální bolest a hemoptýza mohou být projevem plicního infarktu. Významné jsou též příznaky hluboké žilní trombózy, projevující se otokem a bolestivostí lýtky i celé končetiny, v pozdějších fázích cyanózou a kolaterálami na postižené straně.

## 2.1.6. Laboratorní vyšetření trombofilních stavů

### 2.1.6.1. Laboratorní markery trombogeneze a trombofilie

- Dysfunkce endotelu – vyšetřují se parametry popisující stav nebo funkci endotelu (vWF, trombomodulin, solubilní TF, TFPI, adhezivní proteiny: E-selektin, ICAM-1, VCAM-1).
- Aktivace krevních destiček – používají se testy, které popisují funkci, stav a metabolismus krevní destičky během jejich aktivačních kroků (receptory, povrchové antigeny a uvolněné působky: nitrobuněčný vápník, PF4,  $\beta$  - tromboglobulin, TXA<sub>2</sub>). Některé z těchto působky jsou uvolňovány při sekreci  $\alpha$ -granulí po aktivaci krevní destičky.
- Aktivace plazmatického koagulačního systému – sledují se aktivační působky uvolněné zejména účinkem serinových proteáz (aktivační peptidy faktorů nebo komplexy faktorů s inhibitory: F 1+2, TAT komplexy, fibrinopeptid A, aktivační peptidy F IX a F X, fibrinové monomery, F VIIa)
- Aktivace fibrinolýzy – stanoví se produkty štěpení a aktivace fibrinolytického systému (FDP, D-dimery, plasmin – antiplasmin komplexy, celková fibrinolytická aktivita), (Matyášková, 2002).

### 2.1.6.2 Jednotlivé laboratorní testy k popisu trombofilního stavu

K popisu trombofilních stavů se používá řady stanovení. V této části popisujeme v obecné rovině některé testy, které jsme v našem vyšetřovaném souboru použili.

#### Aktivovaný parciální tromboplastinový test - APTT

Základní koagulační test monitorující vnitřní cestu aktivace přeměny protrombinu na trombin. Sleduje funkci nebo hladinu faktorů XII, XI, IX, VIII, prekalikreinu (PK) a HMWK.

U trombofilních stavů zjišťujeme spíše zkrácení času APTT při zvýšených

hladinách F VIII nebo naopak jeho prodloužení v přítomnosti antifosfolipidových protilátek, zejména typu lupus antikoagulans. V těchto případech se může použít test, který má zvýšenou citlivost fosfolipidů k přítomnosti těchto protilátek (APTT –LA). Fyziologicky bývá APTT prodloužen u novorozenců, arteficiálně je prodloužení způsobeno nesprávným odběrem a laboratorním zpracováním.

#### Protrombinový test - PT (tromboplastinový test, Quickův test)

Test monitorující vnější systém přeměny protrombinu na trombin. Popisuje faktory X, V, II, VII a fibrinogen.

Výsledek vyšetření se udává v sekundách společně s časem kontrolní plazmy nebo jako poměr (ratio – R) času vyšetřované osoby vztažené k času kontrolní plazmy. Pro monitorování léčby antagonisty vitamínu K se používá hodnota INR. Jde o hodnotu odvozenou od mezinárodního tromboplastinu WHO 67/40. Hodnota INR se vypočte ze vztahu  $INR = R^{ISI}$ , kde ISI je mezinárodní index citlivosti použitého tromboplastinu zjištěný z kalibrační křivky porovnáním s tromboplastinem 67/40. Ideální hodnota ISI tromboplastinu se pohybuje kolem 1, vyšší hodnoty než 1,4 vykazují malou citlivost tromboplastinu.

Fyziologické hodnoty se pohybují v případě, že se k vyjádření výsledku použijí výsledné časy mezi 10 – 15 s, pokud se použije ratio, tak jeho hodnota se nachází v rozmezí 0,8 – 1,2 a pro INR se normální hodnoty pohybují v rozmezí 0,8 – 1,25.

K prodloužení hodnoty protrombinového testu dochází z řady příčin. V případě trombofilních stavů může jít o přítomnost protilátek typu lupus antikoagulans. Fyziologicky bývá prodloužen podobně jako APTT u novorozenců, kteří mají sníženou kompenzační schopnost faktorů z důvodu jejich snížené hladiny.

### Screening protilátek typu lupus antikoagulans

- Screeningové testy

Mezi tyto testy patří testy popsané dříve (APTT, APTT-LA a PT) a dRVVT. V případě, že dojde k prodloužení časů těchto testů provádí se tzv. diluční testy. U prodloužených časů testu je nezbytné předem odlišit další možné faktory, které mohou vést k jejich prodloužení (u APTT léčba heparinem u PT léčba antagonisty vitamínu K).

Diluční test s jedem Russelovi zmiže (dRVVT) – Dilute Russel viper venom test. dRVVT sleduje cestu přeměny od protrombinázy k tvorbě fibrinového vlákna. K aktivaci F X se používá jed Russelovy zmiže (Daboia russeli).

Laboratorní stanovení LA je velmi citlivé na zpracování materiálu, při špatně zpracovaných vzorcích je riziko vysokého procenta falešně negativních výsledků. Poměrně vysoká citlivost dRVVT testu k LA je dána sníženým množstvím fosfolipidů. V přítomnosti protilátek dochází k výraznému prodlužování testu, který se nekoriguje ani po směsných testech s normální plazmou. Klinicky se test využívá v laboratorním screeningu LA, ale i jako konfirmační test v rámci diagnostiky protilátek typu LA.

- Směsné testy (APTT, APTT-LA, PT, dRVVT)

K vyšetřované plazmě se přidá normální plazma v objemových poměrech 1:1. Po 1 hodinové inkubaci s normální plazmou se provede test. Dojde – li ke zkrácení původně prodlouženého testu jedná se pravděpodobně o defect některého z faktorů (snížená hladina, porucha funkce). V případě, že nedojde ke korekci testu použijí se konfirmační testy.

- Konfirmační testy

V těchto testech se sleduje citlivost protilátek typu lupus anticoagulans k nízkým koncentracím fosfolipidů. Testem se odliší přítomnost inhibitorů od

protilátek typu LA. V případě, že časy vyšetřované plazmy jsou blízké kontrolní plazmě jedná se pravděpodobně o přítomnost inhibitorů. Pokud jsou přítomny protilátky typu lupus antikoagulans dojde k výraznému prodloužení časů testů závislých na fosfolipidech (PT, APTT).

I když in vitro v přítomnosti protilátek typu LA dochází k prodloužení koagulačních časů, což za normálních okolností svědčí spíše pro nedostatečnost koagulačního systému (krváčivý stav) je účinek v organismu opačný. Přítomnost protilátek typu LA v organismu, způsobuje svým vlivem zejména na endotel sklon k trombofilnímu stavu.

K těmto testům patří i konfirmační test s hexagonálními fosfolipidy, který využívá speciálně upravené fosfolipidy krevních destiček.

#### Rezistence na aktivovaný protein (APC – R)

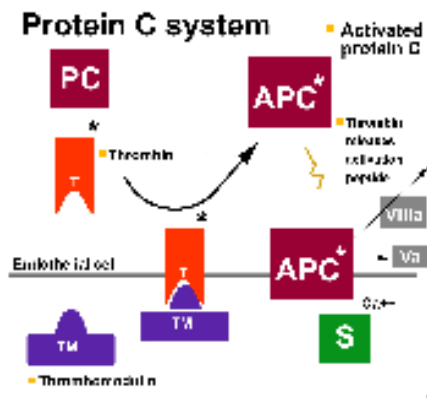
Stanovení rezistence na aktivovaný protein C používá 2 hadí jedy k aktivaci protrombinu a faktoru V. Pozitivní hodnoty tohoto testu mohou upozornit na přítomnost Leidenské mutace. Test je ovlivněn léčbou aprotininem, protaminem, hirudinem, Argatrobanem a není možné jej při současné léčbě těmito látkami provádět. V případě léčby heparinem a pentasacharidy přidává se k testu k vyvázání těchto látek polybren.

#### Vyšetření funkční aktivity proteinu C

Stanovuje se funkční aktivita PC v plazmě koagulační metodou. PC je složkou přirozené antikoagulační cesty. Je to glykoprotein závislý na vit. K, tvořený v hepatocytech. V plazmě je přítomen jako proenzym, jehož přeměna probíhá na endotelu, kde je navázán endoteliální receptor trombinu – trombomodulin (TM). K aktivaci PC dochází v přítomnosti komplexu [F IIa. TM. Ca<sup>2+</sup>]. APC v přítomnosti PS inaktivuje faktory Va a VIIIa, což vede k omezení koagulačního procesu.

Koncentrace PC je stejná u mužů i žen, mírně stoupá s věkem, snížené hodnoty jsou u vrozeného deficitu PC, DIC, trombofilních stavů nebo u

jaterních onemocnění při nedostatku vitamínu K a během antikoagulační léčby antagonisty vitamínu K.



(Godwin, 2007)

### Vyšetření funkční aktivity proteinu S - PS

PS je plazmatický protein závislý na vit. K syntetizovaný v játrech, endotelu a megakaryocytech. Asi 40 % PS je ve volné formě, zbytek je vázán s C4bBP složkou komplementu. Je kofaktorem APC, se kterým volná forma tvoří stechiometrický komplex, který inhibuje faktory Va a VIIIa a tím reguluje aktivitu koagulačního procesu.

PS potencuje účinek APC pravděpodobně tím, že má větší afinitu k fosfolipidové membráně a tak usnadňuje tvorbu koagulačně aktivního komplexu – vlastní aktivitu systému proteinu C urychluje pouze 2x.

Snížené hodnoty se nachází u vrozeného deficitu PS, u jaterních onemocnění, při nedostatku vit. K, při zvýšené spotřebě PS (operace, DIC) nebo v těhotenství. Snížená hladina PS v plazmě zvyšuje tromboembolické riziko. Stanovení PS se provádí v plazmě koagulační metodou.

### Antitrombin - AT

Stanovení funkční aktivity antitrombinu se provádí spektrofotometrickou metodou v přítomnosti chromogenních substrátů. Klinicky se snížení hladiny



AT projeví při vrozeném nebo získaném nedostatku AT, dále při snížené syntéze AT (fyziologicky u novorozenců nebo u jaterních onemocněních), při zvýšených ztrátách, u nefrotického syndromu, při zvýšené spotřebě (DIC, TEN), u rozsáhlých operací, v těhotenství nebo při užívání kontraceptiv.

#### Fibrinogen - FBG

Ke stanovení koncentrace fibrinogenu se v hematologických laboratořích používá koagulační metoda dle Clauss nebo modifikace této metody.

Snížení hladiny může být způsobeno: vrozenou hypofibrinogenémií nebo afibrinogenémií, těžkou poruchou jaterního parenchymu, zvýšenou spotřebou při DIC, trombolytickou léčbou, zvýšenými ztrátami u rozsáhlých poranění, při silném krvácení, při hemodiluci. Naopak zvýšené hodnoty se nachází v těhotenství, při zánětech, u nádorových onemocnění, u stavů po operaci.

#### D-Dimery - imunoturbidimetrické stanovení

D-dimery se stanovují v plazmě imunoturbidimetrickou metodou. Chybnost plazma může vést k falešně nízkým hodnotám. Mikročástice v suspenzi jsou potaženy dvěma různými myšími monoklonálními Ab proti lidským D-dimerům. Vzácně může docházet k falešně vyšším hodnotám jsou - li ve vyšetřované plazmě přítomny Ab proti hovězímu albuminu nebo myším Ab.

#### Stanovení funkční aktivity F VIII

F VIII je plazmatický glykoprotein citlivý k enzymatické degradaci a v plazmě je volně přítomen ve velmi nízké koncentraci (cca 0,1 µg/ml). Vyskytuje se převážně vázaný na vWF, který ho chrání před štěpením působením APC. Vlivem trombinu nebo fosfolipidů se uvolní a trombin jej proteolyticky štěpí za vzniku aktivní složky F VIIIa. K inaktivaci F VIIIa dochází hlavně působením systému APC. Jeho hladina se stanoví koagulační metodou v systému APTT za použití F VIII deficitní plazmy.

Hladina F VIII se zvyšuje při zánětech, chronických infekcích a stresu.

Nedostatek nebo funkční nedostatečnost může vést k těžkým krvácivým projevům – hemofilii A. Naopak zvýšené hodnoty mohou vyvolat tromboembolické stavy.

#### Molekulárně genetická vyšetření u trombofilních stavů

U trombofilních stavů jsou klinicky nejzávažnější ty genetické poruchy, u kterých mutace vyvolá buď ztrátu funkční aktivity inhibitorů koagulačního systému (loss-of-function mutation) nebo naopak při nich dojde k zesílení účinku koagulačních faktorů (gain-of-function mutations). Mezi genetické poruchy inhibitorů se řadí deficity proteinu C, proteinu S a AT. Ke genetickým poruchám, které posilují funkci koagulačního systému můžeme zařadit mutaci protrombinu (G20210A) a mutaci F V Leiden.

V rámci screeningového vyšetření hereditární trombofilie, které se používá v současné době, je po stanovení aktivit antikoagulačních proteinů – AT, proteinu C a proteinu S – doporučeno provedení testu APC - R a v případě jeho pozitivivity doplnění molekulárně genetickým vyšetřením F V Leiden a protrombinové mutace. Vyšetření polymorfismů v MTHFR je doporučeno pouze u pacientů s vysokou hladinou homocysteinu!!

#### 2.1.7 Trombofilní stavy a těhotenství

Hluboká žilní trombóza v těhotenství je většinou lokalizovaná v levé ileofemorální žíle. Incidence DVT/PE v graviditě je 0,5 – 3,0/1000 těhotenství. Pacientky s deficity PC, PS nebo AT mají až 8x vyšší riziko DVT/PE. Nosičky mutace F V Leiden mají asi 16x vyšší riziko, u nosiček protrombinové mutace G20210A je riziko 10x vyšší, u koinheritance obou mutací F V Leiden a protrombinové mutace G20210A je riziko až 100x vyšší.

Hereditární trombofilie zvyšuje riziko těhotenské ztráty, a to především u pozdních těhotenských ztrát a porodů mrtvého plodu. Heterozygotní mutace F V Leiden dvojnásobně zvyšuje riziko, že dojde k porodu mrtvého plodu po 28. týdnu gestace, deficit AT zvyšuje toto riziko 5,2x, deficit proteinu C 2,3x a

deficit proteinu S 3,3x. U pacientek s kombinovanými hereditárními rizikovými faktory se zvyšuje riziko až 14,3x.

Ve studii provedené Kupfermincem byly pacientky s těhotenskými komplikacemi – preklampsii, intrauterinní růstovou retardací plodu - IUGR, abrupcí placenty a porodem mrtvého plodu z 52 % heterozygot pro mutaci F V Leiden, protrombinovou mutaci G20210A nebo homozygot pro mutaci C677T v genu pro MTHFR, v porovnání se 17 % u kontrolní skupiny pacientek bez těhotenských komplikací (*Kupferminc, 1999*).

Ve 2.–3. trimestru je fyziologicky u těhotných žen nacházena zvýšená hladina koagulačních faktorů (F VII, F VIII, prothrombinu, F X, F IX, F XI a fibrinogenu) a inhibitorů fibrinolýzy (PAI-1, nově PAI-2, a inhibitoru fibrinolýzy indukovaného trombinem – TAFI).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Vyšetřovaný soubor**

Ve své studii jsme použila soubor 98 žen vyšetřených v hematologické poradně II. Interní kliniky – Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové pro spontánní aborty z neobjasněných příčin v prvním a druhém trimestru těhotenství v letech 1995 - 2007 (tabulka 1 a 2).

V tabulce I jsou popsány a rozvedeny anamnestické údaje u žen ve sledovaném souboru. Tabulka II shrnuje hodnoty jednotlivých sledovaných laboratorních parametrů v popisovaném souboru žen se spontánními aborty.

Změny laboratorních ukazatelů byly ve studii porovnány s anamnestickými údaji a takto upravené skupiny byly vzájemně porovnány, zpracovány do tabulek a statisticky vyhodnoceny.

Odběr krve a vyšetřování hematologických parametrů bylo prováděno u všech za stejných standardních podmínek. Podle použité metody vyšetření se v hematologické laboratoři zpracovala a k analýze se použila na destičky chudá plazma PPP (platelet poor plazma) popř. plazma bezdestičková.



Tab. 1 – Anamnestické údaje vyšetřovaného souboru

Pacient č.	Věk	Anamnéza	OC	Děti	spont.aborty	trimestr	FV Leiden	F II G20210A	VTE	Pacient č.	Věk	Anamnéza	OC	Děti	spont.aborty	trimestr	FV Leiden	F II G20210A	VTE	
1	21	aborty	1 rok	-	2	1.	heterozygot	negativní mutace	APC-RsFV Leiden	50	31	aborty,Aca poz.na hranici	5 let	1	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.,kontrola!	
2	22	aborty	-	-	3	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	51	31	aborty	5 let	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
3	22	operován myom,aborty	5 let	1	2	1.	heterozygot	negativní mutace	neg.	52	32	aborty	6 měs.	1	2	1.	heterozygot	heterozygot	neg.	
4	24	aborty	4 roky	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	APC-RsFV Leiden	53	32	aborty; CipraleX,Neurol	-	1	5	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
5	24	aborty;IUGR u 1.abortu	5 let	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	54	32	aborty,t.č.-G-17.t	-	2	2	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
6	24	aborty,t.č.-G	2 roky	-	3	1.	negativní mutace	negativní mutace	APC-RsFV Leiden	55	32	aborty	1 rok	-	3	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
7	25	cefalea po OC,aborty	2 roky	-	3	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	56	32	aborty	10 let	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
8	25	aborty	8 let	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.,protein C	57	33	uteroplac.inusuf.-36.týden G-mrtvý plod	-	1	2	1.	heterozygot	negativní mutace	neg.	
9	25	APS	-	-	-	-	negativní mutace	negativní mutace	APS poz.	58	33	aborty,VVV-22.týdnu	2 roky	1	3	1. a 2.	heterozygot	negativní mutace	neg.	
10	26	aborty	3,5 roku	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	59	33	migréna,aborty,IUGR v 32.t-plac.infarkt	-	1	2	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	APC-RsFV Leiden	
11	26	štítná žláza; aborty	2 roky	1	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	60	33	aborty,t.č.-G-16.t	-	1	2	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
12	26	aborty	3 roky	1	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	61	33	vyšší chol.,aborty,úmrtní novor.sepse	6 měs.	-	3	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	MTHFR C677T-homozygot	
13	27	aborty	2 měs.	-	2	1.	negativní mutace	heterozygot	neg.,kontr FVII	62	33	porod v 28.t-úmrtní,aborty	2 roky	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.,kontrola!	
14	27	aborty,odnětí vaječníků,IVF	5 let	-	4	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	63	34	aborty,kompl.porodu	5 let	1	2	1.	homozygot	negativní mutace	neg.	
15	27	anemie,aborty	4 měs.	-	2	1.	heterozygot	negativní mutace	neg.	64	34	operován myom,aborty	-	-	4	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
16	27	homozygot FVL,aborty,IVF	7 let	-	2	po IVF	1.	negativní mutace	negativní mutace	F I V Leiden homoz.-poz.	65	34	aborty	6 měs.	1	6	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	neg.
17	27	aborty	10 let	-	2	1.	homozygot	negativní mutace	F II poz.-heteroz.	66	34	aborty,APC-RsFVL	1 rok	1	3	1.	negativní mutace	negativní mutace	APC-RsFV Leiden	
18	27	aborty	8 let	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	67	34	aborty	1 rok	2	3	-	negativní mutace	negativní mutace	APC-RsFV Leiden	
19	27	spondyloarthritis,otoky,aborty	6 let	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	68	34	DVT,aborty v 28.týdnu	6 let	2	1	3.	negativní mutace	negativní mutace	F VIII	
20	27	koagulum placenty,aborty	mnoho let	-	1	2	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	69	34	aborty,homozygot MTHFR C677T	10 let	1	2	1.?	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
21	28	aborty	-	1	3	1.	negativní mutace	heterozygot	neg.	70	35	aborty,5.týden-G	-	-	3x po IVF	1. a 2.	heterozygot	negativní mutace	neg.	
22	28	aborty	3 měs.	-	3	1.	negativní mutace	heterozygot	neg.	71	35	aborty	-	1	2	1.	heterozygot	heterozygot	F II poz.-heteroz.	
23	28	AH; aborty; hypoestrogenismus	-	-	2x po IVF	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	72	35	↑TK,aborty	-	1	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	heterozygot	
24	28	aborty	-	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	F II F IV poz.heterozygot	73	35	strumektomie,aborty	-	2	2	1.	heterozygot	negativní mutace	neg.	
25	28	aborty	-	1	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	74	35	HBV;24.týden-IUGR	-	-	-	2.	negativní mutace	negativní mutace	APC-RsFV Leiden	
26	28	aborty,mutace MTHFR C677T	4 měs.	-	2,gemini	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	F III 11. a 12. trimestry-heterozygot	75	35	aborty	1 rok	1	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
27	28	aborty,varixy	2 měs.	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	APC-RsFV Leiden	76	35	homozygot MTHFR C677T,aborty	10 let	3	3	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
28	28	aborty	11 let	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	77	35	štítná žláza;aborty	2 roky	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
29	28	dyspepsie,aborty	2 roky	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	78	36	aborty,bristomie 2L.chromosom-p-UP.T.4.4.-G-11.t	-	2	3	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	APC-RsFV Leiden	
30	29	aborty; IUGR u 1.abortu	7 let	-	2	1.	negativní mutace	heterozygot	PS poz.	79	36	↑F VIII;bratr po VTE+heterozygot F II	-	1	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	F II poz.-heteroz.	
31	29	hypertenze,štítná žláza,IUGR-26.týden	-	-	2	2. a 3.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	80	36	nizké endometrium,Ab spermii	10 let	1	3	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
32	29	aborty	1 rok	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	APC-RsFV Leiden	81	37	aborty	1 rok	-	3	1.	heterozygot	negativní mutace	získaná APC - R	
33	29	aborty,peritonitida-srůsty	6 měs.	2	3	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	82	37	aborty,t.č.-G-14.týden	2 roky	2	2	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
34	29	toxoplazmóza,aborty	2 měs.	-	2	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	83	38	-	mnoho let	-	1	-	heterozygot	negativní mutace	neg.	
35	29	aborty,t.č.-G-22.týden	5 let	-	3	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	84	38	Rf,varixy,aborty	3,3 měs.	2	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
36	29	aborty,porod 32.týden,t.č.-G-18.týden	mnoho let	1	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	85	38	aborty; Cilest	užívá	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.;kontr.APS neg.	
37	29	aborty,t.č.-G-13.týden	4 roky	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.,kontgenetika	86	38	varikoflebitida VSM vlevo-Glyvenol	mnoho let	1	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	PS a F II poz.	
38	29	aborty	7 let	1	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	F V I F II poz.-heterozygot	87	40	aborty	10 let	2	3	1.	heterozygot	negativní mutace	F II poz.-heteroz.	
39	30	aborty	9 měs.	1	2;1x   HcG	1.	negativní mutace	heterozygot	neg.	88	40	-	3 roky	-	1	-	negativní mutace	negativní mutace	neg.	
40	30	aborty	-	3	3	1. a 2.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	89	41	aborty,t.č.-G-19.týden,plánována AC	6 let	2	6	1.	negativní mutace	negativní mutace	D-dimery,což není VTE	
41	30	aborty	mnoho let	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	homocystein!	90	42	aborty,t.č.-G-13.týden	-	3	3	1.	negativní mutace	negativní mutace	↓ PS	
42	30	aborty,otec-heterozygot FVL	11 let	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	91	42	femoropilební trombóza vlevo-Warfarin	mnoho let	1	-	-	negativní mutace	negativní mutace	neg.,↑ F VIII	
43	30	po OC bolest lýtek,aborty	3 roky	-	2	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	92	43	DVT,aborty v 16.týdnu	1 rok	2	1	2.	negativní mutace	negativní mutace	F II poz.-heteroz.	
44	30	DVT-Fraxiparin	3 roky	2	1	1.	negativní mutace	negativní mutace	neg.	93	44	hypothyreóza,úkerativní kolitida,psoriáza	7 let	-	3	1.	negativní mutace	negativní mutace	F VIII poz.	
45	31	trombóza umbilikální žíly;t.č.-G	5 let	-	1	3.	negativní mutace	heterozygot	neg.,kontrola!	94	44	arytmie,PE-Warfarin dosud	4 roky	1	1	2.	negativní mutace	negativní mutace	Ab β2-gp I-poz.	
46	31	-	2 roky	-	2	-	heterozygot	negativní mutace	-	95	45	DVT po sádře	ano	3	2	-	negativní mutace	negativní mutace	F VIII	
47	31	bilaterální zánět žil po porodu	-	4	6	-	negativní mutace	negativní mutace	F V Leiden homoz.-poz.	96	48	DVT vlevo-Fraxiparin,kumariny	12 let	3	-	-	heterozygot	negativní mutace	neg.,zajištění rizik	

Tab. 2 – Hodnoty sledovaných parametrů u vyšetřovaného souboru

Pacient č.	Věk	ATI[%]	PT[DNR]	APTT	PC[%]	PS[%]	dRVVT	APTT LA	Dd[mg/l]	F VIII[%]	FBG[g/l]	Pacient č.	Věk	ATI[%]	PT[DNR]	APTT	PC[%]	PS[%]	dRVVT	APTT LA	Dd[mg/l]	F VIII[%]	FBG[g/l]	
1	21	107	1,04	1,16	155	90	0,98	1		82		50	31		1,0609	1,119			1,02	1,2321	0,12			
2	22	100	1,008	0,9802	102	84	0,98	1,0286	0,53	79		51	31		1,1299	1,003			1,19	1,0311	0,03			
3	22	105	1,04	0,99	120	122	0,99	0,99				52	32	115	1,01	0,98	93	107	0,95	0,95				
4	24	104	1,0403	0,9414	101	98	0,87	0,8809	0,07	148		53	32	105	1,14	1,06	118	100	0,98	1,11			2,74	
5	24	80	1,27	1,05	88	90		1,11				54	32		0,9767	0,9797			0,87	0,93	1,26			
6	24		1,0972	1,2845			0,98	1,1906	0,33			55	32	116	1,01	0,98	122	136	0,73	0,89			73	
7	25	91	1,0914	1,033	71	77	0,91	0,9701	0,15			56	32	85	0,9839	0,9847	117	106	0,95	1,0743	0,17		155	
8	25	85	1,1846	0,9644	67	124	0,73	0,9914	0,16		3,08	57	33	119	1,2285	1,1424	97	77	1,02	1,0894			118	
9	25		1,1668	1,582			1,3	1,455				58	33	94	1,17	0,93	93	84	1,09	0,96				
10	26	100	1,0776	0,9507	85	75	0,95	0,9231		160		59	33	112	1,0257	1,0967	190	103	0,93	0,9616	0,59		84	
11	26	115	1	0,8966			0,92	0,883	0,17			60	33	75	1,0161	0,997			0,93	1,0205	0,12			
12	26		1,2031	1,0937			1,05	1,1061	0,28			61	33	106	1,0322	1,0802	157	119	0,95	1,0348	0,22			
13	27	91	1,3274	0,8895	84	72	0,86	0,8638		152		62	33	102	1,1857	0,9541	84	93	1,31	0,8732	0,75			
14	27		1,1647	0,9735			0,91	0,9862	0,17		2,79	63	34	102	1,1	0,97			0,89	0,93				
15	27	99	1,15	1,04	94	74	1,03	0,95		89		64	34	100	1,1964	0,9944	85	64	0,89	1,0193	0,08			
16	27		1,008	0,956			0,95	1,0237	0,23			65	34	89	1,1141	0,9706	101	138	0,99	0,9801	0,49	148	3,94	
17	27	104	1,09	0,9	100		0,97	1,05				66	34	107	1,1026	1,0265	90	107	0,95	1,0621	0,2	98	2,95	
18	27	102	1,1511	0,963	87	135	0,91	0,9297		161		67	34	107			90	107					98	
19	27	103	1,0696	1,0062			1,02	1,078	0,36			68	34	110			146	114					163	
20	27	101	1,25	1,15	71	68	1,03	1,23	0,06			69	34		1,1313	0,9725			0,97	1,0353	0,24			
21	28	97	1,0433	0,9943	98		0,97	1,0131	0,22	72	3,03	70	35	109	1,01	1,03	98	109	1,07	1,0599			69	2,94
22	28	102	1,2374	0,9078	83	71	0,87	1,1412		130	2,54	71	35	110	1,2773	0,9366	101	91	1,06	0,974	0,16			
23	28	95	1,0823	1,059	106	112	1,09	1,128				72	35	98	1,1	0,88	136	105	0,9	1,11				
24	28	100	1,15	1,04	65	73	0,97	0,99		84	2,64	73	35	95	1,3003	1,105	85	120	0,98	0,9638				
25	28	90	1,1061	1,0092	148	80	1,03	1,1023	0,36			74	35	95	1,03	0,97	83	46	0,92	0,97				
26	28	101	1,0569	1,1453	98	102	0,97	1,2611	0,28	103		75	35		1,2191	1,1686			1,14	1,1253	0,23			
27	28	120	0,0171	1,0727			1	1,1429	0,4			76	35		0,9729	0,858			0,94	0,7799	0,2			
28	28	118	1,06	1,02	89	96	0,95	0,95		86		77	35	95	1,1766	1,0432	95	98	0,93	0,9921		110	3,22	
29	28	98	1,0609	1,1331	140	80	1,01	1,1214	0,43			78	36	106	1,094	1,05			0,9	1,1582	1,17			
30	29	90	1,18	1,13	83	43	0,88	1,28		118	3,45	79	36		1,2024	1,1524			0,98	1,1696	0,24			
31	29	88	1,1387	0,9792	114	87	0,89	0,9387	0,42			80	36	97	1,0086	1,1315	101	130	0,95	1,0233	0,19	101	3,14	
32	29	82	1,0337	1,0653	79	74	0,94	1,0962	0,66			81	37	92	1,1397	1,1066	95	69	0,88	1,0574	0,33	71		
33	29	93	1,15	1,09	112	69	1,01	1,03			2,65	82	37	105	1,0455	0,9177	76			0,928	0,67			
34	29	92	1,2087	1,142			1,06	1,1271	0,25			83	38				107	0,72						
35	29	112	0,9595	0,8023			0,84	0,8005	0,66			84	38		1,055	1,055			0,99	1,0298	0,59			
36	29	100	1,1306	0,9627			0,93	0,9157	0,55			85	38	108	1,02	0,92	133	94	1,19	0,93				
37	29		1,0808	1,1424			0,94	1,106	0,15			86	38	103	1,0263	0,8444	128	38	0,94	0,905				
38	29		1,175	1,372			1,07	1,3894	0,24			87	40	97	1,02	1,01	95	102	0,98	0,98			130	
39	30	119	1,0346	1,0287	87	130	0,96	1	0,15	60	3,76	88	40	103			1,47	0,77					200	
40	30		1,2172	0,8736			0,93	0,8027	0,21			89	41		1	1,0484			0,86	1,0875				
41	30	92	1,229	1,0917	74	92	1,02	1,0922	0,15	76		90	42	97	1,0689	0,8973	127	55	0,87	0,983		116	4,1	
42	30	83	1,07	0,96	139	89	0,97	0,96		152	2,92	91	42		0,9659	0,9793	98	111	1,03	1,0282	0,29		173	
43	30		1,1284	1,0465			0,87	1,0973	0,1		3,34	92	43	92			119	61					138	
44	30	123	1,19	1,06	102	87	1	1,16		138	3,37	93	44	97			110	82					240	
45	31	111	1,0086	0,8423	122		0,87	0,744				94	44	99	1,49	1,2							105	3,46
46	31											95	45	102			158	80					215	
47	31				95					146		96	48	93	1,03	0,97	90	93	0,84	1,02			174	
48	31	89	1,1793	0,9784	92	74	0,94	1,036	0,16			97	50	100	2,3147	1,2987							193	3,91
49	31	88	1,2473	1,1747	133	71	1,12	1,3473	0,2		2,97	98	51	86	1,12	1,05	87	80	0,99	1,08				

## 3.2 Materiál a přístrojové vybavení

### 3.2.1 Odběr vzorku

Pacientovi byla krev odebírána na lačno nebo po konzumaci lehké stravy bez tuků. Odběry byly provedeny za standardních podmínek (větší světlost jehly, standardní zatažení paže) a co nejšetrněji, aby se do vzorku nevyplavily aktivační koagulační působky.

K odběru byly použity jednorázové odběrové systémy. Krev byla odebírána do citrátu sodného (0,109 mol/l). První 4 ml krve byly použity pro jiné účely, protože v prvních podílech odebrané krve mohou být přítomny složky, které by mohly ovlivnit výsledek koagulačních vyšetření (uvolnění TF, aktivace destiček v místě kontaktu s odběrovým systémem). Odebraná krev se šetrně a důkladně promísí s antikoagulačním činidlem a co nejrychleji se dopraví do hematologické laboratoře.

Při extrémních hodnotách hematokritu se počítá optimální množství dodaného citrátu podle vzorce a toto množství se použije při odběru:

$$\text{ml Na}^{2+}\text{-citrátu} = (100 - \text{hematokrit} / 595 - \text{hematokrit}) \times \text{ml plné krve}$$

### 3.2.2 Příprava PPP dvojitou centrifugací

U většiny koagulačních testů je nezbytné zpracovat odebranou krev nejpozději do 2 hodin po odběru jinak jsou výsledky obtížně interpretovatelné.

Dvojitou centrifugací se rozumí odstranění krevních destiček, které by mohly při zamrazení a následném rozmrazení vzorku ovlivnit výslednou hodnotu testu (destičky při traumatizaci uvolňují působky, které pak interferují s většinou koagulačních testů). Nejprve se nesrážlivá krev centrifuguje za standardních podmínek (15 minut při 3000 g), poté se plazma chudá na destičky (PPP) odsaje Pasterovou pipetou, pipetuje do nové zkumavky a provede se následná centrifugace za stejných podmínek.



Počet otáček centrifugy závisí na poloměru rotoru a vypočítá se podle vzorce:

$$g = 1,118 \cdot r \cdot n^2 \cdot 10^{-5}$$

r.....poloměr rotoru

n.....počet otáček za minutu

g.....přetížení (*Matýšková, 1999*)

### 3.2.3 Filtrace trombocytárními filtry

Před zamrazením vzorku nebo před vyšetřením na protilátky typu LA je nutné provést odstranění krevních destiček speciálními trombocytárními filtry (Filtropur S 0,2).

Čerstvě stažená plazma se nasaje do injekční stříkačky, která se nasadí na trombocytární filtr filtropur S a plazma se přes filtr přetlačí do mikrozkuhavky (Eppendorf). Takto se postupuje hlavně u plazem, které se zamrazí a stanoví později v sériích. Stejným způsobem se upravuje plazma určená k okamžité analýze na přítomnost protilátek typu LA. Filtrací se získá plazma prakticky zbavená krevních destiček – tzv. bezdestičková plazma.

### 3.2.4 Skladování materiálu před vyšetřením

U testů, u kterých se provádí stanovení v sérii (nastřádání určitého počtu vzorků), je nutné provést zamrazení vzorku. K těmto účelům se používá bezdestičková plazma, která se pipetuje po 1 ml do mikrozkuhovek. Obsah mikrozkuhovek se zamrazí v hluboko mrazícím boxu na teplotu – 70 °C. Při této teplotě lze plazmu uchovávat po dobu 3 – 6 měsíců. Teplotu v mrazícím boxu je nutné monitorovat.

### 3.2.5 Rozmražení vzorku

Před vyšetřením se materiál vyjme z mrazícího boxu a provede se rychlé rozmrazení při teplotě 37 °C v termostatu nebo vodní lázni. Před použitím je nutné materiál důkladně promísit a ještě nejméně 15 minut temperovat za občasného míchání.

Do koagulačního automatu se vkládá plazma neředěná, přístroj si provede ředění příslušným pufrům sám.

### 3.2.6 Přístrojové vybavení

- Centrifuga C3i, Jouan, Francie – slouží k přípravě plazmy chudé na destičky (PPP)
- Automatický koagulometr STA – R, Diagnostica Stago, Francie – používá se ke koagulačnímu stanovení
- Automatický koagulometr STA - COMPACT, Diagnostica Stago, Francie – používá se ke koagulačnímu stanovení

## 3.3 Použité metody

### 3.3.1 Aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT)

#### Princip:

Přidáním parciálního tromboplastinu - kefalinu (fosfolipid) a  $\text{Ca}^{2+}$  dochází k aktivaci koagulace tzv. vnitřní cestou. Rychlost tvorby fibrinového vlákna závisí na koagulačních faktorech vnitřního systému. K urychlení reakce a k aktivaci koagulačního systému je přidáván aktivátor (kaolin, křemičitany, kys. elagová). Provádí se v PPP (platelet poor plasma).

#### Přístroje a pomůcky:

centrifuga C3i, koagulometr STA – R, mikrozkušavky s víčkem, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám, kyvety do koagulometru

#### Reagencie:

- PTT - Automate 10 – lyofylizovaná směs fosfolipidů z mozkové tkáně v pufované suspenzi křemičitanů se stabilizátorem
- $\text{CaCl}_2$  0,025 mol/l - roztok chloridu vápenatého
- Aqua pro injekce – slouží k ředění reagentů
- STA Coag Control N+P – kontrolní plazmy (N – normální, P –

patologická)

#### Postup:

- použije se čerstvá nebo zamražená bezdestičková plazma
- reagencie se naředí předepsaným způsobem
- plazma i reagencie se vloží do koagulometru a provede se stanovení. Měření se spustí po napipetování startovací reagencie (CaCl<sub>2</sub>). Měří se koagulační časy normální a vyšetřované plazmy.

#### Hodnocení:

Výsledek se vyjadřuje poměrem času vyšetřované plazmy ku času kontrolní plazmy (ratio - R). Fyziologické hodnoty se pohybují v rozmezí R = 0,8 – 1,20.

### 3.3.2 APTT citlivý na protilátky lupus antikoagulans (APTT– LA)

#### Princip:

APTT, ve kterém se používá fosfolipid se zvýšenou citlivostí k protilátkám typu lupus antikoagulans. Po přidání tohoto fosfolipidu a Ca<sup>2+</sup> k plazmě dochází k aktivaci koagulačního systému tzv. vnitřní cestou. Rychlost tvorby fibrinového vlákna závisí na koagulačních faktorech vnitřního systému. K urychlení je přidáván aktivátor (kaolin, křemičitany, kys. elagová). Provádí se v PPP (platelet poor plasma). Přítomnost protilátek typu lupus antikoagulans vyvolá prodloužení koagulačního času vyšetřované plazmy.

#### Přístroje a pomůcky:

centrifuga C3i, koagulometr STA – R, mikrozkušavky s víčkem, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám, kyvety do koagulometru

#### Reagencie:

- PTT - LA – lyofylovaná směs fosfolipidů citlivých k LA v pufrované suspenzi křemičitanů se stabilizátorem
- CaCl<sub>2</sub> 0,025 mol/l - slouží k nastartování reakce
- Aqua pro injekce – slouží k ředění reagií

- STA Coag Control N+P – kontrolní plazmy (N – normální, P – patologická)

Postup:

- čerstvá nebo zamražená bezdestičková plazma
- reagencie se naředí předepsaným způsobem
- plazma i reagencie se vloží do koagulometru a provede se stanovení. Měření se spustí po nepipetování startovací reagencie (CaCl<sub>2</sub>). Měří se koagulační časy normální a vyšetřované plazmy.

Hodnocení:

Výsledek se vyjadřuje poměrem času vyšetřované plazmy ku času kontrolní plazmy (ratio - R). Fyziologické hodnoty se pohybují v rozmezí R = 0,8 – 1,20.

### 3.3.3 Protrombinový test (PT)

Princip:

Po přidání tromboplastinu (fosfolipid s TF) a Ca<sup>2+</sup> k testované citrátové plazmě dochází ke spuštění koagulačního procesu. Rychlost tvorby fibrinového vlákna je odvislá od množství a funkce faktorů vnější cesty aktivace koagulačního systému.

Přístroje a pomůcky:

centrifuga C3i, koagulometr STA – R, mikrozkušavky s víčkem, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám, kyvety do koagulometru

Reagencie:

- DG - PT – kalciový tromboplastin (pufrovaná lyofylizovaná směs fosfolipidů z mozkové tkáně králíka se stabilizátorem a CaCl<sub>2</sub>)
- Aqua pro injekce – slouží k ředění reagií
- STA Coag Control N+P – kontrolní plazmy (N – normální, P – patologická)

#### Postup:

- čerstvá nebo zamražená bezdestičková plazma
- reagencie se naředí předepsaným způsobem
- plazma i reagencie se vloží do koagulometru a provede se stanovení. Měření se spustí po nepipetování startovací reagencie (kalciový tromboplastin). Měří se koagulační časy normální a vyšetřované plazmy.

#### Hodnocení:

Zjistí se poměr času vyšetřované plazmy ku času kontrolní plazmy (ratio - R). Výsledek se vyjadřuje hodnotou INR, která se zjistí ze vztahu:

$INR = R^{ISI}$ . Fyziologické hodnoty se pohybují v rozmezí  $INR = 0,80 - 1,20$ .

### 3.3.4 Diluční test s jedem Russelovy zmije (dRVVT)

#### Princip:

Přidáním hadího jedu k vyšetřované plazmě chudé na destičky dojde v přítomnosti  $Ca^{2+}$  k aktivaci F X. F Xa společně s F Va (F V se aktivuje F Xa) a fosfolipidy destičkového typu (kefalin) tvoří komplex protrombinázu, která aktivuje přeměnu protrombinu na trombin. Trombin pak následně mění fibrinogen na fibrin. Analýza je založena na principu protrombinázou vyvolaného koagulačního testu – PiCT (*Calatzis, 2000*).

#### Přístroje a pomůcky:

centrifuga C3i, koagulometr STA – R, mikrozkušavky s víčkem, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám, kyvety do koagulometru

#### Reagencie:

- Kefalin – kaolinové reagens – lyofylizovaný kefalin se naředí a může se uchovávat až 3 měsíce při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (zásobní roztok). Pracovní roztok kefalínu se připraví těsně před stanovením se zásobního roztoku ředěním TRIS pufrům v poměru 1:8 (0,2 ml kefalínu + 1,6ml TRIS pufru). Kaolinová část reagencie se nepoužije!

- RVV (Russel Viper venom) – lyofylizát se naředí a může se uchovávat až 1 měsíc při – 70 °C (zásobní roztok). Pracovní roztok RVV se připraví těsně před stanovením, ředěním zásobního roztoku v poměru 1:200 fyziologickým roztokem (0,01 ml RVV + 2 ml fyziologického roztoku).
- TRIS pufr pH 7,5 – k ředění roztoku kefalínu
- CaCl<sub>2</sub> 0,025 mol/l – startovací reagensie
- fyziologický roztok – k ředění roztoku RVV
- Coag Norm - normální plazma k denní kontrole přesnosti
- Coag Path – kontrolní patologická plazma

#### Postup:

- čerstvá nebo zamražená bezdestičková plazma zbavená trombocytů pomocí trombocytárních filtrů
- reagensie se naředí předepsaným způsobem
- plazma i reagensie (včetně RVV) se vloží do koagulometru. Měření se spustí po napipetování startovací reagensie (roztok CaCl<sub>2</sub>). Měří se koagulační časy normální a vyšetřované plazmy.

#### Hodnocení:

Výsledek se vyjadřuje poměrem času vyšetřované plazmy ku času kontrolní plazmy (ratio - R).

$$R_{dRVVT} = \text{čas pacienta} / \text{čas kontroly}$$

Fyziologické hodnoty se pohybují v rozmezí R = 0,8 – 1,20.

### 3.3.5 Rezistence na aktivovaný protein C (APC – R)

#### Princip:

U každého vyšetřovaného vzorku se stanovují 2 koagulační časy: s přidáním aktivovaného proteinu C a bez aktivovaného proteinu C. K vyšetřované plazmě se přidá F V deficitní plazma a hadí jed z *Daboia russeli* (RVV – V), kterým se

aktivuje všechny F V přítomný ve vzorku (tím je zabráněno působení neaktivovaného F V jako kofaktoru aktivovaného PC). Druhý hadí jed *Notechis scutatus* (Noscarin) působí jako aktivátor protrombinu, a eliminuje se jím vliv koagulačních faktorů obou cest aktivace koagulace. Koagulační čas je závislý na přítomnosti či absenci Leidenské mutace F V ve vyšetřovaném vzorku.

#### Přístroje a pomůcky:

centrifuga C3i, koagulometr STA – R, mikrozkušavky s víčkem, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám, kyvety do koagulometru

#### Reagencie:

- PEFAKIT<sup>®</sup> APC – R Factor V Leiden
  - R1 – reagencie obsahuje APC/RVV-V, tj. APC (+)
  - R2 – reagencie obsahuje pouze RVV-V, tj. APC (-)
  - R3 – reagencie obsahuje Noscarin (PTA reagent)
  - R4 – ředící plasma (F V deficitní plazma)
- PEFAKIT<sup>®</sup> APC – R Factor V Leiden Control
  - C1 – negativní
  - C2 – heterozygotní
- Aqua pro injekce – k ředění reagií

#### Postup:

- čerstvá nebo zamražená bezdestičková plazma
- reagencie se naředí předepsaným způsobem
- plazma i reagencie se vloží do koagulometru a provede se stanovení. Měření se spustí po napipetování startovací reagií (Noscarin). Měří se koagulační časy kontrolní a vyšetřované plazmy.

#### Hodnocení:

Hodnotí se přítomnost nebo absence faktoru V Leiden. Koagulační čas testu je v systému s APC prodloužen na rozdíl od systému, ve kterém APC není přítomen. Pokud je přítomen faktor V Leiden, nedochází k výraznému

prodloužení koagulačního času, ani v systému, ve kterém je přítomen APC. Hodnota R se vypočte jako poměr APC – R (+)/ APC – R (-). Vzorky s poměrem APC – R < 2,2 s jsou označeny APC – R pozitivní. Poměry APC – R normální plazmy jsou tedy  $\geq 2,2$  (Svensson a spol., 1994).

### 3.3.6 Funkční vyšetření proteinu C

#### Princip:

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 (p – nitroanilin). Intenzita zbarvení je přímo úměrná aktivitě proteinu C ve vyšetřované plazmě.

#### Přístroje a pomůcky:

centrifuga C3i, koagulometr STA – R, mikrozkušavky s víčkem, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám, kyvety do koagulometru

#### Reagencie:

- BIOPHEN PROTEIN C
  - R1 – Protac, 1,60 U jed z hada *Agkistrodon C. Contortrix* specificky aktivující protein C
  - R2 – SaPC-21 – specifický chromogenní substrát pro aktivovaný protein C
- STA Owren – Koller pufr – pro ředění plazmy v koagulometru
- Aqua pro injekce - pro ředění reagentů
- STA Unicalibrator – ke zhotovení kalibrační křivky
- STA System Control N+P – kontrolní plazmy (N – normální, P – patologická)

#### Postup:

- Připraví se čerstvá nebo zamrazená bezdestičková plazma
- reagentie se naředí předepsaným způsobem
- reagentie a systémové kontroly se vloží do koagulometru a provede se



změření kalibrační přímky a těchto kontrol Měření se spustí po napipetování startovací reagentie Měří se absorbance ve vzorcích vyšetřované plazmy.

#### Hodnocení:

Spektrofotometricky se měří absorbance (405 nm) uvolněného p-nitroanilinu. Aktivita PC se odečte z kalibrační přímky. Hodnotí se v procentech funkční aktivity. Fyziologické hodnoty se pohybují v rozmezí 70 - 130% a jsou stejné u mužů a žen. U hodnot pod 70 % je potvrzen funkční deficit. U novorozenců jsou hodnoty snižené.

### 3.3.7 Funkční vyšetření proteinu S

#### Princip:

Vyšetřovaná plazma je inkubována s PS deficitní plazmou (obsahuje všechny faktory plazmatického koagulačního systému – neobsahuje PS a PC), aktivovaným proteinem C (APC) a F Va. APC společně s PS inhibuje F Va. Po přidání vápenatých iontů se sleduje prodloužení koagulačního času způsobené inaktivací F Va. Prodloužení je přímo úměrné aktivitě PS ve vyšetřovaném vzorku.

#### Přístroje a pomůcky:

centrifuga C3i, koagulometr STA – R, mikrozkušavky s víčkem, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám, kyvety do koagulometru

#### Reagencie

- STA - STACLOT® PROTEIN S
- R1 – PS deficitní lidská plazma
- R2 – aktivovaný lidský protein C lyofilizovaný
- F Va – reagentie obsahující lyofilizovaný hovězí F Va
- STA - Owren – Koller pufr – k ředění plazmy
- STA - CaCl<sub>2</sub> 0,025 mol/l – startovací reagentie obsažená v setu

- Aqua pro injekce – k naředění reagensů
- STA - Unicalibrator – plazma ke zhotovení kalibrační křivky
- STA - System Control N+P – kontrolní plazmy (N – normální, P – patologická)

#### Postup:

- připraví se čerstvá nebo zamražená bezdestičková plazma
- reagensie se naředí předepsaným způsobem
- plazma i reagensie se vloží do koagulometru a provede se stanovení. Měření se spustí po nepipetování startovací reagensie (CaCl<sub>2</sub>). Měří se koagulační časy kontrolní a vyšetřované plazmy.

#### Hodnocení:

Aktivita PS se odečte z kalibrační křivky. Hodnotí se prodloužení koagulačního času v procentech inhibiční aktivity proti hodnotám atestované normální kontrolní plazmy. Fyziologické hodnoty si nastavuje laboratoř sama podle kontrolních atestovaných plazem, pohybují se v rozmezí 65% - 140% a jsou stejné u mužů a žen.

### 3.3.8 Antitrombin - AT

#### Princip:

Využívá se schopnosti AT vytvářet stechiometrické irreverzibilní komplexy se serinovými proteázami, především F IIa (trombinem) a F Xa. Reakce je potencována v přítomnosti heparinu. Ředěná vyšetřovaná plazma se inkubuje s F Xa v přítomnosti heparinu. Dojde k vytvoření komplexu [F Xa . AT . heparin]. Protože F Xa se přidává přesné množství, ale v nadbytku, zůstává určité množství nevyvázané do komplexu – reziduální F Xa. Nevyvázaný F Xa pak štěpí chromogenní substrát za vzniku p – nitroanilinu, který se stanoví spektrofotometricky při 405 nm.

#### Přístroje a pomůcky:

centrifuga C3i, koagulometr STA – R, mikrozkušavky s víčkem, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám, kyvety do koagulometru

#### Reagencie:

- Coamatic® LR Antithrombin
- F Xa – aktivovaný faktor
- Chromogenní substrát S-2772
- STA Owren – Koller pufr – k ředění plazmy v koagulometru
- Aqua pro injekce – pro naředění reagentů
- STA Unicalibrator – plazma ke zhotovení kalibrační křivky
- STA System Control N+P – kontrolní plazmy (N – normální, P – patologická)

#### Postup:

- připraví se čerstvá nebo zamražená bezdestičková plazma
- reagentie se naředí předepsaným způsobem
- plazma i reagentie se vloží do přístroje a provede se spektrofotometrické stanovení. Měří se absorbance p – nitroanilinu.

#### Hodnocení:

Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci AT. Intenzita zabarvení se vyhodnocuje kineticky jako maximální hodnota absorbance. Funkční inhibiční aktivita se uvádí v % odečtením z kalibrační křivky. Fyziologické hodnoty se pohybují v rozmezí 80 – 120 %.

### 3.3.9 Fibrinogen (metoda podle Clauss)

#### Princip:

Vyšetřovaná plazma je inkubována s nadbytkem trombinu a čas potřebný k tvorbě fibrinového vlákna je v tomto uspořádání závislý pouze na koncentraci fibrinogenu. Výsledky se vyjadřují v g/l odečtením z kalibrační křivky (závislost času koagulace na koncentraci fibrinogenu v g/l).

#### Přístroje a pomůcky:

centrifuga C3i, koagulometr STA – R, mikrozkušavky s víčkem, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám, kyvety do koagulometru

#### Reagencie:

- DG – FIB, Grifols – hovězí trombin (cca.100 NIH/ml)
- STA Owren – Koller pufr – k ředění plazmy
- Aqua pro injekce – k ředění reagensů
- STA Unicalibrator – plazma ke zhotovení kalibrační křivky
- STA System Control N+P – kontrolní plazmy (N – normální, P – patologická)

#### Postup:

- čerstvá nebo zamražená bezdestičková plazma
- reagenty se naředí předepsaným způsobem
- plazma i reagenty se vloží do koagulometru a provede se stanovení. Měření se spustí po napipetování startovací reagenty (hovězího trombinu). Měří se koagulační časy kontrolní a vyšetřované plazmy.

#### Hodnocení:

Koncentrace fibrinogenu se odečte z kalibrační křivky pro každý změřený koagulační čas. Kalibrace se provádí pomocí firemní kalibrační plazmy s přesně definovanou hladinou fibrinogenu (ředění alespoň na pět kalibračních bodů).

Nízké nebo naopak vysoké hladiny fibrinogenu se vyšetří znovu s menším nebo větším ředěním pacientovy plazmy k dosažení větší přesnosti. Fyziologické hladiny fibrinogenu se pohybují v rozmezí 2,0 – 4,0 g/l.

### 3.3.10 D-Dimery - imunoturbidimetrie

#### Princip:

Paprsek monochromatického světla se střetne se suspenzí mikrolatexových částic pokrytých specifickou protilátkou. Je – li vlnová délka světla větší než průměr částic (nejsou přítomny D – dimery), absorpce je jen slabá.

V přítomnosti D – dimerů dojde k aglutinaci a vzniku agregátů (D - dimery + protilátka na latexových částicích), které jsou větší než  $\lambda$  procházejícího světla. Dochází k výraznější absorpci světla (540 nm) a vzestup absorbance je přímo úměrný hladině D-dimerů ve vzorku.

#### Přístroje a pomůcky:

centrifuga C3i, koagulometr STA – R, mikrozkuhavky s víčkem, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám, kyvety do koagulometru

#### Reagencie:

- STA Liatest® D – DI
- TRIS pufr – k nastavení pH v reakční směsi - tris(hydroxymethyl)methylamine (buffer range 7,5 – 9,0) – napipetuje se do naředěné plazmy a nechá se inkubovat = ustavit pH suspenze mikrolatexových částic potažených 2 myšimi monoklonálními protilátkami proti lidským D – dimerům
- STA Owren – Koller pufr – ředění plazmy
- Aqua pro injekce – ředění reagií
- STA Unicalibrator – plazma ke zhotovení kalibrační křivky
- STA Liatest® Control N+P – kontrolní plazmy (N – normální, P – patologická)

#### Postup:

- připraví se čerstvá nebo zamražená bezdestičková plazma
- reagencie se naředí předepsaným způsobem
- plazma i reagencie se vloží do koagulometru a provede se stanovení. Měří se snížení optické hustoty vyvolané agregovanými latexovými částicemi.

#### Hodnocení:

Monitoruje se změna absorbance při 540 nm po dobu 140 s při 37 °C a

stanoví se kvantitativní zastoupení D-dimerů v plazmě odečtením z kalibrační křivky. Kalibrační křivku dodává výrobce. Nastavuje se pomocí čárového kódu a mění se s každou šarží.

Rozsah měření je u metody D – Dil. 0,22 – 4,0 mg/l. Při vyšší hladině D-dimerů se použije metoda D – DI H s rozsahem do 20 mg/l. Koncentrace D-dimerů se udává v mg/l fibrinogenového ekvivalentu FEU – vztažena k množství fibrinogenu použitého k přípravě standardu D-dimerů. Fyziologicky je přítomno v plazmě 0,0 – 0,5 mg/l FEU.

### 3.3.11 Stanovení funkční aktivity F VIII

#### Princip:

Zředěná vyšetřovaná plazma se smísí s plazmou deficitní pro F VIII, která obsahuje ostatní faktory vnitřní cesty v nadbytku. Zjišťuje se koagulační čas v systému APTT. Tato doba je přímo úměrná hladině F VIII ve vyšetřované plazmě.

#### Přístroje a pomůcky:

centrifuga C3i, koagulometr STA – R, mikrozkušavky s víčkem, Pasteurovy pipety, špičky k pipetám, kyvety do koagulometru

#### Reagencie:

- DG – VIII, Grifols – faktor VIII deficitní plazma
- C.K.Prest – obsah nádobky R2 se přelije do nádobky R1
- R1 – kefalin
- R2 – pufrovaná suspenze kaolinu
- STA - Owren – Koller pufr – ředění plazmy
- STA - CaCl<sub>2</sub> 0,025 mol/l – startovací reagencie
- Aqua pro injekce – ředění reagií
- STA - Unicalibrator – plazma ke zhotovení kalibrační křivky
- STA - Coag Control N+P – kontrolní plazmy (N – normální, P – patologická)

#### Postup:

- připraví se čerstvá nebo zamražená bezdestičková plazma zbavená trombocytů pomocí trombocytárních filtrů
- reagencie se naředí předepsaným způsobem
- plazma i reagencie se vloží do koagulometru a provede se stanovení. Měření se spustí po nepipetování startovací reagencie ( $\text{CaCl}_2$ ). Měří se koagulační časy normální a vyšetřované plazmy.

#### Hodnocení:

Výsledný koagulační čas se odečte z kalibrační křivky. Fyziologické rozmezí se pohybuje v rozmezí 50 – 150 %. Je-li aktivita nižší než 50 %, přeměří se vzorek citlivější metodou VIII G/L.

### 3.4 Výsledky

#### 3.4.1. Zastoupení trombofilních mutací ve sledovaném souboru

V souboru 98 žen sledovaných pro rekurentní spontánní aborty v hematologické poradně II.interní kliniky – OKH ve FN a LF UK Hradec Králové jsme zjišťovali zastoupení trombofilních mutací (F V Leiden a mutace protrombinu F II G2021A). Zajímalo nás rovněž zastoupení homozygotních a heterozygotních forem mutací případně vliv současného výskytu obou mutací.

Tab. 3 – Výskyt mutací u pacientek v celém souboru

Pacient č.	Věk	FV Leiden	F II G20210A	Pacient č.	Věk	FV Leiden	F II G20210A	Pacient č.	Věk	FV Leiden	F II G20210A	Pacient č.	Věk	FV Leiden	F II G20210A
1	21	heterozygot	negativní mutace	26	28	negativní mutace	negativní mutace	51	31	negativní mutace	negativní mutace	76	35	negativní mutace	negativní mutace
2	22	negativní mutace	negativní mutace	27	28	negativní mutace	negativní mutace	52	32	heterozygot	heterozygot	77	35	negativní mutace	negativní mutace
3	22	heterozygot	negativní mutace	28	28	negativní mutace	negativní mutace	53	32	negativní mutace	negativní mutace	78	36	negativní mutace	negativní mutace
4	24	negativní mutace	negativní mutace	29	28	negativní mutace	negativní mutace	54	32	negativní mutace	negativní mutace	79	36	negativní mutace	negativní mutace
5	24	negativní mutace	negativní mutace	30	29	negativní mutace	heterozygot	55	32	negativní mutace	negativní mutace	80	36	negativní mutace	negativní mutace
6	24	negativní mutace	negativní mutace	31	29	negativní mutace	negativní mutace	56	32	negativní mutace	negativní mutace	81	37	heterozygot	negativní mutace
7	25	negativní mutace	negativní mutace	32	29	negativní mutace	negativní mutace	57	33	heterozygot	negativní mutace	82	37	negativní mutace	negativní mutace
8	25	negativní mutace	negativní mutace	33	29	negativní mutace	negativní mutace	58	33	heterozygot	negativní mutace	83	38	heterozygot	negativní mutace
9	25	negativní mutace	negativní mutace	34	29	negativní mutace	negativní mutace	59	33	negativní mutace	negativní mutace	84	38	negativní mutace	negativní mutace
10	26	negativní mutace	negativní mutace	35	29	negativní mutace	negativní mutace	60	33	negativní mutace	negativní mutace	85	38	negativní mutace	negativní mutace
11	26	negativní mutace	negativní mutace	36	29	negativní mutace	negativní mutace	61	33	negativní mutace	negativní mutace	86	38	negativní mutace	negativní mutace
12	26	negativní mutace	negativní mutace	37	29	negativní mutace	negativní mutace	62	33	negativní mutace	negativní mutace	87	40	heterozygot	negativní mutace
13	27	negativní mutace	heterozygot	38	29	negativní mutace	negativní mutace	63	34	homozygot	negativní mutace	88	40	negativní mutace	negativní mutace
14	27	negativní mutace	negativní mutace	39	30	negativní mutace	heterozygot	64	34	negativní mutace	negativní mutace	89	41	negativní mutace	negativní mutace
15	27	heterozygot	negativní mutace	40	30	negativní mutace	negativní mutace	65	34	negativní mutace	negativní mutace	90	42	negativní mutace	negativní mutace
16	27	negativní mutace	negativní mutace	41	30	negativní mutace	negativní mutace	66	34	negativní mutace	negativní mutace	91	42	negativní mutace	negativní mutace
17	27	homozygot	negativní mutace	42	30	negativní mutace	negativní mutace	67	34	negativní mutace	negativní mutace	92	43	negativní mutace	negativní mutace
18	27	negativní mutace	negativní mutace	43	30	negativní mutace	negativní mutace	68	34	negativní mutace	negativní mutace	93	44	negativní mutace	negativní mutace
19	27	negativní mutace	negativní mutace	44	30	negativní mutace	negativní mutace	69	34	negativní mutace	negativní mutace	94	44	negativní mutace	negativní mutace
20	27	negativní mutace	negativní mutace	45	31	negativní mutace	heterozygot	70	35	heterozygot	negativní mutace	95	45	negativní mutace	negativní mutace
21	28	negativní mutace	heterozygot	46	31	heterozygot	negativní mutace	71	35	heterozygot	heterozygot	96	48	heterozygot	negativní mutace
22	28	negativní mutace	heterozygot	47	31	negativní mutace	negativní mutace	72	35	negativní mutace	heterozygot	97	50	negativní mutace	negativní mutace
23	28	negativní mutace	negativní mutace	48	31	negativní mutace	negativní mutace	73	35	heterozygot	negativní mutace	98	51	negativní mutace	negativní mutace
24	28	negativní mutace	negativní mutace	49	31	negativní mutace	negativní mutace	74	35	negativní mutace	negativní mutace				
25	28	negativní mutace	negativní mutace	50	31	negativní mutace	negativní mutace	75	35	negativní mutace	negativní mutace				

Celkem jsme našli 23 mutací. U 75 žen jsme žádné mutace nezjistili. Jednotlivá mutace F V Leiden se prokázala u 14 žen v heterozygotní formě, 2 ženy měly F V Leiden v homozygotní formě a jednotlivá mutace F II G2021A se prokázala u 9 žen, všechny byly v heterozygotní formě. U 2 žen se vyskytla kombinace mutací F II G20210A a F V Leiden, u obou v heterozygotní formě. Zastoupení jednotlivých mutací vyjádřené % je znázorněno v grafech č. 1 – 5.

### 3.2.2 Mutace a trombofilní parametry

Sledovaný soubor byl rozdělen na dvě skupiny podle toho, zda byla či nebyla přítomna mutace. Tyto soubory byly porovnány s dalšími parametry, které rovněž popisují trombofilní stav. Byly hodnoceny změny těchto parametrů v obou souborech a zjišťována statistická významnost nepárovým t – testem.



Tab. 4 – Hodnoty trombofilních parametrů u souborů s pozitivním a negativním výskytem mutací

Název vyšetření	pozitivní	negativní
AT [%]	98,98 ± 10,32	102,33 ± 8,97
PT [INR]	1,11 ± 0,22	1,12 ± 0,10
APTT [R]	1,04 ± 0,12	1,00 ± 0,1
PC [%]	106,81 ± 27,80	100,76 ± 18,40
PS [%]	90,58 ± 23,12	90,61 ± 22,58
dRVVT [R]	0,97 ± 0,10	0,95 ± 0,07
APTT - LA [R]	1,04 ± 0,13	1,01 ± 0,11
D - dimery [mg/l]	0,33 ± 0,26	0,22 ± 0,08
F VIII [%]	126,61 ± 49,50	105,42 ± 36,81
FBG [g/l]	3,20 ± 0,46	3,14 ± 0,47

Z tabulky a grafů 6 – 10 je patrné, že hodnoty některých parametrů v souboru s pozitivní mutací se nepatrně liší od parametrů zjištěných v souboru s negativní mutací, rozdíly však nejsou statisticky významné. U souboru s pozitivním nálezem jedné nebo více mutací dochází k mírnému poklesu hodnot AT, naopak hodnoty D – dimerů, F VIII a fibrinogenu jsou zvýšeny oproti souboru bez zjištěných mutací.

### 3.2.3 Věk a trombofilní parametry

Protože i věk by mohl hrát významnou roli při vzniku tromboembolické nemoci byl vypočítán medián věku žen v souboru. Podle tohoto mediánu byl rozdělen soubor vyšetřovaných žen do dvou skupin: ženy do věku 30 let a ženy s věkem nad 30 let. V obou souborech byly hodnoceny změny jednotlivých parametrů a zjišťována statistická významnost nepárovým t – testem.

Tab. 5 – Hodnoty trombofilních parametrů u různých věkových skupin

Název vyšetření	do 30 let	nad 30 let
AT [%]	98,75 ± 10,76	100,95 ± 9,32
PT [INR]	1,08 ± 0,20	1,13 ± 0,20
APTT [R]	1,04 ± 0,12	1,02 ± 0,11
PC [%]	105,75 ± 26,23	104,22 ± 24,76
PS [%]	91,47 ± 20,80	89,68 ± 25,00
dRVVT [R]	0,98 ± 0,12	0,96 ± 0,07
APTT - LA [R]	1,05 ± 0,13	1,02 ± 0,12
D-dimery [mg/l]	0,30 ± 0,20	0,35 ± 0,31
F VIII [%]	123,47 ± 51,97	117,33 ± 42,29
FBG [g/l]	3,09 ± 0,28	3,26 ± 0,55

Hodnoty jednotlivých parametrů v závislosti na věku jsou znázorněny v tabulce a grafech 11 - 15. Nachází se mírné rozdíly v hodnotách parametrů v obou hodnocených souborech, ale zjištěné odchylky jsou statisticky nevýznamné.

### 3.2.4 Orální antikoncepce a trombofilní parametry

Užívání antikoncepce do jisté míry ovlivňuje srážlivost krve (dochází ke změnám v systému proteinu C, které mohou vest ke snížení PS a to se může se projevit jako získaná APC – R) – citace. Soubor byl z těchto důvodů rozdělen podle doby užívání OC na tři skupiny: Ženy, které nikdy neužívaly antikoncepci, ženy které ji užívaly jen krátkodobě ať už z důvodu projevených komplikací či jiného důvodu a ženy dlouhodobě užívající antikoncepci bez somatických potíží, které v současnosti mají sklon k trombofilii nebo prodělaly rekurentní spontánní aborty.

Tab. 5– Hodnoty trombofilních parametrů rozdělené podle užívání OC

Název vyšetření	bez medikace OC	krátkodobá medikace	dlouhodobá medikace
AT [%]	100,09 ± 11,06	96,56 ± 11,61	101,24 ± 8,45
PT [INR]	1,07 ± 0,26	1,11 ± 0,08	1,14 ± 0,20
APTT [R]	1,05 ± 0,14	1,04 ± 0,10	1,02 ± 0,12
PC [%]	104,85 ± 26,08	113,93 ± 33,63	101,29 ± 20,32
PS [%]	91,4 ± 23,22	93,00 ± 16,01	88,86 ± 25,65
dRVVT [R]	0,97 ± 0,13	0,98 ± 0,11	0,96 ± 0,07
APTT - LA [R]	1,06 ± 0,13	1,04 ± 0,12	1,02 ± 0,12
D - dimery [mg/l]	0,31 ± 0,18	0,28 ± 0,21	0,36 ± 0,32
F VIII [%]	113,83 ± 49,41	133,00 ± 55,38	119,00 ± 42,67
FBG [g/l]	3,14 ± 0,37	3,00 ± 0,24	3,31 ± 0,55

Hodnoty trombofilních parametrů v jednotlivých skupinách podle užívání OC jsou zpracovány v tabulce a grafech 16 - 20. Rovněž u tohoto souboru dochází k drobným odchylkám v hodnotách trombofilních parametrů u hodnocených skupin. Rozdíly jsou podobně jako u předchozích souborů statisticky významné.

### 3.2.5 Prodělané aborty a trombofilní parametry

Hematologické testy byly prováděny na oddělení klinické hematologie – II.interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové u žen, které navštívily hematologickou ambulanci z důvodu nevysvětlených rekurentních spontánních abortů. Z tohoto hlediska bylo zajímavé porovnat hodnoty vyšetření hlavně vzhledem k těmto prodělaným abortům.

Gynekolog by měl posílat ženy na přešetření trombofilního stavu až po třetím abortu v prvním trimestru, ale při dalších komplikacích (např. IUGR, embolizace placenty, trombóza, úmrtí plodu) jsou vyšetřeny i ženy po jednom abortu. Většina žen chce být vyšetřena už po druhém abortu, proto byl

vyšetřovaný soubor rozdělen na dvě skupiny: ženy s jedním prodělaným spontánním abortem a ženy se 2 a více prodělanými aborty.

Tab. 6 – Hodnoty trombofilních parametrů porovnané s počtem prodělaných abortů

Název vyšetření	1 prodělaný abort	2 a více prodělaných abortů
AT [%]	101,11 ± 10,37	99,75 ± 10,04
PT [INR]	1,14 ± 0,16	1,11 ± 0,20
APTT [R]	1,01 ± 0,21	1,02 ± 0,10
PC [%]	108,44 ± 26,85	104,41 ± 25,24
PS [%]	82,22 ± 21,68	91,98 ± 22,86
dRVVT [R]	1,01 ± 0,14	0,97 ± 0,09
APTT - LA [R]	1,08 ± 0,18	1,03 ± 0,12
D - dimery [mg/l]	0,41 ± 0,12	0,32 ± 0,26
F VIII [%]	110,25 ± 55,64	122,75 ± 44,75

Hodnoty trombofilních parametrů v obou skupinách porovnané s počtem abortů jsou zpracovány v tabulce a grafech 26 - 30. U obou skupin dochází k drobným odchylkám v hodnotách trombofilních parametrů u hodnocených skupin. Rozdíly nejsou podobně jako u předchozích souborů statisticky nevýznamné.

### 3.2.6 Rozdělení souboru podle počtu narozených dětí

U žen vyšetřovaných pro opakované aborty má jistě vliv na jejich celkový psychický stav, zda již nějaké děti mají nebo se snaží o první úspěšné těhotenství. Ženy s více dětmi jsou většinou starší a mohou prodělavat neodhalené aborty. Rovněž se u nich může projevit, vzhledem k jejich věku, výraznější sklon k trombofilii.

Ženy pokoušející se o první dítě mohou být úzkostlivější a je větší pravděpodobnost odhalení brzkých těhotenských ztrát, mohou prodělavat hormonální terapii předcházející IVF a proto mohou mít hodnoty testů ovlivněny touto terapií. Plánované druhé dítě může být také důvodem

k odhalování brzkých těhotenských ztrát, zároveň je potvrzena možnost fyziologického otěhotnění a donošení zdravého plodu.

Soubor žen byl rozdělen podle počtu donošených těhotenství na tři skupiny: ženy bez dětí, ženy s jedním dítětem a ženy se 2 a více dětmi.

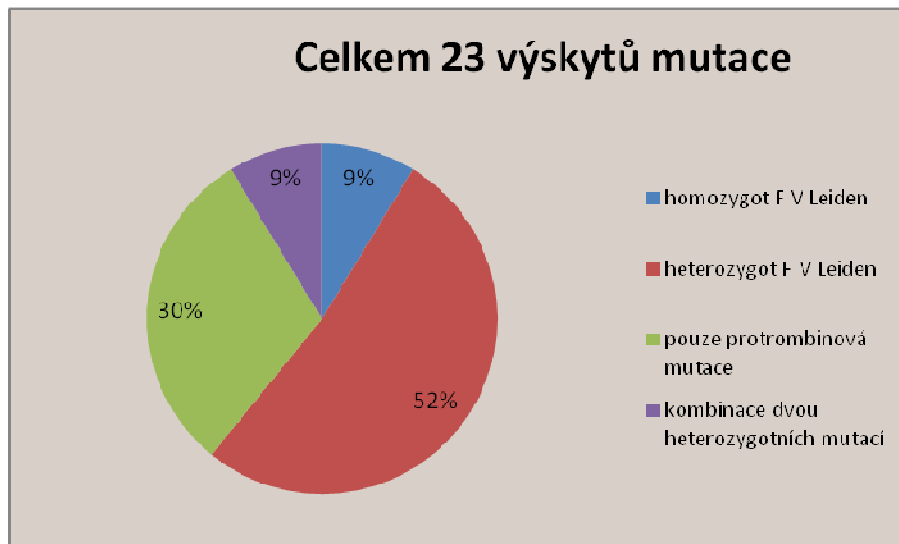
Tab. 7 – Trombofilní parametry porovnávané s počtem donošených těhotenství

Název vyšetření	bez dětí	jedno dítě	2 a více dětí
AT [%]	98,40 ± 11,23	100,71 ± 7,68	101,17 ± 8,97
PT [INR]	1,09 ± 0,19	1,14 ± 0,26	1,13 ± 0,10
APTT [R]	1,04 ± 0,12	1,03 ± 0,14	1,02 ± 0,09
PC [%]	108,11 ± 28,99	103,67 ± 22,78	103,31 ± 19,02
PS [%]	91,54 ± 20,23	86,42 ± 29,72	88,15 ± 23,52
dRVVT [R]	0,98 ± 0,12	0,96 ± 0,07	0,95 ± 0,07
APTT - LA [R]	1,05 ± 0,12	1,02 ± 0,15	1,02 ± 0,09
D - dimery [mg/l]	0,29 ± 0,19	0,40 ± 0,35	0,42 ± 0,08
F VIII [%]	121,50 ± 51,34	143,22 ± 43,62	135,80 ± 31,27
FBG [g/l]	3,05 ± 0,29	3,45 ± 0,61	3,38 ± 0,47

Z tabulky a grafů 21 – 25 je patrné, že hodnoty některých parametrů se u jednotlivých skupin liší. Při statistickém hodnocení byla nalezena statistická významnost u stanovení F VIII ( $p < 0,000117$ ) a D-DI ( $p < 0,047870$ ) mezi soubory bez dětí a soubory s jedním nebo více dětmi. Ostatní rozdíly nejsou statisticky významné.

## 5 GRAFY

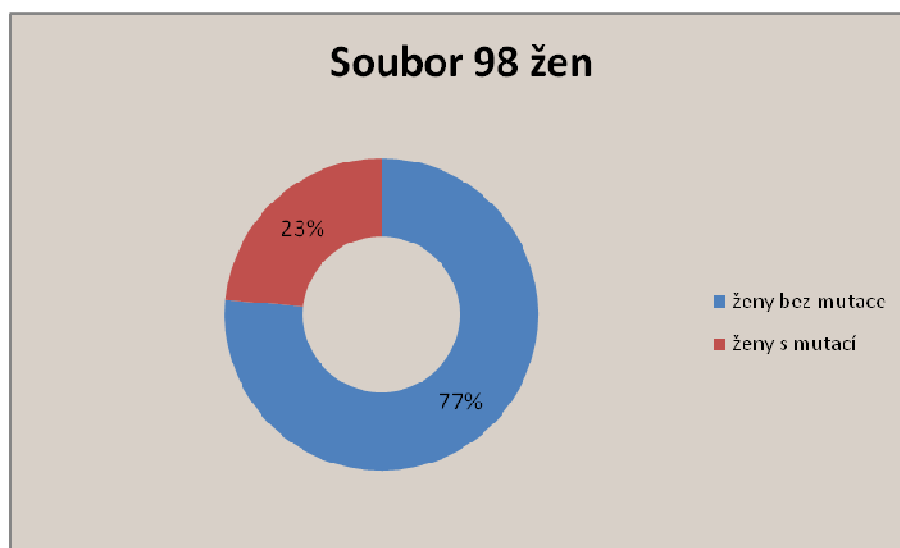
Graf č.1 – Zastoupení jednotlivých typů mutací



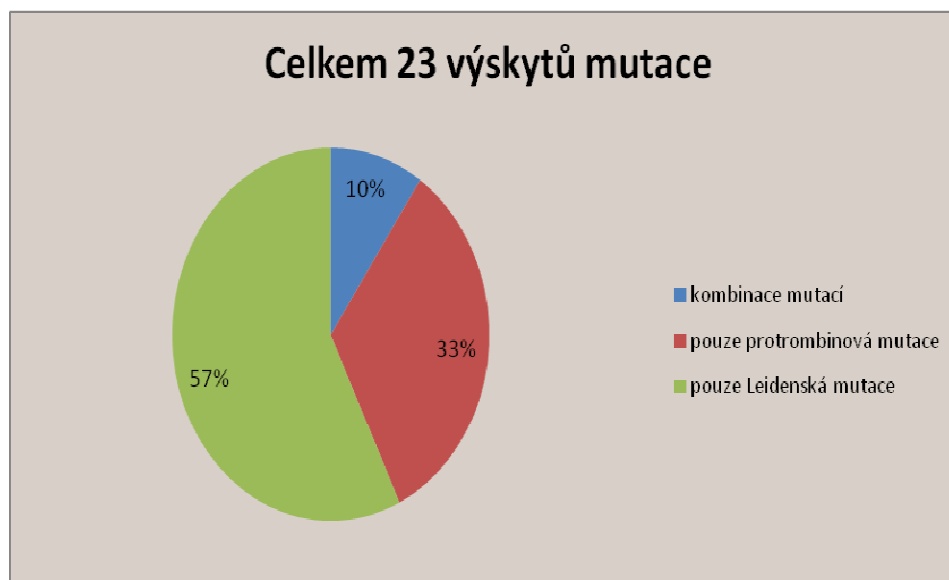
Graf č.2 – Zastoupení obou mutací v souboru s mutacemi



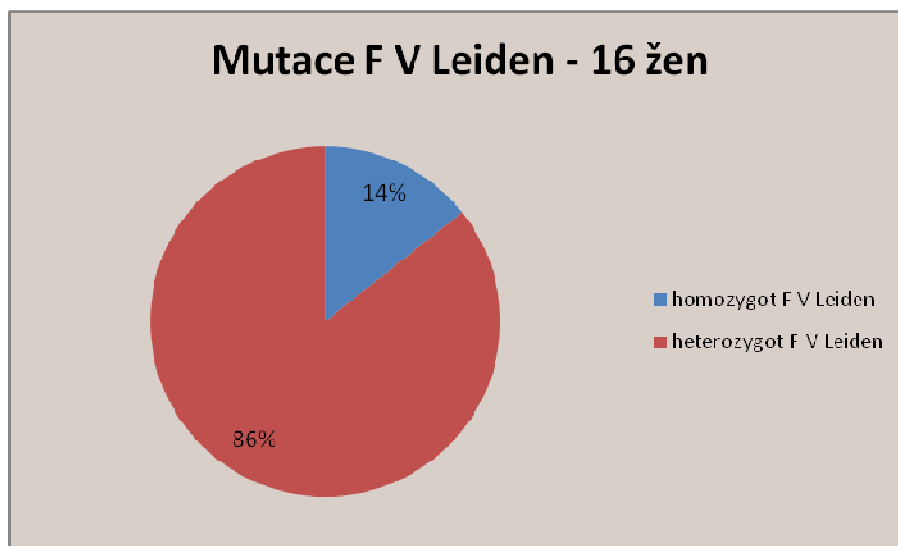
Graf č.3 – Zastoupení mutací v celém vyšetřovaném souboru



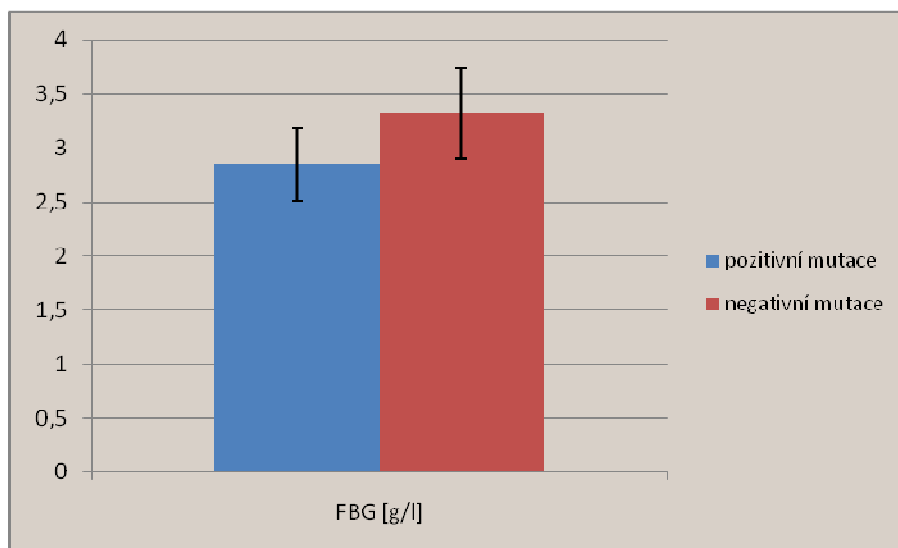
Graf č.4 – Výskyt kombinace protrombinová a Leidenská mutace



Graf č. 5 - Typy Leidenské mutace a jejich výskyt

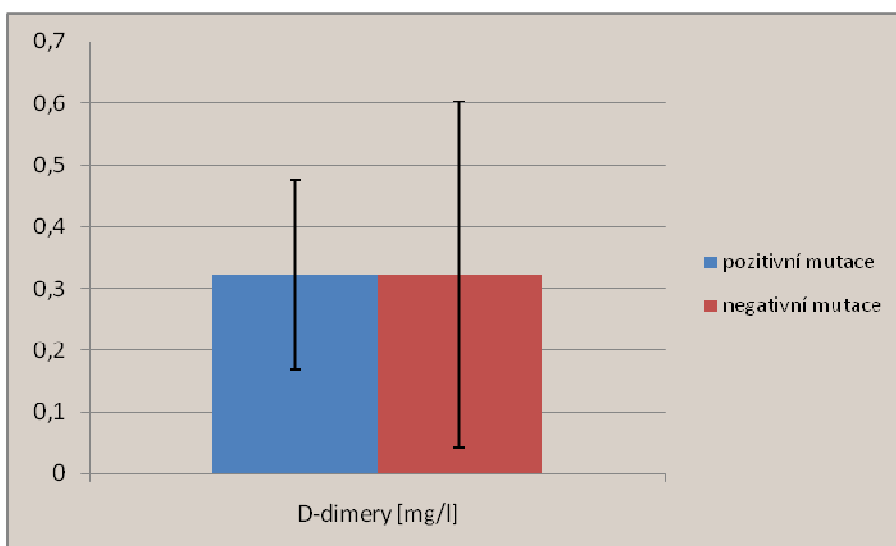


Graf č.6 – Hodnoty fibrinogenu u pozitivní a negativní mutace

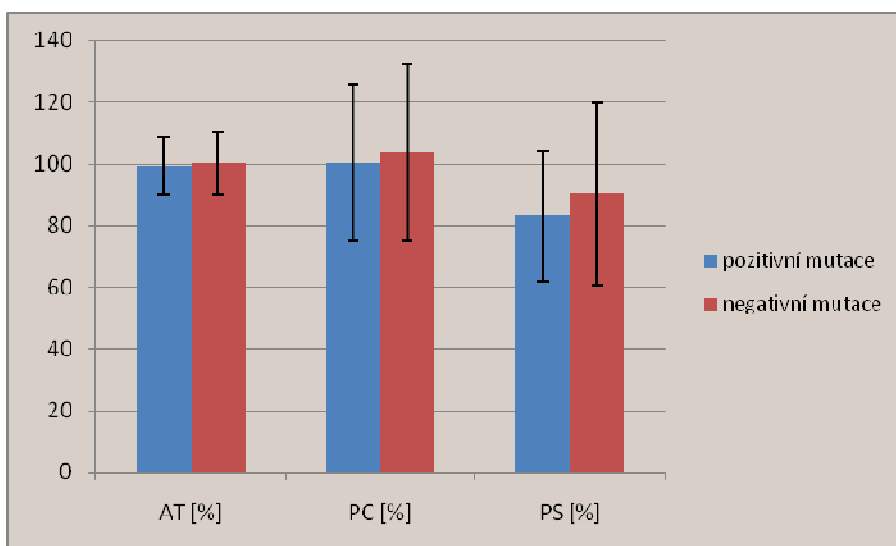




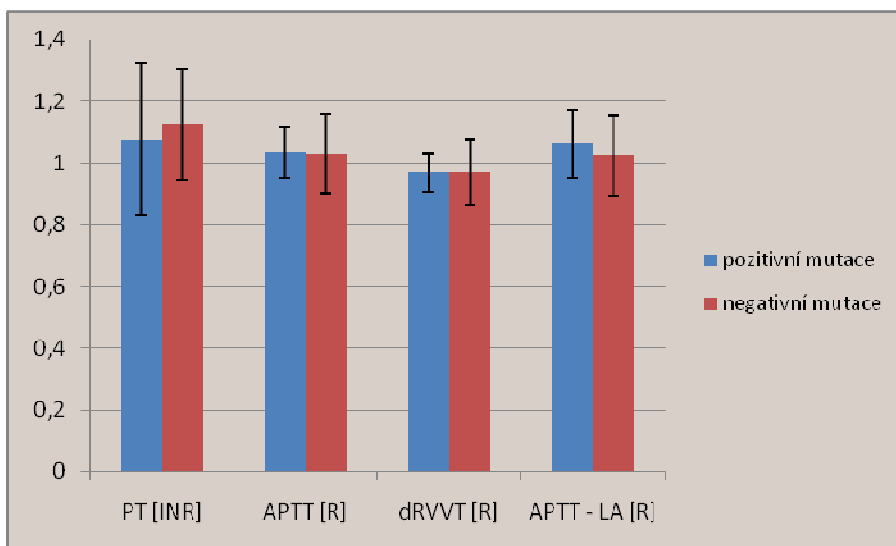
Graf č.7 – Hodnoty D-dimerů u pozitivní a negativní mutace



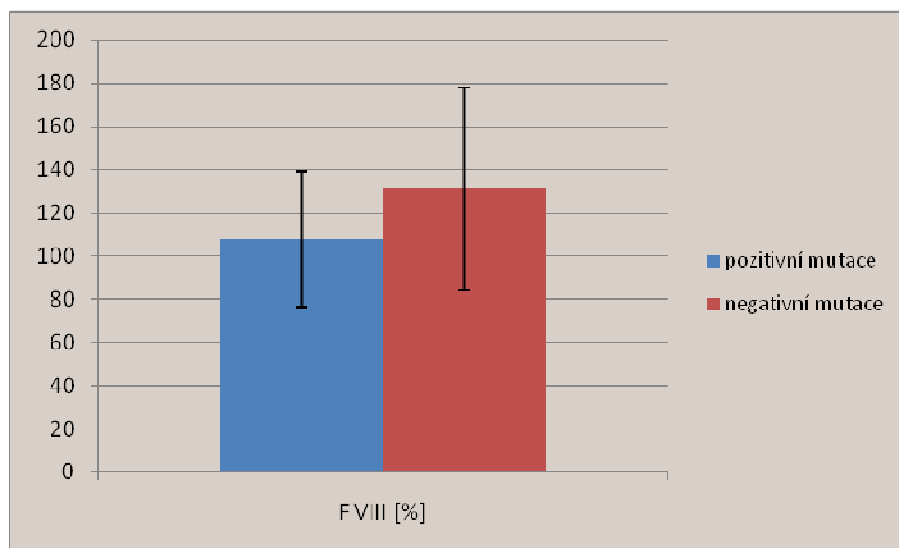
Graf č.8 – Hodnoty inhibitorů u pozitivní a negativní mutace



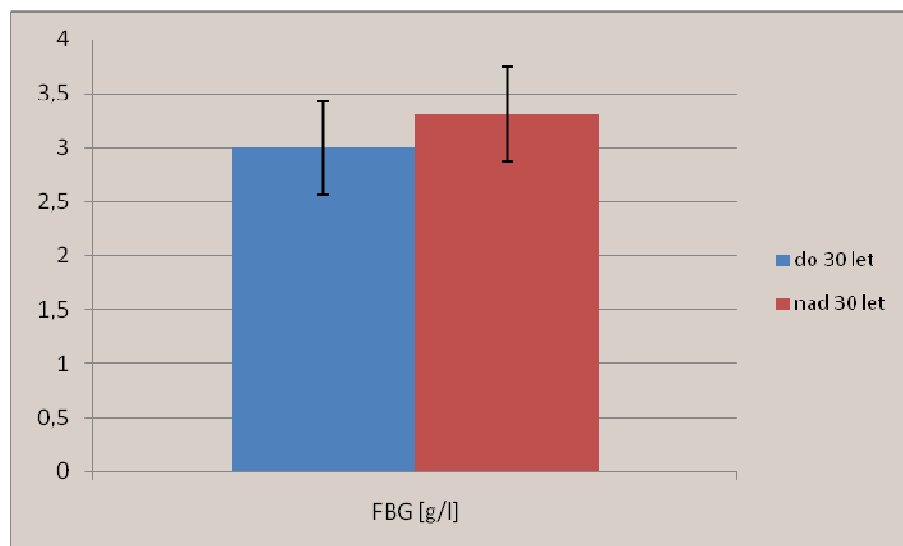
Graf č.9 – Screenig LA porovnány hodnoty u pozitivní a negativní mutace



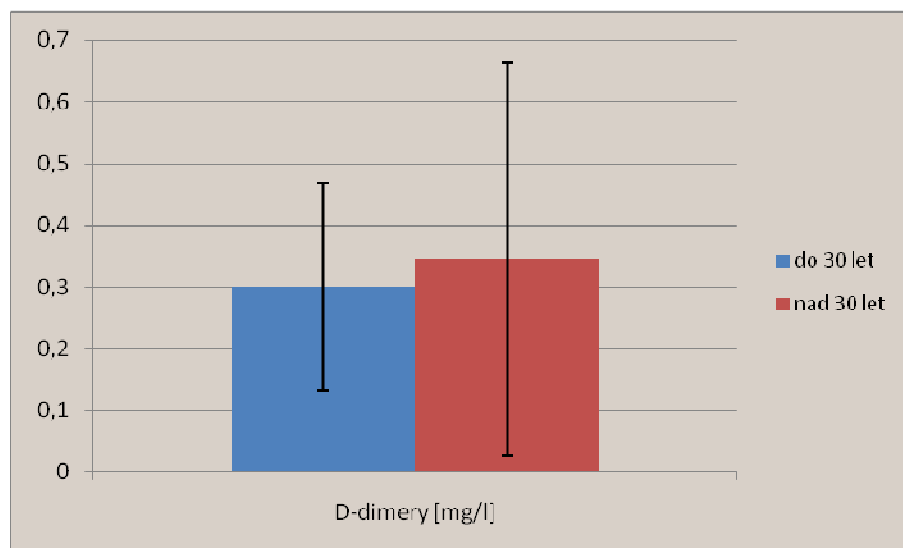
Graf č.10 – Hodnoty F VIII u pozitivní a negativní mutace



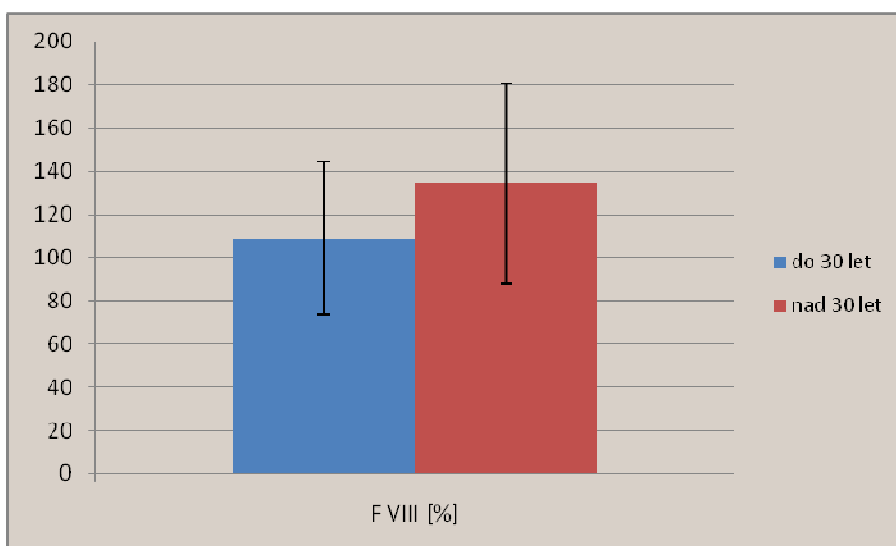
Graf č.11 – Hodnoty FBG v souboru rozděleném podle věku



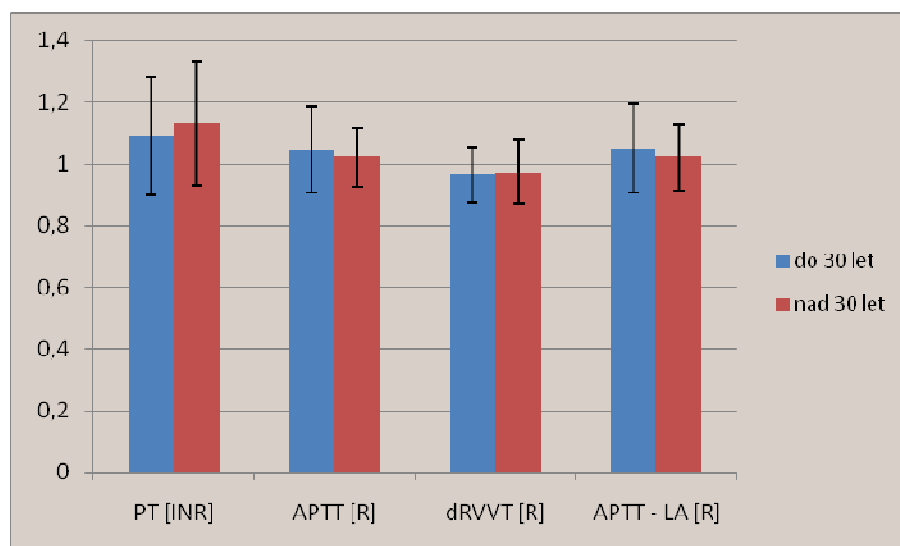
Graf č.12 – Hodnoty D – dimerů v souboru rozděleném podle věku



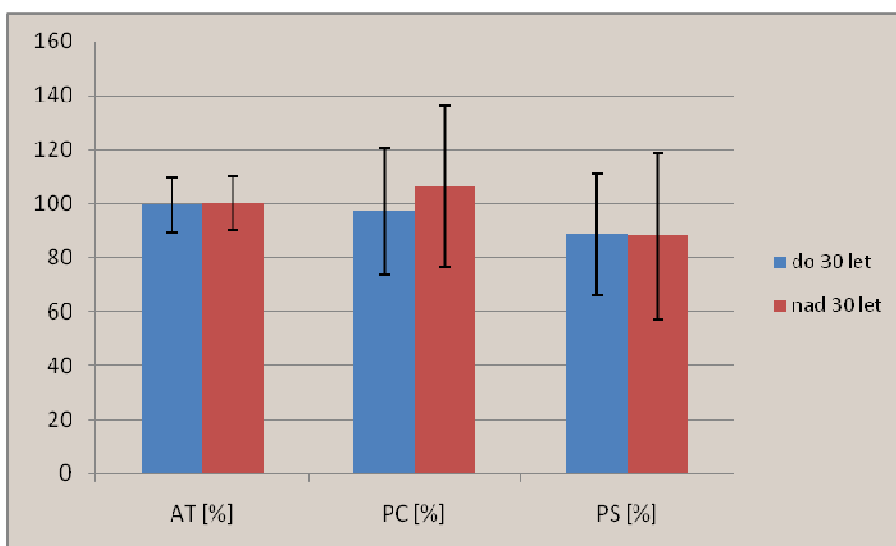
Graf č.13 – Hodnoty F VIII v souboru rozděleném podle věku



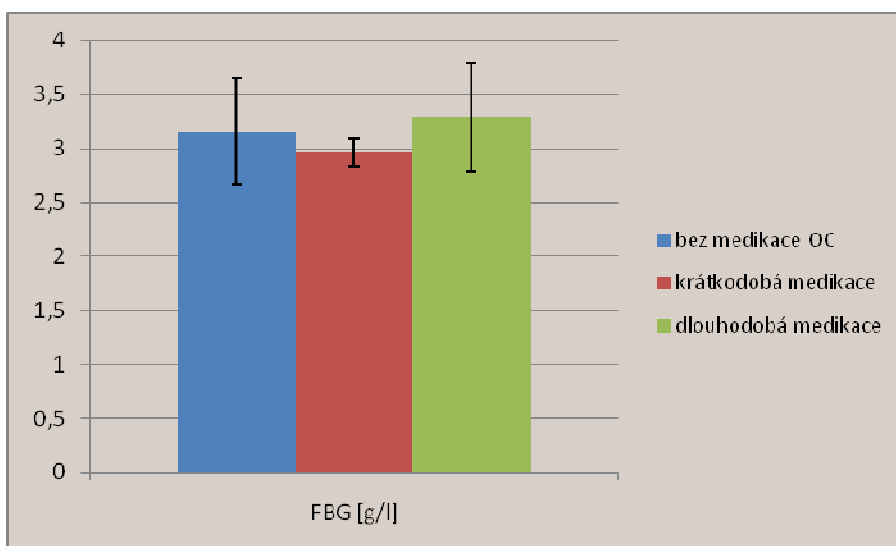
Graf č. 14 – Hodnoty screeningu LA v souboru rozděleném podle věku



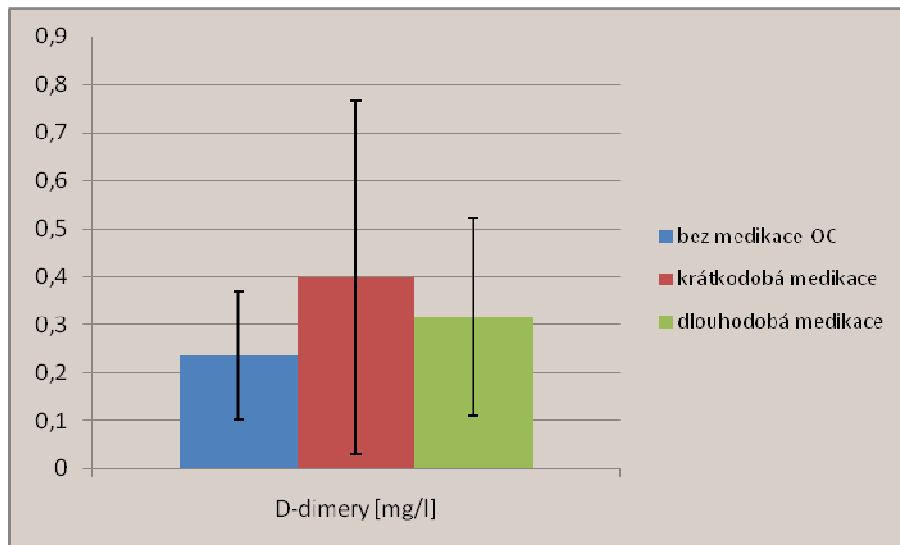
Graf č.15 – Hodnoty inhibitorů v souboru rozděleném podle věku



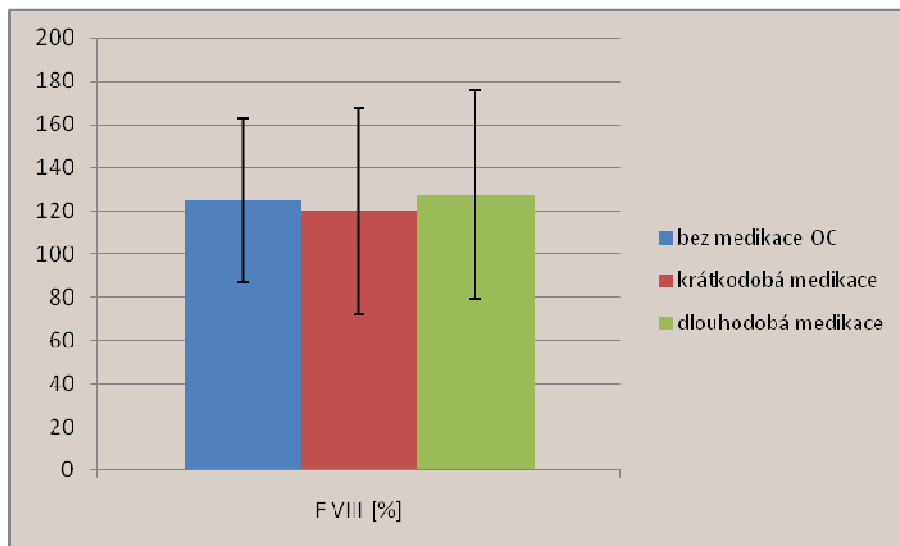
Graf č.16 – Hodnoty FBG rozdělené podle doby užívání antikoncepce



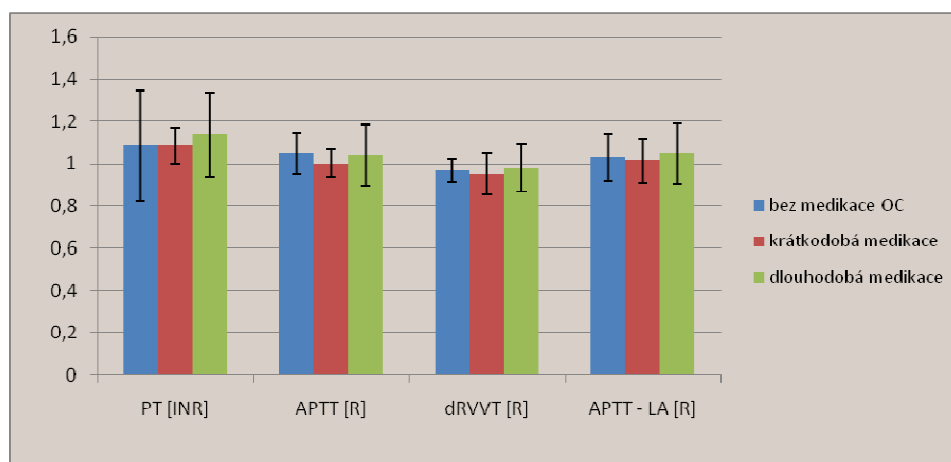
Graf č.17 – Hodnoty D – dimerů podle doby užívání antikoncepce



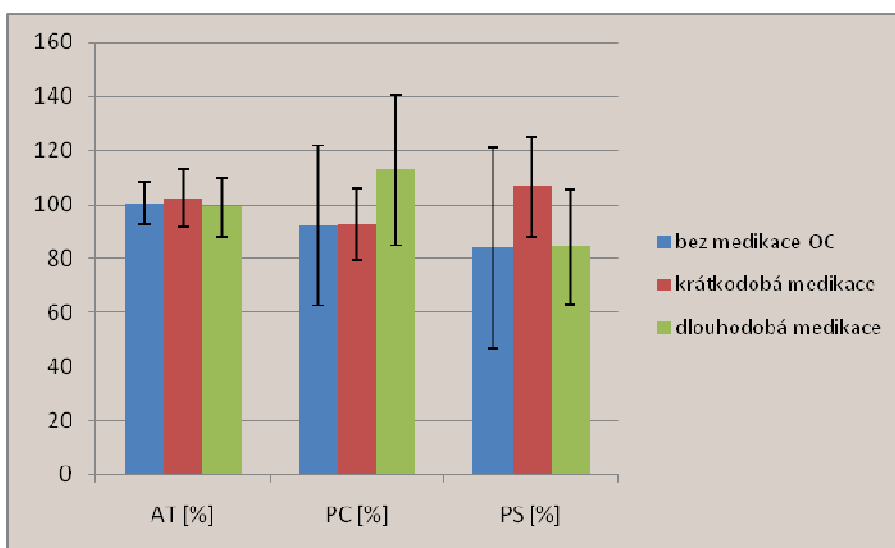
Graf č.18 – Hodnoty F VIII podle doby užívání antikoncepce



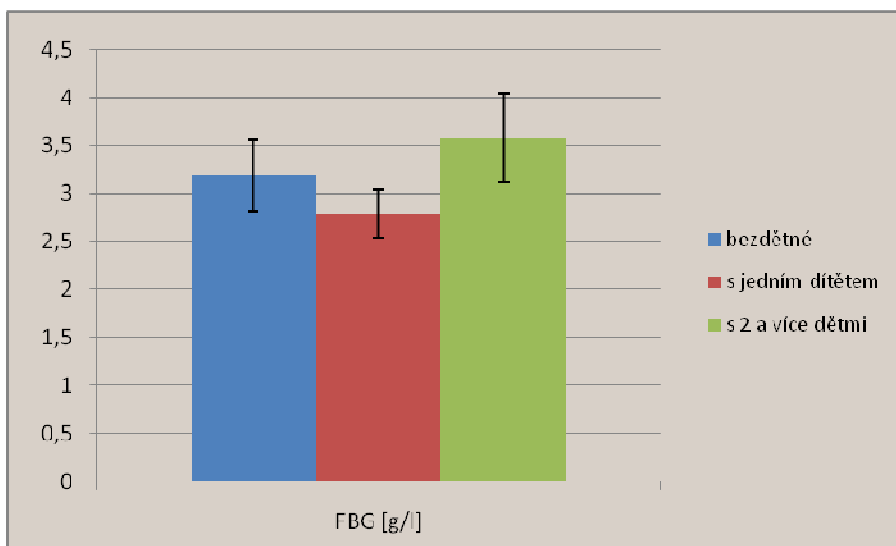
Graf č.19 – Hodnoty screeningu Ab typu LA podle doby užívání antikoncepce



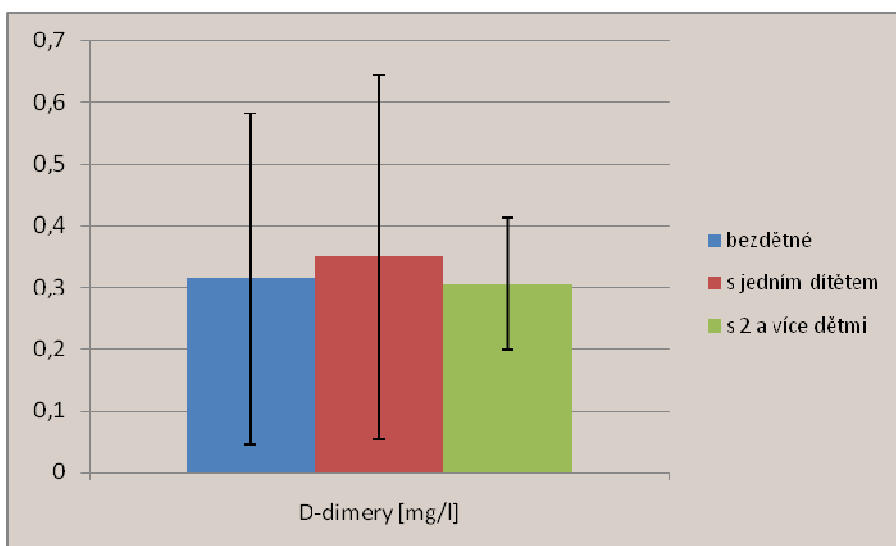
Graf č.20 – Hodnoty inhibitorů podle doby užívání antikoncepce



Graf č.21 – Hodnoty fibrinogenu podle počtu narozených dětí

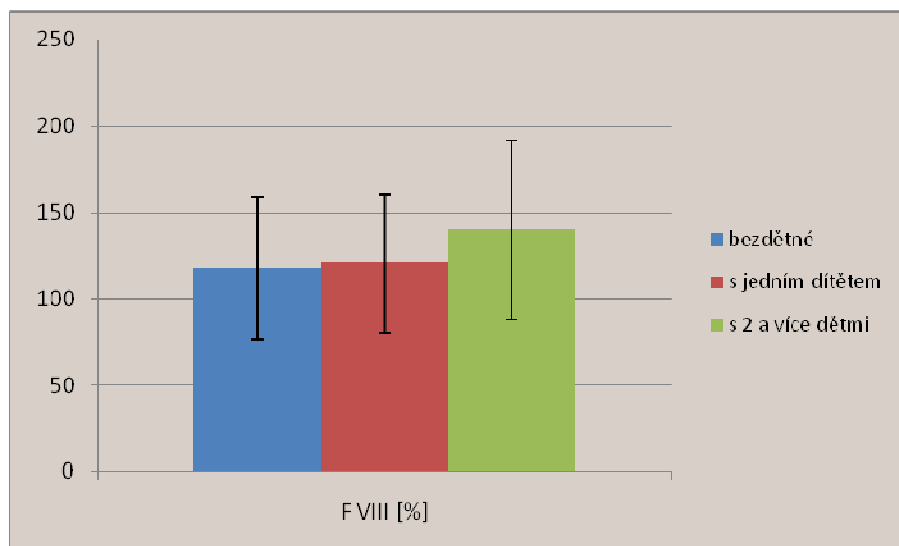


Graf č.22 – Hodnoty D – dimerů podle počtu narozených dětí

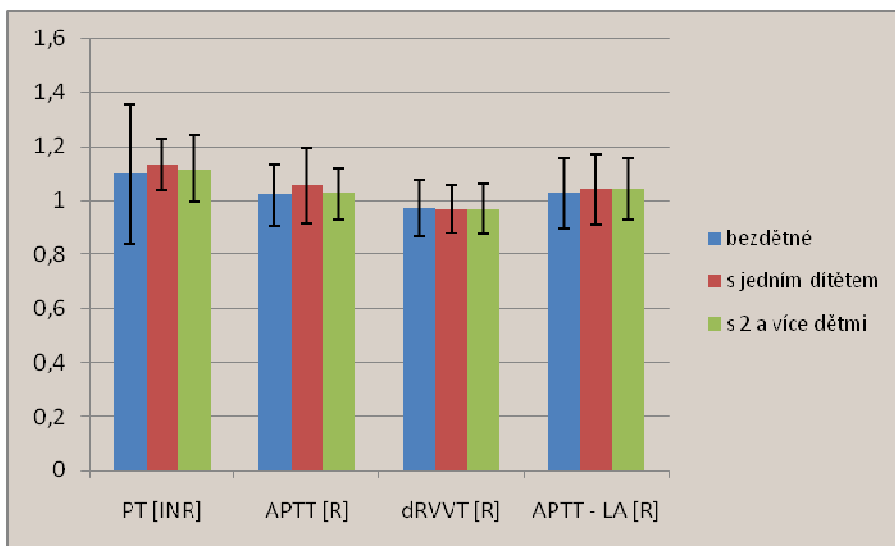




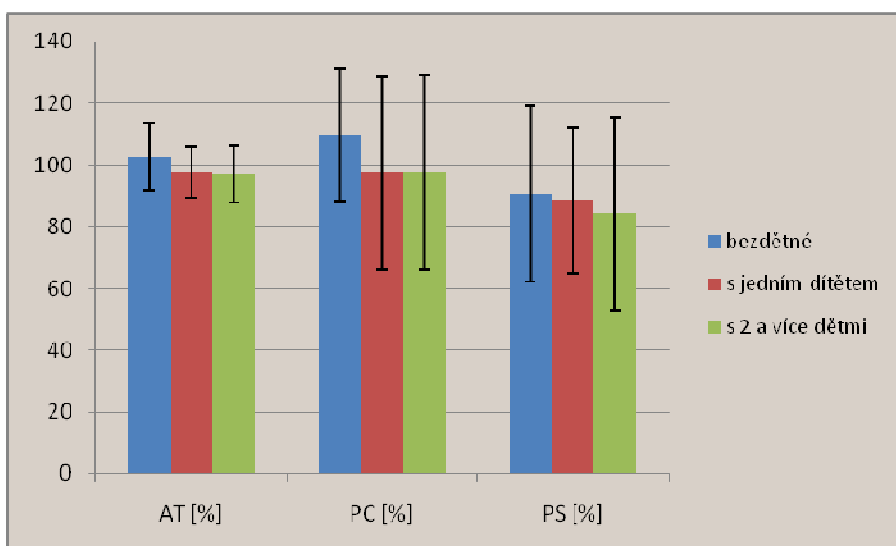
Graf č.23 – Hodnoty F VIII podle počtu narozených dětí



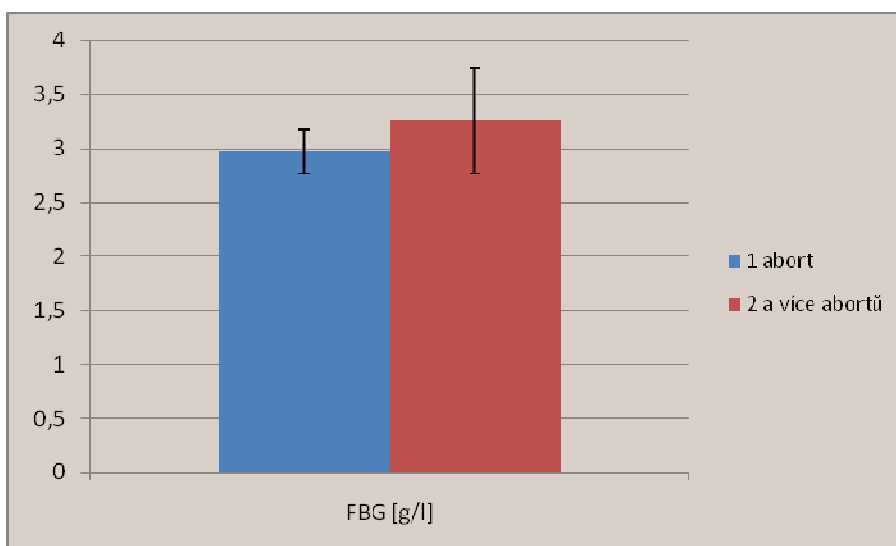
Graf č.24 – Hodnoty screeningu LA podle počtu narozených dětí



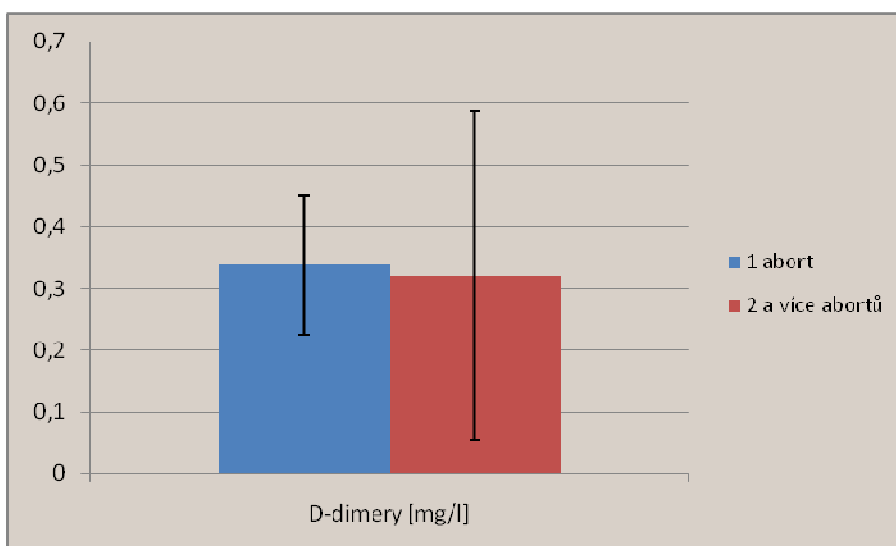
Graf č.25 – Hodnoty inhibitorů podle počtu narozených dětí



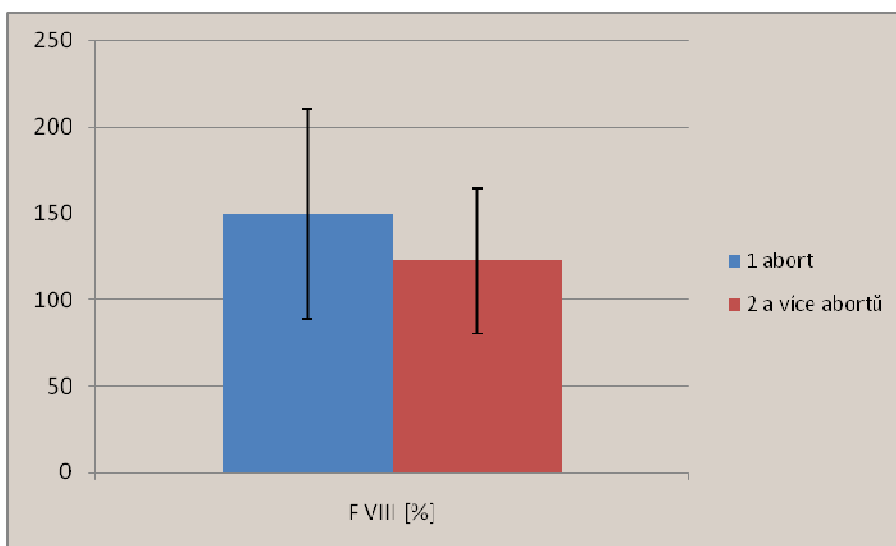
Graf č.26 – Hodnoty fibrinogenu podle počtu prodělaných abortů



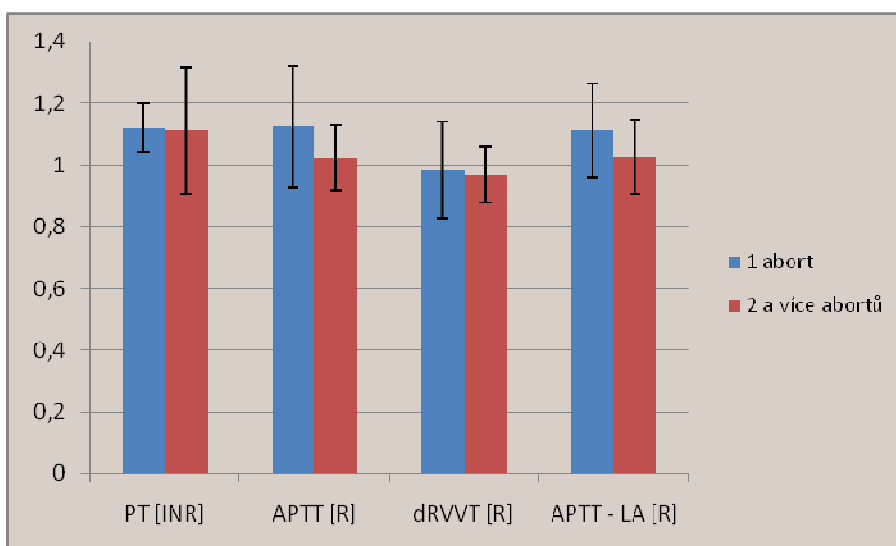
Graf č.27 – Hodnoty D – dimerů podle počtu prodělaných abortů



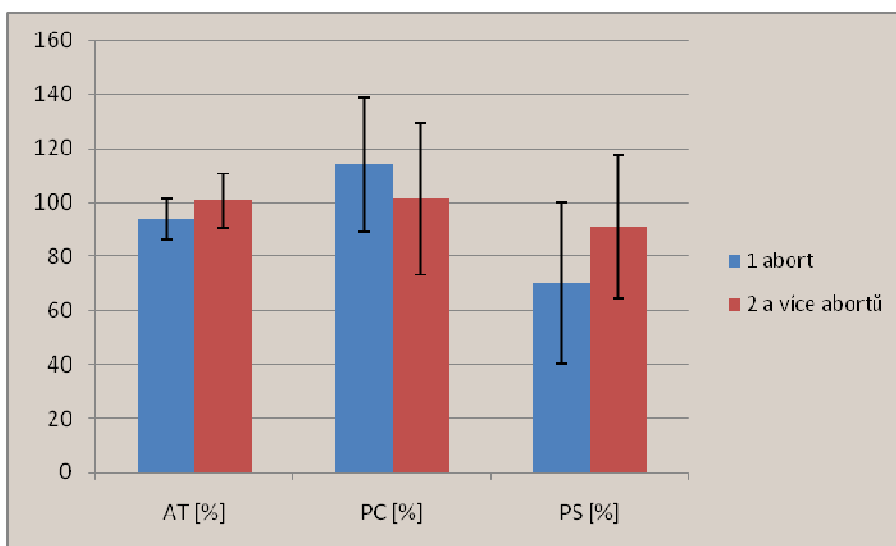
Graf č.28 – Hodnoty F VIII podle počtu prodělaných abortů



Graf č.29 – Hodnoty screeningu LA podle počtu prodělaných abortů



Graf č.30– Hodnoty inhibitorů podle počtu prodělaných abortů68



## 6 DISKUZE

Zvýšené riziko opakovaného předčasného ukončení gravidity představují jak vrozené či získané stavy spojené se zvýšeným krvácením, tak i stavy trombotické. Zatímco spontánní potraty spojené s hemorrhagickou diatézou lze považovat za poměrně vzácné, habituální potracení spojené s poruchou krevního srážení, která vede ke zvýšené náchylnosti k trombóze s trombofilii, je mnohem častější. Tato skupina je velmi heterogenní s různou frekvencí výskytu, od chorob s vysokou frekvencí v populaci, až po choroby, které se vyskytují spíše výjimečně.

Základním patogenetickým momentem, který se při ztrátě plodu uplatňuje, je trombotická okluze cév placenty, a to jak arteriálního, tak venózního řečiště. Gravidita je ve své podstatě fyziologicky hyperkoagulační stav. Kombinace této fyziologické skutečnosti s vrozenou či získanou tendencí ke zvýšenému krevnímu srážení je tedy možnou a poměrně častou příčinou těhotenských komplikací (*Roztočil, 2002; Penka, 2001*).

Již dříve se řada autorů zabývala trombofilními stavy a jejich vlivem na spontánní aborty u žen (*Dulíček, 1996; Gaillyová, 2006; Lubušký, 2004; Matyášková, 1999; Penka, 1999; Procházka, 2004; Slavík, 2004; Roztočil, 2001*). Tito autoři našli vzájemné závislosti některých parametrů popisujících trombofilní stavy na těhotenství, případně na jeho průběhu. Největší význam je připisován vrozeným trombofilním stavům a to zejména genetickým mutacím (Faktor V Leiden, mutace protrombinu).

Leidenská mutace faktoru V (G1691A) je spojována se záměnou glycinu za arginin v pozici 506 (označovaná FV R506Q) proteinového řetězce F V. Takto pozměněný aktivovaný F V je rezistentní k aktivovanému proteinu C a nedochází tímto inhibičním systémem k jeho inaktivaci (*Bertina, 2004*). U evropské populace se pohybuje prevalence mutace F V Leiden v rozmezí 2 - 7%. Ve světové populaci je její výskyt velmi variabilní (*Lockwood, 2002; Procházka, 2004*).

V námi popisovaném souboru jsme našli mutaci F V Leiden celkem u 16

žen. 2 ženy z tohoto souboru měly mutaci dokonce v obou alelách tohoto genu a 2 ženy s jednou mutovanou alelou F V měly navíc heterozygotní mutaci protrombinu G20210A. V souboru byly ženy, které měly potíže gynekologické povahy (spontánní aborty), u některých byl zjištěn rodinný výskyt TEN. U několika žen došlo ve spojitosti s trombotickým stavem během těhotenství ke ztrátě plodu.

Z literárních pramenů je známo, že incidence heterozygotní formy mutace protrombinu G20210A se u kavkazské populace pohybuje kolem 2%. Pokud tito jedinci prodělali TEN, zvyšuje se incidence na 6 % a dosahuje dokonce 20 % mezi pacienty odeslanými do center specializovaných na léčbu trombózy (Blatný, 2006). Náš soubor vykazuje podobné výsledky. Protrombinovou mutaci v heterozygotní formě jsme našli celkem u 9 % vyšetřovaných žen z našeho souboru.

Podle Gaillyové ke známým rizikovým faktorům abortů patří především věk ženy, anatomické a endokrinní příčiny (Gaillyová, 2006). Všeobecně uváděné riziko spontánního potratu je asi u 10 - 11 % všech poznaných těhotenství. Riziko je závislé zejména na věku těhotné ženy. U žen ve věku 22 let, kdy je dosaženo minima, se riziko pohybuje kolem 8,7 %; s narůstajícím věkem riziko stoupá a ve věku 48 let již dosahuje hodnoty kolem maxima - 84 %. K potratům jsou náchylnější ženy mladší 20 let (z fyziologických a psychosociálních příčin) a ženy starší 35 let z důvodů, které jsou rozebrány v této části (Gaillyová, 2006). Navíc vyšší věk ženy (nad 30 let) je mnoha autory považován za rizikový faktor fetální ztráty nebo spontánního potratu. (Cibula, 2003; Hashimoto, 1999; Kupfermanc, 2003; Loockwood, 2002; Kubešová, Penka, 2001).

Frekvence spontánních potratů narůstá také s počtem proběhlých gravidit. Rovněž pokud se vyskytla před spontánním abortem riziková gynekologická anamnéza či opakované fetální ztráty, multiparita a vícečetné těhotenství – zvyšuje se riziko komplikovaného nebo neúspěšného průběhu těhotenství se zvýšeným rizikem fetální ztráty. Navíc předcházející spontánní abort

významně zvyšuje riziko opakovaného abortu.

V současnosti dochází ke změnám ve věku těhotných žen. V minulých desetiletích byly ženy prvorodičky většinou mladšího věku a pokud rodila žena s věkem nad 30 let, jednalo se většinou o ženy se sníženou fertilitou v anamnéze nebo se jedná o multipary. V současné době se jedná většinou o ženy plánující rodičovství a první porod ve věku kolem 30 let.

U žen s věkem 42 let nebo vyšším, končí asi 50 % všech gravidit spontánním abortem, mimoděložní graviditou nebo nitroděložním úmrtím plodu (*Andersen, 2000; Roztočil, 2002; Mára, 2002*). Zvýšené riziko spontánních potratů je pozorováno u starších žen prvorodiček i opakovaně gravidních, bez významné souvislosti s předchozí gynekologickou anamnézou.

Vyšší riziko spontánního potratu u starších žen souvisí se zvýšeným procentem chromosomových aberací embryí a se sníženou funkcí hormonální a děložní (*Rubio, 2003*). Nabízí se vysvětlení, že většina žen s opakovanými fetálními ztrátami může spadat do vyšších věkových skupin, protože se jim opakovaně nedaří dosáhnout porodu dítěte. Vyšší riziko spontánních abortů však bylo prokázáno ve vyšším věku jak u žen po opakovaných fetálních ztrátách, tak bez této rizikové anamnézy. Riziko opakovaného spontánního abortu je však vyšší než riziko prvního samovolného abortu v každé věkové skupině (*Gallyiová, 2006*).

V této diplomové práci jsme rozdělili vyšetřovaný soubor žen do dvou skupin: věk do 30 let a věk nad 30 let. V každé skupině byly stanoveny hodnoty laboratorních testů. Jednalo se o testy, které měly určitou spojitost s možností popisu trombofilního stavu. Jednotlivé sledované parametry vykazují určitý vzestup některých hodnot se stoupajícím věkem sledovaných žen (viz. Tab. č.2 a grafy č. 11 - 15), ale zjištěné hodnoty nejsou statisticky významné.

Získané rizikové faktory trombózy jsou obecně známy. Patří mezi ně věk nad 45 let, obezita, operace, poranění, imobilizace, nádorová onemocnění, TEN, varixy, hormonální léčba, těhotenství a šestinedělí. Pro arteriální

trombózu jsou rizikovými faktory navíc kouření, hypertenze a poruchy lipidů. (Penka, 2001). Těhotenství samo o sobě může vést k manifestaci vrozeného i získaného trombofilního stavu (Roztočil, 2002).

Antifosfolipidové protilátky jsou velmi heterogenní skupinou protilátek. Obecně je tato skupina většinou spojena se získaným trombofilním stavem (Harris a Hughes, 1986). Antifosfolipidové protilátky typu lupus-antikoagulans a případně i antikardiolipinové protilátky bývají spojovány s komplikacemi při porodu. Mezi komplikace spojované s antifosfolipidovým syndromem je možné zařadit smrt plodu, opakované potraty, preeklampsie, insuficienci placenty.

První klinický případ u těhotných žen spojený s protilátkami typu „antikoagulans“ popsal v roce 1954 - Beaumont (Beaumont, 1954). Souvislost mezi antifosfolipidovými protilátkami a spontánními potraty naznačila Nilssonová se svými spolupracovníky (Nilssonová a spol., 1957) a v roce 1980 - Soulier a Boff definovali třídu – opakované spontánní aborty, trombembolické příhody a cirkulující antikoagulans jako Soulier-Boffův syndrom (Soulier a Boff, 1980). Termín APS s definovanými klinickými a laboratorními kritérii se užívá od roku 1985 (Buliková, 2004).

V našem souboru jsme porovnávali hodnoty screeningových testů, které se používají ke stanovení přítomnosti protilátek typu lupus antikoagulans. APS jsme prokázali u jedné ženy ze sledovaného souboru. Statistickou významnost jsme v tomto ojedinělém případě nezjišťovali. Hodnoty parametrů jsou uvedeny v kapitole Výsledky (Tab. 3 - 7, grafy č. 6 – 30).



## 7 POUŽITÉ ZKRATKY

AT	antitrombin
ADP	adenosin diphosphate (adenosin difosfát)
APC	aktivovaný protein C
APC – R	activated protein C – resistance (rezistence na APC)
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
CMP	cévní mozková příhoda
dRVVT	dilute Russel viper venom test (test s jedem Russelovy zmije)
DVT	deep venous thrombosis (hluboká žilní trombóza)
F 1+2	fragment 1 a fragment 2
F II	protrombin
F IIa	trombin
F VIII	faktor VIII
FBG	fibrinogen
FDP	fibrin degradační produkty
HMWK	high molecular weight kininogen (vysokomolekulární kinino-gen)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IM	infarkt myokardu
INR	international normalized ratio (mezinárodní normalizovaný poměr)
ISI	international sensitivity index (index citlivosti tromboplastinu)
IUGR	intrauterine growth retardation (nitroděložní retardace růstu)
KO	krevní obraz
LA	lupus antikoagulans
MTHFR	methylenetetrahydrofolát reduktáza
OC	oral contraception (orální kontracepce, antikoncepce)
PAI – 1, PAI - 2	plasminogen activator inhibitor (inhibitor aktivátoru plazminogenu)
PE	plicní embolie
PGI <sub>2</sub>	prostaglandin I <sub>2</sub> - prostacyklin
PNH	paroxysmální noční hemoglobinurie
PC	protein C

PS	protein S
PT	protrombinový test
R	ratio (poměr)
SLE	systemový lupus erythematoses
SPS	sticky platelet syndrome (syndrom lepivých destiček)
TAT komplexy	trombin - antitrombin komplexy
TEN	tromboembolická nemoc
TF	tkáňový faktor
TFPI	tissue - pathway platelet inhibitor (inhibitor tkáňového faktoru)
TM	trombomodulin
t-PA	tissue plasminogen activator (tkáňový aktivátor plazminogenu)
TXA <sub>2</sub>	tromboxan A <sub>2</sub>
u-PA	urokinase - plasminogen activator (urokináza)
VSM	vena saphena magna
vWF	von Willebrandův faktor

## 8 LITERATURA

- ANDERSON, D. R. a spol. Comparison of Low-Intensity Warfarin Therapy with Conventional-Intensity Warfarin Therapy for Long-Term Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism. *N. Engl. J. Med.*, 2003, č. 7, s. 631-639, ISSN 0028-4793, IF 34.833.
- BERTINA, R.M. Laboratory diagnosis of APC-resistance : a critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria., *Thromb. Haemost.*, 1994, č. 72(6), s. 880-886. ISSN 0340-6245.
- BERTINA, R.M. Genetic approach to thrombophilia. *Thromb. Haemost.*, 2001, č. 86(1), s. 92-103. ISSN 0340-6245.
- BULÍKOVÁ, A.; PENKA, M. Anticoagulant treatment failure. *Vnitr. Lek.*, 2006, č. 52, s. 107-118. ISSN 0042-773X.
- CALATZIS, A. a spol. Management and monitoring of recombinant activated factor VII. *Blood Coagul. Fibrinolysis.*, 2000, č. 11, s. 25-30. ISSN 0957-5235. IF 1.370.
- CIBULA, D. a spol. Informed consent for factor V Leiden mutation screening before recommending use of combined hormonal contraceptives or hormone replacement therapy. *Ceska Gynekol.*, 2003, č. 68(3), s. 212. ISSN 1210-7832.
- DÄHLBECK, B. a spol. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C : prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, č. 90, s. 1004-1008, ISSN 0027-8424.
- DULÍČEK, P.; MALÝ, J.; PEŠAVOVÁ, I. *Profylaxe tromboembolické choroby v graviditě u žen s kongenitálním trombofilním stavem.*, prezentováno na VII. Slovensko-české konferenci o hemostáze a trombóze, Martin, 26.5.2000.
- DULÍČEK, P. a spol. Mutace FV Leiden – nejčastější rizikový

faktor pro vznik žilní trombózy. *Hematológia a transfuziológia*, 1997, č. 4, s. 6–9, ISSN 1335-2075.

- DULÍČEK, P. a spol. Antithrombotic prophylaxis and treatment in thrombophilic disorders in gynaecology and obstetrics. *Vnitr. Lek.*, 2006, č. 52, s. 58-62. ISSN 0042-773X.
- EJINDEN-SCHRAUWEN, Y. Alu-repeat polymorphism in the tissue-type plasminogen activator (tPA) gene does not affect basal endothelial tPA synthesis. *Thromb Haemost.*, 1995, Č. 74(4), s. 1202. ISSN 0340-6245.
- ERLEBACHER, A. Ovarian insufficiency and early pregnancy loss induced by activation of the innate immune system. *J. Clin. Invest.*, 2004, č. 114(1), s. 39-48. ISSN 0021-9738.
- GAILLYOVÁ, R. *Genetické příčiny poruch reprodukce : vyšetření páru s opakovanými fetálními ztrátami*. Brno, 2006, 104 s., [26] s. příl. Disertační práce. Masarykova Univerzita v Brně. Lékařská fakulta. Ústav preventivního lékařství. Oddělení lékařské genetiky fakultní nemocnice v Brně. Školitelka Prof. MUDr. Drahoslava Hrubá, DrSc.
- GRIFFIN, J. H. a spol. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease., *J. Clin. Invest.*, 1981, č. 68(5), s. 1370-1373. ISSN 0021-9738.
- HASHIMOTO, K. a spol. The factor V Leden mutation in Japanese couples with recurrent spontaneous abortion. *Hum. Reprod.*, 1999, č. 14, roč. 7, s. 1872-1874, ISSN 0268-1161, IF 3.003.
- HEIT, J. A. a spol. Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum : a 30-year population-based study. *Ann. Intern Med.*, 2006, č.144(6), s. 453-455. ISSN 0003-4819. IF 14.780.
- HOMBURG, R. The management of infertility associated with polycystic ovary syndrome. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2003, č. 14,

- s. 109. ISSN 1477-7827 [online].
- INDRÁK, K. a spol. *Hematologie : Posgraduální klinický projekt, Vnitřní lékařství, 7. vydání*. Praha/Kroměříž: Triton, 2006/2007, 278 s., ISBN 8072548689.
  - KRÍŽOVÁ, P. a spol. Image analysis of blood platelets adhesion. *Sb. Lek.*, 2003, č. 104(2), s. 223-229. ISSN 0036-5327.
  - KUBEŠOVÁ, H.; PENKA, M. Specific features of hematopoiesis and hemostasis in advanced age. *Vnitr. Lek.*, 2003, č. 49(3), s. 227-233., ISSN 0042-773X.
  - KUBISZ, P. a spol. *Hematológia a transfuziologia*. Praha: Grada, 2006, 323 s. ISBN 8024717794.
  - KUPFERMINC, M.J. Trombophilia and pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2003, č. 1, s. 735-748, ISSN 1477-7827.
  - KVASNIČKA, J. Žilní a tepenná trombofilie. *Interv. Akut. Kardiol.*, 2003, č. 2, s. 23–29, ISSN 1213-807X.
  - LOCKWOOD, C.J. Inherited thrombophilias in pregnant patients : detection and treatment paradigm. *Obstet. Gynecol.*, 2002, č. 99(2), s. 333-341. ISSN 0009-9201. IF 0.928.
  - MARCHI, R.; LUNDBERG, U.; GRIMBERGEN, J. a spol. Fibrinogen Caracas V, an abnormal fibrinogen with an A a 532 Ser® Cys substitution associated with thrombosis., *Thromb. Haemost.*, 2000, č. 84, s. 263–270, ISSN 0340-6245, IF 4.372.
  - MARTÍNKOVÁ, J. a spol. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007, 379 s., ISBN 9788024713564.
  - MATÝŠKOVÁ, M.; ZAVŘELOVÁ, J.; HRACHOVINOVÁ, I. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Adamov: Mikada, 1999, 203 s. ISBN 8070132787.
  - MATÝŠKOVÁ, M. a spol. ABO/H blood groups and factor V

Leiden., *Cas. Lek. Cesk.*, 2002, č. 141(5), s. 146-151.  
ISSN 0008-7335.

- NORDSTRÖM, M. a spol. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J. Intern. Med.*, 1992, č. 232, s. 155–160, ISSN 0954-6820.
- PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu : Fyziologie a patofyziologie hemostázy*. Český Těšín: Finidr, 2004, 237 s. ISBN 8086682005 (soubor), ISBN 808668203X (3.díl).
- PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu : Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín: Finidr, 2004, ISBN 8086682021 (2. díl).
- PECKA, M. Laboratory monitoring of antithrombotic treatment., *Vnitr. Lek.* 2006, č. 52, s. 26-30. ISSN 0042-773X.
- PENKA, M. a spol. *Hematologie 1, Neonkologická hematologie*. Praha : Grada, 2001, 201 s. ISBN 8024700239.
- POORT, S.M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis., *Blood.*, 1996, č. 88(10), s. 3698-3703. ISSN 0006-4971.
- POUL, H. *Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci : Doporučení pro klinickou praxi.*, Oddělení hematologie a transfuziologie Nemocnice Pelhřimov, Vydáno 16.3.2006 u příležitosti konání XII. Pařízkových dní. Dostupné na [www.thrombosis.cz](http://www.thrombosis.cz) a [www.pr-lab.cz](http://www.pr-lab.cz), 12 s.
- PROCHÁZKA, M. a spol. Frequency of selected thrombophilias in women with placental abruption. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.*, 2007, č. 47(4), s. 297-301. ISSN 0004-8666. IF 0.835.
- ROZTOČIL, A. Vyšetření páru s opakovaným potrácením : Sterilita a opakované potrácení. *Mod. gynekol.*, 2002, č. 11, s. 605-609, ISSN 1211-1058.

- SCHWARZ, H. P. a spol. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease., *Blood.*, 1984, č. 64(6), s. 1297-1300. ISSN 0006-4971.
- SELA, B. Hyperhomocysteinemia as a risk factor in atherosclerotic and thrombotic vascular processes., *Harefuah.*, 1995, č. 129(10), s. 407-12. ISSN 0017-7768.
- SILBERNAGL, S.; LANG, F. *Atlas patofyziologie člověka*. Praha: Grada, 2001, 392 s. ISBN 8071699683.
- ŠÁMALOVÁ, L. *Klinické použití krve : Příručka*. Praha: Grada, 2002, 221 s. ISBN 8024702681.
- *Velký lékařský slovník. 4. vydání*, Praha: Jessenius Maxdorf, 2004. ISBN 8073450372.