

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**Trombin generační čas (TGT)
a porovnání koagulačních parametrů**

Bakalářská práce

Vladimír Koblasa

2009

Vedoucí práce: Mgr. Ivana Malíková

Abstrakt: **Trombin generační čas a porovnání koagulačních parametrů**

Centrální hematologické laboratoře a Trombotické centrum VFN, Praha 2,ČR

Trombin generační čas (TGT) je nová metoda komplexního vyšetření koagulace. Je založena na fluorimetrickém měření generace trombinu v čase. Jedná se o vyšetření koagulace z pohledu celé koagulační kaskády. Výhodou metody je, že se koagulace dá vyšetřit nezávisle na počtu krevních destiček v plazmě i nezávisle na hladině tkáňového faktoru. Sledování generace trombinu je univerzální metoda pro monitorování funkce hemostatického systému.

Cílem této studie bylo ověřit, jaké hodnoty generace trombinu vykazuje skupina zdravých jedinců a jak spolu korelují hodnoty získané běžným koagulačním vyšetřením a stanovením trombin generačního času v porovnání se skupinou pacientů s vysokým F VIII a nízkým APTT. Nakonec pak ještě porovnání se skupinou pacientů se známou antikoagulační léčbou.

Metodika: Měření koagulačních parametrů na BCS XP bylo provedeno pomocí standardních kitů pro stanovení hladiny PT : *Thromborel S*, APTT : *Pathromtin SL*, TT : *Thromboclotin(5 NIH)*, AT III : *Berichrom AT*, D-Dimer : *MediRox*, Fbg : *Technoclone*, F VIII : DG-FVIII. Sledování generace trombinu bylo provedeno pomocí kitu TECHNOTROMBIN TGA reagents for Ceveron, analyzátor CEVERON, Rakousko.

Výsledky studie: Počet stanovení 360, byly stanoveny parametry generace trombinu pro reagentie TGA RB (nízký obsah TF a PL) : Lag time (min) průměr 7,7, medián 7,6; Peak Trombin (nM) průměr 186,8, medián 181,4; AUC průměr 1848,6, medián 1878,2; TGA RC Low (nízký obsah PL a vyšší obsah TF) : Lag time (min) průměr 3,5; medián 3,4; Peak Trombin (nM) průměr 188,5; medián 174,6; AUC průměr 1931,5, medián 1876,9; TGA RC High (vysoký obsah PL a vyšší obsah TF) : Lag time (min) průměr 8,7; medián 8,5, Peak Trombin (nM) průměr 408,4; medián 387,1; AUC průměr 2273,4; medián 2246,6.

Závěr: Při sledování generace trombinu bylo dosaženo hodnot, které spolu dobře korelují. Reagencii TGA RB je vhodné používat při sledování hladiny faktoru VIII, event. inhibitorů faktoru VIII, reagencii TGA RC low u trombofile nebo naopak u krvácivých stavů a reagentie TGA RC high pro monitorování antikoagulační terapie. Trombin generační čas je možné poměrně jednoduše a spolehlivě monitorovat a sledování generace trombinu by mělo podat celkový obraz hemostatického systému a tím doplnit běžně prováděné koagulační vyšetření.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma *Trombin generační čas (TGT) a porovnání koagulačních parametrů* vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

Souhlasím s použitím práce k vědeckým účelům.

V Praze 10.5.2009

.....

Podpis studenta

Poděkování: Velice děkuji paní Mgr. Ivaně Malíkové z Centrální hematologické laboratoře Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za neobyčejně obětavou pomoc, poskytnutí studijních materiálů a věcné připomínky k mé práci.

Taktéž děkuji celé mé rodině za pomoc a pochopení.

1. Úvod

Trombotické stavy patří mezi nejčastější příčiny úmrtí v populaci, přitom více než polovina z nich připadá na infarkt myokardu. Trombotické stavy se dělí na dědičné a získané. Důvodem těchto stavů mohou být vedle poruch koagulačních faktorů nebo jejich inhibitorů i poruchy krevních destiček, leukocytů, endoteliálních buněk apod. Podle místa vzniku rozdělujeme trombózy na žilní trombózy, arteriální trombózy, trombotické cévní příhody a syndrom diseminované intravaskulární koagulace.

Žilní trombózu způsobuje především zástava proudění krve a hyperkoagulace, ke které dochází při aktivaci plazmatických koagulačních faktorů a při selhání funkce jejich přirozených inhibitorů v krevní plazmě a krevním řečišti. Možnou letální komplikací je utržení trombu s následnou embolizací do plic (80% pacientů s plicní embolií umírá do dvou hodin). Při vzniku arteriální trombózy se na počátku především uplatňuje aktivace a agregace krevních destiček a dysfunkce endotelu, která je vyvolána ve většině případů aterosklerotickým procesem při zánětu cévní stěny. Trombotické stavy bychom měli umět diagnostikovat, neboť při jejich časném rozpoznání lze vhodně zvolenou profylaktickou léčbou a kontrolou její účinnosti zabránit vzniku nebo opětovného výskytu trombóz.

Se získanými trombotickými stavy, které často bývají komplexnější povahy, se setkáváme u pokročilých jaterních onemocnění, nefrotického syndromu, zhoubných nádorových procesů, v pooperačním období, v průběhu těhotenství, v poporodním období nebo u myeloproliferačních onemocnění. Trombotické komplikace bývají často klinickým příznakem v přítomnosti antifosfolipidových protilátek, které se mohou vyskytovat při systémovém onemocnění nebo i ojediněle.

Léčba trombotických stavů, zvláště vrozených, spočívá v prevenci. U lehčích forem se při rizikových situacích podávají antikoagulantia, jako je například heparin. U těžkých forem trombotických stavů je prevence celoživotní a zakládá se na podávání heparinu nebo kumarinových přípravků. Primární léčbou trombotických příhod je antikoagulační léčba heparinem, doplněná podáváním chybějících faktorů v podobě čerstvě mražené plazmy nebo koncentrátů.

Nefrakcionovaný heparin má ovšem řadu nežádoucích účinků, které mohou vést ke komplikacím. Nejčastěji se setkáváme s předávkováním, které se projevuje krvácením u 5-10 % léčených pacientů. Pro kontrolu podávané dávky stanovujeme APTT. Nefrakcionovaný heparin při metabolických změnách vede k rozdílnosti hladin v plazmě. Někdy může docházet k rezistenci na heparin, což se projevuje tím, že po podání vysoké dávky heparinu (až 40 000 IU) nedochází ke zvýšení APTT. Může docházet

k hypersenzitivitě s výskytem alergických projevů. V 60. letech minulého století byly izolovány fragmenty heparinu. Jsou to účinné nízkomolekulární složky, které vykazují méně nežádoucích účinků provázejících léčbu standardním heparinem. Do klinické praxe byly uvedeny jako preparáty nízkomolekulárního heparinu. Liší se různou přípravou, molekulární hmotností a poměrem vazby F Xa a F IIa. Jak ukazuje řada klinických studií, jsou nízkomolekulární hepariny vhodnější než nefrakciovaný heparin. Mají nižší počet nežádoucích účinků a jednoduchou subkutánní aplikaci. LMWH lze používat jako prevenci i jako dlouhodobou léčbu, např. při komplikovaném těhotenství. I když jsou doporučeny dávky LMWH vztažené na BMI, je vhodné léčbu monitorovat, aby byla ověřena účinnost podávané dávky.

1.1 Hemostáza

Hemostáza je schopnost organismu zastavit krvácení a současně schopnost udržet tekutost krve v neporušeném cévním řečišti. V případě porušení souvislosti cévní stěny vede krevním srážením (koagulací) k zástavě krvácení. Tento složitý mechanismus udržuje rovnováhu mezi stavem hypokoagulačním a hyperkoagulačním za součinnosti mnoha systémů a struktur. Hemostatická rovnováha je výsledkem normální funkce cévní stěny, krevních destiček a plazmatických činitelů zahrnujících koagulační a fibrinolytický systém a jejich inhibitory. Narušení této rovnováhy se může projevit jako krvácivý nebo trombotický stav.

1.1.1 Krvácivé stavy

Krvácivé stavy jsou charakteristické spontánními krvácivými projevy nebo krvácením, které je neúměrné danému stavu. Ke krvácivému stavu dochází při porušení některého z mechanismů hemostatické rovnováhy. Krevní destičky hrají důležitou úlohu při tvorbě primární hemostatické zátky. Proto při sníženém počtu destiček nebo jejich funkční nedostatečnosti se mohou projevovat jako krvácivé stavy. Koagulopatie jsou krvácivé stavy způsobené sníženou koncentrací nebo sníženou aktivitou daného koagulačního faktoru (popřípadě celou řadou faktorů). Mají většinou klasický klinický obraz projevující se spontánním krvácením. Mírnější koagulopatie se projevují pouze při poranění nebo chirurgickém zákroku. Těžké projevy se objevují při poklesu aktivity koagulačního faktoru pod 5%. Z vrozených koagulopatií jsou nejčastější hemofilie, von Willebrandova choroba a autoimunitní koagulopatie.

Hemofilie A je způsobena nedostatkem nebo nedostatečnou funkčností F VIII. Při Hemofilii B jde o poruchu F IX. Obě tyto hemofilie jsou vázané na pohlavní chromosom X s recesivním typem dědičnosti. Hemofilie se léčí substituční metodou (nahrazení nedostatečného faktoru).

Von Willebrandova choroba je autozomálně dědičná (postihuje ovšem převážně ženy). Příčinou této nemoci je nedostatek nebo porucha von Willebrandova faktoru (vWF). Je narušena primární hemostáza a dochází ke snížení F VIII. Je důležité odlišit vWF chorobu od Hemofilie A pomocí agregace destiček (ristocetinem) a měření hladiny vWF. Pacientům s touto chorobou se podává koncentrát s obsahem vWF a léčí se klinické projevy krvácení.

Získané koagulopatie se vyznačují tím, že je snižená celá skupina koagulačních faktorů. Jsou častější než koagulopatie vrozené. Vhodná léčba je stavěna tak, že většinou stačí dosáhnout vymizení příznaků. Mezi získané koagulopatie můžeme zařadit poruchy resorpce a využití vitamínu K, cirkulující antikoagulans (CA) a konsumpční koagulopatie (DIC).

Poruchy resorpce a využití vitamínu K vedou k nedostatečné produkci vitamín K dependentních faktorů (F II, F VII, F IX, F X), které se tvoří v játrech. Při krvácení z příčiny nedostatku vitamínu K je nejvhodnější léčba úprava hladin faktorů transfúzními přípravky s podáváním vitamínu K.

Autoimunitní koagulopatie je onemocnění, při kterém někteří jedinci mohou tvořit protilátku proti některému z vlastních koagulačních faktorů. Jde většinou o látky proteinové povahy IgG. Inhibiční účinek může být namířen proti jakémukoliv faktoru. U této skupiny onemocnění není účinná žádná substituční léčba. Léčba je závislá na koncentraci inhibitoru. Při vysoké koncentraci se užívá plazmaferéza a imunosupresní terapie.

Diseminovaná intravaskulární koagulopatie (DIC) představuje poruchu, při které dochází na různých místech v organismu k významné aktivaci hemostázy s tvorbou vnitrocévních mikrotrombů, spotřebě koagulačních faktorů, aktivaci sekundární fibrinolýzy a tendenci ke krvácení. DIC se projevuje sníženou hladinou koagulačních faktorů, krevních destiček, zvýšenou hladinou trombinu, volného monomeru fibrinu a aktivací fibrinolýzy (vysoká hladina D-dimeru). Syndrom DIC je doprovodným jevem závažných onemocnění. Klinicky se většinou vyskytují těžké krvácivé nebo trombotické projevy, často současně. DIC můžeme rozdělit do 3 stádií: 1. hyperkoagulační, 2. hypokoagulační a 3. aktivace fibrinolýzy. U prvního a druhého stádia jsou měřitelné

hodnoty základního koagulačního screeningu (AT III, fibrinogen snížen; APTT prodloužen). Ve 3. stádiu již většinou není možné měřit hodnoty na analyzátoch. DIC může mít i akutní průběh a projevit se přímo jako krvácivý stav s téměř nesrážlivou krví. Celková léčba je volena podle daného stadia a individuálního stavu pacienta.

1.1.2 Trombotické stavy

Trombotické stavy jsou chorobné stavy, při kterých dochází k intravaskulárnímu srážení (trombózám). Jde vlastně o opak krvácivého stavu. Obecně jde o porušení cévní stěny, hemodynamiky, o poruchy destičkových funkcí, narušení koagulačního a fibrinolytického systému. Tyto stavy může doprovázet řada onemocnění zvláště cévního zaměření, jako jsou tromboembolické stavy (dojde k tvorbě trombu, který se uvolní a následně ucpe některou z cév). Většinou se jedná o infarkt myokardu, plicní embolii, náhlou cévní příhodu mozkovou nebo žilní trombózy končetin. Trombotické stavy můžeme rozdělit do dvou skupin: vrozené a získané.

Vrozené trombotické stavy jsou přesně definované a jejich klinický obraz je charakterizován především žilními trombózami v neobvyklých místech. Postižení bývají již lidé v mladém věku a bývá pozitivní rodinná anamnéza. Mezi rizikové faktory patří porucha v genu protrombinu (F II), defekt F V (faktor V Leiden), PC, PS, AT III, antifosfolipidový syndrom a abnormality fibrinolýzy (t-PA, PAI).

Získané trombotické stavy bývají komplexnějšího původu. Setkáváme se s nimi například u nefrotického syndromu, těhotenství a šestinedělí, zhoubných nádorových procesů, v pooperačním období, myeloproliferačním období. Komplikace trombotických stavů obvykle bývají v přítomnosti antifosfolipidových protilátek (APA). APA mají schopnost interferovat na různých místech se systémem krevního srážení. Zvyšuje se riziko opakovaných potratů u postižených žen a větší náchylnost k žilní a arteriální trombóze. Laboratorně se zjišťují jednotlivé hladiny inhibitorů koagulace, fibrinolýzy, aktivace krevních destiček a speciální testy. Léčba je individuální podle stavu pacienta a formy a druhu trombotického stavu. Nejčastěji se podávají celoživotně antikoagulancia (heparin, Warfarin) jako prevence. U lehčích forem se antikoagulancia podávají jen za rizikových situací (těhotenství, operace). Popřípadě se léčba doplňuje chybějícími faktory pomocí koncentrátů.

1.2 Léčba trombotických stavů

Antitrombotická léčba může být rozdělena na léčbu antikoagulační, trombolytickou a antiagregační. Je zaměřena na zamezení nadměrného shlukování krevních destiček, zabránění narůstání trombu, případně rozpuštění fibrinové složky a omezení činnosti koagulačního systému. Hemostáza se aktivuje v místě poškozené cévní stěny, jako je odtržený endotel nebo porušený cholesterolový plát. Vzniká tak nástěnný trombus, který ve velkých tepnách, kde je velký tok krve, vytváří tromby obsahující zagregované destičky s krystaly cholesterolu a ateromatózní drtí. Léčba se formuje jako antiagregační terapie. Ve stagnující krvi se rovněž může aktivovat hemostáza, ovšem léčba je mířená jako antikoagulační. Ve stagnující krvi je velké množství fibrinu a erytrocytů.

Kontrola terapie se provádí pomocí laboratorních testů, které by se měly pohybovat v referenčním rozmezí. Pokud by hodnoty byly příliš vysoké či nízké, nemocný by byl ohrožen krvácivými nebo tromboembolickými stavy.

Antikoagulační terapie zabraňuje tvorbě trombinu, který by následně dopomáhal tvorbě fibrinu (vznik trombu). Inhibuje také koagulační faktory. Léčba je prováděna pomocí heparinu nebo kumarinových přípravků. Heparin patří mezi nepřímá antikoagulantia a s AT III blokuje F X a F II. Používá se spíše při akutních stavech a léčbu je možné monitorovat pomocí APTT, speciálním testem na LMWH (nízkomolekulární heparin) a UFH (nefrakcionovaný heparin). Kumarinové přípravky působí na F II, F VII, F IX a F X (faktory závislé na vitamínu K). Léčba je stabilní až po několika dnech a kontrolu je možno provádět stanovením protrombinového času (PT). Mezi kumarinové přípravky můžeme zařadit například Warfarin s biologickým poločasem okolo 3 dnů.

Trombolytická terapie aktivuje fibrinolytický mechanismus, který je zaměřen na trombus v cévě. Jde o metodu neinvazivní na rozdíl od chirurgického zákroku trombotických ucpání cév. Terapie je směřována na zprůchodnění cévy a tím zlepšení cirkulačních pochodů v daném orgánu. Terapie se provádí pomocí trombolitik. Patří sem například streptokináza, urokináza, antistreptáza a tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA). Trombolytika jsou indikována při uzávěrech cév (infarkt myokardu - IM), plicní embolii a hluboké žilní trombose. Podávají se buď soustavně nebo jednorázově. Jednorázově se podávají u IM, a to co nejdříve při projevu potíží a nejpozději do 6 hodin. U dlouhodobé léčby je možná kontrola terapie pomocí trombinového testu.

Antiagregační terapie je založena na inhibici funkce krevních destiček (omezení agregability). Na krevních destičkách je mnoho míst, kde je možné působit a ovlivňovat tak jejich shlukování. Aktivace krevních destiček je složitý proces, který

zahrnuje interakci agonisty s membránovým receptorem, transport signálu přes membránu do nitra destičky a specifickou odpověď destičky. Extracelulární signály aktivace krevní destičky je možno rozdělit do tří skupin. Mezi silné agonisty patří trombin, kolagen, prostaglandiny, tromboxan a faktory ovlivňují destičky (PAF). Mezi slabé agonisty lze zařadit ADP, adrenalin a serotonin. Tito agonisté se projeví až po uvolnění obsahu destičkových granulí. Farmakologicky můžeme například omezit degranulaci ADP z denzních granul krevních destiček, narušit cyklus kyseliny arachidonové, provést blokadu aktivace krevní destičky pomocí kyseliny acetylsalicylové (ASA) nebo ticlopidinem inhibovat vazbu destiček navzájem pomocí fibrinogenu. Monitorování léčby se provádí agregačními testy, při kterých se zjišťuje inhibice destiček u jednotlivých podnětů (kolagen, ADP, epinefrin, ristocetin, kyselina arachidonová).

2. Metodika koagulace

2.1 Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém představuje skupinu dějů, které vedou ke vzniku zesíťovaného (nerozpustného) fibrinu. Jedná se o řadu enzymatických reakcí, při kterých dochází limitovanou proteolýzou ke štěpení proenzymů přítomných v krvi na aktivní enzymy. Podstatou tohoto systému je přeměna bílkoviny krevní plazmy fibrinogenu na fibrin, katalyzovaná trombinem. Tento systém se aktivuje stykem s tkáňovým faktorem nebo kontaktem se subendotelovými strukturami. V systému koagulace se uplatňuje kaskádovité zesílení, což znamená, že primární spouštěcí signál je mnohonásobně zesílen. Na každém stupni pak dochází ke zvýšení koncentrace meziproduktu. Fibrin vytváří vláknitou síť, ve které se zachycují krevní buňky a vytváří se stabilní fibrinová zátka. V poslední fázi dochází k retrakci okrajů rány a hojení, na čemž se podílejí krevní destičky.

2.2 Koagulační faktory

Většina faktorů je tvořena v játrech, u některých je zapotřebí k syntéze vitamín K (F II, FV, FX, FIX, protein C a S). Jedná se většinou o glykoproteiny charakteru proenzymů a kofaktorů, které se v plazmě nachází v neaktivní formě a v procesu srážení

prodělávají strukturální změny. Deficit, nízká hladina nebo nefunkčnost faktorů vede ke krvácivým projevům.

F I (Fibrinogen)

Je syntetizován v játrech a skládá se ze tří párů peptidových řetězců. Fibrinogen je substrátem pro trombin a plazmin, kromě toho může být štěpen i jinými trombinu podobnými enzymy. Minimální koncentrace pro homeostázu je 0,5 – 1,0 g/l. Fibrinogen patří mezi proteiny akutní fáze (PAF)

F II (Protrombin)

Je složený asi z 500 aminokyselin. Vzniká v játrech za přítomnosti vitamínu K.

F III (Tkáňový faktor, tkáňový tromboplastin)

Jde o extrakt z tkáně, nejvíce obsažený je v mozku, plicích a placentě. Jeho koagulační aktivita závisí na druhu tkáně. Jde o jednořetězový polypeptid a patří mezi membránové proteiny.

F IV (Kalcium)

Chlorid vápenatý je zásadní pro každou fázi hemostázy. Nejmenší nutné množství pro hemokoagulaci je 0,5 mmol/l.

F V (Proakcelerin)

Vzniká v játrech a velmi snadno se váže na povrch membrán.

F VI

Zahrnuje destičkový faktor 3 a 4.

F VII (Prokonvertin)

Je glykogen vznikající v játrech za přítomnosti vitamínu K. Jeho hlavní funkcí je přeměna F X na F Xa po exogenním podnětu.

F VIII (Antihemofilický faktor A)

Jde o glykoprotein, který je koagulačně neaktivní. Tento faktor má řadu stejných sekvencí jako F V. V plazmě se F VIII vyvazuje na velký glykoprotein tzv.

von Willebrandův faktor (vWF), který jej chrání před biologickým štěpením. Funkčně aktivní funguje jako proteinový kofaktor při tvorbě komplexu s F X. Jeho nedostatek nebo dysfunkce může vést k závažnému krvácivému defektu (hemo filie A).

F IX (Christmas faktor)

Je to glykoprotein vznikající v játrech za účasti vitamínu K. Při aktivaci se štěpí na 2 podjednotky.

F X (Stuart – Prower)

Je klíčovým faktorem koagulace, aktivuje se proteolytickým štěpením. Vzniká v játrech za přítomnosti vitamínu K.

F XI (Rosenthalův faktor)

Aktivuje se při kontaktní fázi plazmatického koagulačního procesu, jde o glykoprotein.

F XII (faktor Hageman)

Je to glykoprotein vznikající v játrech. K aktivaci dochází při poškození povrchu cévy. Za normálních fyziologických podmínek s cévní stěnou nereaguje.

F XIII (faktor stabilizující fibrin)

Tvoří se v krevních destičkách nebo játrech, jedná se glykoprotein.

2.3 Přeměna protrombinu na trombin

Tuto přeměnu můžeme podle dřívějších představ rozdělit do dvou cest.

Vnější cesta aktivace protrombinu probíhá při porušení celistvosti cév a úniku krve z nich, kdy dojde ke styku s TF. Při tvorbě protrombinového komplexu touto cestou neprobíhají žádná proteolytická štěpení, ale dochází ke změnám konformace molekul. Tento komplex protrombinu je velmi účinně vyvazován na receptorová místa membrány krevní destičky. Krevní destička má několik tisíc vazebných míst pro protrombinový komplex. Touto vazbou se přeměna na trombin urychlí až 300 000 krát. Smyslem této rychlé produkce trombinu je zajištění koagulace krve v místě poškození cév tak, aby koagulace neprobíhala dále po proudu krve.

Vnitřní cesta aktivace protrombinu nastává při kontaktu se subendoteliální strukturou. Sled dějů je zahájen aktivací F XII po jeho kontaktu s poškozeným cévním povrchem (kolagen; destičkový fosfolipid), popřípadě *in vitro* (sklo, kaolin, silica) ^(obr.2).

Podle novější teorie se tyto cesty spojují v jednu. Tkáňový faktor je nyní pojímán jako hlavní iniciátor aktivace koagulačního procesu *in vivo*. Krev přichází do styku s tkáňovým faktorem na povrchu endoteliálních buněk a monocytů po stimulaci Tumor Necrosis Factor (TNF) endotoxinem, nebo interleukinem 1 (IL 1). Není jasné, zda koagulace *in vivo* je iniciována nízkou proteolytickou aktivitou F VII nebo přítomností malého množství F VIIa. Vzniklý komplex TF+VII je následně nejspíše přeměněn na F Xa na komplex TF+VIIa. Tento komplex aktivuje F X a F IX. F Xa generuje malé množství F IIa (trombinu), který aktivuje F VIII a F V. Fosfolipidové komplexy těchto aktivovaných faktorů poté vytváří dostatečné množství trombinu, nezbytné k přeměně fibrinogenu na fibrin.

Trombin zvyšuje účinnost F V, F VIII, F X a aktivuje F XIII na F XIIIa, který ovlivňuje polymeraci fibrinu. Rovněž vyvolává nevratnou agregaci destiček ve fázi primární hemostázy. Aktivované destičky vytváří nejen hemostatickou zátku, ale současně poskytují reaktivní fosfolipidový povrch pro tvorbu koagulačně aktivních komplexů. U aktivovaných destiček je narušena asymetrie membránových fosfolipidů, což má za následek odhalení záporně nabitých fosfolipidů, které tvoří vnitřní dvojvrstvu membrány.

2.4 Přeměna fibrinogenu na fibrin

Vytvořený trombin vyvolává přeměnu fibrinogenu na fibrin, který působením F XIIIa dále polymerizuje na nerozpustný, zesíťovaný fibrin. Takto vytvořený fibrin je nerozpustný v roztoku močoviny a kyselině monochloroctové. Pokud vzniká bez přítomnosti F XIII a Ca^{2+} , je v těchto roztocích rozpustný. Při vzniku fibrinu dochází nejen ke vzniku trojrozměrné sítě, ale také se vytváří během polymerizace nové struktury, které mohou působit jako regulační místa pro některé mechanismy. Trombin štěpí fibrinogen na dva fibrinopeptidy A a B. Uvolněním těchto fibrinopeptidů vznikají monomery fibrinu. Fibrinopeptid B způsobuje vasokonstrikci (zúžení cév), což přispívá k zástavě krvácení.

2.5 Fibrinolytický systém

Lidská krev obsahuje enzymový systém schopný rozpouštět fibrinovou sraženinu. Za normálních fyziologických podmínek tento systém udržuje hemostatickou rovnováhu. Zvýšená činnost fibrinolytického systému může vést ke krvácivým stavům, naopak snížení funkčnosti tohoto systému vede k trombotickým stavům. Fibrinové koagulum omezuje krevní tok a mohlo by dojít k nekontrolovatelné reakci a k uzavření cévy. Fibrinolytický systém obsahuje několik složek. Jednou z nich je plazminogen, který je aktivován zároveň s koagulací. Další složkou je plazmin, proteolytický enzym, který kromě fibrinogenu (a jeho různých podob) štěpí i další složky koagulačního systému, jako jsou fibrinogen, F V a F VIII. Při štěpení se zesíťovaný fibrin štěpí na fragmenty X a Y, které se dále rozpadají na fragmenty nazývané D-dimery. Jejich stanovení je přímým důkazem stanovení štěpení zesíťovaného fibrinu.

Fibrinolýza zprůchodňuje cévy a uvádí je do původního stavu. Je aktivována při porušení endotelu. Přestože aktivace probíhá současně s agregací destiček, celková doba trvání je 48-72 hodin. Rozpuštění fibrinové zátky je záležitostí několika hodin. Za patologických stavů se může tento proces výrazně zkrátit až na několik minut.

Fibrinolýza je nepřetržitě probíhající proces s vyšší aktivitou během dne a při fyzické námaze a s nižší aktivitou během těhotenství. Tento děj má mnoho významů při léčbě, např. rekanalizace cév při trombotických stavech a léčba různých zánětlivých změn s tvorbou fibrinu. Fibrinolýza probíhá nejen v krvi, ale také v slzách, mateřském mléku, moči a jiných tělních tekutinách.

2.6 Inhibitory krevního srážení

Inhibitory krevního srážení jsou součástí a zároveň i základním regulačním mechanismem koagulace. Pokud by koagulace probíhala nekontrolovaně, tak by v krátké době došlo k masivnímu srážení krve, ucpání cév a následné smrti. Udržování hemokoagulační rovnováhy je základním principem koagulace. Jednou z nejvýznamnějších regulací jsou fyziologické inhibitory koagulačního a fibrinolytického systému. Inhibitory jsou přirozené složky krve a tlumí výše zmíněné mechanismy koagulace. Zabraňují nekontrolovatelnému srážení aktivními složkami procesu. Snížené hladiny inhibitorů (zvláště AT III, proteinu S a C) představují značné riziko vzniku trombózy. Inhibitory můžeme rozdělovat do dvou skupin na přirozené a získané.

Mezi přirozené inhibitory koagulačního systému můžeme např. zařadit: fibrin, antitrombin III (ATIII), heparin, protein C, protein S a α_2 -antiplazmin (inhibitor

fibrinolýzy). Trombin se tvoří po dobu koagulace v nadbytku, po ukončení srážení musí být trombin ihned inhibován, aby nedocházelo k dalšímu srážení krve. Všechny inhibitory plazmatického koagulačního systému jsou v plazmě a jejich specifita je nízká. Z inhibitorů krevního srážení se nejvíce uplatňují AT III a α_2 -makroglobulin. Oba jsou v plazmě obsaženy v relativně velké koncentraci. AT III s kofaktorem heparinu odpovídají za 80% inhibiční koagulační aktivity. Trombin je účinně vyvazován fibrinem, který jej adsorbuje na svém povrchu. Při fibrinolýze je vazba vyvázána heparinem a AT III.

Antitrombin III je α_2 -glykoprotein tvořený v játrech. Je jedním z nejdůležitějších fyziologických inhibitorů serinových proteáz (serpinů), které mají centrální úlohu při regulaci hemostatické rovnováhy. AT III vyvazuje trombin a jiné sérové proteinázy v poměru 1:1 za vzniku nevratného komplexu. Antitrombin má opožděný účinek (asi 15-30 minut), rychlost inhibičního komplexu může být urychlena navázáním heparinu nebo proteoglykanů z endoteliálních buněk. AT III inhibuje kromě trombinu (F IIa) a F Xa také jiné složky koagulačního systému (F XIIa, F XIa, F IXa, F VIIIa). Vyskytuje se nejen v plazmě, ale také v pleurální a peritoneální zánětlivé tekutině. V moči se téměř nevyskytuje (3 μ g/den).

Samotný *heparin* reaguje až po navázání na AT III, s kterým vytváří dimerní komplex, který pak účinně vyvazuje trombin. Heparin jako směs mukopolysacharidů má odlišnou afinitu k AT III. Svými náboji pomáhá vytvořit matrix, která vytváří snadněji komplex AT III*heparin a usnadňuje vazbu na trombin. Z komerčně vyráběných heparinů se váží jen ty hepariny, které mají strukturu pentasacharidů.

Systém proteinu C je tvořen proteinem C, proteinem S a trombomodulinem. Tento systém může inhibovat F Va a F VIIIa.

Protein C je klíčovou složkou koagulace, která je aktivována na povrchu endoteliálních buněk trombinem navázaným k trombomodulinu. Jde o glykoprotein vznikající v játrech za účasti vitamínu K. Tento glykoprotein se může dělit na dvě části, z nichž jedna je vázaná na protein S. Aktivovat protein C je možné několika způsoby. Jedním z nich je působením trypsinu. Nejúčinnější aktivace je vyvolávána *in vivo* na povrchu cévních endotelií, kde je navázán specifický endoteliální receptor trombinu trombomodulin. Vazba přes tento receptor je mnohonásobně rychlejší než se samotným trombinem. Trombomodulin vzniká v endotelu buněk a z nich je uvolňován do krevního oběhu nebo se váže na specifické receptory a stává se součástí membrány. Aktivovaná forma proteinu C (APC) se na rozdíl od účinku AT III štěpí proteolyticky a tím inaktivuje na membráně navázané plazmatické

faktory neenzymového původu (F Va a F VIIIa). To vede k potlačení aktivovaného koagulačního procesu.

Protein S váže protein C k fosfolipidovým povrchům, jako jsou membrány krevní destičky nebo poškozených endotelií. Aktivovaný protein C má profibrinolytickou aktivitu (zvyšuje uvolňování aktivátoru plazminogenu).

2.7 Inhibitory fibrinolýzy

Inhibitory fibrinolýzy tlumí fibrinolytickou aktivitu a zabraňují jejímu šíření po okolí. α_2 -antiplazmin je jedním z nejdůležitějších inhibitorů fibrinolýzy. Jde o glykoprotein serinového typu a s plazminem tvoří komplex 1:1. Antiplazmin je v plazmě v nadbytku a okamžitě velmi účinně vyvazuje veškerý volný plazmin. Pokud je plazmin vázán na fibrin, není možné, aby tuto vazbu antiplazmin inhiboval.

Mezi *inhibitory fibrinolýzy* můžeme zařadit nespecifické inhibitory: α_2 -makroglobulin, α_1 -antitrypsin a C1 inhibitor. Obecně můžeme říct, že jde o inhibitory proteáz, jejichž účinek přesahuje rámec koagulačních a fibrinolytických pochodů, kde se také mohou uplatňovat.

Získané inhibitory jsou patologickým nálezem a nevhodně ovlivňují koagulaci. Ze získaných inhibitorů hrají nejvýznamnější úlohu nespecifické antifosfolipidové protilátky (APA). APA jsou heterogenní protilátky namířené proti negativně nabitým fosfolipidům s makromolekulární látkou bílkovinné povahy. Můžeme sem zařadit lupus antikoagulans (LA) nebo antikardiolipidové protilátky (ACA). LA jsou protilátky namířené proti fosfolipidovým složkám protrombinového komplexu koagulační kaskády. LA může způsobit abnormální nález u APTT.

3. Koagulační stanovení jednotlivých metod

Všechna měření, která byla v této práci použita, byla prováděna na dvou typech analyzátorů – rutinně používaný analyzátor BCS XP firmy Dade Behring Marburg GmbH a nově zaváděný analyzátor Ceveron Alpha firmy Technoclone GmbH, Vienna.

Pro koagulační vyšetření se používá citrátová plazma. Odběr venózní krve se provádí do 0,129 mol/l citrátu sodného v poměru 1:10. Následuje centrifugace 15 minut při 3 000 ot./minutu (minimálně 1500xg). Plazma by měla být zpracovávána do 2 hodin po odběru. V případě doby prodlení je plazma mražena a zůstává stabilní při -18°C po dobu

jednoho měsíce. Při delším skladování se vzorky hluboce mrazí při -80°C , stabilita je až několik měsíců.

3.1 Analyzátor BCS XP

BCS XP (Behring Coagulation System) je automatický analyzátor, který provádí kvantitativní testy specifických parametrů v plazmě. Jde o vysokokapacitní (až 350 testů/hod.) koagulometr s možností měření rozptylu světla (turbidimetrie), chromogenních, imunologických a aglutinačních stanovení. Využívá se hlavně v laboratořích s velkým množstvím normálních i patologických vzorků, rutinních, speciálních a statimových testů. Ochrana vzorků proti záměně je zajištěna pomocí automatického čtení čárového kódu (barkódu) umožňujícího pozitivní identifikaci vzorků a reagensů. Otevřený systém umožňuje validaci procedur. Vzorky, reagensie nebo rotory mohou být vkládány kdykoli dle potřeby. Maximální počet vzorků je 100 kusů. Vzorky mohou být vkládány v různých druzích zkumavek (odběrové, eppendorf a další). Analyzátor obsahuje několik následujících funkcí: pomocí dvou pipetorů zajišťuje pipetování všech nezbytných reagensů a vzorků; chlazení reagensů v zabudovaném chladicím boxu; měření v rotorových kyvetách různými vyhodnocovacími metodami a v několika modech (fixed-time, fixed-absorbance a kinetic); inkubace také v kyvetách; kalkulace a vyhodnocení měřených výsledků; automatické odesílání platných výsledků do připojeného počítače (popřípadě systému); správu referenčních křivek a šarží pro jednotlivé reagensie. Celý systém obsahuje dvě jednotky. Jedním je samostatný analyzátor, který načítá vzorky a reagensie, provádí ředění vzorků, kalibrace a měření testů. Druhou částí je počítač umožňující zadávat data, vybírat z programu menu, načítat a ukládat šarže, vypočítávat referenční křivky a výsledky testů a v neposlední řadě komunikovat s LIS (laboratorním informačním systémem).

Měření koagulačního času je hodnota měřená v okamžiku vzniku fibrinové sraženiny (fibrinového vlákna) nebo čas do koncového bodu jiné reakce. Měřený čas je doba od smíchání reagensie se vzorkem. Vznik fibrinu (sraženiny) snižuje prostupnost světla, stoupá zákal ve vzorku.

Imunochemické metody jsou určeny pro měření koncentrace proteinů. Vzorek reaguje s protilátkami, které např. mají latexové částice. Takto formovaný celek vede ke

změně zákalu a jedná se o rychlost této změny, která je měřena. Tato metoda vylučuje možnost chyb v měření způsobených nadbytkem antigenů.

Chromogenní metody využívají barevné reakce p-nitroanilinu, intenzita zabarvení je proměřována a vyhodnocena na základě kalibračních křivek.

3.1.1 Protrombinový, tromboplastinový čas (PT; QUICK,) - Thromborel S

PT slouží jako citlivý a rychlý screeningový test ve vnější části koagulačního systému, zejména při poruchách F II, FV, FVII, FX. S deficitní plazmou může také sloužit pro zjištění aktivity těchto faktorů.

Při inkubaci plazmy s daným množstvím tromboplastinu a kalcia je vyvolána koagulace, při které se měří čas do vzniku fibrinového vlákna. U vybraných fotometrických přístrojů lze podle nárůstu zákalu po uplynulé koagulaci vypočítat hodnotu fibrinogenu (derivovaný fibrinogen).

Test se provádí při 37°C, kdy se 1 díl (100 µl) citrátové plazmy smíchá s 2 díly (200 µl) tromboplastinu (směs tkáňového tromboplastinu s 0,025 mol/l chloridem sodným) a začíná se měřit čas. Výsledek měření se udává v sekundách, v % normy, v protrombin ratio (PR) nebo International Normalised Ration (INR). $PR = \text{reakční doba vzorku} / \text{reakční doba normální plazmy}$. $INR = PR^{ISI}$ (ISI= International Sensitivity Index). Normální hodnoty se pohybují v rozmezí 0,8 – 1,2 INR; 70 – 130 % normy. Test je využíván jako terapeutická kontrola při podávání warfarinu nebo podobného léčebnému přípravku (kumarinu). Terapeutické hodnoty by měly odpovídat rozsahu 2,0 – 3,0 INR u hluboké venózní trombózy, plicní embolie a arteriálního onemocnění. Dosažení hodnoty INR 3,0 – 4,5 by mělo být u umělé srdeční chlopně.

3.1.2 Aktivovaný parciální trombínový čas (APTT) - Pathromtin SL

APTT podává informace o funkčnosti vnitřní části koagulační kaskády, zejména citlivě zachycuje poruchy F VIII, F IX a kontaktní faktory. Ve spojení s deficitními plazmami je APTT reagentie určena pro stanovení jednotlivých faktorů endogenního systému, pro diagnosu hemofilie a pro odhalení trombofilie z důvodu zvýšené hladiny např. faktoru VIII. Kromě toho může být použit pro sledování heparinové terapie. Spouštěcím aktivátorem je kaolin, který zastupuje záporně nabitý povrch poraněné cévy. Pro některé reakce je nutná přítomnost destičkového faktoru 3 (PF3), který se uvolňuje z aktivovaných krevních destiček. U testu APTT je vyšetřovaná plazma chudá na destičky,

a proto je třeba fosfolipidy dodat použitím tkáňového fosfolipidu kefalínu (Parciální Tromboplastin). Výsledná hodnota testu APTT udává čas (sekundy), který uplyne od spuštění koagulační kaskády vápenatými ionty do vytvoření fibrinové sraženiny. Prodloužení APTT může být způsobeno například nedostatkem faktorů vnitřní části kaskády (FVIII a FIX), terapií heparinem či předávkováním warfarinem. Test se provádí při teplotě 37°C, kdy 1 díl (100 µl) plazmy se smísí s 1 dílem (100 µl) kefalín-kaolinové směsi. Tento komplex je dále inkubován 180 sekund, a poté je přidán 1 díl (100 µl) chloridu vápenatého o koncentraci 25 mmol. Po přidání vápenatých iontů se spustí stopky a měří se čas do vytvoření fibrinového vlákna. Normální hodnoty se pohybují mezi 25 – 40 sekundami, záleží ovšem na laboratoři a použitých reagentech. Tato doba se označuje jako aktivovaný parciální tromboplastinový čas.

3.1.3 Trombinový čas (TT) - *Thromboclotin, 5 NIH*

TT je používán pro sledování inhibice koagulace při heparinizaci a pro kontrolu fibrinolytického účinku při streptokinázové terapii. Mimo jiné je i jedním z nejdůležitějších testů pro rozlišení patologických nálezů.

Test je založen na přidání určitého množství trombinu o určité koncentraci k citrátové plazmě. Čas do vzniku fibrinového vlákna je závislý na množství a kvalitě fibrinogenu. Výsledný čas také mohou ovlivňovat inhibitory. Poruchy fáze koagulace Trombin → Fibrinogen ⇒ Fibrin se vyskytují při inhibici účinku trombinu, jako je zvýšená aktivita AT u heparinizace, při snížené koncentraci fibrinogenu pod 1,0 g/l nebo při poruše polymerace fibrinu. Čím je koncentrace trombinu nižší, tím lze lépe zachytit poruchy konečné fáze koagulace. Vyšetření se provádí při 37°C, kdy se 1 díl (100 µl) plazmy nechá inkubovat 1 minutu a poté se přidá 1 díl (100 µl) roztoku trombinu (stabilizovaný hovězí trombin s Ca²⁺ ionty). Po přidání se ihned měří čas. Normální čas se pohybuje v rozmezí 12-18 sekund.

3.1.4 Antitrombin III (AT III) - *Berichrom AT*

Antitrombin III je plazmatický inhibitor trombinu, aktivuje F X a tvoří s ním irreverzibilně inaktivní komplex. Inaktivace koagulačních faktorů je výrazně urychlována heparinem. Stanovení fyziologického AT III nám umožňuje diagnostikovat vrozený nebo získaný deficit AT III. Deficit souvisí s vrozeným nebezpečím vzniku trombóz.

V testu se AT III ve vzorku naváže na známé množství trombinu za přítomnosti heparinu a přebytečné množství trombinu vytvoří se substrátem p-nitroanilinem zbarvení, které

měříme při 405 nm. Při měření ředíme plazmu roztokem PBS v poměru 1:3 (50 µl). Ředěná plazma se smísí s trombinem a inkubuje se 3 minuty při laboratorní teplotě. Poté se přidá substrát a ihned se začne měřit extinkce. Výsledek je uváděn v % a výpočet se provádí automaticky na základě kalibrační křivky. Normální hodnoty jsou v rozmezí 70 – 140 %.

3.1.5 D-Dimer, MediRox

D-dimer je významný plazmatický protein, který je během fibrinolytického procesu uvolňován do cirkulující krve. Proteolytická degradace zesíťovaného fibrinu plazminem představuje ochranný mechanismus namířený proti trombóze tím, že obnovuje průtok krve v žilách po odstranění usazenin fibrinu. Po aktivaci fibrinolytického systému se zesíťovaný fibrin štěpí aktivní proteázou plazminem na fragmenty D a E. Nejmenší jednotkou příčného zesíťení mezi D-doménami je D-dimer, jehož přítomnost ukazuje na reaktivní fibrinolýzu. Zvýšené koncentrace D-dimerů ukazují na přítomnost krevní sraženiny a byly popsány u hluboké žilní trombózy v končetinách, DIC a embolie. D-dimer slouží jako marker trombofilních stavů. Jeho hladina odráží aktuální aktivaci systému *in vivo* a není produkována *in vitro*. Tento test se je založen na reakci polystyrenové částice, na které je navázaná monoklonální protilátka proti příčně zesíťeným D-dimerům. Zóna příčného zesíťení je zrcadlově symetrická, tj. epitop pro monoklonální protilátku je přítomen dvakrát. Proto stačí jedna protilátka k vyvolání aglutinační reakce, která je detekována nárůstem turbidity.

D-Dimer MediRox je latexově zesílený turbidimetrický test pro kvantitativní stanovení příčně zesíťeného D-dimeru. Test zahrnuje několik reagensů, latexové reagens obsahuje polystyrenové částice, monoklonální myši protilátky, lidský sérový albumin, triclin (0,02 mol/l), sacharózu a konzervační prostředek azid sodný. Kapalné ředící medium obsahuje fyziologicky pufovaný roztok. Test je prováděn na koagulačním analyzátoru automaticky. Koncentrace D-dimeru v µg/l je automaticky vyhodnocena z kalibrační křivky. Celkový rozsah měření od 25 do 6400 µg/l. Tento rozsah se docílí dvěma metodami, které musí být odděleně kalibrovány (D-dimer low: 50 – 800 µg/l, D-dimer high: 600 – 6500 µg/l). Pokud koncentrace leží nad měřicím rozsahem, lze vzorek ředit fyziologickým roztokem.

3.1.6 Fibrinogen, Technoclone

Fibrinogen je bílkovina krevní plazmy, která se podílí na srážení krve. Je složená z dimeru, jehož podjednotky se skládají z peptidových řetězců. Účinkem thrombinu se

fibrinogen štěpí na monomer a ten pak dále za přispění F XIII na nerozpustný fibrin. Stanovení fibrinogenu se provádí metodou dle Clause (u BCS XP modifikovanou metodou dle Clause).

Metoda dle Clause založena na velkém přebytku trombinu, který vyvolá koagulaci citrátové plazmy. Koagulační čas zde závisí na obsahu fibrinogenu ve vzorku. Metoda se provádí s vytemperovaným vzorkem i reagensy na 37°C. Vzorek ředíme v poměru 1:10 roztokem NaCl (0,154 mol/l). Směs ředěného vzorku a pufru se inkubuje se 60 sekund při 37°C, poté se přidá díl trombinového reagentu a hned se stanoví koagulační čas. Koncentraci odečteme z kalibrační křivky.

Kalibrační křivka se sestojí pomocí řady kalibrátorů ředěných v poměru 1:10; 1:20; 1:40 a 1:80 roztokem NaCl. Jako bod nula se používá roztok NaCl. Proměří se hodnoty stejně jako u vzorku. Výsledkem je kalibrační graf. Referenční hodnoty se pohybují v rozmezí 2,00 – 4,00 g/l. Každá laboratoř má vlastní přesně dané referenční hodnoty.

Modifikovaná metoda dle Clause je založena na stejném principu, jen místo jednoho kalibrátoru jsou použity plazmy s přesně danými hodnotami. Očekávané hodnoty u této metody jsou 1,8 – 3,5 g/l. Rozsah měření se pohybuje mezi 0,8 - 12 g/l. Přesnost je testována pomocí normální a patologické plazmy. Variační koeficienty v sérii jsou 2,9 % u normální plazmy a 7,2 % u patologické plazmy.

Snížení fibrinogenu může nastat při intravaskulární proteolýze fibrinogenu trombinem (spotřební koagulopatie), při uštknutí jedovatým hadem, při onemocnění jater (snížená produkce), při akutním krvácení či při zvýšeném odbourávání fibrinogenu.

Přechodně zvýšené hodnoty fibrinogenu se mohou vyskytovat u zánětů, fibrinogen chová jako protein akutní fáze (PAF). Dále se přechodně hypofibrinogenemie mohou vyskytovat po operacích, úrazech, srdečním infarktu a infekcích. Se vzrůstajícím věkem bývá pozorována stoupající koncentrace fibrinogenu. Zvýšená koncentrace fibrinogenu je rizikovým faktorem pro kardiovaskulární choroby.

3.1.7 Faktor VIII, DG-FVIII

Faktor VIII je kofaktorem při aktivaci koagulačního faktoru X na faktor Xa. Vzorky plazmy se závažným nedostatkem faktoru VIII vykazují výrazně prodloužený aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT). Je-li plazma pacienta smíchána s plazmou se známým nedostatkem faktoru VIII (vrozeným nebo sníženým imunologickou cestou), bude míra upravení APTT proporcionálně odpovídat hladině faktoru VIII v plazmě pacienta. Reagencie obsahuje mrazem lyofilizovanou lidskou plazmu, u níž bylo

imunoadsorpcí na koloně s imobilizovanou polyklonální IgG protilátkou kozího původu specifickou pro lidský faktor VIII dosaženo odstranění faktoru VIII (faktoru VIIIc a faktoru VIII-vWF). Aktivita faktoru VIII činí méně než 1% normální úrovně, zatímco aktivita ostatních koagulačních faktorů se pohybuje v normálním rozmezí. Vzhledem k nestálosti reagensie je nutné ji připravit až před samotným měřením rozpuštěním v 1 ml vody určené pro přípravu reagensií. Po dosažení úplného rozpuštění se roztok ponechá stát 20 minut při pokojové teplotě. Poté se plazma skladuje v plastové zkumavce až do okamžiku použití při teplotě 2-8 °C. Rozpuštěná reagensie je stabilní osm hodin za předpokladu, že je skladována za daných podmínek při teplotě 2-8 °C.

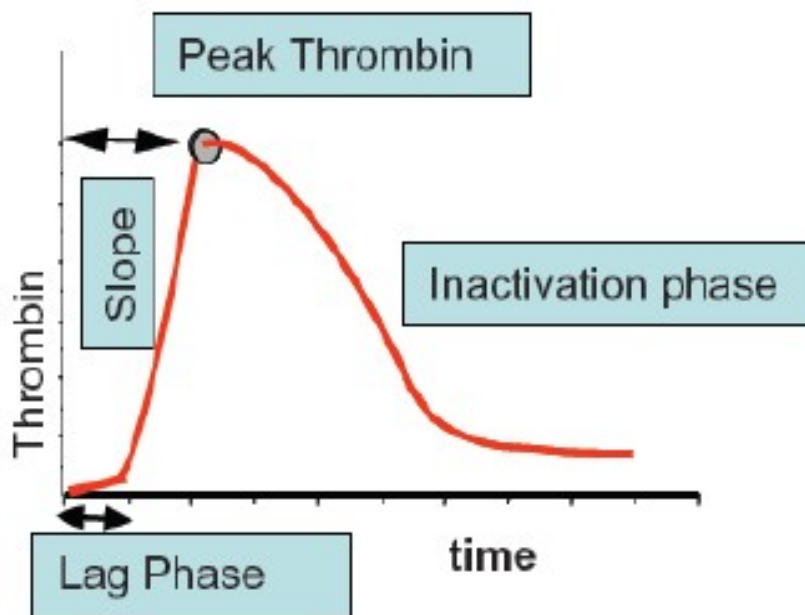
3.2 Analyzátor Ceveron Alpha

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

Trombin je aktivní forma protrombinu, která má enzymatické i neenzymatické funkce. V koagulaci hraje klíčovou roli, ve svých mnoha funkcích působí dle potřeby jak prokoagulačně, tak antikoagulačně. Proto je sledování generace trombinu v čase díky nové metodice "Trombin generační test - TGA" vynikajícím nástrojem k získání celkového obrazu o hemostáze. Tento systém se tak svou technikou měření přibližuje situaci „in vivo“. Princip metody je založen na měření fluorescence produktu aminomethylkumadinu, který vzniká přeměnou fluorogenního substrátu působením trombinu. Fluorescenci vyvolává dopadající monochromtické záření o vlnové délce 360 nm, které vyvolá emisi záření o vlnové délce 460 nm, která je snímána detektory. Fluorogenní signál není úměrný aktivitě trombinu (závisí na spoustě faktorů jako je např. barva plazmy, se snižující se koncentrací substrátu klesá rychlost jeho přeměny, apod.), proto je nutné při měření používat trombinový kalibrátor, což je modifikovaný trombin schopný přeměňovat fluorogenní substrát. Tento modifikovaný trombin se neúčastní koagulační kaskády a není inhibován plazmatickými inhibitory. Výstupem tohoto testu je trombogram, který popisuje koncentraci trombinu v čase ve srážející se plazmě a je tedy obecným funkčním testem tromboticko-hemostatického systému (viz obrázek č. 1). TGA je schopný detekovat jak trombofilní, tak krvácivé stavy a může být využit k měření jakýchkoliv genetických nebo

získaných nemocí (např. deficit antitrombinu), ke sledování léčby hemofilie (léčba FVIII, FIX nebo rFVIIa), sledování léčby tromboembolických nemocí (léčba kumariny, hepariny), případně k získání celkového obrazu trombotické tendence u pacientů se zvýšeným rizikem trombózy nebo krvácení.

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



3.2.1 Měřené parametry

Lag phase (= **t lag**) - Čas do začátku generace trombinu (min)

Time to Peak (= **t Peak**) - Čas dosažení maximální formace trombinu (min)

Peak (= **Peak trombin**) - Maximální koncentrace formace trombinu (nM)

Slope (= **VI**) - Rychlost formace trombinu za minutu

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

AUC = ETP (Endogenní trombinový potenciál)

4. Vlastní měření

- 4.1 Pro srovnání analyzátorů byla vybrána skupina 60-ti zdravých osob o různém věku, ve složení 30 mužů a 30 žen, jako vzorek populace.
- 4.2 Jako druhý soubor pro srovnání byly použity výsledky TGT hodnot ze souboru 12-ti pacientů s vysokou hladinou F VIII a nízkým APTT.
- 4.3 Pro porovnání byl vybrán ještě soubor 5-ti pacientů s perorální antikoagulační léčbou (Warfarin).

„Všechny hodnoty naměřené při této studii jsou uvedeny v příloze.“

5. Vyhodnocení:

Výsledky studie: Počet stanovení 360, byly stanoveny parametry generace trombinu pro reagentie TGA RB (nízký obsah TF a PL) : Lag time (min) průměr 7,7, medián 7,6; Peak Trombin (nM) průměr 186,8, medián 181,4; AUC průměr 1848,6, medián 1878,2; TGA RC Low (nízký obsah PL a vyšší obsah TF) : Lag time (min) průměr 3,5; medián 3,4; Peak Trombin (nM) průměr 188,5; medián 174,6; AUC průměr 1931,5, medián 1876,9; TGA RC High (vysoký obsah PL a vyšší obsah TF) : Lag time (min) průměr 8,7; medián 8,5, Peak Trombin (nM) průměr 408,4; medián 387,1; AUC průměr 2273,4; medián 2246,6.

Při sledování generace trombinu bylo dosaženo hodnot, které dobře korelují s běžně prováděnými koagulačními testy. Jedná se o základní koagulační vyšetření, která jsem měřil na koagulačním analyzátoru BCS XP a která jsou velmi důležitá pro základní trombofilní screening. U vyšetření TGT se jedná především o lag time generace trombinu, Peak = maximální koncentrace trombinu a celkové množství generovaného trombinu pomocí integrace plochy pod křivkou. Při zpracování těchto dat jsem používal program Microsoft Excel, jehož statistické funkce splňují dostatečně požadavky na zpracování tohoto typu dat a zároveň nebylo nutné používat složitější systém, protože všechny výsledky byly velmi podobné výsledkům podobných studií (ty jsou taktéž uvedeny v použité literatuře).

Z výsledků kontroní skupiny pacientů s vysokým F VIII a nízkým APTT, které byly vyšetřeny na analyzátoru BCS XP, je jasně patrné, jak právě při této zvýšené koagulaci u této skupiny dochází k několikanásobnému zvýšení generace trombinu zaznamenané vyšetřením plazmy na analyzátoru Ceveron Alfa.

Naprosto odlišná je situace u skupiny pacientů užívajících antikoagulační terapii (Warfarin), u které došlo vlivem této léčby k úpravě generace trombinu k normálním, eventuelně i nižším hodnotám ve srovnání ke zdravé populaci.

Výsledkem studie je ověření, že reagentii TGA RC low je vhodné používat u trombofilie (např. vysoké hladiny faktoru VIII) a reagentie TGA RC high pro monitorování antikoagulační terapie.

Výsledky jsou vztaženy k normálním hodnotám získaným v dané laboratoři na jednom konkrétním analyzátoru. Pro porovnání s výsledky získanými v jiných laboratořích by bylo zapotřebí jednotlivé parametry TGT standardizovat.

6. Závěr:

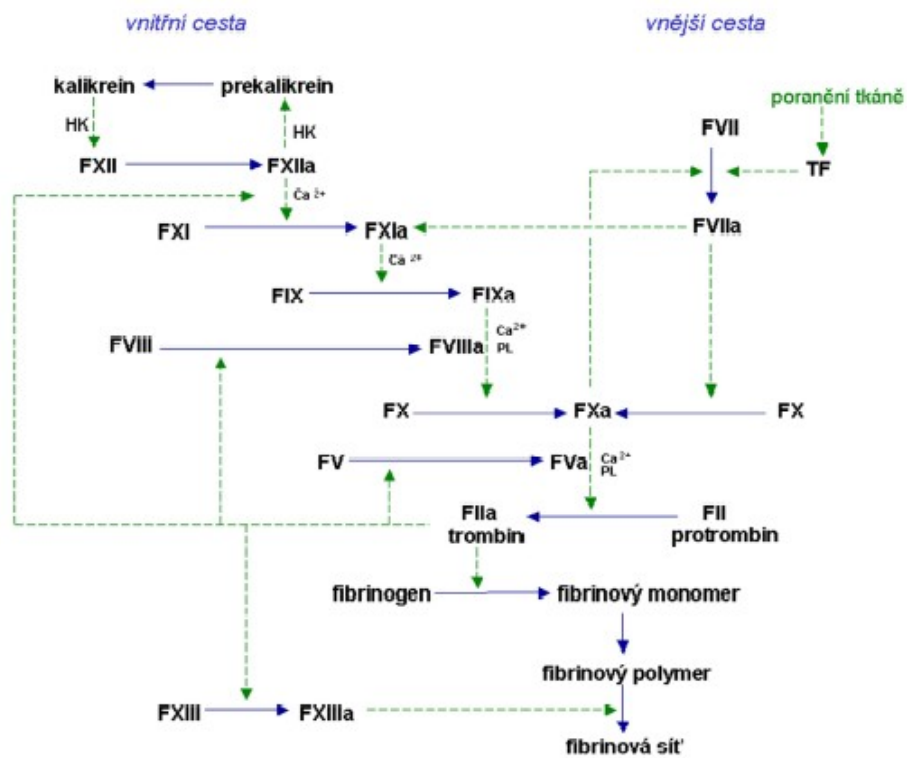
Trombin generační čas je možné poměrně jednoduše a spolehlivě monitorovat a sledování generace trombinu by mělo podat celkový obraz hemostatického systému a tím doplnit běžně prováděná koagulační vyšetření. Hemostatický systém je potřeba hodnotit komplexně a při jakékoliv patologii v získaných vyšetřeních je potřeba dalšího upřesňujícího laboratorního vyšetření, které by dokonale popsalo o jakou poruchu koagulace se jedná, aby mohla být lékařem zvolena adekvátní léčba. Zároveň je nutné mít vyšetřenou skupinu zdravých jedinců, aby bylo možné pro parametry koagulace stanovit normální rozmezí.

7.Literatura:

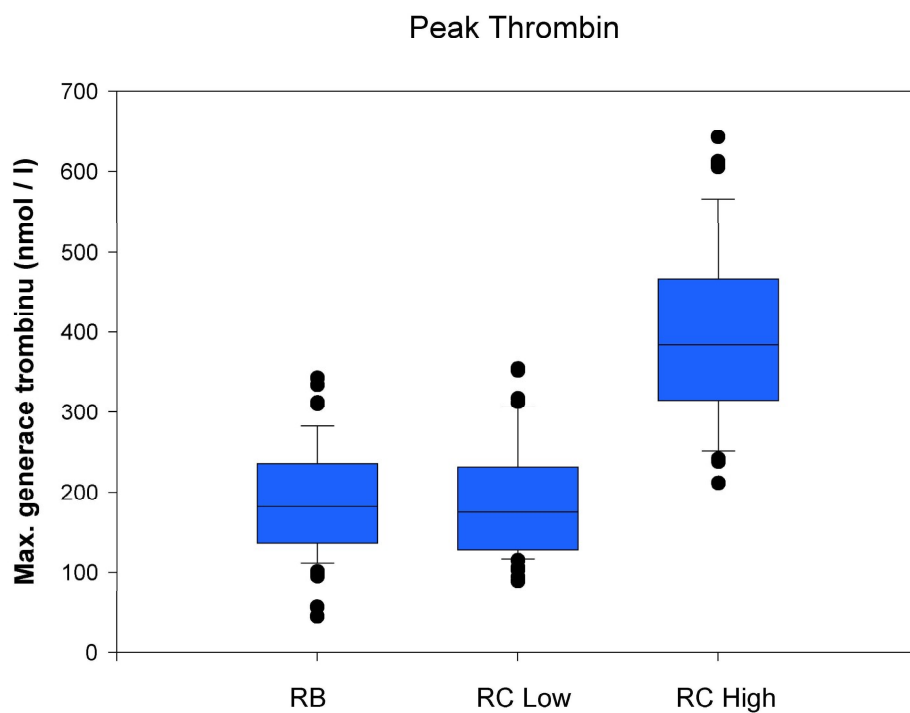
- 1) KVASNIČKA J., *Žilní a tepenná trombofilie*, I. interní klinika, Oddělení klinické hematologie a Trombotické centrum Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Interv. Akut. Kardiol. 2: 23-29, 2003.
- 2) KRČOVÁ V. a kol., *Komplikace dlouhodobé léčby heparinem v těhotenství*. Hemato-onkologická klinika FNO; porodnicko-gynekologická klinika FNO; II.interní klinika FNO, 2003.
- 3) PŘEROVSKÝ I., *Prevence a terapie akutní žilní trombózy*, IKEM, Zdroj: Lékařské listy, 2004.
- 4) PECKA M. a kol., *Přehled laboratorní hematologie III.*. Galén, Hradec Králové, 1998.
- 5) ALVING B.M., *The hypercoagulable states*, Hosp. Pract., 28, 1993.
- 6) STEFANO V. DE, FINAZZI G., MANNUCCI P. M., *Inherited thrombophilia: Pathogenesis, clinical syndromes and management*, Blood, 87, 1996.
- 7) DADE BEHRING MARBURG GMBH, *Multifibren® U*,
COOPER J. & DOUGLAS A. S., *Fibrinogen Level as a Predictor of Mortality in Survivors of Myocardial Infarction*. Fibrinolysis 5, 1991.
COOK N. S. & UBBEN D., *Fibrinogen as a Major Risk Factor in Cardiovascular Disease.*, TIPS 11, 1991.
U.S. Department of Health and Human Services CDC, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication (CDC) 93_8395; 1999.
DEMPFLE C.E., KELLER A., KIRCHNER A., HEENE D.L., *Thromb. Haemost.* 80: 716-717; *The Influence of Hirudin on Plasma Fibrinogen Assays*. *Haemost.* 80, 1998.
THOMAS L., *Clinical and Laboratory Diagnostics*, 5th edition/TH Books, Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, Germany, 1998.
- 8) www.technoclone.com
- 9) Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test predicts for venous thrombosis in men and women Tans G. et al., *British Journal of Haematology*, 2003, 122, 465-470

8. Přílohy:

Obr. č.2: Schéma koagulační kaskády



Graf č.1: Vyhodnocení generace trombinu u souboru zdravých dárců



Tabulka č.1: Naměřené hodnoty koagulace na BCS XP

ID	PT (INR)	APTT (s)	TT (s)	Fbg (g/l)	AT III (%)	D-dimer (ug/l)
1	1,0	42,0	13,9	2,3	112	396
2	0,9	32,0	11,4	4,3	111	141
3	1,1	30,4	12,0	3,3	70	268
4	0,9	27,4	14,5	3,9	121	245
5	1,0	29,5	13,7	3,1	108	159
6	1,0	31,9	14,6	3,2	92	179
7	0,9	26,7	12,7	2,5	99	87
8	1,1	38,0	15,3	3,4	85	334
9	1,0	30,5	13,9	4,1	102	126
10	1,1	37,4	14,2	2,2	87	242
11	0,9	29,6	11,3	4,7	90	148
12	1,0	31,2	12,4	2,5	113	180
13	1,0	36,1	12,1	3,2	87	223
14	1,0	26,7	13,3	2,6	120	111
15	1,1	33,9	14,4	2,2	94	142
16	0,9	37,7	16,4	3,8	112	99
17	1,0	33,9	13,5	4,2	90	218
18	1,0	31,9	13,8	2,3	91	539
19	1,1	36,0	11,9	3,0	83	416
20	1,0	34,6	12,9	2,7	104	409
21	1,2	38,3	12,3	2,5	112	489
22	1,0	45,8	13,8	3,4	98	118
23	1,0	34,6	12,6	3,6	110	110
24	0,9	31,2	12,6	2,9	116	129
25	1,1	35,4	13,8	3,5	88	131
26	0,9	30,4	13,2	3,9	115	91
27	1,0	28,7	12,7	2,9	100	208
28	1,0	36,9	16,3	3,9	103	248
29	1,0	34,1	14,9	3,9	98	118
30	1,2	42,9	13,7	3,2	87	167
31	1,0	32,3	14,5	2,8	103	165
32	1,0	28,7	13,6	2,5	106	144
33	0,9	25,9	13,2	3,7	101	228
34	0,9	31,4	14,5	3,4	106	137
35	1,1	30,4	12,6	3,4	106	211
36	0,9	29,7	13,0	3,1	81	301
37	1,0	28,7	12,2	3,5	81	203
38	1,0	26,4	11,3	3,2	115	373
39	1,0	25,7	12,7	3,4	116	312
40	1,0	27,2	13,1	3,3	107	587
41	0,9	28,7	12,7	2,9	91	178
42	0,9	26,9	13,5	2,9	96	194
43	1,0	26,1	13,5	2,9	90	208
44	1,0	30,0	13,9	2,9	87	238
45	1,2	37,8	13,3	2,3	80	162
46	1,0	30,3	12,8	3,0	94	276
47	1,0	30,9	13,1	2,3	85	156
48	0,9	26,4	14,2	3,2	89	105
49	1,0	29,0	14,2	2,0	85	139
50	1,1	30,1	11,7	2,7	117	289
51	1,1	28,6	13,8	2,6	115	575
52	1,0	31,6	11,0	2,6	108	156
53	1,0	27,4	12,5	3,1	102	400
54	1,0	34,1	11,7	2,9	84	258
55	1,2	28,8	13,8	2,4	87	227
56	0,9	32,6	12,3	2,4	93	382
57	1,0	34,2	14,9	3,2	102	75
58	1,0	35,2	16,1	3,7	112	196
59	0,9	26,5	15,7	3,4	106	276
60	1,0	31,7	17,3	3,6	105	142

Tabulka č.2: Naměřené hodnoty TGT pro reagentii RB

ID	tLag-RB (min)	tPeak-RB (min)	Peak-RB (nM)	VI-RB (nM/min)	AUC-RB (ETP)
1	8,6	14,5	170,8	28,9	1855,2
2	8,7	9,2	204,8	37,4	1955,4
3	10,1	17,8	139,4	18,3	1790,8
4	8,9	14,7	117,5	20,2	1351,9
5	8,6	14,8	112,4	18,1	1318,8
6	8,1	14,4	99,5	15,6	1353,2
7	7,7	13,1	161,4	30,0	1716,9
8	7,9	13,9	124,2	20,7	1409,4
9	9,8	16,9	101,3	14,2	1241,6
10	8,6	15,5	134,4	19,5	1708,6
11	7,6	13,7	136,0	22,3	1610,0
12	5,9	9,6	310,1	83,4	2290,2
13	7,9	14,1	192,9	31,9	2088,5
14	11,1	17,5	129,4	20,2	1666,5
15	6,1	9,9	312,7	84,7	2356,3
16	7,6	12,5	55,9	12,5	712,9
17	8,8	11,4	44,4	17,3	654,1
18	5,4	9,3	343,4	88,1	2486,2
19	7,1	11,9	210,4	43,7	1919,8
20	6,6	11,1	241,9	53,4	2057,2
21	8,3	14,1	169,4	28,9	1827,1
22	5,3	9,3	280,3	69,1	2173,4
23	5,0	8,7	334,7	90,2	2421,5
24	7,1	12,7	183,4	32,8	1890,1
25	6,1	10,3	300,9	72,7	2484,5
26	7,7	14,1	196,7	30,7	2050,1
27	5,6	9,4	205,5	53,9	1649,0
28	7,2	12,8	167,2	29,8	1649,9
29	7,4	13,2	160,7	27,8	1741,1
30	7,5	13,0	144,5	26,8	1606,3
31	7,3	12,4	161,6	32,0	1672,2
32	6,5	11,1	251,0	54,8	2109,9
33	11,9	19,8	95,6	12,3	1299,5
34	6,3	11,5	193,5	37,3	1832,4
35	6,1	10,8	225,0	48,1	2139,4
36	6,0	10,4	230,9	52,0	1926,4
37	5,4	9,9	258,6	58,1	2235,5
38	7,1	11,5	245,9	55,8	1994,0
39	7,2	12,1	197,9	40,3	1958,6
40	7,0	13,5	195,6	30,4	2062,0
41	9,8	15,9	162,9	27,0	1862,0
42	9,4	16,9	134,6	18,0	1654,6
43	11,1	16,7	119,8	21,4	1551,5
44	10,1	17,3	159,4	22,2	1882,5
45	7,1	13,5	163,0	25,5	1874,0
46	7,0	13,4	179,4	28,1	2104,9
47	8,4	15,9	115,2	15,3	1586,6
48	8,7	15,6	185,8	27,0	2170,8
49	8,2	13,5	243,7	46,6	2345,4
50	6,7	11,7	241,9	48,4	2131,5
51	10,3	17,9	139,4	18,4	1680,8
58	6,0	11,1	235,5	46,6	2183,6
59	8,4	14,5	200,2	33,2	2159,2
60	8,0	13,0	264,3	53,6	2372,3
Průměr	7,7	13,2	186,8	36,9	1848,6
Medián	7,6	13,1	181,4	30,2	1878,2
SD	1,6	2,6	67,6	20,4	391,2
Minimum	5,0	8,7	44,4	12,3	654,1
Maximum	11,9	19,8	343,4	90,2	2486,2

Tabulka č.3: Naměřené hodnoty TGT pro reagenii RC-low

ID	tLag-RClow (min)	tPeak-RClow (min)	Peak-RClow (nM)	VI-RClow (nM/min)	AUC-RClow (ETP)
1	3,9	9,6	163,6	28,5	1773,4
2	4,1	9,9	185,1	32,2	1862,1
3	3,7	12,7	116,6	13,0	1752,8
4	2,0	9,9	115,1	14,4	1506,6
5	1,5	8,3	123,5	18,3	1557,0
6	2,4	9,4	103,4	14,6	1506,9
7	2,7	9,5	150,6	22,2	1854,0
8	2,9	9,9	119,0	17,1	1493,3
9	3,9	11,4	94,5	12,5	1285,9
10	3,2	11,1	121,7	15,6	1696,1
11	2,3	9,9	120,6	16,1	1691,6
12	2,5	6,8	318,0	73,8	2403,2
13	3,1	10,7	155,8	20,6	2026,1
14	4,6	12,2	116,4	15,2	1664,0
15	3,7	7,6	312,8	80,5	2321,4
16	2,9	6,6	310,4	82,8	2204,1
17	3,2	7,1	282,9	73,1	2145,0
18	2,9	6,8	354,9	91,7	2519,9
19	3,6	9,1	202,6	37,3	1937,1
20	3,8	8,8	230,1	46,2	2074,8
21	4,6	11,1	152,9	23,6	1787,4
22	2,8	7,0	247,9	57,7	2086,8
23	2,1	5,7	352,5	98,7	2454,7
24	2,9	8,8	182,8	31,1	1949,6
25	2,6	7,2	305,7	67,2	2545,0
26	3,8	10,5	178,7	26,5	2034,1
27	4,0	7,7	224,9	60,6	1692,2
28	2,6	9,4	137,8	20,2	1583,5
29	3,0	9,4	147,6	23,0	1752,7
30	3,5	9,6	150,9	24,7	1682,3
31	3,7	8,9	165,5	31,4	1734,2
32	4,1	9,1	255,5	52,0	2175,5
33	4,3	13,5	89,5	9,7	1379,2
34	3,0	8,7	188,5	32,9	1878,1
35	4,0	8,6	212,9	46,3	2092,1
36	4,7	8,8	209,9	50,4	1814,5
37	5,0	9,2	291,7	70,1	2318,4
38	6,4	11,2	231,4	48,6	2004,8
39	6,5	12,0	183,3	33,3	1918,0
40	2,6	9,7	174,9	24,5	2030,5
41	3,9	10,7	159,4	23,5	1875,7
42	3,6	11,8	121,7	14,9	1689,0
43	2,9	11,0	130,3	16,0	1803,7
44	6,1	12,5	125,9	21,0	1704,5
45	4,1	11,0	144,4	20,9	1860,1
46	1,9	10,3	156,9	18,8	2039,8
47	2,4	10,6	106,3	12,9	1611,7
48	2,7	10,2	174,3	23,0	2245,9
49	4,0	9,5	247,5	44,8	2412,9
50	3,0	8,2	240,6	46,0	2259,3
51	4,8	12,7	127,7	16,1	1826,2
58	3,0	9,2	191,1	30,5	2115,4
59	3,3	9,7	215,6	34,8	2352,7
60	4,0	8,7	258,2	55,8	2316,3
Průměr	3,5	9,6	188,5	35,9	1931,5
Medián	3,4	9,6	174,6	27,5	1876,9
SD	1,1	1,7	69,8	22,8	303,4
Minimum	1,5	5,7	89,5	9,7	1285,9
Maximum	6,5	13,5	354,9	98,7	2545,0

Tabulka č.4: Naměřené hodnoty TGT pro reagentii RC-high

ID	tLag-RChigh(min)	tPeak-RChigh(min)	Peak-RChigh(nM)	VI-RChigh(nM/min)	AUC-RChigh(ETP)
1	10,0	13,9	408,9	106,7	2400,6
2	10,5	14,6	374,5	91,4	2242,4
3	13,2	18,5	320,1	60,6	2403,4
4	9,6	14,1	238,9	52,8	1637,4
5	8,9	13,1	241,9	57,9	1588,2
6	9,8	13,9	271,0	66,5	1722,7
7	8,2	11,7	387,2	109,6	2244,0
8	9,2	12,6	308,1	89,1	1746,6
9	11,5	16,6	276,9	55,6	1905,3
10	10,3	14,1	316,9	85,3	1925,9
11	9,1	13,1	290,5	71,4	1876,7
12	6,5	9,0	605,6	247,0	2563,1
13	9,6	13,3	454,0	124,8	2547,4
14	11,9	16,1	337,2	80,7	2079,4
15	7,7	10,3	642,7	252,2	2611,7
16	5,5	8,0	562,8	223,5	2571,8
17	6,4	8,9	495,7	202,1	2379,0
18	6,5	9,1	595,1	226,0	2698,3
19	8,0	11,2	426,7	135,1	2174,9
20	8,2	11,2	480,0	158,4	2409,5
21	9,4	13,6	345,1	82,3	2248,0
22	5,2	8,0	494,8	178,8	2291,4
23	4,9	7,3	612,6	255,5	2592,1
24	7,9	11,3	432,8	128,8	2268,8
25	7,0	9,6	608,7	226,5	2763,7
26	8,9	12,5	455,5	125,3	2554,5
27	6,9	9,6	405,2	148,3	1897,4
28	7,4	11,6	347,3	81,7	2220,4
29	7,5	11,1	369,8	101,5	2148,9
30	7,8	11,2	317,1	94,5	1847,0
31	7,8	10,7	375,1	128,3	1941,6
32	7,8	11,1	478,2	145,9	2465,0
33	11,9	17,7	212,0	36,6	1886,6
34	8,5	11,4	420,5	146,5	2080,8
35	9,4	12,3	453,3	161,6	2245,3
36	9,7	12,4	450,7	162,4	2139,4
37	10,6	13,5	534,7	185,0	2542,7
38	12,8	15,8	424,1	142,3	2193,6
39	14,3	17,8	373,2	109,2	2121,7
40	8,3	12,7	366,6	84,9	2365,7
41	9,1	13,8	300,0	63,0	2184,4
42	10,8	16,3	238,4	43,3	2036,5
43	9,8	15,5	241,9	42,7	2017,7
44	11,0	16,0	306,7	61,4	2253,7
45	9,5	13,2	380,8	102,1	2211,3
46	7,5	12,0	314,9	70,7	2211,9
47	8,1	12,9	252,2	52,9	1846,2
48	9,0	13,5	366,2	82,2	2468,9
49	8,5	12,0	517,5	148,4	2792,2
50	8,1	11,3	454,5	140,2	2321,4
51	10,4	15,7	283,7	54,1	2214,6
52	7,4	11,2	387,1	100,7	2321,1
53	5,8	8,5	686,7	254,7	3050,6
54	8,6	13,5	334,9	69,0	2427,5
55	6,3	9,0	620,5	235,9	2847,7
56	7,9	11,0	571,5	187,5	2812,7
57	11,2	16,2	294,9	59,3	2203,8
58	6,3	9,7	466,6	136,4	2522,4
59	7,4	10,9	428,4	120,9	2463,4
60	7,3	10,3	545,7	186,1	2657,1
Průměr	8,7	12,4	408,4	123,9	2273,4
Medián	8,5	12,3	387,1	109,4	2246,6
SD	2,0	2,6	117,8	61,8	315,8
Minimum	4,9	7,3	212,0	36,6	1588,2
Maximum	14,3	18,5	686,7	255,5	3050,6

Tabulka č. 5: Referenční meze sledovaných parametrů

Parametr	Dolní mez	Horní mez
PT (INR)	0,8	1,25
APTT (s)	25,9	40
TT (s)	12	18
AT III (%)	70	140
Fbg (g/l)	2	4
D-Dimer (ug/l)	0	190
F VIII	70	150
TGA RB tLag (min)	4,5	10,9
TGA RB tPeak (min)	8	18,4
TGA RB Peak (nM)	51,6	322
TGA RB VI (nM/min)	16,5	57,3
TGA RB AUC (ETP)	1066	2631
TGA RClow tLag (min)	1,3	5,7
TGA RClow tPeak (min)	6,2	13
TGA RClow Peak (nM)	118,7	258,3
TGA RClow VI (nM/min)	13,1	58,7
TGA RClow AUC (ETP)	1325	2538
TGA RChigh tLag (min)	4,7	12,7
TGA RChigh tPeak (min)	7,2	17,6
TGA RChigh Peak (nM)	290,6	526,2
TGA RChigh VI (nM/min)	62,1	185,7
TGA RChigh AUC (ETP)	1642	2905

Tabulka č.6: Pacienti s vysokou hladinou FVIII a nízkým APTT

ID	APTT	F VIII	tLag	Peak	AUC
1	21	270,4	7,1	250,2	1865,1
2	20,5	216,2	4,9	503,6	4257,7
3	20,4	136,2	4,4	667,5	4806,5
4	23,1	212,2	2,4	737,2	5325,6
5	23,7	148	2,5	683,8	5430,3
6	22,2	198,1	2	1142,1	5609,1
7	20,8	426	2,1	1015,7	5565,5
8	22,5	292,6	2,1	1072,1	5278,8
9	21,4	263,5	6,3	957	4903,6
10	18,4	253,5	3,5	827,9	5348,9
11	22,9	266,9	4,1	616,1	5350,4
12	21,2	141,1	4,3	508	3553,6
Půměr	21,5	235,4	3,8	748,4	4774,6
Medián	21,3	234,9	3,8	710,5	5302,2
SD	1,5	80,7	1,7	265,5	1095,9
Minimum	18,4	136,2	2,0	250,2	1865,1
Maximum	23,7	426,0	7,1	1142,1	5609,1

Tabulka č.7: Výsledky sledovaných parametrů u osob dlouhodobě léčených Warfarinem

Reagencie	TGA RB		
ID	tLag(min)	Peak(nM)	AUC(ETP)
1	7,9	231	2994,7
2	11	151,2	1980,6
3	7,8	146,5	2062
4	6	196,1	1778,9
5	11,5	78,2	1208,5
Průměr	8,8	160,6	2004,9
Medián	7,9	151,2	1980,6
SD	2,3	57,6	645,9
Minimum	6,0	78,2	1208,5
Maximum	11,5	231,0	2994,7

Reagencie	TGA RC low		
ID	tLag(min)	Peak(nM)	AUC(ETP)
1	3,2	209,8	2947,9
2	6,1	96,2	1760,9
3	5,8	111,8	1778,1
4	5	187,6	1748,9
5	7,1	111,7	1282,9
Průměr	5,4	143,4	1903,7
Medián	5,8	111,8	1760,9
SD	1,5	51,5	619,7
Minimum	3,2	96,2	1282,9
Maximum	7,1	209,8	2947,9

Reagencie	TGA RC high		
ID	tLag(min)	Peak(nM)	AUC(ETP)
1	7,3	363,4	3044,3
2	11,6	207,4	1912,7
3	7,3	185,1	1878,5
4	5,4	263,1	1814,4
5	10,5	99,7	1137,2
Průměr	8,4	223,7	1957,4
Medián	7,3	207,4	1878,5
SD	2,6	97,7	686,1
Minimum	5,4	99,7	1137,2
Maximum	11,6	363,4	3044,3

EVIDENCE VÝPŮJČEK

Prohlášení:

Beru na vědomí, že odevzdáním této závěrečné práce poskytuji svolení ke zveřejnění a k půjčování této závěrečné práce za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

V Praze, 10.5.2009

Podpis autora závěrečné práce

Jako uživatel potvrzuji svým podpisem, že budu tuto práci řádně citovat v seznamu použité literatury.

Jméno	Ústav / pracoviště	Datum	Podpis