

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Milan Košťál

2012

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program
Vnitřní nemoci

Rizikové faktory mozkových žilních trombóz a výskyt mutace JAK2

Cerebral venous thrombosis risk factors and JAK2 mutation

MUDr. Milan Košťál

Školitel: Doc. MUDr. Petr Dulíček, Ph.D.
Školitel- konzultant: Prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

Hradec Králové, 17.5.2012

Obhajoba dne:

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 17.5.2012

Poděkování

Pokládám za svou milou povinnost poděkovat všem, kteří přispěli k dokončení této práce. Především bych chtěl poděkovat svému školiteli Doc. MUDr. Petru Dulíčkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, pomoc při účastech na kongresech a zpracování této práce, MUDr. Dagmar Krajičkové, CSc. za pomoc se sběrem dat od nemocných a odborné konzultace a Mgr. Filipu Vrbackému za laboratorní zpracování souboru. Děkuji Doc. MUDr. Edvardu Ehlerovi, CSc. za poskytnutí údajů o pacientech s trombózou splavů z Krajské nemocnice Pardubice.

Dále bych chtěl poděkovat prof. MUDr. Jaroslavu Malému, CSc. za umožnění této práce a materiální zajištění laboratorního vyšetření.

Obsah

Obsah	5
Použité zkratky:	7
1 Úvod	8
2 Historie:	9
3 Etiologie	10
3.1. Vrozené trombofilie:	11
3.1.1 Leidská mutace faktoru V, mutace protrombinu	11
3.1.2 Protein C, Protein S, antitrombin	13
3.1.3 Hyperhomocytéinémie	14
3.2 Získané trombofilie	15
3.2.1 Hormonální antikoncepce	15
3.2.2 Maligní onemocnění	19
3.2.3 Ostatní získané trombofilní stavy	21
4 Mutace JAK2	22
4.1 JAK 2 a trombózy :	25
4.2 JAK2 a trombózy neobvyklých lokalizací	27
5 Diagnostika :	29
5.1 Rentgenové metody	29
5.2 Ultrazvukové vyšetření	31
5.3 Magnetická rezonance	32
5.4 D-dimery	32
5.5 Střední objem trombocytu (MPV)	34
6 Klinické známky CVT	35
7 Terapie CVT	37
7.1 Antikoagulační léčba	37
7.2 Intervenční terapie	38
7.3 Podpůrná léčba	39
8 Prognóza	40
9 Cíle práce	42
10 Soubor	43
11 Metodika	46
11.1 Vyšetření mutace JAK2	47
11.2 Statistická analýza	48
12 Výsledky	49
12.1 JAK2	49
12.2 Typ postiženého sinu	50

12.3	Parametry krevního obrazu	51
12.3.1	Střední objem destičky	51
12.3.2	Leukocyty	51
12.3.3	Hemoglobin	52
12.4	Rekanalizace	53
12.5	Vstupní příznaky	55
12.6	Trombofilní faktory	58
12.7	Čas do stanovení diagnózy	59
12.8	Klinický stav po trombóze	61
12.9	Typ terapie	63
12.10	D-dimery	64
13	Diskuze	65
13.1	Lokalizace trombózy	65
13.2	Rizikové faktory trombózy a mutace JAK2	66
13.3	Faktory krevního obrazu	68
13.4	Rekanalizace	70
13.5	Vstupní příznaky, trombofilie	72
13.6	Čas do diagnózy, D-dimery	73
13.7	Klinický stav po trombóze	75
13.8	Terapie	76
13.9	Rekurence	77
14	Závěry	80
15	Literatura	82
16	Seznam příloh:	114
16.1	Metodika laboratorních vyšetření	115
16.1.1	Protrombinový čas	115
16.1.2	Aktivovaný parciální trombinový čas	116
16.1.3	Fibrinogen	117
16.1.4	Antitrombin	118
16.1.5	D-dimery	119
16.1.6	Protein C	120
16.1.7	Protein S	121
16.1.8	Lupus antikoagulans	122
16.1.9	dRVVT	123
16.2	Souhlas zástupce Pardubické krajské nemocnice s použitím dat z databáze nemocnice v této studii.	124

Použité zkratky:

CEVETIS.....	Cerebral VEin Thrombosis International Study
CT.....	Počítačová tomografie
CVT.....	Centrální žilní trombózy
DVT.....	Hluboká žilní trombóza
HAK.....	Kombinovaná perorální hormonální antikoncepce
LMWH.....	Nízkomolekulární heparin
MPD.....	Myeloproliferativní onemocnění
MPV.....	Střední objem trombocytů
MR.....	Magnetická rezonance
mRS.....	Modified Rankin Scale
MTHFR.....	Methylentetrahydrofolát reduktáza
OAT.....	Perorální antikoagulační terapie
VTE.....	Venózní trombembolie

1 Úvod

Trombózy v žilní oblasti centrálního nervového systému jsou poměrně vzácnou formou cévních mozkových příhod. Četnost výskytu trombózy hlubokých mozkových žil a intrakraniálních splavů (cerebral venous thrombosis - CVT) je podstatně nižší než u arteriálních příhod. Incidence se odhaduje na méně než 1/100.000, zatímco incidence arteriálních iktů je asi 300krát vyšší ¹. S rozvojem moderních zobrazovacích metod jsou CVT diagnostikovány častěji a v časnějším stádiích.

Mezi žilním řečištěm mozkových splavů a řečištěm žil dolních končetin existuje řada anatomických rozdílů (stavba stěny sinů, nekomprimovatelnost sinů) i fyzikálních rozdílů (gravitační působení, svalová pumpa). Důsledkem jsou odlišnosti v patogenetice, klinickém průběhu i léčbě ².

Pátrání po rizikových faktorech je významné v prevenci CVT, časné diagnostice i terapii. Jednotlivé rizikové faktory mají odlišnou závažnost, což má vliv na léčbu i opatření k prevenci recidiv.

Rizikové faktory mozkových trombóz vykazují geografickou distribuci. Příčinou je nejčastější získaný rizikový faktor ve vyspělých zemích – hormonální antikoncepce. V zemích s nižší dostupností této formy antikoncepce převažují vrozené rizikové faktory, období těhotenství, infekce nebo malignity ^{3,4}.

V poslední dekádě došlo k významnému posunu v diagnostice trombóz neobvyklých lokalizací – tedy především břišních trombóz a CVT. U břišních trombóz se jasným rizikovým faktorem stala přítomnost myeloproliferativního onemocnění, především pravé polycytémie a esenciální trombocytémie. Tyto stavy jsou spjaty s mutací JAK2 kinázy, jak bylo prokázáno v polovině minulého desetiletí ^{5,6}. Naopak - míra rizika CVT nebo venózní trombembolie (VTE) u nositelů mutace JAK2 je zatím předmětem výzkumu. S příchodem nové skupiny léků – inhibitorů JAK2 kinázy je pravděpodobné, že její význam v diagnostice a terapii CVT poroste. Tato práce se proto zabývá vrozenými i získanými rizikovými faktory mozkových trombóz a to především výskytem mutace JAK2 V617F.

2 Historie:

První zmínky o mozkových trombózách pocházejí z první poloviny 19 století, kdy Ribes r.1825 popisuje případ 45 letého muže s maligním rozsevem, který měl 6-ti měsíční anamnézu bolestí hlavy, epileptických záchvatů a deliria⁷. Při pitvě byla nalezena trombóza horního šípového splavu, levého laterálního splavu a korových žil v parietální oblasti. Abercrombei v roce 1828 popisuje trombózu horního šípového splavu v souvislosti s puerperiem⁸. Dále byly popisovány trombózy mozkových splavů především u dětí, těhotných a starých lidí⁹. Protože neexistovaly vhodné zobrazovací metodiky, jednalo se o pitevní diagnózy. Až roku 1940 popsal dr. Symonds klinicky úspěšně diagnostikovanou CVT – popsal charakteristické klinické subjektivní a objektivní příznaky a výsledek lumbální punkce¹⁰. Onemocnění bylo považováno za velmi vzácné, etiologicky spjaté s tradičními rizikovými faktory trombóz – malignita, těhotenství, věk. Rozvoj a lepší dostupnost CT a magnetické rezonance umožňuje diagnostikovat více případů. V čase se také mění spektrum vyvolávajících faktorů. V minulosti šlo především o infekce, komplikace těhotenství a nádorová onemocnění. V dnešní době ve vyspělých zemích dominují především aseptické CVT, nejčastěji v souvislosti s užíváním hormonální antikoncepce³. V rozvojových zemích jsou infekce stále častou příčinou CVT. I přes současné diagnostické možnosti je více než pravděpodobné, že řada CVT zůstává nadále nezjištěna.

3 Etiologie

Příčin trombóz (nejen CVT) je identifikováno řada, některá mají širší platnost (infekce, traumata, operace, malignity trombofilie, hormonální terapie, těhotenství aj.), jiná jsou publikována formou kazuistických sdělení (polékové trombózy, komplikace výkonů, systémová onemocnění aj.), viz tab. č.1^{11, 12}. Klasická Virchovova triáda rizikových faktorů trombózy (porucha cévní stěny, krevní stáza, trombofilní stav) nepozbývá platnosti ani u mozkových trombóz. Zajímavé i klinicky významné je srovnání predisponujících a rizikových faktorů DVT a CVT. Na rozdíl od klasické trombózy hlubokých žil na dolních končetinách existují v mozkovém žilním řečišti rozdílné anatomické i fyzikální předpoklady. Cévní stěna splavů neobsahuje svalovou vrstvu (tunica muscularis). Stěny splavů jsou však vyztuženy pevnou vrstvou (dura mater), která brání jejich útlaku i v případě intrakraniální hypertenze. Není zde chlopenní systém. Krev tedy může proudit oběma směry, na jejím převažujícím toku se podílí především gravitace. Nepřítomnost svalové vrstvy neumožňuje žádnou kontrakci – splavy jsou stále dilatované. Četné komunikace celého systému splavů umožňují i velmi dobrý klinický stav při rozsáhlých trombózách. Do mozkového žilního systému se též odvádí krev z obličejové části. Tyto spojky mohou být možnou cestou infekčního agens a následné trombózy - typicky je tomu u kavernózního sinu (infekce se může rozšířit při kožních afekcích obličejové části organismu) nebo u příčného sinu (infekce z otitis media).

Tabulka č. 1: Etiologie CVT – některé časté příčiny¹²

Lokální příčiny	Traumata, kraniotomie, chir. výkony, lumbální punkce aj.
Infekce	Meningitida, absces, sinusitida, mastoiditida, otitida, furunk Endokarditida, tuberkulóza, AIDS, aspergilóza aj.
Koagulopatie	Deficit proteinů C a S, antitrombinu, Leidenská mutace, mutace protrombinu, antifosfolipidový syndrom aj.
Systémové příčiny	Těhotenství, systémová onemocnění (m. Crohn, systémový lupus erytematodes...), nefrotický syndrom, sarkoidóza, jaterní cirhóza, malignity aj.
Účinky léků	Hormonální antikoncepce, hormonální substituční terapie v přechodu, anabolika, kortikosteroidy aj.

Při trombóze sinus sagitalis superior je nemožná drenáž mozkomíšního moku do tohoto splavu. Dochází k intrakraniální hypertenzi a otoku papily zrakového nervu¹³. Lze shrnout, že etiologie CVT je multifaktoriální. Důležité jsou jak příčiny (např. infekce, traumata), tak predisponující stavy. V zatím největší publikované studii z r. 2004 mělo 44% pacientů více než 1 predisponující rizikový faktor³. Vrozené trombofilie byly zjištěny u 22 % pacientů.

3.1. Vrozené trombofilie:

S rozvojem nových genetických diagnostických metod i s dokonalejší charakteristikou koagulační kaskády byly v devadesátých letech minulého století definovány nové, hyperkoagulační stavy. V roce 1993¹⁴ byla popsána rezistence na aktivovaný protein C (APC rezistence), v následujícím roce¹⁵ pak její nejčastější příčina – Leidenská mutace faktoru V. V roce 1996 následoval objev mutace protrombinu¹⁶. Vyšetřování genetických abnormalit se postupně s přibývajícím důkazy stalo součástí trombofilního screeningu.

Dnes se mezi nejčastější vrozené trombofilie řadí: deficit antitrombinu, deficit proteinu C, deficit proteinu S, mutace faktoru V (Leidenská mutace), mutace faktoru II (mutace protrombinu) a hyperhomocysteinémie (mutace MTHFR genu). Hyperhomocysteinémie není svázána jen s mutací MTHFR a proto by mohla být zařazena i do získaných trombofilii^{17,18}.

3.1.1 Leidenská mutace faktoru V, mutace protrombinu

V devadesátých letech byla zjištěna APC (aktivovaný protein C) rezistence u 20 % pacientů s nově diagnostikovanou trombózou^{15,19}. Ve skupině pacientů s pozitivní rodinou anamnézou trombózy byla APC rezistence zjištěna až u 50 % případů. Toto vedlo k pátrání po genetické mutaci podmiňující APC rezistenci. O rok později byla zjištěna bodová mutace faktoru V v nukleotidu na pozici 1691 (záměna guaninu za adenin) podmiňující vznik defektního faktoru V (Leiden), rezistentního na aktivovaný protein C. Bylo zjištěno, že se vyskytuje u 5% zdravé populace a zvyšuje riziko trombózy asi 7x^{15,20}. Mutace faktoru V Leiden je doposud nejrozšířenější

testovanou geneticky podmíněnou trombofilní mutací. Vzhledem k její rozšířenosti v populaci a násobně nižším procentu pacientů s trombózou nebývá obvykle jedinou příčinou trombózy. K rozvoji trombózy je zapotřebí dalšího spouštěcího faktoru. Tímto momentem může být např. těhotenství, hormonální preparáty, trauma, imobilizace aj. Riziko trombózy se pak obvykle násobí s rizikem trombózy při mutaci f. V Leiden. Lze předpokládat, že obdobné pravidlo platí i v případě CVT. Ověřením této hypotézy se zabývalo více prací. V dosud největší publikované studii (600 pacientů s CVT) byla vrozená trombofilie nalezena u 22% pacientů³. V pozdější metaanalýze původních prací zkoumající výskyt mutace faktoru V Leiden u pacientů s CVT a u kontrol byla tato mutace zjištěna u 11% pacientů. Spočítaný poměr šancí (odds ratio) činil 3,38 (95% CI 2,27 – 5,05; $p < 0,001$). Zahrnuto bylo 469 pacientů s CVT a 3023 kontrol²¹. V porovnání s DVT, kde je Leidenská mutace f.V zastoupena v přibližně 20-25% je prevalence Leidenské mutace u CVT nižší²²⁻²⁴. V jiném pozorování z r. 2007 na 52 pacientech však rozdíl v prevalenci Leidenské mutace u CVT a při hluboké žilní trombóze nebyl zjištěn²⁵. Přesná prevalence Leidenské mutace u pacientů s CVT tak vzhledem k nízkému počtu sledování na malých souborech doposud není známa.

Mutace protrombinu G20210A (záměna guaninu za adenin, identifikována v r.1996) se u venózní trombembolie (VTE) vyskytuje zhruba v 5-10%²⁶. Riziko VTE je u nositelů této mutace zvýšeno 2-4x¹⁹. Výskyt mutace ve zdravé populaci vykazuje významnou geografickou distribuci. Je typická pro bělošskou populaci zejména jižních států Evropy. V Africe, Asii a u původních obyvatel Ameriky se téměř nevyskytuje. Na rozdíl od Leidenské mutace se zde nemění sekvence aminokyselin protrombinu, ale zvyšuje se kvantita. Publikace z r. 1996 prokazuje, že při zvýšení koncentrace protrombinu na 115% se zvýší riziko trombózy 2x¹⁶. Mutace přitom zvyšuje koncentraci protrombinu v průměru na 133%^{26, 27}. Zvýšená koncentrace protrombinu vede dále k zvýšení trombinem aktivovaného fibrinolytického inhibitoru. Ten inhibuje fibrinolytický proces a tím zpomaluje odbourávání trombu²⁸.

Obě mutace (mutace protrombinu i Leidenská mutace) zvyšují riziko rekurence VTE. Spočítané relativní riziko pro rekurenci VTE u Leidenské mutace je 1,39 (95% CI 1,15-1,67) a u mutace protrombinu 1,20 (CI 0,89-1,61)²⁹. Zajímavý je rozdíl obou mutací ve vztahu k plicní embolizaci. Zatímco Leidenská mutace nezvyšuje riziko plicní embolie, mutace protrombinu toto riziko představuje^{23, 30}.

3.1.2 Protein C, Protein S, antitrombin

Proteiny C a S hrají důležitou roli v udržování rovnováhy prokoagulačních a antikoagulačních faktorů. První pacient s deficitem proteinu C byl popsán v r. 1981³¹, deficit proteinu S byl popsán o 3 roky později³². Oba proteiny (serinové proteázy) jsou syntetizovány v játrech a jejich syntéza je vitamin K- dependentní (protein S může být syntetizován i v endoteliích a megakaryocytech). Plazmatický poločas obou proteinů je poměrně krátký (protein C – 8hod, protein S – 42hod.). Pro svou aktivaci se protein C musí navázat na EPCR (endoteliální receptor pro protein C) na povrchu endotelu. Zde je aktivován trombinem v komplexu s trombomodulinem. Aktivovaný protein C inaktivuje na membránu vázaný (za spoluúčasti fosfolipidů) aktivovaný faktor VIIIa a Va. K tomu potřebuje svůj kofaktor – protein S. Neaktivní formy faktoru V a VIII nejsou aktivovaným proteinem C ovlivněny. Hlavním inhibítorem aktivovaného proteinu C je protein C inhibitor – serinová proteáza syntetizovaná játry, která dělí protein C na 534. pozici³³. Protein C má kromě antikoagulačního působení i cytoprotektivní funkci³⁴.

Vzhledem k anti-koagulačnímu působení obou proteinů, jejich deficit zvyšuje riziko trombózy. Prevalence deficitu proteinu C je ve zdravé populaci kolem 0,4%³⁵, u proteinu S je prevalence kolem 0,1%³⁶. U pacientů s VTE je deficit proteinu C a S nacházen přibližně v 3% případů. Riziko VTE bylo ve studiích zvýšeno 3-11x³³. Roční výskyt rekurence VTE byl u pacientů s deficitem proteinu C 6% a proteinu S 8,4%^{37, 38}. Tito pacienti jsou ohroženi vyšším rizikem arteriální trombózy. Metaanalýza ischemických iktů a CVT u dětských pacientů ukázala poměr šancí (odds ratio - OR) 8,76 (95%CI 4,53-16,96) při deficitu proteinu C a 3,2 (95%CI 1,22-8,4) při deficitu proteinu S³⁹.

Prevalence deficitu proteinu C a proteinu S u pacientů s CVT je těžké stanovit. Vezmeme-li v úvahu nízkou incidenci CVT a předpokládanou prevalenci kolem 3% (jako u DVT), musel by soubor obsahovat stovky, lépe však tisíce pacientů. Takováto studie v praxi zatím realizována nebyla. Studie na menších souborech ukazují na prevalenci kolem 2% pro každý deficit^{40, 41}. Poměr šancí byl pro protein C 11.10 (95% CI 1.87-66.05, p<0.009) a pro protein S 12.49 (95% CI 1.45-107.29, p<0.03)²¹.

Antitrombin (dříve označován jako Antitrombin III) je nejsilnějším inhibítorem trombinu a je též inhibítorem ostatních serinových proteáz (faktorů Xa, XIa, XIIa) a

těž komplexu tkáňový faktor/faktor VIIa. Heparin reakci mezi antitrombinem a serinovými proteázami značně urychluje. Antitrombin je syntetizován v játrech, má biologický poločas 48 h. Vrozený deficit antitrombinu má prevalenci v populaci 1: 2000 – 1: 5000⁴². Ve studiích, které stanovovaly prevalenci jednotlivých trombofilních stavů ve skupině neselektovaných jedinců s první příhodou venózního tromboembolizmu v životě, byla frekvence výskytu deficitu antitrombinu 0,5% - 1,0%. Relativní riziko VTE je u jedinců s kongenitálním deficitem antitrombinu 25x – 50x větší než u jedinců bez trombofilního stavu⁴³.

3.1.3 Hyperhomocysteinémie

Hyperhomocysteinémie jako rizikový faktor CVT je předmětem častých diskuzí. V případě DVT byla hyperhomocysteinémie jako rizikový faktor trombozy potvrzena více autory, souhrnně pak v metaanalýze z r. 2005⁴⁴, kde byl vzestup koncentrace homocysteinu o 5 μ mol/l vázán s nárůstem rizika tromboembolie o 27%. Hyperhomocysteinémie je vázána na mutaci genu pro MTHFR C677T (záměna alaninu za valin). Tuto mutaci má v západní populaci 10-12% obyvatel a v průměru způsobuje v homozygotní formě vzestup koncentrace homocysteinu o 25 % (v závislosti na příjmu vit. B12 a folátů)⁴⁵. Den Heijer et al., 2005 udávají v metaanalýze, že přítomnost mutace MTHFR C677T je spojena s nárůstem rizika trombozy o 20 %⁴⁴. Autoři dále poukazují na rozdíl v geografické distribuci rizika – studie ze Severní Ameriky tento nárůst rizika nepotvrzují. Příčinou je vyšší příjem folátů a vit. B12 v severoamerické populaci, který efekt genetické mutace na koncentraci homocysteinu vyrovnává. Studie Cantu et al., z r.2004 již u pacientů s CVT skutečně potvrdila hyperhomocysteinémii jako rizikový faktor CVT¹⁸. Nízká koncentrace folátů byla také spojena se zvýšeným rizikem CVT. Výzkum byl proveden na vzorku 45 pacientů a 90 kontrol s nižším socioekonomickým statutem (hodnoceno podle měsíčního příjmu v dolarech), kde hlavním predisponujícím faktorem bylo puerperium (přes 50%). Deficit folátů byl tedy nejspíše zapříčiněn nízkou pestrostí stravy a vyšší potřebou v těhotenství. Mutace MTHFR byla přítomna zhruba v dvojnásobném počtu u pacientů s CVT než u zdravých kontrol. Tento výsledek ale na daném vzorku nebyl statisticky signifikantní. Předchozí studie z r. 2003¹⁷ tyto závěry podporuje. I zde byla hyperhomocysteinémie rizikovým

faktorem CVT, zvyšující riziko trombózy 4x. Nízká koncentrace folátů nebyla jako rizikový faktor CVT potvrzena.

V r. 2010 byla publikována metaanalýza 9 prací zabývajících se závislostí přítomnosti mutace MTHFR a CVT ⁴⁶. Asociace mutace s trombózou vyšla jako nesignifikantní (zajímavé je, že v případě DVT tato závislost potvrzena byla ⁴⁴). Lze tedy uzavřít, že závislost hyperhomocysteinémie a CVT je potvrzena více autory, ale závislost mutace MTHFR a CVT zůstává nadále sporná ^{17, 18}. Příčinou je pravděpodobně významný vliv zevních faktorů (nejspíše příjem folátů). Není vyloučena ani možnost ovlivnění dat malým počtem zahrnutých pacientů, anebo nedostatků v provedení některých publikovaných prací ⁴⁶.

3.2 Získané trombofilie

3.2.1 Hormonální antikoncepce

Používání hormonálních preparátů v prevenci početí se stalo masovou záležitostí. První hormonální antikoncepce (HAK) byla na trh uvedena na začátku šedesátých let 20. století. Již v r. 1961 byl publikován první případ plicní embolie v souvislosti s užíváním HAK. O rok později byl zveřejněn první případ ischemické cévní mozkové příhody a následný rok i případ infarktu myokardu v souvislosti s HAK ⁴⁷. Původní názor na protektivní funkci estrogenů byl tak rychle změněn. Vývoj hormonální antikoncepce však pod silným požadavkem společnosti pokračoval. Dnes se používá u nejvíce rozšířené kombinované HAK kombinace gestagenu (který blokuje luteinizační hormon a tím brání ovulaci) a estrogenu ⁴⁸. Ve snaze snížit vedlejší účinky se měnila původní směs, která obsahovala vysokou dávku estrogenu (až 150 μ g), a dávka se snižovala až na 30-50 μ g ethinylestradiolu a dále až k dnešním 15-20 μ g. V případě gestagenní složky byly postupně vyvinuty celkem 3 generace progestinů. Dnes se běžně používá jen 2. generace (levonorgestrel) a 3. generace (gestoden, desogestrel, norgestimát, dienogest). Dávky progestinů tak významně, jako tomu bylo v případě estrogenů, měněny nebyly. Studie posledních let ukázaly možné mechanismy, kterými estrogены zvyšují riziko trombózy ⁴⁹⁻⁵². Během užívání HAK dochází k zvýšení koncentrace prokoagulačních faktorů II, VII, VIII, X, vWf a snížení koncentrace proteinu S a antitrombinu ⁵⁰. Dochází též k ovlivnění

fibrinolytického systému snížením inhibitoru plazminogenového aktivátoru (PAI-1), na druhé straně ale dochází i k zvýšení trombinem aktivovaného inhibitoru fibrinolýzy (TAFI). Efekt na fibrinolýzu je tedy nejspíš nulový. Nejčastěji citovaný je však efekt HAK na vznik rezistence na aktivovaný protein C^{51, 52}. Právě tento efekt nejspíše synergisticky působí na zvýšení rizika trombózy především u pacientek s Leidenskou mutací faktoru V (viz níže).

Na druhou stranu je rezistence na aktivovaný protein C tlumena právě přidáním gestagenů, jak prokazuje studie z r. 2004⁴⁹. U uživatelek HAK je zvýšené i riziko arteriální trombózy. Dle již dříve publikovaných dat je riziko akutního infarktu myokardu zvýšeno přibližně 2x, riziko ischemické cévní mozkové příhody 3x a riziko ischemie dolních končetin přibližně 4x^{48, 53-56}. Riziko arteriální trombózy je samozřejmě u uživatelek HAK dále ovlivněno konvenčními rizikovými faktory (arteriální hypertenze, kouření hypercholesterolemie, diabetes), které obvykle riziko dané užíváním HAK násobí⁵⁶. Původně se zvažoval též pozitivní efekt třetí generace progestinů na lipidogram uživatelek HAK a tím i snížení rizika arteriální trombózy. Tento efekt však nebyl studii jednoznačně prokázán^{48, 57}. Z publikovaných výsledků dále plyne, že další redukce ethinylestradiolu pod 50μg již nepřináší redukcí rizika arteriální trombózy⁴⁸. Rizikové faktory žilní trombózy (mutace f. V Leiden, mutace protrombinu) riziko arteriální trombózy nezvyšují⁵⁸.

Riziko venózní trombembolie (VTE) u uživatelek HAK je prokázáno již přes 40 let. Od té doby byla odhalena řada patofyziologicky i klinicky významných detailů. První práce z r. 1967 identifikovala asi trojnásobné zvýšení rizika VTE, což potvrdily i následné studie⁵⁹. Zvýšené riziko VTE trvá pouze po dobu užívání HAK a nemá kumulativní charakter. Byla též prokázána závislost na dávce estrogenu a to i při dávkách pod 50μg ethinylestradiolu. Snížením dávky ethinylestradiolu na 30μg dochází k redukci rizika VTE o 17-32% (dle typu progestinu). Dalším snížením na 20μg se riziko sníží o dalších 7-20%^{60, 61}. Riziko venózní trombózy s sebou nese i progestinová složka HAK. S vývojem 2. a 3. generace progestinů byly i ty srovnány stran rizika VTE s překvapivým výsledkem. Riziko VTE je u progestinů 3. generace (oproti 2. generaci) zvýšeno přibližně 2x^{62, 63}. Trombogenní potenciál HAK nezávisí jen na složení antikoncepční pilulky. Na riziku se též podílejí faktory na straně pacientky (věk, obezita, trombofilie, kouření vysoký tlak, aj.) a dále forma a délka aplikace HAK. Nejvyšší riziko trombózy bylo zaznamenáno v prvních třech měsících po nasazení HAK^{56, 60}. Od 1. roku po nasazení je již riziko konstantní a

s délkou užívání HAK se nemění. Vliv má také aplikační forma kombinovaného antikoncepčního preparátu a compliance pacientky. Náplast'ová forma HAK má stejné, nebo jen o málo vyšší riziko VTE nežli antikoncepční tablety⁶⁴. Medikované čistě gestagenní intrauterinní tělíčko s levonorgestrem nevede k zvýšení rizika VTE v porovnání s pacientkami bez HAK⁶⁵. Tato forma antikoncepce je proto vhodná i pro pacientky s dalšími riziky VTE.

Celkově riziko trombózy je i u uživatelék HAK poměrně nízké, zvláště vezmeme-li v úvahu i ostatní rizikové faktory. Lépe je tento fakt vyjádřen absolutním rizikem. Pro mladé ženy, které neužívají žádné hormonální preparáty, je absolutní riziko trombózy 1-3/10000/rok^{60, 66}. Uživatelky HAK (bez rizikových faktorů) mají toto riziko 3-6/10000/rok. V průběhu 1. roku po nasazení antikoncepce je riziko zvýšené na 12/10000/rok (2. generace progestinů) a 30/10000/rok (3. generace progestinů)⁶⁷. Tento vzestup může vypadat jako významný. Stejný efekt má ale i samotný věk uživatelky. U zdravých žen ve věku 40 let je riziko trombózy 14/10000/rok. Ve věku nad 45 let je toto riziko již 34/10000/rok^{56, 68}. I fyziologické stavy jako je těhotenství s sebou nesou zvýšení rizika VTE – 10-20/10000/rok⁵⁶.

Nejrizikovější je kombinace více rizikových faktorů – na straně HAK (vliv různé generace progestinů, léková forma, délka aplikace), na straně pacientky (věk, obezita, imobilizace, malignita, kouření, krevní tlak, aj.) a vrozeného trombofilního stavu. Nejčastěji jde o kombinace Leidenské mutace f. V a mutace protrombinu s HAK, které jsou v populaci nejčastější^{69, 70}. Vzhledem k podobnému protrombogennímu působení přes rezistenci na aktivovaný protein C se trombogenní potenciál této kombinace faktorů násobí. Kombinace heterozygotní formy Leidenské mutace a HAK zvyšuje riziko trombózy přibližně 10-30x⁷¹ (tab.2), V případě homozygotní formy je riziko zvýšeno více jak 100x⁷¹. V absolutních číslech je to přibližně 33/10000/rok. Kombinace mutace f.V Leiden a těhotenství přináší zvýšení rizika VTE na přibližně 100/10000/rok⁵⁶.

U protrombinové mutace je riziko trombózy zvýšeno přibližně 7-16x^{71, 72}. Vlivem kvantitativní změny proteinů koagulační kaskády na riziko trombózy u uživatelék HAK se zabývala práce z r.2003⁷³. Vyšší riziko trombózy je spojeno se vzestupem faktorů II, VIII, IX, X, XI. V kombinaci s HAK byly nejrizikovější zvýšené koncentrace fII, V, VIII a XI (tab.3).

Tabulka č. 2: Riziko trombózy u pacientek s HAK a Leidenskou mutací v heterozygotní formě ⁶⁶

Mutace f.V Leiden	HAK	Relativní riziko	95% interval spolehlivosti	Incidence na 10000/rok
-	-	1,0		0,8
-	+	3,7	2,2-6,3	3,0
+	-	6,9	1,8-28,3	5,7
+	+	34,7	7,4-224	28,5

Tabulka č. 3: Rizika zvýšených koagulačních faktorů a HAK ⁷³

faktor	Poměr šancí (HAK + zvýšená koncentrace faktoru)
II	10,1
V	12,6
VIII	7,9
XI	11,9

Deficit proteinů C, S nebo antitrombinu také zvyšuje riziko trombózy u pacientek užívajících HAK. Jejich zastoupení v populaci je ale oproti ostatním faktorům poměrně nízké (do 0,2%) ⁴⁸. Je tedy nepochybné, že užívání HAK s sebou nese i riziko VTE. Preventivní screening trombofilní stavů před předepsáním HAK však není prováděn a byl by ekonomicky náročný ⁷⁴. Wu et al, 2006 doporučují preventivní screening trombofilních stavů jen u pacientek s pozitivní rodinnou anamnézou VTE. Efektivita tohoto doporučení však nebyla v některých jiných pracích prokázána ⁷⁵. Rekurence trombóz na podkladě HAK byla dokonce nižší než v případě idiopatických trombóz ⁷⁶. Přesto by pacientky s anamnézou VTE na podkladě HAK neměly dále antikoncepci užívat. Riziko rekurence je 97/10000/rok. V případě dalšího užívání antikoncepce se toto riziko zvyšuje na 273/10000/rok ⁷⁷.

Antikoncepce je hlavním rizikovým faktorem také u CVT ^{3, 78, 79}. V metaanalýze z r.2006 ²¹ vyšel poměr šancí pro riziko CVT u uživatelék HAK oproti pacientkám bez HAK 5,59 (95% CI 3,95 - 7,91). V kombinaci s dalšími rizikovými faktory se poměr šancí zvyšuje na 19, 5, 30 a 79,3 pro hyperhomocysteinémii, mutaci faktoru V Leiden a protrombinovou mutaci ²¹. Těhotenství a doba poporodní jsou také rizikovými faktory CVT. Těhotenství je příčinou CVT v 6,3% a doba poporodní v 13,8% případů ^{3, 80}.

Zvýšené riziko VTE s sebou nese i užívání hormonální substituční terapie v přechodu (HRT). Riziko trombózy je u uživatelů zvýšeno přibližně 2x⁸¹. Riziko dále narůstá s věkem, obezitou a přítomností Leidenské mutace. Podkladem zvýšeného rizika VTE při hormonální substituci v přechodu je nejspíše elevace prokoagulačních faktorů VII, VIII, IX, X, XII a XIII a snížení antitrombinu a proteinu S^{82, 83}. Užívání hormonální terapie v přechodu s sebou nese i malé riziko výskytu nádorů prsu - pro kombinovanou hormonální substituci byl poměr rizik (HR) 1,26⁸⁴. Toto riziko je stejně velké jako např. časná menarché, rodinná anamnéza nádoru prsu nebo postmenopauzální obezita⁸⁵. Je navíc pravděpodobné, že nasazení hormonální substituce v přechodu pouze stimuluje již přítomný hormon-dependentní tumor a nepodmiňuje jeho vznik de novo. Toto potvrzuje i fakt, že většina nádorů je diagnostikována časně po nasazení této léčby a po vysazení četnost nově diagnostikovaných nádorů prsu opět klesá⁸⁶. Prognóza těchto nádorů je díky časnější diagnostice a citlivosti na hormonální terapii relativně příznivá⁸⁵.

3.2.2 Maligní onemocnění

Jako první upozornil na spojení trombembolie a maligních onemocnění v r. 1865 Trousseau, který popsal spojení migrující tromboflebitidy s maligním onemocněním gastrointestinálního traktu⁸⁷. V následujících dekáдах byl tento vztah mnohokrát potvrzen. Maligní onemocnění zvyšují riziko trombózy více způsoby. Pacienti s nádorovým onemocněním podstupují četné chirurgické zákroky s následnou imobilizací, jsou v riziku útlaku cév nádorovou masou, mají zavedeny katetrové systémy a dostávají cytochemickou terapii. Dalším predisponujícím faktorem je i přímá invaze nádoru do cév s poškozením endotelu a zvýšená produkce prokoagulačních a fibrinolytických faktorů. Jsou zde zastoupeny všechny 3 klasické rizikové faktory VTE – krevní stáza, poškození endotelu i prokoagulační posun hemostatické rovnováhy. Zvýšenou aktivaci hemostatického systému a její vztah k mortalitě a malignitě popisuje např. studie z r. 2004⁸⁸. Ve skupině zdravých mužů s aktivací hemostatického systému (měřeno protrombinovými fragmenty 1+2 a fibrinopeptidemA) byla během sledovací doby 3x vyšší mortalita na nádorová onemocnění než v kontrolní skupině. Dalším možným mechanismem aktivace koagulace je zvýšení koncentrace koagulačních faktorů V, VIII, IX a XI a tkáňového

faktoru, který má zřejmě největší vliv⁸⁹. Tkáňový faktor za normálních okolností není exprimován na povrchu krevních buněk ani endotelu. Jeho expresi indukují zánětlivé cytokiny (interleukin 1 β , TNF- α , bakteriální liposacharidy aj.). U nádorových buněk je ale exprimován i bez vnějšího stimulu⁹⁰. Vyšší exprese tkáňového faktoru koreluje s vyšší incidencí VTE u tumorů pankreatu a ovárií^{91, 92}. U pacientů s nádorovým onemocněním je v periferní krvi zvýšené množství takzvaných mikropartikulí s tkáňovým faktorem. Tyto mikropartikule vznikají odštěpením části buněčné membrány mateřské buňky, jejíž povrchové znaky nesou a to včetně tkáňového faktoru. Mikropartikule nevznikají jen z krevních elementů ale také ve zvýšené míře z nádorových buněk. Jejich množství pozitivně koreluje s rozsahem nádorové masy a klesá pro chirurgických resekcí^{93, 94}. Množství mikropartikulí také koreluje s incidencí VTE. V publikaci Zwicker et al., 2009 bylo ve skupině pacientů s malignitou a detekovatelnými mikropartikullemi s tkáňovým faktorem roční incidence VTE 34% oproti 0% u pacientů bez těchto mikropartikulí⁹⁴.

Riziko VTE je u pacientů s nádory zvýšeno v průměru 7x, záleží na typu tumoru jeho rozsahu a lokalizaci⁹⁵. Přítomnost VTE je také prediktorem vyšší mortality v prvním roce po stanovení diagnózy⁹⁶. Toto riziko navíc zvyšují časté komorbidity těchto pacientů, především vyšší věk a častá imobilita. Vyšší je také riziko rekurence VTE. Pozorování Prandoniho et al., 2002 zjistila poměr rizik roční rekurence VTE u pacientů s nádory na 3.2 (95% CI, 1.9-5.4)⁹⁷. Vyšší byl i poměr rizik pro riziko významného krvácení (2.2 (95% CI, 1.2-4.1)). Autoři shrnují, že pacienti s nádory mají vyšší riziko trombózy, rekurence VTE i závažného krvácení.

V r. 2008 skupina autorů navrhla prediktivní model pro VTE asociovanou s chemoterapií (viz tab. 4). Riziko tromboembolie bylo do 1% ve skupině s nízkým rizikem (skóre = 0), 1,8 - 2% ve střední skupině (skóre 1 - 2) a přibližně 7% ve vysoce rizikové skupině (skóre > 3)⁹⁸.

Tabulka č. 4: Prediktivní model pro VTE asociovaný s chemoterapií ⁹⁸

	Skóre
Lokalita nádoru	
- Vysoce riziková lokalita (žaludek, pankreas)	2
- Riziková (plíce, lymfomy, žlučník, gynekologická oblast, testes)	1
Hemoglobin < 100g/L	1
Leukocytóza před chemoterapií > 10x10 ⁹ /L	1
BMI > 35kg/m ²	1

V případě CVT hrají malignity menší roli. Dle studie Ferro et al., 2004 jsou malignity příčinou 7,3% případů mozkových trombóz ³.

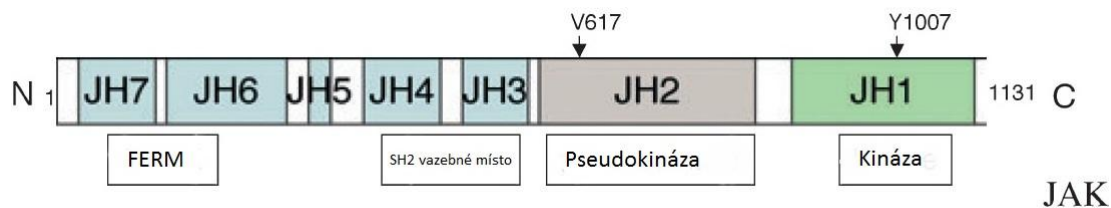
3.2.3 Ostatní získané trombofilní stavy

Získaných rizikových faktorů žilní trombembolie je v literatuře popsána řada. Riziko VTE vzrůstá s věkem. V porovnání incidence VTE u 25ti letých a 85ti letých je toto riziko VTE zvýšeno 80x ⁹⁹. Dalším častým faktorem je imobilizace, která se navíc obvykle kombinuje např. s chirurgickým zákrokem a hospitalizací. U hospitalizovaných pacientů (do 2 týdnů) nad 65 let bylo riziko VTE zvýšeno 6x v porovnání s pacienty bez hospitalizace ¹⁰⁰. K dalším rizikovým faktorům VTE patří srdeční selhání, chronická obstrukční plicní nemoc, nefrotický syndrom, diabetes, cévní mozková příhoda, autoimunitní onemocnění aj.. Starší nemocní obvykle mívají více jak 1 rizikový faktor. Prevalence 2 a více faktorů je 35% u lidí mezi 40 - 59lety a narůstá až k 80% u pacientů nad 80 let ¹⁰¹. S věkem klesá svalová síla, klesá účinnost svalové pumpy dolních končetin a spolu s chronickou venózní insuficiencí tyto faktory vedou ke krevní stáze. V cévní stěně ubývá svalových vláken, přibývá kolagenu a klesá antikoagulační schopnost endotelu ¹⁰². Spojení mikroalbuminurie, jako markeru endoteliálního poškození, a VTE prokázala práce z r. 2009 ¹⁰³. Stáří je též vázáno k vyššímu výskytu maligních onemocnění. Na druhou stranu malignity ve stáří nemívají tak agresivní průběh jako u mladších pacientů. Např. u plicních nádorů byl právě mladší věk spojen s vyšším rizikem VTE ¹⁰⁴.

4 Mutace JAK2

Janus kinázy patří do rodiny intracelulárních tyrosinových kináz. U savců existují celkem 4 Janus kinázy – JAK1, JAK2, JAK3 a TYK 2. Vyskytují se na všech buňkách s výjimkou JAK 3 kinázy, která je přítomna pouze na hemopoetických buňkách¹⁰⁵. Každá obsahuje celkem 7 domén, z nichž první na C-terminálním konci je charakteru tyrozinkinázy (JH1- JAK homology 1) následovaná druhou doménou bez katalytické aktivity – pseudokinázou (JH2) (obr. 1.). Pseudokináza hraje důležitou regulační roli. Při laboratorních pokusech, kdy byla funkčně vyřazena pseudokináza, došlo k výraznému zvýšení aktivity tyrozinkinázy (JH1 doména). To vedlo ke zjištění, že pseudokináza má za normálních podmínek inhibiční vliv na funkci kinázy. Následují další domény (JH3 - JH7) obsahující SH2 vazebné místo a FERM doménu, která zprostředkovává vazbu na cytokinový receptor. Spojení aktivní kinázy s inaktivní pseudokinázou dalo kinázám jméno po římském bohu Janusovi (bůh počátku a konce všech věcí, ochránce dveří a bran a zároveň bůh vchodu a východu - proto zobrazován se dvěma tvářemi, z nichž jedna hledí kupředu, druhá dozadu). Na počátku devadesátých let byla prokázána účast JAK kináz v intracelulárním přenosu signálu po aktivaci interferonového receptoru. Následně byl tento mechanismus přenosu intracelulárního signálu potvrzen i pro interleukiny, kolonie stimulující faktory, erythropoetin, a další krevní působky^{106, 107}.

Obrázek č. 1: Základní schéma JAK kinázy. Je zobrazeno místo mutace JAK2 V617F a fosforylační místo Y1007¹⁰⁷

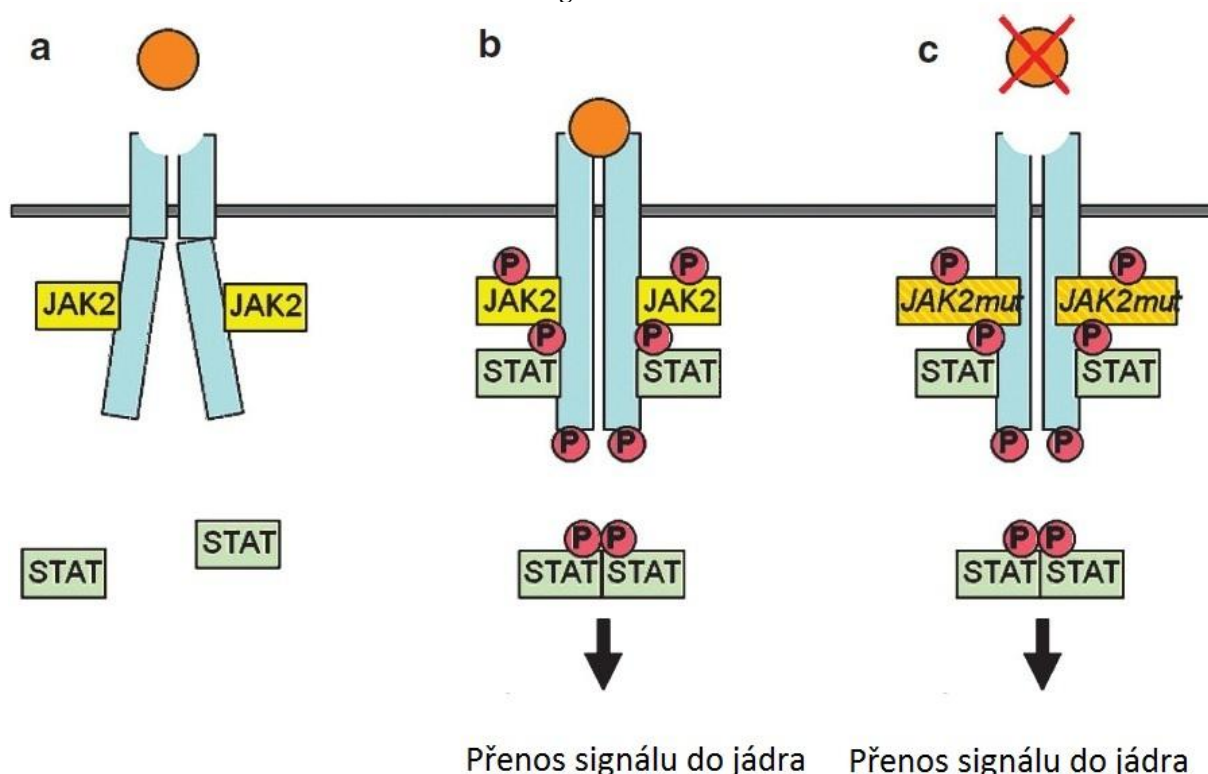


Přenos signálu v buňce je zajišťován soustavou přenašečů STAT (signal transducers and activators of transcription). Ty existují v monomerní nefosforylované podobě v buněčném cytosolu. Aktivace a fosforylace JAK kináz vede k připoutání STAT k JAK přes SH2 vazebné místo a následně k jejich dimerizaci a fosforylaci. Následuje přenos STAT molekul do buněčného jádra, kde je stimulována transkripce DNA (obr. 2). Aby nedošlo k excesivní aktivaci a amplifikaci signálu, který by mohl vést k autoimunitním poruchám nebo k malignímu zvratu, je buňka vybavena několika regulačními mechanismy. Patří sem skupina tyrosin fosfatáz, proteinových inhibitorů aktivovaných STAT (PIAS), SLIM (STAT interacting LIM protein) a exprese SOCS (supressor of cytokine signalling) ^{107, 108}.

Zvýšená činnost JAK kináz může vést i ke vzniku maligních onemocnění. Mechanismem může být zvýšená aktivace kinázy při porušeném inhibičním působení JH2 domény nebo ostatních inhibičních mechanismů a/nebo genetický defekt, vedoucí ke vzniku fúzních genů. (TEL-JAK2, BCR-JAK2, PCM1). Ty jsou pak konstitučně aktivovány a vedou k nekontrolovanému dělení buňky. (Obdoba fúzního genu BCR/ABL u chronické myeloidní leukémie vedoucí k vzniku hyperaktivní tyrozinkinázy) ¹⁰⁷.

Významnou roli hraje JAK2 kináza u myeloproliferativních onemocnění (MPD – mealoproliferative disease). Jedná se především o bodovou mutaci na pozici 617, kdy je valin zaměněn za fenylalanin – mutace JAK2 V617F. Výskyt mutace se u jednotlivých MPD liší. U polycytémia vera je mutace přítomna u více jak 90% případů, u esenciální trombocytémie nebo idiopatické myelofibrózy v přibližně 40-50% ¹⁰⁹.

Obrázek č. 2: a) cytokinový receptor existuje jako dimer bez kinázové aktivity, b) Navázaný ligand způsobí konformační změnu receptoru a tím i fosforylaci JAK a STAT, c) mutovaná JAK2 kináza zůstává aktivní i bez navázaného ligandu ⁶



Z přítomnosti JAK2 negativních myeloproliferací vyplývá, že mutace JAK2 V617F není jedinou příčinou vzniku MPD (myeloproliferativní onemocnění). Výzkum proto pokračoval hledáním dalších mutací zodpovědných za MPD. Byly identifikovány mutace JAK2 v exonu 12 (více jak 30 mutací), především u pravé polycytémie (přibližně 3% případů pravé polycytémie), mutace MPL (gen kódující receptor pro trombopoetin, vyskytující se především u primární myelofibrózy), LNK mutace, TET2 mutace a další ^{109, 110}. Zajímavé je, že mutace JAK2 exonu 12 i JAK2 V617F jsou přítomny i u refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty a trombocytózou (RARS-T). Tato jednotka tak nejspíše představuje překrývající se syndrom myeloproliferativního a myelodysplastického syndromu. Z pohledu této práce je však podstatnější, že mutace JAK2 V617T (na rozdíl od mutací exonu 12) se vyskytuje ve zvýšeném množství u trombóz neobvyklých lokalizací – především u splachnických trombóz (Budd-Chiariho syndrom a trombóza portální žíly) -viz níže.

Trombóza představuje hlavní příčinu morbidity a mortality u MPD. Prevalence trombózy je 2,5-5% ročně u pravé polycytémie a 1,9-3% ročně u esenciální

trombocytémie v závislosti na rizikových faktorech. Z venózních trombóz dominuje u pacientů s myeloproliferativním onemocněním DVT, častěji u pacientů s pravou polycytémií a primární myelofibrózou. U esenciální trombocytémie bývají časté symptomy z postižení mikrocirkulace – např. erytromelalgie, zrakové a sluchové výpadky, bolesti hlavy nebo periferní parestázie ¹¹¹. Rekurence trombózy dosahuje 5,6% ročně a 10-ti letá pravděpodobnost rekurence je přibližně 50% ¹¹². Většina trombóz u MPD je především arteriálních (60 -70% případů) - akutní infarkt myokardu, ischemické cévní mozkové příhody a okluze periferních tepen. Právě riziko arteriálních trombóz vedlo k rozdělení pacientů do rizikových skupin. Předchozí trombóza a věk nad 60 let řadí pacienty do vysoce rizikové skupiny. Tyto dva rizikové faktory se dále kombinují se standardními rizikovými faktory arteriálních trombóz (hypercholesterolemie, diabetes, arteriální hypertenze, kouření). Správné zhodnocení rizika by mělo vést k adekvátní antiagregační nebo antikoagulační terapii spolu s léčbou MPD ¹¹¹.

Patogeneza trombózy u MPD je multifaktoriální ¹¹³. Vliv má vysoký hematokrit (nad 60%), hyperviskozita, kvalitativní změny trombocytů (změny membránových glykoproteinů, snížení funkce GP Ib receptoru a GP IIb-IIIa receptoru, zvýšená exprese GP IV receptoru) a leukocytóza nad $9 \times 10^9/L$, která byla potvrzena jako nezávislý rizikový faktor trombózy. Leukocyty zvyšují riziko trombózy produkcí prokoagulačních látek, přímým působením na destičky a cévní stěnu a tvorbou agregátů destiček s neutrofily ^{114, 115}.

4.1 JAK 2 a trombózy :

Podezření na trombofilní vliv mutace JAK2 vzniklo na podkladě spojitosti vysokého počtu JAK2 pozitivních MPD a častých trombóz. Nese-li ale samotná mutace trombofilní potenciál nebo je vyšší incidence trombóz dána jen fenotypovým projevem myeloproliferací (i bez mutace JAK2) není jasné. Od r. 2004, kdy byla mutace JAK2 V617F identifikována především u pacientů s pravou polycytémií, tuto otázku řešilo více autorů ¹¹⁶⁻¹¹⁸. U pacientů s esenciální trombocytémií byla podle Campbella et al., 2005 (806 pacientů) mutace JAK2 spojena se signifikantně vyšší koncentrací hemoglobinu a množstvím neutrofilů, nižším množstvím erytropoetinu a ferritinu a vyšším množstvím venózních trombóz v roce před

diagnózou ¹¹⁹. V následném období byl sice výskyt VTE číselně vyšší u pacientů s mutací JAK2, tento rozdíl ale nebyl signifikantní. Rozdíl ve výskytu arteriálních trombóz zaznamenán nebyl ¹¹⁹. Další práce souvislost trombózy a mutace JAK2 potvrdily s poměrem šancí přibližně 2,3 pro venózní trombózu a 1,8 pro arteriální trombózu ¹¹⁶⁻¹¹⁸. Pacienti s homozygotní formou mutace JAK2 měli riziko trombózy a rekurence vyšší než pacienti s heterozygotní formou mutace nebo bez ní ¹¹¹. Vyšší procento mutované alely je také spjato s vyšším věkem, delším trváním choroby, vyšším množstvím leukocytů a vyšším hematokritem, tedy faktory, které již byly identifikovány jako rizikové pro VTE. Samotný efekt mutace JAK2 na riziko VTE je proto často zpochybňován. Práce Carobbiho et al., 2007 JAK2 mutaci jako rizikový faktor trombózy nepotvrdila ¹²⁰. Obdobný závěr potvrzují i jiné práce ^{121, 122}. Tyto práce však nerozlišují arteriální a venózní trombotické příhody. Vliv mutace JAK2 na riziko trombózy tak zatím zůstává nejasný.

Dle recentních prací se zdá, že v případě klasické DVT je výskyt mutace JAK2 velmi malý, blíží se výskytu u běžné populace. Lauw et al., 2011 zjistil přítomnost mutace JAK2 u 2,3% pacientů (179 pacientů) ¹²³.

Práce Rodgera et al., z téhož roku (503 pacientů) udává prevalenci mutace JAK2 pouze 0,2% ¹²⁴. Metaanalýza Dentaliho et al., 2009 zahrnující 1293 pacientů s DVT nebo plicní embolií identifikovala JAK2 mutaci u 0,88% případů ¹²⁵. Je tedy pravděpodobné, že prevalence mutace JAK2 u venózních trombóz běžných lokalizací se pohybuje do 1%. Tento výskyt se blíží prevalenci mutace JAK2 ve zdravé populaci, kterou práce autorů Xu et al., 2007 na skupině 3935 čínských dárců krve vyčíslila na 0,96% ¹²⁶. Podle autorů Lauw et al., 2011 je v kontrolním souboru zdravých dárců (Nizozemí) výskyt JAK 2 mutace 0,5% ¹²³.

Mechanismy, jimiž mutace JAK2 působí zvýšení rizika trombózy, jsou zatím předmětem výzkumu. Byly navrženy některé hypotézy jak vysvětlit trombogenní vliv mutace JAK2. Přítomnost mutace JAK2 zvyšuje adhezivitu červených krvinek u pravé polycytémie ¹²⁷. Proces buněčné adheze je zprostředkován pomocí selektinů, membránových glykoproteinů na povrchu endotelu (E-selektin), leukocytů (L-selektin) a destiček (P-selektin). V klidové fázi je P-selektin přítomen v membráně alfa-granulí trombocytů. Na povrch destičky se P-selektin dostává až po stimulaci, např. trombinem ¹²⁸. Práce z r. 2007 (Xu et al) se zabývala právě výskytem P-selektinu (jako markeru aktivace destiček) u MPD v závislosti na mutačním stavu JAK2 kinázy. Plazmatický P-selektin byl signifikantně vyšší u pacientů s MPD

v porovnání s kontrolami. Signifikantně vyšší byl také u pacientů s mutovanou JAK2 kinázou než u pacientů bez mutace¹²⁹. Vyšší zastoupení povrchového P-selektinu u pacientů s esenciální trombocytémií a mutovanou JAK2 kinázou v porovnání s kontrolami bez mutace JAK2 potvrdily jiné práce^{128, 130, 131}. Množství P-selektinu bylo vyšší i u pacientů s anamnézou VTE. Na zvýšeném riziku trombózy se může podílet i zvýšené množství integrinu CD11b na povrchu leukocytů. Tento integrin je zodpovědný za adhezi leukocytů s endotelem a destičkami, zvyšuje schopnost fagocytózy a degranulace leukocytů¹²⁸. Leukocytóza spolu s tvorbou agregátů destiček a leukocytů byla prokázána jako rizikový faktor VTE u pacientů s MPD (viz výše). Dále bylo u pacientů s mutací JAK2 zachyceno vyšší množství destičkového membránového tkáňového faktoru¹³¹.

4.2 JAK2 a trombózy neobvyklých lokalizací

Zvýšený výskyt mutace JAK2 v případě trombóz běžných lokalizací nebyl prokázán (viz výše). Toto však neplatí pro trombózy neobvyklých lokalizací – především pro splachnické trombózy (Budd-Chiariho syndrom, trombóza v. portae a přilehlých žil (extrahepatální okluze portální žíly, trombózy mezenterických žil), ale i pro trombózy mozkových splavů a trombózu retinálních žil. Relativně menší incidence těchto trombóz v porovnání s klasickou DVT komplikuje provedení větších prospektivní studií. Přesto je již k dispozici celá řada menších studií a metaanalýz (viz níže), které se této problematice věnují. Budd-Chiariho syndrom má roční incidenci 0,4-0,8/milion obyvatel a prevalenci 1,4 na milion obyvatel¹³². Extrahepatální okluze portální žíly má roční incidenci přibližně 4/milion obyvatel a trombóza mezenterické žíly 27/milion obyvatel^{132, 133}. Zajímavé je i porovnání prevalence mutace JAK2 u trombóz různých lokalizací. Poměr šancí výskytu mutace JAK2 u splachnické trombózy v porovnání s DVT byl 11,9 (CI 1,74-81,97, p=0,0117), u CVT 4,2 (CI 1,8-9,44, p=0,0005)⁵.

Na vzniku trombóz ve splachnické oblasti se podílejí tradiční faktory venózní trombembolie - tedy poškození endotelu (např. extravaskulární kompresí - nádory, nebo při parazitární infekci, abscesu, cystách, aj.), krevní stáza (venookluzivní choroba jater, srdeční selhání, jaterní cirhóza) nebo trombofilní stav. Uplatňují se zde trombofilní faktory vrozené i získané. Mutace protrombinu je pravděpodobně častější

u extrahepatální obstrukce portální žíly, Leidenská mutace u Budd-Chiariho syndromu; deficit proteinu C, S a antitrombinu jsou často ovlivněny horší funkcí jater^{132, 134}. Ze získaných faktorů je často zjišťováno užívání hormonální antikoncepce, těhotenství a puerperium, autoimunitní choroby, antifosfolipidový syndrom nebo se uplatňují i další faktory. Zdaleka nejčastější etiologický faktor u splachnické venózní trombózy je latentní nebo již diagnostikovaná myeloproliferace a s ní související mutace JAK2. Autoři Qi et al., 2011 provedli metaanalýzu a zjistili, že mutace JAK2 je přítomna u 37% pacientů s Budd-Chiariho syndromem a u 24% pacientů s extrahepatální okluzí portální žíly (bez ohledu na myeloproliferativní onemocnění)⁵. Většina prací se zaměřuje na přítomnost mutace JAK 2 bez splnění diagnostických kritérií MPD. Prevalence mutace JAK2 u těchto pacientů je 26% pro Budd-Chiariho syndrom a 19% pro extrahepatální okluzi portální žíly⁵. Vyšetřování mutace JAK2 u pacientů s již diagnostikovaným MPD dříve nemělo praktický klinický význam. U pacientů bez MPD však přítomnost mutace JAK2 znamená zvýšené riziko přechodu do myeloproliferativního onemocnění a tudíž i jiný přístup v léčebné strategii. (Poměr šancí pro přechod do MPD při výskytu mutace JAK2 z Budd-Chiariho syndromu je 10.77, 95% CI: 1.75–66.35 a z extrahepatální jaterní obstrukce 14.22, 95% CI: 3.67–55.12)⁵. Tito pacienti by měli být častěji sledováni včetně vyšetření kostní dřeně. S příchodem nových léků – inhibitorů JAK2 kinázy se znalost mutačního stavu JAK2 kinázy stává zajímavou i u pacientů s již diagnostikovaným MPD.

Výskyt mutace JAK2 u centrální žilní trombózy v přítomnosti a nepřítomnosti MPD je stále předmětem diskuze. Její výskyt je zřejmě menší, než v případě splachnické venózní trombózy, ale vyšší než u klasické trombózy hlubokých žil⁵. Poměr již diagnostikovaných a latentních myeloproliferativních onemocnění při CVT je zatím nejasný.

5 Diagnostika :

5.1 Rentgenové metody

Diagnostika mozkových trombóz je založena na zobrazovacích metodách. Dnešní metody se nezaměřují jen na samotné zobrazení trombózy, ale i na případné parenchymové komplikace – nitrolební krvácení, mozkový edém, transtentoriální herniace aj. Dříve používaná angiografie (používána byla digitální subtrakční angiografie) zůstává sice možnou alternativou, běžně se však již pro svou náročnost a invazivnost nepoužívá. Trombozovaný sinus zde byl zachycen buď jako úplný nebo částečný výpadek v náplni nebo jako zpomalení toku kontrastní látky. Anatomické odchylky snižují specifitu metody. Nejčastější abnormalitu - hypoplazii příčných splavů či ageneze jednoho splavu bylo pro angiografii často nemožné odhalit. Na konci devadesátých let minulého století se s rozvojem počítačové tomografie staly základem diagnostiky CT skeny mozku, které mohou být provedeny ihned na urgentním příjmu. Diagnostika CVT na snímcích počítačové tomografie se opírá buď o přímý průkaz trombozovaného sinu nebo o nepřímé známky trombózy². Postižený splav je hyperdenzní, mohou být zachyceny i ischemické změny parenchymu. Podání kontrastní látky (CT- venografie) odhalí trombotizovaný splav nejlépe. Typický je příznak delta – hyperdenzní náplň horního šípového splavu s defektem, kde může být i patrna trombóza jako výpadek v náplni („empty delta sign“) ¹³⁵. Tento příznak je přítomen u zhruba 20% případů a obvykle vymizí do 2 týdnů. Mezi nepřímé známky trombózy, které by měly vést k důslednějšímu vyhledávání trombózy patří především mozkový edém, nebo edém mozkových gyrů, venózní infarkty, mozkové krvácení, zúžení mozkových komor nebo zvýraznění kolaterálního venózního oběhu ¹³⁶.

Vyšetření počítačovou tomografií zobrazí lépe rozsah trombózy, jako je tomu i v případě arteriálních cévních mozkových příhod. Patofyziologie parenchymových komplikací mozkových venózních trombóz a arteriálních trombóz se liší. Změny v parenchymu jsou obvykle následkem vazogenního edému nebo mozkového krvácení. Prvotní příčinou obou těchto komplikací je zvýšení venózního tlaku, následně dochází k tvorbě kolaterál. Záleží na umístění a rozsahu trombózy, zda-li tento kolaterální systém bude dostatečný k odvodu venózní krve z mozku. Schaller et al., 2003 se zaměřili na výzkum parenchymových komplikací na zvířecím modelu ¹³⁷. Zjistili, že trombózy přední části horního šípového splavu nejsou obvykle vázány

s většími parenchymovými komplikacemi. Je zde množství možných kolaterál přes kortikální žilní systém. Naopak okluze zadní části horního šípového splavu je svázána s větším vzestupem venózního tlaku a následných komplikací. Samotná trombóza (na rozdíl od trombembolie při arteriálním iktu) vzniká po delší dobu a umožní tak otevření kolaterálního systému. I tak může narůstat venózní tlak, čímž dochází k poklesu perfúzního tlaku a následné mozkové ischemii, jak popsali Mahmoud et al., 2009¹³⁵. Tyto změny se však vyvíjejí postupně a jsou reverzibilní. Pokud nedojde k rekanalizaci nebo dostatečnému vývoji kolaterál, ischemická tkáň propadá nekróze a zvyšuje se i riziko krvácení. Mahmoud et al., 2009 také prokázali ve studii s 20 pacienty při nekontrastním CT vyšetření přítomnost hemoragických infarktů v 60%, nehemoragických infarktů v 30% a u 10% pacientů byl nález na mozkovém parenchymu normální¹³⁵. K podobným výsledkům došla i studie autorů Khandelwal et al., 2006, která navíc porovnávala vyšetření CT-venografií a MR-venografií¹³⁸. Obě tyto metody jsou dle této studie srovnatelné při diagnostice CVT. Mají obdobnou specifitu i senzitivitu, která se mírně liší podle lokalizace trombózy. Studie k porovnání CT venografie a digitální subtrakční angiografie také prokázala spolehlivost CT venografie v diagnostice CVT¹³⁹. Autoři dále zdůrazňují přínos CT venografie především v rychlosti a dostupnosti pro pacienta. Tato metoda nevyžaduje dlouhý statický pobyt jako přístroje magnetické rezonance, který může být pro často dezorientovaného pacienta v akutní fázi neakceptovatelný. CT-venografii lze navíc provést i u pacientů s kovovými implantáty. Nevýhody CT-venografie jdou dány použitou metodou, tedy zátěží rentgenovým zářením. Ionizující záření je nevhodné pro těhotné ženy a není vhodné ani k častějšímu sledování vývoje CVT (pro vysokou zátěž ionizačním zářením).

Zásadní přínos diagnostiky CVT pomocí počítačové tomografie je právě v zobrazení parenchymu mozku. Jeho poškození je totiž u CVT poměrně časté – jedná se především o parenchymové krvácení, mozkový edém, transtentoriální herniaci nebo ložiska ischemie. Odhalení těchto komplikací je přitom pro následnou volbu terapie zásadní. Na rozdíl od arteriálních cévních mozkových příhod lze parenchymové komplikace při CVT efektivně léčit v delším časovém úseku¹³⁶.

Lokalizace parenchymových změn napomáhá i k určení trombozovaného sinu. Například parasagitální postižení doprovází postižení horního šípového splavu, temporoparietální lokalizace je spojena s postižením příčných splavů a postižení thalamu nebo mozečku signalizuje obvykle trombózu hlubokého žilního systému

mozku^{135, 136, 140}. Další úskalí diagnostiky CVT spočívá v anomáliích žilního systému. Obzvláště složité je odlišit hypoplastický žilní splav od trombózy¹⁴¹⁻¹⁴³. Hypoplastický splav vzniká nejspíše již během embryonálního vývoje. Zpomalení krevního toku v hypoplastickém sinu pravděpodobně vede ke krevní stáze a tím i k predispozici této strany.

5.2 Ultrazvukové vyšetření

Ultrazvukové vyšetření intrakraniálních splavů není běžným vyšetřovacím standardem. Vyšetření má několik limitací. Nelze je použít pro hlubší mozkové žíly a nehodí se ani pro horní šípový splav. Používá se transkraniální dopplerovský ultrazvuk. Přístup je přes temporální akustické kostní okno (esovitý sinus a oblast karotického sifonu), kolem očnice (sinus cavernosus) nebo přes spánek (příčný splav)¹⁴⁴. Senzitivita tohoto vyšetření pro diagnostiku CVT se pohybuje mezi 73% a 100%, specificita od 65% do 80%^{145, 146}. Podobně jako u diagnostiky pomocí počítačové tomografie i zde existují přímá a nepřímá kritéria trombózy¹⁴⁴. Přímou lze zobrazit trombózu jako deficit barevného signálu v sinu. Částečnou trombózu nebo hypoplazii sinu ale takto diagnostikovat nelze. Nepřímé známky zahrnují především průkaz kolaterálního oběhu – zvýšení průtoku ostatními žilami (objem i rychlost toku), retrográdní směr toku a významný stranový rozdíl (nad 50%). Jedním z možných využití ultrazvuku u mozkových trombóz je sledování obnovy průtoku v trombotizovaném žilním systému. Na rozdíl od tradičních zobrazovacích metod popisuje ultrazvuk skutečný žilní tok v reálném čase a tak je vhodnější k reálnému posouzení funkčního stavu žilního systému¹⁴⁷. Stolz et al., 2002 popsali na sérii 26 pacientů, že úvodní normální nález nebo normalizace původně patologického nálezu během 90 dnů pozitivně koreluje s dobrou prognózou

¹⁴⁸.

Ultrazvukové vyšetření je speciální metodou využitelnou při diagnostice a sledování CVT. Má velmi dobrou sensitivitu i selektivitu a může být využito i k posouzení funkčního stavu mozkového žilního

5.3 Magnetická rezonance

Základem diagnostiky CVT je dnes magnetická rezonance. Není sice k dispozici na všech pracovištích, ale vzhledem k bezpečnosti této metody je vhodnější zejména ke dlouhodobějšímu sledování. Na urgentním příjmu je často jako metoda první volby zvoleno CT mozku, které je však při podezření na trombózu sinu doplněno vyšetřením magnetickou rezonancí.

Magnetická rezonance stejně jako počítačová tomografie dokáže zobrazit i parenchymové komplikace trombóz (krvácení, infarkty, mozkový edém a jejich kombinace). Základem diagnostiky je přímé zobrazení splavu s trombem. Používá se magnetická rezonance - venografie. Trombozovaný sinus se zde jeví jako výpadek v jeho náplni ².

Kochhar et al., 2006 se zabývali přínosem zobrazení arteriálního systému pro diagnostiku CVT ¹⁴⁹. Vzhledem k zvýšenému venóznímu tlaku v případě CVT dochází k zpomalení arteriálního toku krve. Stáza arteriální krve způsobuje její desaturaci, což se jeví při vyšetření magnetickou rezonancí změnou na venózní typ signálu. Autoři spočítali senzitivitu tohoto vyšetření na 60% při specificitě 100%. Pozitivní prediktivní hodnota byla 100%, negativní prediktivní hodnota 55%. U pacientů s edémem papily zrakového nervu byla arteriální kontaminace zachycena častěji (66%).

5.4 D-dimery

Nespecifičnost příznaků mozkových žilních trombóz vede k hledání jednoduchého vyšetření, které by mohlo CVT vyloučit. Stávající diagnostika pomocí zobrazovacích metod je stále vázána na drahé přístrojové vybavení a není vždy rychle dostupná. Nejčastější symptom CVT - bolest hlavy - často ani nevede k zahájení vyšetřovacího procesu. Jedním z rychle dostupných a levných laboratorních testů je vyšetření D-dimerů. V případě VTE běžných lokalizací (především hluboká žilní trombóza a plicní embolie) již byla prokázána vysoká negativní prediktivní hodnota tohoto vyšetření ¹⁵⁰. V případě DVT koncentrace D-dimerů pozitivně koreluje s rozsahem trombózy, je vyšší v případě proximálních trombóz (nad kolenem) než u trombóz distálních ¹⁵¹. Trombózy mozkových splavů se

ale od trombóz dolních končetin výrazně liší – například rozsahem žilního řečiště, stěnou vén, nepřítomností chlopní, rozdílným gravitačním gradientem atd. – jak již bylo uvedeno výše. Mozkové trombózy jsou navíc často diagnostikovány až v chronickém stádiu nebo jako náhodný nález při jiné indikaci vyšetření. Vyšetřením D-dimerů u CVT se zabývá více autorů¹⁵²⁻¹⁵⁷. Většina prací se shoduje na přínosu vyšetření D-dimerů k vyloučení CVT pro vysokou negativní prediktivní hodnotu. Nicméně výsledky nejsou tak přesvědčivé jako v případě DVT. Crassard et al., 2005 uvádí 10% falešně negativních výsledků¹⁵⁶. Ve skupině pacientů s CVT, jejichž jediným příznakem byla bolest hlavy, bylo až 26% falešně negativních výsledků, zatímco ve zbytku souboru pouze 4%. Z toho lze usuzovat, že samotná bolest hlavy bez dalších symptomů je spojena s menším rozsahem trombózy a tudíž i nižší hodnotou D-dimerů. Stejně tak orální antikoncepce, jako jediný rizikový faktor je častěji spjata s lehčími klinickými projevy a vyšší četností negativního výsledku vyšetření D-dimerů¹⁵⁶. Časový faktor také negativně koreluje s množstvím D-dimerů (zde je tomu stejně jako v případě DVT)^{158, 159}. Práce se často liší v zařazení pacientů, u nichž lze předpokládat elevaci D-dimerů i z jiných příčin (např. malignity, těhotenství, záněty aj.). V neposlední řadě hodnotu D-dimerů ovlivňuje i hormonální antikoncepce sama, toto však ve všech studiích zohledněno nebylo. Metaanalýza autorů Dentali et al., 2011 prokazuje výslednou senzitivitu D-dimerů u CVT na 89,1%¹⁶⁰. U souboru pacientů s delší dobou od diagnózy byla senzitivita 83,1% a u pacientů s izolovanou bolestí hlavy jen 81,6%. Výsledky senzitivity se mezi pracemi lišily (senzitivita v rozmezí 60-100%)¹⁶⁰. Relativně velké rozmezí výsledků je dáno rozdíly mezi pracemi, především zařazením či vyřazením skupin pacientů, u nichž lze předpokládat elevaci D-dimerů i bez CVT, způsobem zařazení chronických CVT a CVT s lehkým průběhem.

Dalším zajímavým výsledkem těchto studií je zjištění, že poměr suspektních a skutečně prokázaných CVT byl 10%¹⁵⁵ a 16%¹⁵⁷. Z toho lze uzavřít, že při podezření na CVT s typickými příznaky je skutečná šance diagnostikovat CVT mezi 10% a 20%.

5.5 Střední objem trombocytu (MPV)

Destičky mají zásadní roli v tvorbě krevního koagula. Udržují celistvost cévní stěny již v prvních okamžicích poškození a napomáhají iniciovat následnou koagulační kaskádu. Jsou to bezjaderné krevní elementy, které se v cirkulující krvi vyskytují v různém množství a velikostech. Tyto parametry jsou dány rychlostí jejich produkce z megakaryocytů a jejich destrukce v cévním řečišti¹⁶¹. Tvorba trombocytů je regulována trombopoetinem, jenž se zvýšeně vyplavuje při poklesu počtu destiček¹⁶². Dalšími možnými faktory, které ovlivňují tvorbu trombocytů jsou např. granulocyty-kolonie stimulující faktory, interleukiny nebo oxidy dusíku¹⁶¹. Tyto působky se zvýšeně uvolňují při endoteliální dysfunkci – typicky v případě diabetu, ischemických cévních mozkových příhod¹⁶³ nebo u kardiálních ischemiích při zátěžových testech¹⁶⁴. Objem a tvar destiček se také zvyšuje v průběhu jejich aktivace. Větší destičky obsahují více granul, tromboxanu A₂, serotoninu i ATP, exprimují více adhezních molekul (P-selektin GpIIb/IIIa) a některé práce skutečně prokázaly jejich větší prokoagulační potenciál¹⁶⁵. Klinický význam těchto laboratorních nálezů je proto stále předmětem výzkumu¹⁶⁶. Největší počet prací se soustřeďuje na problematiku MPV u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a s diabetem. MPV se zvyšuje u kardiaků po zátěžovém testu¹⁶⁴. Jiné práce potvrdily zvýšené MPV u pacientů s akutním infarktem myokardu a angínou pectoris¹⁶⁷. Zvýšený MPV je u těchto pacientů rizikovým faktorem nekoreluje však s místem ani s rozsahem trombózy¹⁶⁸. U pacientů po perkutánní koronární plastice je riziko retrombózy vyšší u pacientů s vyšším MPV^{167, 169}. U diabetiků MPV pozitivně koreluje s koncentrací glykovaného hemoglobinu. V případě lepší kompenzace diabetu klesá i MPV¹⁷⁰. Obdobná zjištění byla publikována i v případě obezity, hypercholesterolemie, kouření nebo metabolického syndromu¹⁶¹. Hodnota MPV je také rizikovým faktorem cévní mozkové příhody. Studie Bath et al., 2004 na 383 pacientech s cévní mozkovou příhodou prokázala vztah k MPV - relativní riziko mozkové příhody stoupá o 11% při vzestupu MPV o 1 femtolitr¹⁷¹. Jiné studie se zabývaly vztahem MPV a klinickým výstupem u pacientů s cévní mozkovou příhodou. V případě studie Butterworth et al., 1998, kde klinický stav byl hodnocen pomocí mRS systému (modified Rankin scale), byla závislost MPV a mRS prokázána¹⁷². V předchozích studiích však tento vztah potvrzen nebyl^{173, 174}.

Jednou z možných příčin často odlišných nebo i protichůdných výsledků je systém odběru a zpracování vzorků. Při použití odběrového systému s EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) dochází v prvních 39 hodinách k zvýšení objemu destiček o přibližně 17% („otoku destiček“, měřeno impedanční metodou), následně se objem opět vrací k původní hodnotě. Alternativou může být odběr do citrátového média. Uvedenou chybu vyšetření je však lehce možné vyloučit vyšetřením MPV do dvou hodin po odběru. Zásadní je ale i použitá metoda měření. V případě optické metody dochází nejdříve k poklesu MPV o přibližně 22%¹⁷⁵. Je tedy patrné, že k správné interpretaci výsledků je nutný i jednotný systém odběru a měření MPV.

Vztah venózní trombózy a MPV je složitější. Většina prací vychází z předpokladu, že větší destičky mají i vyšší hemostatický potenciál – zda-li však jde o příčinu nebo následek trombózy zatím není jasné. Populační prospektivní studie Braekkan SK et al., 2010 na 27158 obyvatelích potvrzuje MPV jako rizikový faktor VTE¹⁷⁶. Výsledky jsou však těsně za hranicí statistické významnosti. Navíc do studie byli zahrnuti i pacienti s předchozí arteriální trombózou, což může výsledky zkreslit. Jiná populační studie Biino G et al., 2011 na 11084 obyvatelích souvislost MPV a trombózy (arteriální nebo žilní) neprokázala a uzavírá, že zvýšení MPV je spíše následkem než příčinou trombózy¹⁷⁷. Obě studie se shodují, že existuje nepřímá úměra mezi počtem destiček a jejich MPV. U pacientů s již diagnostikovanou žilní trombózou je MPV v porovnání s kontrolami statisticky významně vyšší^{178, 179}. U pacientů s plicní embolií je vyšší MPV prediktorem časné smrti a je též spojen s komorovou dysfunkcí¹⁸⁰. U pacientů s CVT zatím nebyla publikována pozorování popisující změny MPV.

6 Klinické známky CVT

Klinický obraz je extrémně variabilní - s akutním, subakutním i chronickým průběhem. Jsou možné spontánní remise, ale i progresivní zhoršování, které může skončit smrtí. Různé kombinace současného postižení mozkových splavů, kortikálních i hlubokých mozkových žil jsou důvodem toho, proč klinický obraz CVT postrádá jakýkoli typický obraz, jako tomu bývá v případě arteriální okluze.

Nejčastějším a často i jedním příznakem CVT je bolest hlavy. Je přítomna u přibližně 90% případů CVT. Její příčinou je zvýšení nitrolebního tlaku a lokální stimulace bolestivých receptorů v dura mater při distenzi trombozovaného sinu^{181, 182}. Bolest může začít akutně nebo mít pozvolný začátek, poté obvykle graduje. Dalšími častými příznaky jsou zánikové nebo iritační ložiskové příznaky - hemiparézy, fatické poruchy, hemianopsie, mnestické poruchy a/nebo konvulzivní projevy (až u 40 %), které mohou být i tranzitorní. Jejich asociace s bolestí hlavy a zhoršenou úrovní vědomí by k podezření na CVT měla vést. Další častou klinickou manifestací je izolovaný syndrom nitrolební hypertenze, častý (45 %) zejména u izolované trombózy laterálního splavu (sinus transversus a sigmoideus), s malou pravděpodobností vývoje žilního infarktu a epileptických projevů (3 %) ^{79, 183}. Byla popsána i další spojení typických příznaků a lokalizací trombóz mozkových splavů. Například trombóza kavernózního sinu a oční příznaky, trombóza sagitálního sinu a motorické deficity s epileptoidními záchvaty nebo trombóza levého transverzálního sinu a afázie². Postižení hlubokého žilního systému CNS je obvykle spjata s velmi závažnými projevy - především psychickými změnami, oboustranným motorickým deficitem, nebo i kómatem, Velmi závažné je poškození parenchymu, pro které jsou typické záchvaty až status epilepticus. S největším rizikem pozdní či špatné diagnózy jsou spojeny projevy subakutní difúzní encefalopatie, bez jasného fokálního nálezu či syndromu nitrolební hypertenze.

Tabulka č. 5: Klinický nález u pacientů s CVT³

Bolest hlavy	88,8%
Epileptický záchvat	39,3%
Paréza	37,2%
Edém zrakové papily	28,3%
Psychické změny	22%
Afázie	19,1%
Porucha vědomí	13,9%
Diplopie	13,5%
Ztráta zraku	13,2%

U starších osob jsou projevy izolované intrakraniální hypertenze vzácné (8 % vs 24 % u mladších), ale může dojít k různým změnám mentálního stavu a poruchám vigility (43 % vs 20 % u mladších) ¹⁸⁴. Výsledkem kongesce v žilním systému je žilní infarkt, někdy hemoragický – u 34 % až 46 % nemocných ³. Bývá provázen ložiskovými příznaky a vzniká častěji při větším rozsahu trombózy, současném postižení hlubokého žilního systému a/nebo rychlém vývoji CVT, protože se nestačí otevřít kolaterály, které mozek do jisté míry chrání před kongescí v žilním systému. Průměrná doba od vzniku potíží k přijetí do nemocnice je 4 dny a asi 14 % nemocných při přijetí má různě hlubokou poruchu vědomí ⁷⁹. Všechny tyto symptomy nejsou specifické jen pro CVT. Lez předpokládat, že velká část pacientů s běžnou bolestí hlavy nebo nevýrazným klinickým nálezem může zůstat nedagnostikována. Jak již bylo uvedeno v kapitole o D-dimerech, jen u 10-20% pacientů s typickou symptomatologií CVT je trombóza skutečně diagnostikována.

7 Terapie CVT

7.1 Antikoagulační léčba

Terapie CVT není založena na jasných doporučeních vyplývajících z randomizovaných studií, ale především na zkušenostech s léčbou trombóz jiných lokalizací. Na rozdíl od těchto trombóz je ale terapie CVT komplexní záležitostí. Nejedná se pouze o antikoagulační léčbu ale o soubor život zachraňujících opatření zahrnujících intubaci, umělou ventilaci, protizáchvatovou terapii, antiedematózní, chirurgickou a podpůrnou léčbu ¹⁸⁵. Základem kauzální terapie CVT je zabránit další progresi trombózy a urychlit její regresí. Na druhou stranu je zde riziko parenchymového krvácení, které může být nadměrnou antikoagulační léčbou podpořeno. Dle výsledků největší publikované studie u pacientů s CVT je parenchymové krvácení přítomno v 40-50% nově diagnostikovaných případů CVT ³. Jaké je riziko antikoagulační terapie a je-li v těchto případech přínosná lze soudit jen z kazuistických případů nebo menších sérií pacientů. Byly publikovány dvě studie ^{186, 187} a jejich metaanalýza ¹⁸⁸ srovnávající léčbu heparinem a placebem. První studie srovnává 20 pacientů (10 pacientů s nefrakcionovaným heparinem oproti deseti pacientům s placebem) se statisticky významně lepším výsledkem ve skupině

léčených heparinem. Autoři také nepotvrdili spojitost parenchymového krvácení a celkového stavu po trombóze. Práce uzavírá, že přítomnost parenchymového krvácení by neměla být kontraindikací antikoagulační terapie. Druhá práce ¹⁸⁷ porovnává terapii nízkomolekulárními hepariny u 30 pacientů a 29 kontrol s obdobnými výsledky (13% ireverzibilních poškození mozkových funkcí v léčené skupině oproti 21% v neléčené). Léčba hepariny (nefrakcionovaný nebo nízkomolekulární) je proto doporučována i při výskytu parenchymového krvácení ¹⁸⁹. Studie srovnávající terapii nefrakcionovaným a nízkomolekulárním heparinem pro CVT nejsou k dispozici. Obdobné studie pro extracerebrální trombózy prokázaly vyšší efektivitu nízkomolekulárního heparinu ¹⁹⁰. U pacientů v závažném stavu, kde není možné vyčkávat efektu terapie hepariny je možné zahájit radikálnější léčbu formou trombolýzy. Efektivnost a bezpečnost tohoto postupu nebyla nikdy ověřena. Chybí i data porovnávající trombolýzu a běžnou antikoagulační léčbu hepariny. Takováto studie se však nyní připravuje ¹⁹¹.

7.2 Intervenční terapie

Trombolýza urokinázou byla poprvé použita v r 1988, postupem času byla nahrazena rekombinantním aktivátorem tkáňového plazminogenu (rtPA). V každém případě je nutné před podáním trombololytika transvenózní zavedení katétru do místa trombózy. Používá se Fogartyho katetr cestou femorální nebo jugulární žíly. Trombololytikum je podáváno přímo do místa trombózy buď jako bolus nebo jako kontinuální infúze po dobu několika hodin nebo dnů. Přes 86% takto léčených pacientů má dobrou prognózu ¹⁹². Metodou volby je balónková trombektomie. Byly popsány dobré výsledky se speciálními nástroji, např. Rheolytický systém AngioJET firmy firmy Possis Medical, Minnesota, MN, USA (využívá kombinace přetlaku a podtlaku na konci katetru zavedeného skrz trombus k odsátí sraženiny) nebo mechanický systém pomocí tzv. Merci katetru (Concentric Medical, California, USA) ¹⁸⁵. S tímto katétre jsou dobré zkušenosti na našem pracovišti. Všechny tyto systémy mají urychlit rekanalizaci žilního systému v porovnání s konzervativní léčbou hepariny nebo samotnou trombolýzou. Endovaskulární metody s sebou nenesou zvýšené riziko poranění cévy a intrakraniální hemoragie. Balónková

trombektomie je spojena s častější reokluzí vény, nicméně v 88% případů vede k zlepšení stavu pacienta ¹⁹³.

7.3 Podpůrná léčba

Léčba CVT je komplexem opatření zahrnujících nejen kauzální terapii trombózy, ale vzhledem k zranitelnosti mozkové tkáně také řadu opatření zabraňujících dalšímu poškození mozku. Nejčastější a důležitou složkou podpůrné léčby je terapie epileptických záchvatů, které se jako příznak CVT vyskytují u 35-50% případů ³. Epileptické záchvaty se častěji vyskytují u pacientů s postižením horního šípového splavu, kortikálních žil, s ložiskovými příznaky a při krvácení do mozkového parenchymu. Výjimečný není ani status epilepticus. Masuhr et al., 2006 zjistili ve studii se 194 pacienty s CVT, že k epileptickým záchvatům docházelo ve 44% případů ¹⁹⁴. U 12,8% z nich se vyskytl status epilepticus, který byl spojen s 3x vyšší letalitou nežli je obecně udáváno. Autoři doporučují antiepileptickou profylaxi u rizikových pacientů – pacientů s poškozením parenchymu, krvácením do parenchymu, při motorických nebo senzitivních výpadcích a u trombózy kortikálních žil. Tito autoři doporučují také prolongovanou antiepileptickou terapii pro pacienty se status epilepticus a při krvácení do mozkového parenchymu. V ostatních případech se antiepileptická terapie ukončuje po 3 měsících ¹⁹⁴.

Nejzávažnějším nálezem u pacientů s CVT je transtentoriální herniace mozku, která je často i příčinou smrti. Tyto případy jsou obvykle spjaty s jednostranným rozsáhlým hemorhagickým infarktem, který znemožňuje zahájení trombolýzy ¹⁹⁵. Nejrychlejší (a často jedinou možnou) terapií je neodkladná dekompresní hemikraniektomie. Prvním příznakem herniace bývá často komprese třetího hlavového nervu s dilatací zornic, horšení stavu vědomí a středočárový posun při zobrazení mozku na CT nebo pomocí magnetické rezonance. Lath et al., 2010 udávají nutnost hemikraniektomie u 10% případů CVT se smrtností 27% ¹⁹⁶. Jiná práce autorů Theaudin et al., 2010 u pacientů se závažnou CVT, u kterých byla indikována hemikraniektomie, uvádí letalitu 12,5% a pokud neprovedli dekompresní hemikraniektomii byla smrtnost 100% ¹⁹⁷. Rozdíl v letalitě mezi studii může být dán malým vzorkem pacientů a rozdílným prostředím (Indie/Francie). Obě práce i

CVT guidelines z r. 2010 se shodují na doporučení dekompresní hemikraniektomie u pacientů s prokázanou transtentoriální hernií jako život-zachraňujícím výkonem¹⁸⁹.

8 Prognóza

Prognóza CVT byla do poloviny 20 století nepříznivá, s udávanou letalitou 40-80%. Na takto špatných výsledcích se podílel především nedostatek vhodných diagnostických metod, kdy CVT byla diagnostikována většinou až post mortem. S lepšími možnostmi diagnostiky jsou rozpoznávány i méně rozsáhlá poškození a celková prognóza CVT se radikálně změnila. Dnes má dobrou prognózu přes 80% případů, 6% pacientů má jen mírné obtíže¹⁹⁸. Doživotní závažné následky vykazují 5% případů. Smrt v důsledku CVT je udávána podle různých autorů v 3-15% případů; v případě největší evropské studie ISCVT ve skupině 624 pacientů byla zjištěna úmrtnost v 3,4% případů³. Jiné studie se ale kloní spíše k vyšší letalitě - nad 10%^{4, 199}. Rizikovými faktory časné smrti je trombóza hlubokého žilního systému mozku, porucha vědomí, koma a krvácení do mozkového parenchymu. Příčinou smrti je nejčastěji krvácení do mozkového parenchymu s elevací intrakraniálního tlaku a transtentoriální hernií mozku. Na fatální prognóze se podíleli i jiné komplikace – např. status epilepticus nebo plicní embolie. V chronické fázi (nad 30 dnů od diagnózy) jsou příčinou smrti jiná, obvykle maligní onemocnění. Bolest hlavy je nejčastější dlouhodobý následek CVT (až v 44% případů)²⁰⁰. Obdobně časté jsou i psychické změny, nejčastěji charakteru depresí nebo úzkostí. Pozdní epileptické záchvaty jsou popisovány u 10% pacientů v prvním roce po příhodě (viz výše).

Jako rizikové faktory dlouhodobých následků byly identifikovány: nádorová onemocnění, infekce CNS, trombóza hlubokého žilního systému CNS, intrakraniální krvácení, porucha vědomí nebo koma při přijetí, věk nad 37 let a mužské pohlaví¹⁹⁹. Z těchto rizikových faktorů vychází i navrhovaný skórovací systém pro prognózu CVT²⁰¹. Systém má dobrou prediktivní hodnotu pro pacienty s dobrou prognózou (96%), spolehlivě odlišit pacienty se špatnou prognózou ale nelze.

Klinický význam rekanalizace trombozovaných sinů není dořešen. Byla popsána řada případů bez rekanalizace, kde došlo k úplné úpravě stavu. K rekanalizaci dochází zpravidla v prvních třech měsících od diagnózy²⁰². Parciální nebo kompletní

rekanalizace dosáhne 85% pacientů. Putaala et al., 2010 zjistili, že věk nad 37 let a chronický začátek CVT jsou rizikové faktory pro parciální nebo žádnou rekanalizaci²⁰³. Reziduální bolest hlavy je častější u pacientů s horší rekanalizací^{203, 204}.

9 Cíle práce

Centrální venózní trombózy jsou pro svou nízkou incidenci stále málo známým onemocněním. Oproti trombózám jiných lokalizací je zde řada rozdílných biologických i fyzikálních faktorů, které ovlivňují vznik trombu. Jejich četnost je známa jen z několika málo větších prací, menších sérií a jejich metaanalýz.

Primární cíle studie

- Ověřit četnost výskytu a klinický význam JAK2 mutace u mozkových trombóz
- Posoudit výskyt a význam genetických abnormalit a vrozených a získaných trombofilních faktorů pro CVT

Sekundární cíle studie

- Zjistit nejčastější symptomatologii CVT (diagnostický a prognostický dopad)
- Ověřit význam klinických ukazatelů (doba do přijetí, vývoj klinického stavu, typ terapie, výsledný klinický stav)
- Ověřit význam laboratorních ukazatelů (D-dimery, krevní obraz)
- Zhodnotit význam rekanalizace a počet rekurencí CVT.

10 Soubor

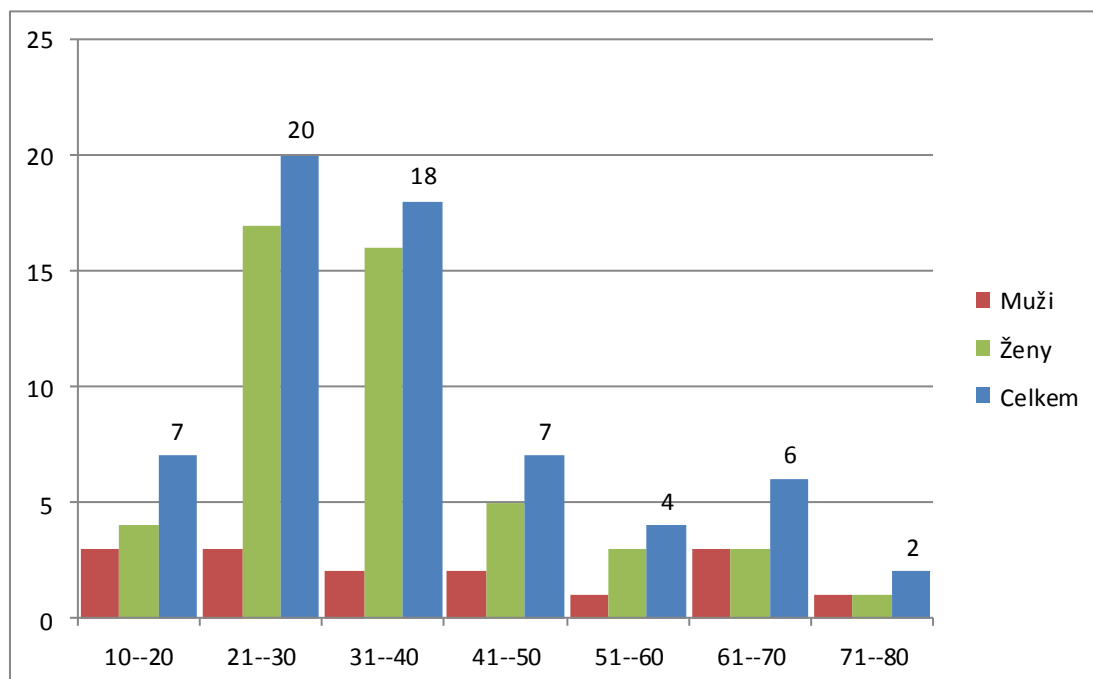
Získávání údajů bylo provedeno podle původního plánu studie, tj. menší část retrospektivně – pacienti léčení před zahájením studie (za období od r. 2000 - 2007) a těžiště bylo položeno na pacienty zařazované prospektivně během studie při jejich léčbě:

- a) Retrospektivně (v období před zahájením studia) bylo zařazeno:
 - z registru Fakultní nemocnice Hradec Králové – 18 pacientů s CVT
 - z registru Pardubické krajské nemocnice, a.s. – 5 pacientů s CVT
- b) Prospektivně – v průběhu studie 1.7.2007 – 30.3.2012 bylo zařazeno 41 pacientů Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Všichni pacienti (i retrospektivně zařazení z Pardubické nemocnice) byli osobně vyšetřeni po zahájení studie autorem této práce. Byl také proveden odběr na JAK2 mutaci a doplněn chybějící trombofilní screening (Leidenská mutace, mutace protrombinu, vyšetření proteinu C, S, antitrombinu, vyšetření na antifosfolipidový syndrom, koncentrace homocysteinu).

Kritériem pro zařazení do zkoumaného souboru byla prokázaná trombóza splavů CNS (a to podle klinických příznaků a CT skenů nebo magnetické rezonance), dostupnost anamnestických dat a laboratorních vyšetření. Celkem bylo ke konci studie (březen r. 2012) zařazeno 64 pacientů s prokázanou CVT. Tři pacienti byli ze studie vyřazeni - jeden pacient studii odmítl, u dvou pacientů nebylo k dispozici potřebné množství údajů a nebylo možné pacienty kontaktovat k doplnění odběrů. Základní data souboru - viz tabulka č.6, graf č.1.

Graf č. 1: Soubor pacientů dle věku

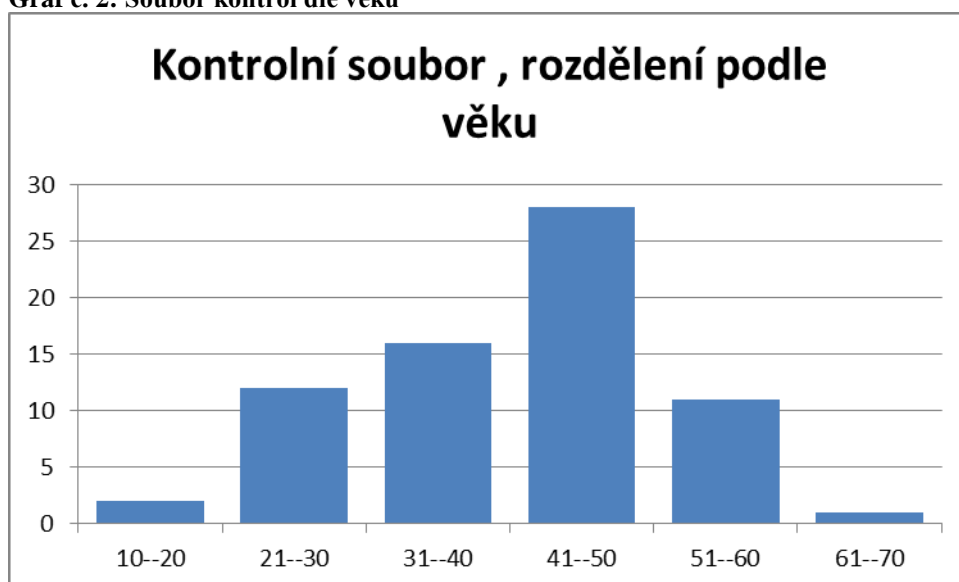


Tabulka č. 6: Základní charakteristika souboru pacientů

	Průměrný věk	Směrodatná odchylka	Medián	Minimum	Maximum	Počet (%)
Celkem	36,1	16,14	32	17	78	64
Muži	40,6	20,3	32	17	73	15 (23)
Ženy	34,7	14,6	32	17	78	49 (77)

Kontrolním souborem byla skupina dárců Transfúzního oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové. Po podrobném a srozumitelném poučení a vysvětlení účelu odběru (především odběru na JAK2) byl s dárci podepsán Informovaný souhlas. V průběhu března 2012 byla odebrána krev od 70 po sobě následujících dárců a provedena vyšetření na JAK2 mutaci a vyšetření krevního obrazu. Jedná se o zcela zdravé jedince (bez hluboké žilní trombózy v anamnéze). Základní data souboru - viz tab. č.7, graf č.2. Náklady na vyšetření mutace JAK2 u zdravých kontrol byly hrazeny z výzkumného záměru II. interní kliniky FN v Hradci Králové.

Graf č. 2: Soubor kontrol dle věku



Tabulka č. 7: Základní charakteristika souboru kontrol

	Průměrný věk	Směrodatná odchylka	Medián	Minimum	Maximum	Počet (%)
Celkem	40,9	10,3	42	19	61	70
Muži	43	10	43,5	19	61	20 (29)
Ženy	40,1	10,4	42	20	56	50 (71)

11 Metodika

Data od pacientů byla přepsána do jednotné databáze a vyhodnocena v posledním půl roce výzkumu.

Klinická vyšetření byla zaměřena na získání zejména těchto údajů:

- anamnestické údaje: osobní a rodinná anamnéza (zvláště detaily o žilních trombózách), rizikové situace pro možnost vzniku trombóz (jako např. operace, imobilizace nebo obecně větší traumata, nádory aj.), užívání hormonálních preparátů - ať z důvodu antikoncepce nebo substituční terapie v přechodu a jejich časová souvislost s trombózou
- z informačních systémů nemocnice s přihlédnutím k údajům od pacientů byla určena doba od příznaků k diagnóze, příznaky trombózy, průběh hospitalizace, typ a délka podané terapie a klinický stav při dimisi
- během následných kontrol byl podrobně sledován vývoj klinického stavu, rekanalizace trombózy při kontrolní magnetické rezonanci, parametry krevního obrazu a další provedená laboratorní vyšetření
- byly sledovány a odděleně hodnoceny případy rekurence trombózy v CNS i mimo něj a provedeno potřebné doplnění trombofilního screeningu.

K finálnímu hodnocení byla použita stupnice zveřejněná skupinou autorů v časopise Blood z roku 2006 viz tabulka č.8²⁰⁵. Při přijetí prospektivně sledovaných nově diagnostikovaných pacientů s diagnózou CVT do FN Hradec Králové byla kromě základních hematologických a biochemických ukazatelů provedena tato laboratorní vyšetření:

Leidská mutace, protrombinová mutace, množství proteinů C, S a antitrombinu, protrombinový čas, aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT), aPTT citlivé na lupus antikoagulans, test s jedem Russelovy zmiže (dRVVT), koncentrace fibrinogenu, homocysteinu, D-dimery (metodika hematologické laboratoře FN Hradec Králové - viz příloha). Parametry krevního obrazu byly provedeny na přístroji Sysmex XE-2100 dle doporučení výrobce a MPV byl měřen impedanční metodou. Protilátky proti Beta2-glykoproteinu I a antikardiolipinové protilátky byly vyšetřeny na Ústavu klinické imunologie a alergologie FNHK. Mutace JAK2 byla odebrána následně, až během kontroly v hematologické ambulanci FNHK.

Vzhledem k odlišnostem metodik v laboratořích ve FN Hradec Králové a Krajské nemocnice Pardubice nebyly laboratorní výsledky D-dimerů, a parametrů KO v akutní fázi získané od pacientů z pardubické nemocnice zahrnuty do statistického zpracování.

Tabulka č. 8: Stupnice závažnosti výsledného stavu mozkových příhod (modified Rankin scale systém) ²⁰⁵

0	Bez příznaků
1	Bez výraznějšího omezení, schopen vykonávat všechny obvyklé denní potřeby a aktivity
2	Lehká invalidita: neschopnost vykonávat všechny dříve obvyklé aktivity, schopen vykonávat všechny své potřeby bez dopomoci
3	Mírná invalidita: vyžaduje pomoc, ale je schopen chůze bez dopomoci
4	Středně těžká invalidita: neschopnost chůze bez dopomoci, neschopnost vykonávat tělesné potřeby bez dopomoci
5	Těžká invalidita: upoután na lůžko, inkontinentní, vyžaduje nepřetržitou péči
6	Smrt

11.1 Vyšetření mutace JAK2

Vyšetřování mutace JAK2 V617F probíhalo metodou Real-time PCR v laboratorní části II. interní kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. DNA byla izolována z 200 μ l krve antikoagulované K₃EDTA pomocí soupravy NucleoSpin® Blood (Macherey-Nagel, Bethlehem, USA) dle manuálu výrobce. Vzorek byl ihned po odběru zamrazen na -20st. Celsia a skladován do doby vyšetření. Byla použita PCR reakční směs ve složení (na 1 reakci): Voda pro PCR 6 μ l, zásobní roztok primerů (10 μ M) 1 μ l, zásobní roztok sond (6 μ M) 1 μ l, reakční směs ABsolute™ QPCR Mix (Thermo Scientific, Cambridge, Británie) 10 μ l. (Složení primerů a sond - viz tab.9). Směs je připravena na počet reakcí, který se rovná dvojnásobku analyzovaných vzorků (vše analyzováno v „dubletách“) + 8 reakcí (pozitivní kontroly, kontrola bez templátu a jedna reakce jako objemová záloha). Reakční směs je rozpipetována po 18 μ l do připravených mikrozkuvek v chladícím bloku pro přípravu PCR. K reakčním směšem jsou přidány 2 μ l analyzované templátové DNA, popř. kontrol, které jsou tvořeny plasmidovou DNA obsahující pouze divokou alelu JAK2, směs divoké a mutované alely 98:2 (test citlivosti metody) a směs 1:1 (pozitivní kontrola). Do jedné zkuvky není přidána žádná DNA a slouží jako kontrola, že reakční směs nebyla kontaminována nechtěnou

DNA. Analýza probíhá v přístroji Rotor-Gene 6000 5-plex+HRM (Corbett Life Science, Valencia, USA). V přístroji probíhá denaturace DNA, annealing primerů a amplifikace dle schématu v tab. č.10. Hranice positivity určuje rozdíl mezi nemutovanou kontrolou a pozitivní kontrolou s 2% mutované alely.

Poznámka: Finanční zajištění vyšetření mutace JAK2 u kontrolního souboru bylo hrazeno z výzkumného záměru pracoviště (II. interní klinika FNHK)

Tabulka č. 9: Složení primerů a sond k vyšetření JAK2 V617F mutace

Primery	Jak2-JM-F: agcagcaagtatgatgagc
	Jak2-JM-R: gatgctctgagaaaggcat
Sondy	Jak2-JM-WT: FAM-cacaG+aC+A+cA+tA+ctc-BHQ1
	Jak2-JM-Mut: JOE-ctccA+C+agA+A+aC+atac-BHQ1

Tabulka č. 10: Reakční podmínky pro PCR

1x	95 °C	15 min	Aktivace enzymu	
50x	95	10 s	Denaturace DNA	
	65 °C	30 s	Annealing primerů	Načtení dat kanálů pro zelenou a žlutou barvu
	72 °C	25 s	Amplifikace	

11.2 Statistická analýza

Vyšetření JAK 2 mutace bylo provedeno v hematologické laboratoři Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Pacient byl označen jako JAK2 pozitivní, přesáhla-li kvantita mutace detekční mez 2% (kvantita mutace dále hodnocena nebyla). Počty negativních a pozitivních pacientů a kontrol byly vloženy do kontingenční tabulky a byla provedena analýza Fisherovým přesným testem. Ke zjištění statistické významnosti rozdílů byl u hodnot stejné skupiny použit párový t-test, u dvou různých skupin nepárový t-test, v případě porušení normality neparametrický Mann – Whitney test. Použitá hladina významnosti: $p = 0,05$. Statistické zpracování bylo konzultováno před zahájením výzkumu i při hodnocení výsledků na Ústavu lékařské biofyziky Lékařské fakulty v Hradci Králové. Testování provedeno v programu SigmaStat 3,5 pro Windows. Datové grafy byly zpracovány v programu Microsoft Excel. Významné výsledky jsou barevně označeny.

12 Výsledky

12.1 JAK2

Na JAK2 mutaci bylo celkem vyšetřeno 55 pacientů, z toho 12 mužů (21%) a 43 (78%) žen. Pozitivní nález byl u 5 z nich (1 muž + 4 ženy). V kontrolním souboru bylo vyšetřeno 70 pacientů, z toho 20 mužů (29%) a 50 žen (71%). Pozitivní nebyl ani jeden vzorek kontrolního souboru. K vyhodnocení byl použit Fisherův přesný test.

U jedné pacientky byla přítomna esenciální trombocytémie již před mozkovou příhodou. Vzhledem ke klinickému významu testování mutace JAK2 u CVT byl test přepočítán s vyřazením této pacientky. Ze zbývajících 4 pacientů 2 dosáhli diagnostických kritérií MPD do doby ukončení studie (1x polycytemia vera, 1x esenciální trombocytémie), u dalšího pacienta je podezření na začínající myeloproliferaci (suspektní pravá polycytémie).

Tabulka č. 11: Srovnání JAK2 pozitivních pacientů a kontrol, všichni vyšetření

JAK2	Pozitivní+	Negativní-
Pacienti	5	50
Kontroly	0	70

p=0,015

Výsledek statistického hodnocení:

Ve výskytu mutace JAK2 je mezi pacienty a kontrolami rozdíl, **p=0,015**.

Tabulka č. 12: Srovnání JAK2 pozitivních pacientů a kontrol, s vyřazením již diagnostikovaného myeloproliferativního onemocnění

JAK2	Pozitivní+	Negativní-
Pacienti	4	50
Kontroly	0	70

p=0,034

Výsledek statistického hodnocení:

Ve výskytu mutace JAK2 je mezi pacienty po vyřazení již diagnostikovaného myeloproliferativního onemocnění a kontrolami rozdíl, **p=0,034**.

Na základě výše uvedených šetření (viz tabulka č. 11 a 12) lze uzavřít:

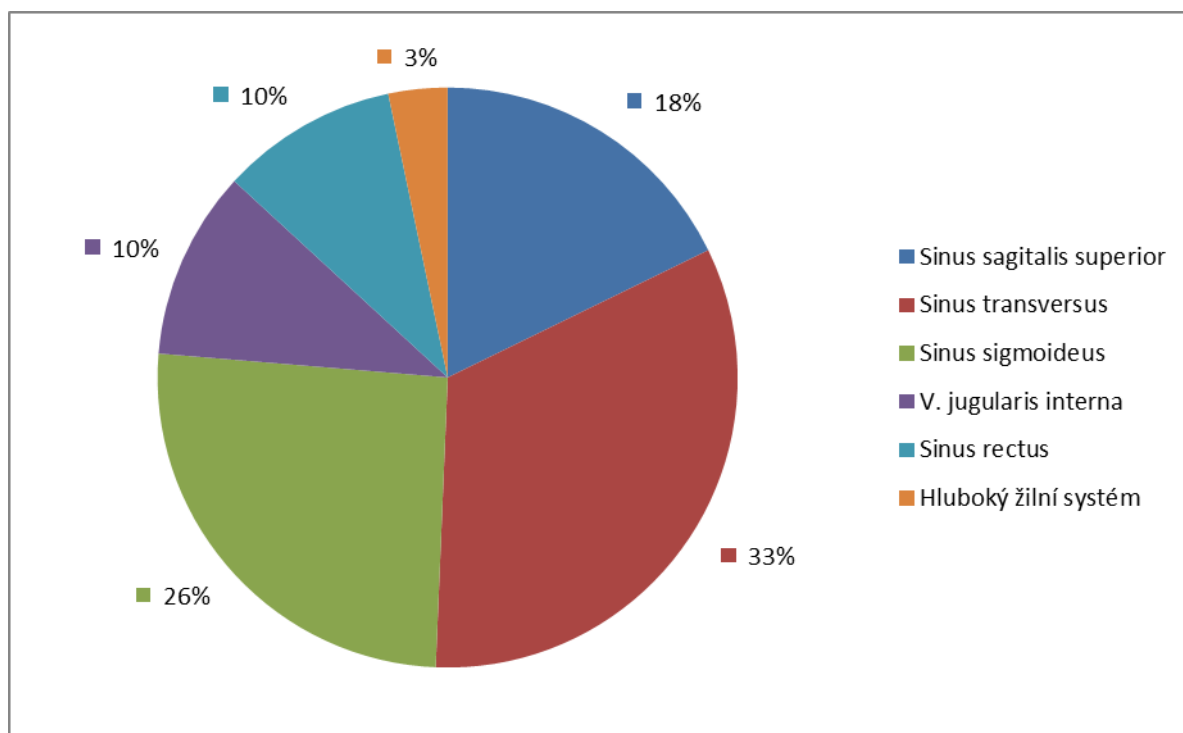
Byl zaznamenán rozdíl ve výskytu mutace JAK2 u pacientů s CVT a kontrol.

12.2 Typ postiženého sinu

Údaje o postižení jednotlivých splavů byly získány z výsledků zobrazovacích vyšetření. V 10 případech se jednalo o počítačovou tomografii - angiografii (CTAg) i magnetickou rezonanci-angiografii (MRAg), ve 3 případech pouze o CTAg vyšetření a v 51 případech pouze o MRAg. Ve většině případů bylo postiženo více splavů najednou (56 pacientů). Postižení pouze horního šípového splavu bylo v 7 případech., jednou byl zachycena pouze trombóza hlubokého žilního systému CNS.

Pokud jde o lateralizaci - 9x byl nález symetricky oboustranný (tj. např. oba příčné splavy), ve všech ostatních případech (55 pacientů) šlo o kombinované postižení více různých splavů na obou stranách nebo postižení horního šípového splavu. V nálezech na magnetické rezonanci dominovalo postižení levé strany (vlevo: 34/64 vs vpravo: 13/64), $p < 0,003$. Procentuální zastoupení postižených splavů zobrazuje graf č. 3.

Graf č. 3: Zastoupení postižených splavů



12.3 Parametry krevního obrazu

12.3.1 Střední objem destičky

Střední objem trombocytů (MPV) byl hodnocen celkem u 31 pacientů v akutní fázi, u kterých bylo možné zjistit i MPV za více jak 1 měsíc po příhodě (v chronické fázi). MPV byl srovnán i s MPV kontrolního souboru (70 kontrol). Viz. tab. č. 13 a 14.

Tabulka č. 13: Porovnání MPV v akutní a chronické fázi CVT

Skupina	Počet	Průměr (fL)	Směrodatná odchylka
MPV v akutní fázi	31	10,21	1,23
MPV v chronické fázi	31	10,16	1,24

Legenda: rozdíl mezi MPV v akutní a chronické fázi nebyl zjištěn, $p = 0,743$

Tabulka č. 14: Porovnání MPV u pacientů a kontrol

Skupina	Počet	Průměr (fL)	Směrodatná odchylka
MPV pacienti	31	10,21	1,23
MPV kontroly	70	11,02	0,96

Legenda: rozdíl mezi MPV mezi pacienty a kontrolami byl významný, $p < 0,001$.

12.3.2 Leukocyty

Výsledek porovnání vstupního počtu leukocytů u pacientů a kontrol je uveden v tabulce č. 15.

Tabulka č. 15: Porovnání počtu leukocytů u pacientů a kontrol

Skupina	Počet	Průměr ($\times 10^9/L$)	Směrodatná odchylka
Leukocyty - pacienti	41	9,38	4,31
Leukocyty - kontroly	70	5,94	1,36

Legenda: rozdíl v počtu leukocytů mezi pacienty a mezi kontrolami je významný, $p < 0,001$.

Vzhledem k možné závislosti počtu leukocytů na fázi onemocnění (akutní nebo chronická fáze), byla zjišťována také závislost počtu leukocytů na čase od diagnózy. Závislost byla potvrzena, $p = 0,011$, regresní koeficient $-0,8651$ – počet leukocytů s časem klesá.

12.3.3 Hemoglobin

Byla porovnána koncentrace hemoglobinu u pacientů a u kontrol. Nebyl zjištěn významný rozdíl, $p = 0,93$ (viz tab. 16).

Tabulka č. 16: Porovnání koncentrace hemoglobinu u pacientů a kontrol

Skupina	Počet	Průměr (g/L)	Směrodatná odchylka
Hemoglobin pacienti	47	137,7	21,14
Hemoglobin kontroly	70	140,6	11,63

Legenda: koncentrace hemoglobinu u pacientů a u kontrol se neliší, $p = 0,93$.

Souhrn výsledků vyšetření parametrů krevního obrazu:

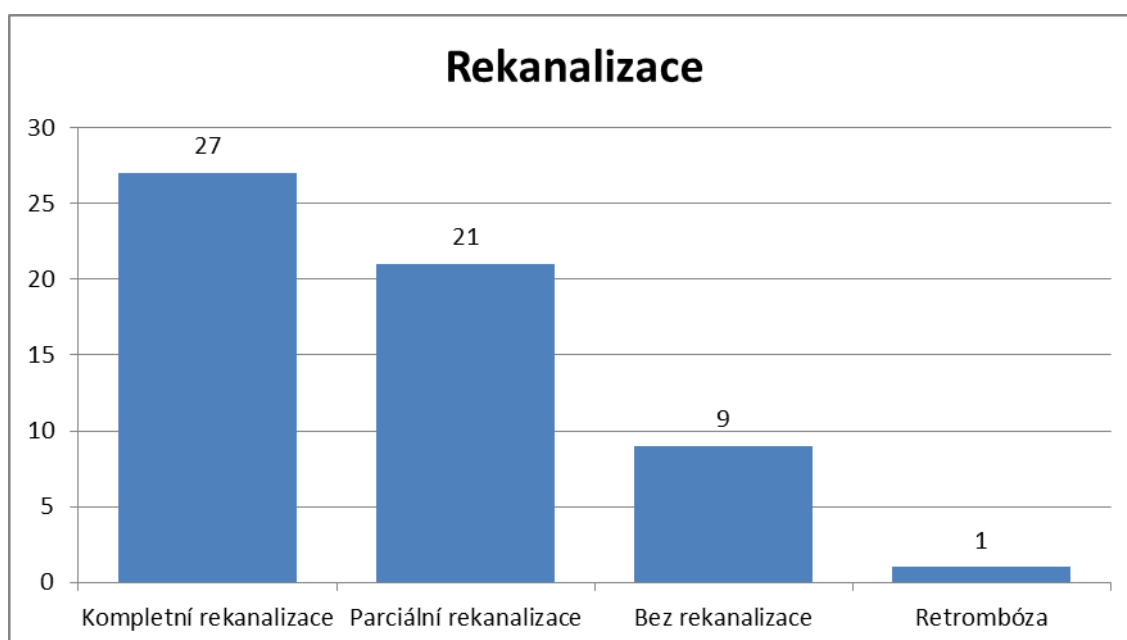
- Byl zjištěn významný rozdíl mezi MPV u pacientů s CVT a kontrolami,
- Dále byl zjištěn významný rozdíl v množství leukocytů při diagnóze CVT a kontrolami.

12.4 Rekanalizace

Rekanalizace byla hodnocena vyšetřením magnetickou rezonancí - angiografií u pacientů za 3 měsíce od příhody. Jako kompletní rekanalizace byl označen nález plného zprůchodnění sinů; jako parciální rekanalizace byl hodnocen stav, kdy byla zjištěna parciální trombóza jednoho sinu i při zprůchodnění jiných, dříve trombozovaných sinů. Ostatní bylo hodnoceno jako „Bez rekanalizace“ – viz graf č.4, kde je zachycena i retrombóza.

K dispozici byly údaje od 58 pacientů. Kompletní nebo parciální rekanalizace dosáhlo 83% pacientů.

Graf č. 4: Rekanalizace



Dále byla porovnána přítomnost rekanalizace v souborech rozdělených dle vybraných parametrů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č.17. Jako nulová hypotéza byl postaven předpoklad, že jevy v obou skupinách jsou stejně časté. V tabulce č. 17 je jako trombofilie zahrnuta přítomnost alespoň jednoho z následujících faktorů: Leidenská mutace, mutace protrombinu, hyperhomocysteinémie, antifosfolipidový syndrom nebo mutace JAK2.

**Tabulka 17: Porovnání rekanalizace v souborech rozdělených dle vybraných parametrů
(Nulová hypotéza: Jevy jsou v obou skupinách stejně časté)**

Výsledný stav (mRS) (0 vs 1 a více)	p=0,022
Krvácení (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,207
Pohlaví	p=0,560
HAK, (pouze ženy) (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,018
Trombofilie (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,055
Trombolýza (přítomnost vs nepřítomnost)	p =0,976
D-dimery (pozitivita vs negativita)	p=0,246
Čas do diagnózy (do 7 dnů vs 8 a více)	p=0,279
Věk (do 39 vs 40+)	p=0,041

Souhrn výsledků hodnocení rekanalizace

Lepší (kompletnější) rekanalizace (viz graf. 4) dosahují pacienti s nižším mRS skóre, pacientky užívající HAK, mladší pacienti a pravděpodobně i pacienti bez trombofilie.

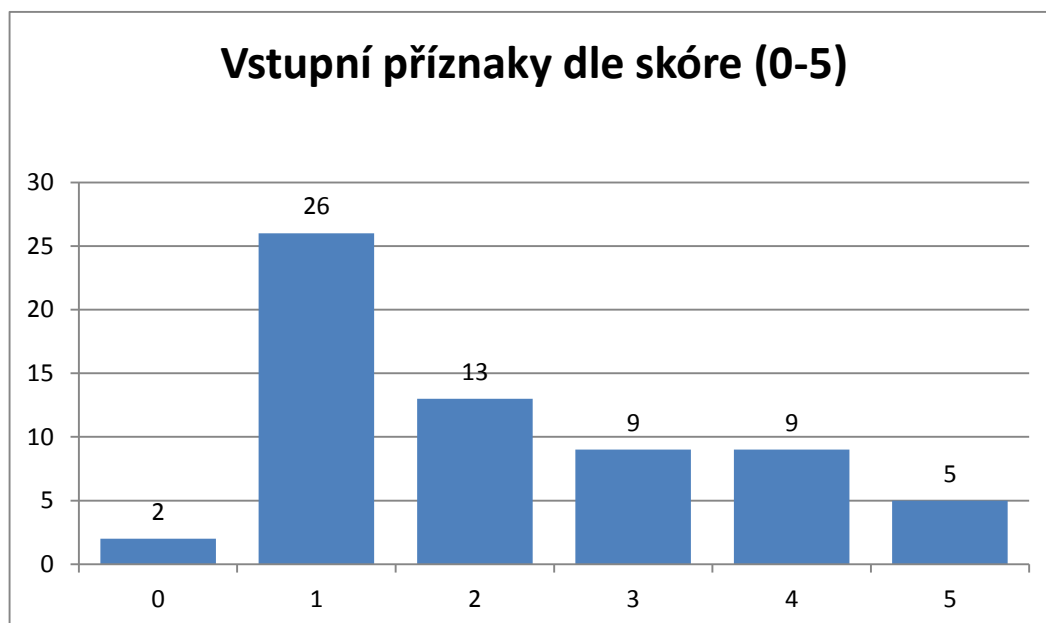
12.5 Vstupní příznaky

Ke statistickému zpracování tíže vstupních příznaků jsme navrhli vlastní skórovací systém (viz tab. 18). Pacienti jsou rozděleni do 6 skupin (stupňů) - viz graf 5. Mozkové krvácení se při diagnostickém zobrazení mozku vyskytlo u 13 pacientů (20%).

Tabulka č. 18: Příznaky - tabulka skórovacího systému

Skóre	Příznaky
0	Bez příznaků
1	Mírné (bolest hlavy, vertigo, zvracení, nevolnost..)
2	Středně těžké (epileptický záchvat, poruchy vizu, afázie), max. 1 příznak)
3	Těžké (kombinace více příznaků ze skóre 2, porucha vědomí /jiná než epiparoxysmus/ nebo zánikové příznaky)
4	Velmi těžké (kombinace 2 a více příznaků ze skóre 3)
5	Život ohrožující (ohrožení vitálních funkcí, vždy s poruchou vědomí)

Graf č. 5: Vstupní stav



Následně jsme porovnali vstupní stav s ostatními sledovanými parametry (nepárovým T-testem). Jako nulová hypotéza byl stanoven předpoklad, že porovnávané jevy jsou stejně časté.

Poznámka: V prvním řádku tabulky č. 19 je hodnocení výsledného stavu /pacienti zařazení podle modifikované Rankinovy škály ²⁰⁵, který byl porovnáván s tíží vstupních příznaků hodnocených dle vlastního skorovacího systému. Vlastní stupnice vyhovuje lépe - Rankinova stupnice neumožňovala přesně zařadit některé stavy nebo symptomatologii – je zaměřena především na hodnocení stupně invalidity. Závislost výstupního stavu (dle Modified Rankin scale systém – viz výše) je takto hodnocena oproti vstupním příznakům vlastní škály 0 – 5.

Tabulka č. 19: Porovnání tíže vstupního stavu v souborech rozdělených dle vybraných parametrů

Výsledný stav (podle mRS) (0 vs 1 a více)	p=0,259
Krvácení (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,213
Pohlaví	p=0,776
HAK (pouze ženy) (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,854
Trombofilie* (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,697
Trombolýza (přítomnost vs nepřítomnost)	p<0,001
D-dimery (pozitivita vs negativita)	p=0,098
Čas do diagnózy (do 7 dnů vs 8+)	p=0,003
Rekanalizace (kompletní vs jiná)	p=0,176

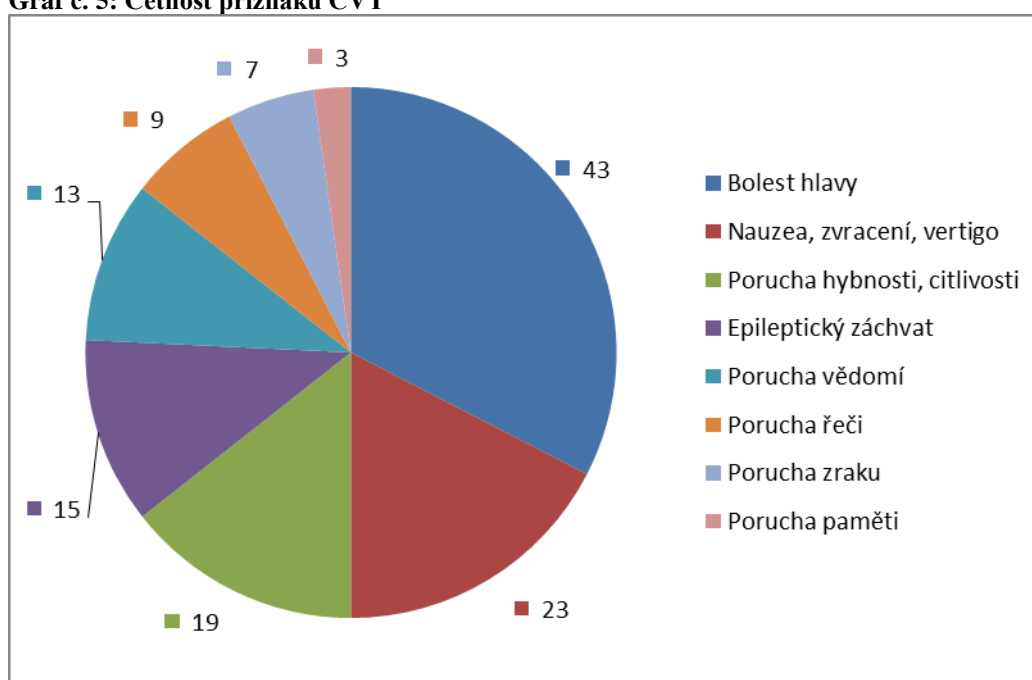
* jako trombofilie byl zahrnut stav, kdy byl přítomen alespoň jeden z následujících faktorů: Leidenská mutace, mutace protrombinu, hyperhomocytéinémie, antifosfolipidový syndrom nebo mutace JAK2

Pro celkový přehled je uvedena na tabulce č. 20 a na grafu č. 6 četnost jednotlivých registrovaných klinických příznaků. Nejčastějším příznakem jsou bolesti hlavy.

Tabulka č. 20: Četnost jednotlivých příznaků

Příznak	Výskyt (% z celkového počtu pacientů)
Bolest hlavy	43 (67%)
Nauzea, zvracení, vertigo	23 (36%)
Porucha hybnosti, citlivosti	19 (29%)
Epileptický záchvat	15 (23%)
Porucha vědomí	13 (20%)
Porucha řeči	9 (14%)
Porucha zraku	7 (11%)
Porucha paměti	3 (5%)

Graf č. 5: Četnost příznaků CVT



Souhrn hodnocení vstupní symptomatologie

Pacienti v těžším stavu byli častěji indikováni k trombolýze, měli kratší dobu od prvních příznaků k diagnóze a také pozitivita D-dimerů se blížila hranici statistické významnosti. ($p = 0,098$).

12.6 Trombofilní faktory

Vyšetření trombofilních faktorů nebylo možné provést u všech pacientů. Data jsou proto udávána jako podíl, kde v čitateli je počet nalezených pozitivit a ve jmenovateli celkový počet vyšetřených. V případě hormonální antikoncepce, hormonální substituční terapie v přechodu a těhotenství je v tab. č. 21 uveden poměr pouze ze skupiny žen. V 12 případech byl zachycen souběh 2 a více trombofilních faktorů. Deficit proteinů C, S a antitrombinu zachycen nebyl. Pro srovnání jsou uvedena i data ze studie CEVETIS²⁰⁶.

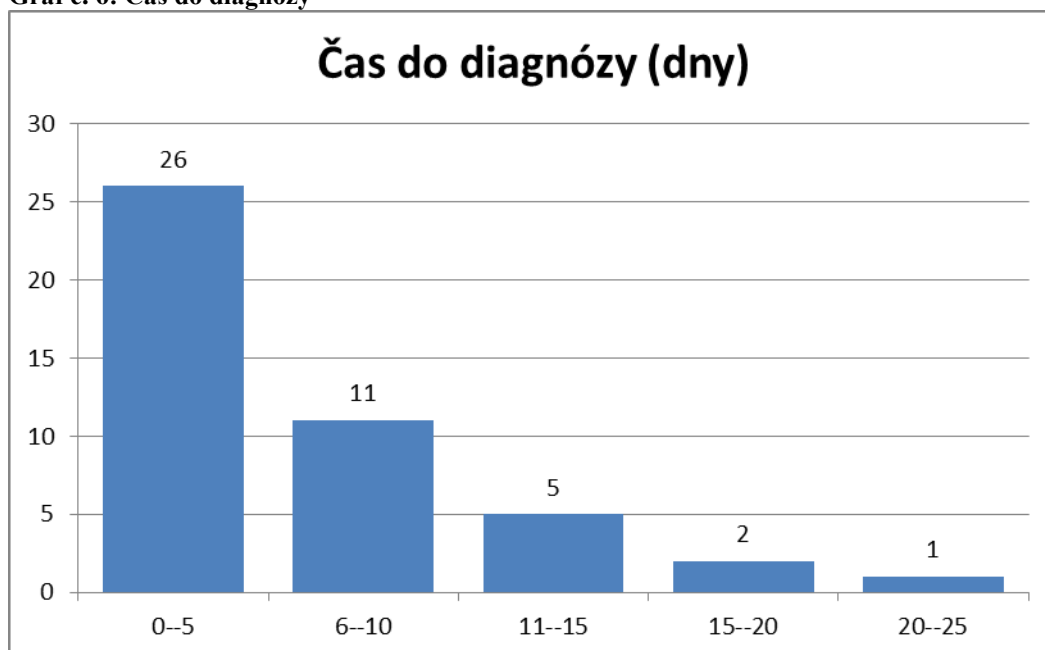
Tabulka č. 21: Trombofilní faktory

Trombofilní faktor	Počet pozitivních /vyšetřených	Data ze studie CEVETIS
Leidenská mutace	7/63 (11%)	51/560 (9,1%)
Mutace protrombinu	6/63 (10%)	105/551 (19,1%)
Mutace JAK2	5/55 (9%)	17/131 (13,0%)
Antifosfolipidový syndrom	2/62 (3%)	28/554 (5,1%)
Hyperhomocysteinémie	3/55 (5%)	69/546 (12,6%)
Malignita	4/64 (6%)	45/706 (6,4%)
Infekce	3/64 (5%)	59/706 (8,3%)
Hormonální antikoncepce	29/49 (59%)	278/520 (53,5%)
Hormonální substituční terapie	2/49 (4%)	(HAK+HRT)
Těhotenství	3/49 (6%)	54/520 (10,4%)
Idiopatické CVT	12/64 (19%)	Neuvedeno
Deficit proteinu C	0/64 (0%)	18/552 (3,3%)
Deficit protein S	0/64 (0%)	18/552 (3,3%)
Deficit antitrombinu	0/64 (0%)	11/564 (2,0%)

12.7 Čas do stanovení diagnózy

Z anamnestických dat byla zjištěna doba od prvních příznaků CVT do provedení diagnostického zobrazovacího vyšetření. Doba byla měřena ve dnech (minimálně 1 den). Následně byl tento parametr porovnán s jinými. Pokud byla doba větší než 30 dnů, je CVT označena jako chronická. Čas do diagnózy se podařilo zjistit u 57 pacientů, 12 (21%) z nich měli trombozu diagnostikovanou jako chronickou. Rozdělení pacientů - viz graf 7.

Graf č. 6: Čas do diagnózy



Tabulka č. 22: Čas do diagnózy, základní parametry. Do hodnocení nejsou zahrnuty chronické trombózy

Počet	Průměr (dny)	Medián (dny)	Směrodatná odchylka
45	6	5	5,51

Dále byla porovnána závislost sledovaných faktorů na době do stanovení diagnózy. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č.23. Jako nulová hypotéza byl postaven předpoklad, že jevy v obou skupinách jsou stejně časté. V tabulce č. 23 je jako trombofilie zahrnuta přítomnost alespoň jednoho z následujících faktorů: Leidská mutace, mutace protrombinu, hyperhomocysteinémie, antifosfolipidový syndrom nebo mutace JAK2.

Tabulka č. 23: Porovnání času do diagnózy v souborech rozdělených dle vybraných parametrů

Výsledný stav (mRS) (0 vs 1 a více)	p=0,453
Krvácení do parenchymu (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,173
Rekanalizace (kompletní vs jiná)	p=0,397
HAK (pouze ženy, přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,151
Trombofilie (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,571
Trombolýza (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,111

Souhrn hodnocení času do stanovení diagnózy:

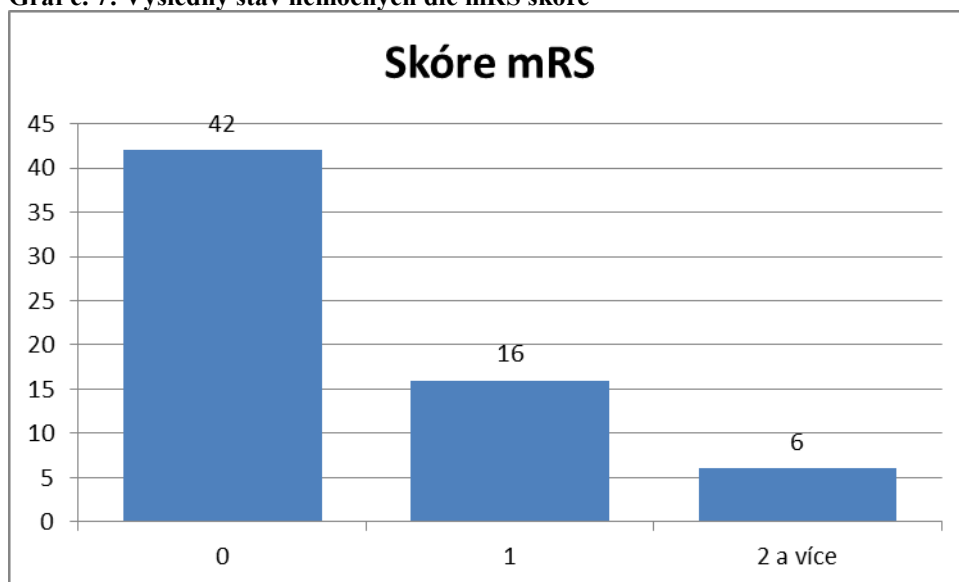
Uvedené testované parametry nebyly významně závislé na době od prvních příznaků do diagnózy

12.8 Klinický stav po trombóze

Výsledný klinický stav byl hodnocen při ambulantních kontrolách po ukončení hospitalizace (minimálně 1x za alespoň 3 měsíce po ukončení hospitalizace). Sledování pacientů bylo ukončeno a je hodnoceno naposled v březnu 2012.

K vyhodnocení efektu terapie byl použit systém „modified Rankin scale“ (viz tab. č. 7). U CVT byla většinou dobrá prognóza, v 58 případech bylo skóre 0-1. Jen v 1 případě pacient zemřel. Příčinou smrti byl ale karcinom plic. Ve většině případů (10/16) byla přetrvávající obtíž bolest hlavy (hodnoceno jako skóre 1). Skóre 2 a více bylo přiřazeno 6 pacientům (9%).

Graf č. 7: Výsledný stav nemocných dle mRS skóre



Legenda: mRS skóre = modified Rankin score ²⁰⁵

Byla porovnána také závislost vybraných sledovaných faktorů na výsledném klinickém stavu. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č.24. Jako nulová hypotéza byl vytýčen předpoklad, že jevy v obou skupinách jsou stejně časté. V tabulce č. 24 je jako trombofilie opět zahrnuta přítomnost alespoň jednoho z trombofilních faktorů, jako v předchozí tabulce č. 23.

Tabulka č. 24: Porovnání skupin parametrů rozdělených dle mRS skóre (0 vs 1 a více)

Krvácení do mozkového parenchymu (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,325
Rekanalizace (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,022
Hormonální antikoncepce (pouze ženy) - přítomnost vs nepřítomnost	p=0,004
Trombofilie (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,920
Trombolýza (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,494
D-dimery (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,050
Čas do diagnózy (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,453
Věk	p=0,350
Epilepsie (jako vstupní příznak) - přítomnost vs nepřítomnost	p=0,081
Pohlaví	p=0,260
Vstupní stav	p=0,259
Počet leukocytů	p=0,897

Legenda: Vstupní stav hodnocen dle tab. č.18

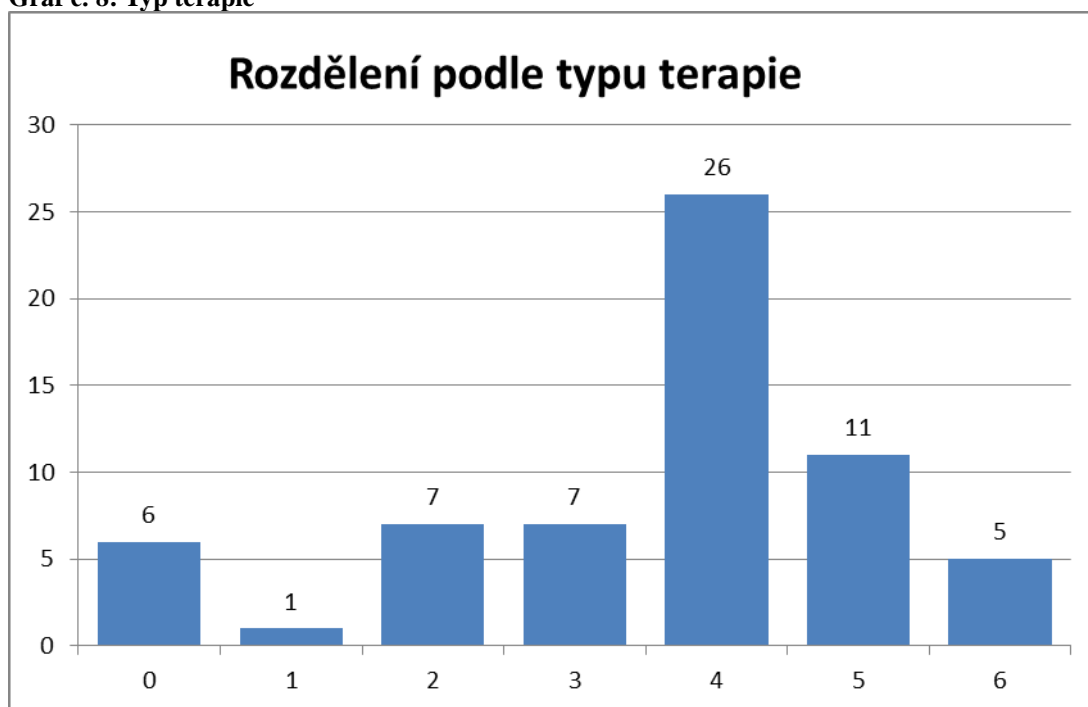
Souhrn hodnocení konečného klinického stavu po prodělané trombóze:

Pacienti s kompletní rekanalizací, uživatelky hormonální antikoncepce a pacienti s negativními D-dimery dosahují kompletního uzdravení častěji (mRS skóre 0). Zjistili jsme tendenci k horší prognóze u pacientů, kteří měli epileptické záchvaty na začátku onemocnění. Při větším počtu členů souboru by pravděpodobně mohla být statistická významnost zjištěna.

12.9 Typ terapie

Z dokumentace jsme zaznamenali typ antikoagulační/antiagregační terapie. Podle typu terapie (viz tab. 25) byli pacienti rozděleni do skupin. Nejčastější formou terapie (26 případů) byla aplikace nízkomolekulárního heparinu (LMWH) s následnou perorální antikoagulační terapií více jak 3 měsíce. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č.9. Pacient, který zemřel na karcinom plic, nebyl zahrnut do výsledků (nebyla u něj zahájena terapie).

Graf č. 8: Typ terapie



Tabulka č. 25: Typ terapie – legenda ke grafu č. 9

Sloupec č.	Typ terapie
0	Bez terapie
1	Pouze Anopyrin
2	Pouze LMWH
3	LMWH s následnou OAT po dobu max. 3 měsíce
4	LMWH s následnou OAT 3 měsíce – 5 let
5	LMWH s následnou OAT doživotně (5 a více let)
6	Trombolýza

Legenda: OAT = perorální antikoagulační terapie; LMWH = nízkomolekulární heparin.

12.10 D-dimery

Hodnotu D-dimerů jsme zaznamenali pouze u případů, kdy od prvních příznaků do odběru neuplynulo více jak 30 dnů. V chronické fázi (nad 30 dnů) byly změřeny pouze u 3 pacientů a byly v normálním laboratorním rozmezí. Z výsledků (hodnot D-dimerů) byla spočítána senzitivita testu.

Tabulka č. 26: Výsledky vyšetření D-dimerů

Vyšetřeno celkem	Pozitivních	Negativních
31	25	6

Senzitivita: 80,6%.

Obdobně jako v předchozích subkapitolách byla porovnána také závislost vybraných sledovaných faktorů na hladině D-dimerů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č.27. Jako nulová hypotéza byl vytýčen předpoklad, že jevy v obou skupinách jsou stejně časté.

Tabulka č. 27: Porovnání D-dimerů v souborech rozdělených dle vybraných parametrů

Čas do diagnózy (do 7 dnů vs 8 a více)	p=0,029
Rekanalizace (kompletní vs jiná)	p=0,614
Trombolýza (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,248
Trombofilie (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,215
Parenchymatózní mozkové krvácení (přítomnost vs nepřítomnost)	p=0,223
Výstupní stav (mRS), (0 vs 1 a více)	p=0,050

Souhrnné hodnocení hladiny D-dimerů:

Hodnota D-dimerů je nižší u pacientů s delším časem do diagnózy (více jak 7 dnů) a u pacientů s lepším výsledným (výstupním) stavem.

13 Diskuze

Do souboru bylo celkem zařazeno 64 pacientů, u kterých byly zkompletovány potřebné údaje a vyhodnoceny trombofilní faktory, anamnestická data i data o průběhu onemocnění. Z analýzy souboru vyplývá, že výskyt pacientů podle věku není stejnoměrný (viz graf č. 1). Zastoupení nemocných není stejné také co do pohlaví. Jednoznačně dominují ženy (77%) a jejich věkový průměr je nižší (35 let) než u mužů (41 let). Nejvíce žen je ve věkovém rozmezí 20-40 let, zatímco muži v žádné věkové skupině nedominují (viz tab. č. 6). Takovéto rozdělení je výsledkem přítomnosti nejčastějšího získaného rizikového faktoru – užívání kombinované hormonální antikoncepce, kterou ženy začínají užívat již před 20. rokem života do přibližně padesáti let. Mimo tento interval je zastoupení mužů a žen obdobné.

13.1 Lokalizace trombózy

Pokud jde o lokalizaci trombózy, nejčastěji byl postižen příčný, esovitý a horní šípový splav (77% postižených). Obvykle se ale jednalo o trombózu přesahující více splavů, jen v sedmnácti případech (27%) byl postižen pouze 1 splav. Tyto výsledky jsou srovnatelné s jinými publikovanými ^{2, 3}. Statisticky významně častěji bylo postižení levostranné ($p < 0,003$). Práce autorů Surendrababu et al., 2006 zkoumající mozkový žilní systém u 100 pacientů odhalila dominanci pravého příčného splavu u 59% pacientů zatímco levý příčný splav byl dominantní jen u 30% pacientů ¹⁴¹. Naopak hypoplastický levý sinus byl nalezen u 35% případů, zatímco pravý jen v 13%. Autoři tento stranový rozdíl vysvětlují embryonálním vývojem. Obdobná data publikovali i jiní autoři ^{142, 143}. Zpomalení krevního toku v hypoplastickém splavu je jedním z triády prokoagulačních momentů (porucha cévní stěny, krevní stáza, trombofilie), které predisponují tento sinus k častější trombóze.

13.2 Rizikové faktory trombózy a mutace JAK2

Naše studie se zabývala především rizikovými faktory mozkových trombóz, se zaměřením na výskyt mutace JAK2 a nepřímo i na výskyt myeloproliferativního onemocnění. Právě mozková trombóza (nebo i břišní trombóza) je často první manifestací latentního Ph-negativního myeloproliferativního onemocnění¹¹¹.

V našem souboru bylo nalezeno celkem 9% JAK2 pozitivních pacientů. Jedna pacientka měla již v době diagnózy CVT diagnostikovanu esenciální trombocytémii. Další 2 pacientky splnily diagnostická kritéria myeloproliferativního onemocnění v následném období (za 1 rok (pravá polycytémie) a druhý za 9 let (esenciální trombocytémie) po CVT). U jednoho pacienta je splnění kritérií myeloproliferativního onemocnění v budoucnu pravděpodobné. Jde o pacienta, s koncentrací hemoglobinu nad horní hranici normy (nedosahující ale diagnostických kritérií pravé polycytémie) a nízkým erytropoetinem.

Nikdo z JAK2 negativních pacientů neonemocněl myeloproliferativní chorobou v době diagnostikovaného CVT ani v následném období po celou dobu trvání této studie. Takový vývoj u JAK2 pozitivních CVT a obdobná již publikovaná data vedou k závěru, že CVT jsou skutečně často prvním příznakem latentních myeloproliferací typu pravé polycytémie, esenciální trombocytémie nebo primární myelofibrózy²⁰⁷.

Na rozdíl od břišních trombóz, kde je spojení mutace JAK2 a myeloproliferativního onemocnění uznávaným a testovaným rizikovým faktorem, je význam testování JAK 2 mutace jako rizikového faktoru pro CVT doposud diskutovaným tématem s množstvím protichůdných názorů^{125, 207-211}. Na vině je relativně nízká incidence CVT a zřejmě i nižší prevalence mutace JAK2, než jak je tomu u břišních trombóz. Na druhou stranu v porovnání s výskytem mutace JAK2 u hluboké žilní trombózy se jeví výskyt mutace u CVT opravdu zvýšen. Přehled doposud publikovaných studií viz tab.č.28.

Z prací, uvedených v tabulce č.28, je patrná poměrně velká nejednotnost výsledků, což může být dáno některými menšími soubory, ale také laboratorním zpracováním starších souborů. (mutace JAK2 je známa od r. 2005, lze předpokládat, že starší studie ještě nemusely mít dostatečně citlivé a standardní testování mutace JAK2.). Poměrně velká studie Passamonti et al., 2012 uvádí výsledky (výskyt JAK2 mutace) srovnatelné s naším pozorováním²⁰⁷.

Tabulkač. 28: Přehled publikovaných studií o výskytu mutace JAK2 u CVT

Studie	Počet pacientů	Pozitivita JAK2	
		Celkem	Bez MPD
De Stefano et al., 2008 ^{211, 212}	48	6	3
Colaizzo et al., 2007 ²¹³	45	0	0
Bellucci et al., 2008 ²¹⁰	87	1	1
Koopman et al., 2009 ²⁰⁹	59	2	0
Passamonti et al., 2012 ²⁰⁷	152	10	4
Tato studie	55	5	4
Celkem	446	24 (5,3%)	12 (2,7%)

V rámci studie CEVETIS (kam jsme přispěli 45 pacienty, z nichž byli 4 pozitivní na JAK2 mutaci, viz níže) vyšel počet JAK2 pozitivních pacientů 17 ze 131, tj. 13%²⁰⁶, tedy opět výsledky obdobné našemu pozorování (v našem souboru 9%). Naše studie prokazuje statisticky významně zvýšený výskyt mutace JAK2 u pacientů s CVT v porovnání s kontrolním souborem zdravých jedinců. Na rozdíl od některých jiných prací (viz tab. 28) zůstává zvýšený výskyt mutace JAK2 statisticky významný i po vyřazení již diagnostikovaných myeloproliferativních chorob.

Tato práce má omezení, mezi které patří fakt, že vzhledem k malému počtu pacientů a nulovému výskytu mutace JAK2 v našem kontrolním souboru může být tento výsledek zkreslen náhodnou chybou. Porovnáme-li ale výskyt mutace u DVT nebo ve zdravé populaci (0,5-0,9%) s našimi daty (ale i s daty již publikovanými), výskyt mutace JAK2 u CVT zvýšen je^{123, 126}. Nulový záchyt mutace JAK2 v našem kontrolním souboru odpovídá nízké prevalenci mutace ve zdravé populaci. Je-li prevalence mutace JAK2 u zdravé populace 0,2-0,9%, pak by musel mít soubor na zachycení 1 pozitivního dárce přibližně 200-500 členů souboru.

Důležitost testování mutace JAK2 nesouvisí pouze s prevalencí mutace, ale také s její rizikovostí stran rekurence CVT či vývoje jiných komplikací a tedy významu jejího testování.

V současné době je v rámci vyhledávání trombofilních faktorů běžné testování Leidenské mutace a mutace protrombinu v rámci vyhledávání trombofilních faktorů. V naší studii byla Leidenská mutace nalezena u 11 % pacientů, mutace protrombinu u 10 % pacientů a mutace JAK2 u 9 % pacientů. Rozdíl mezi výskytem mutace JAK2 a výskytem Leidenské mutace nebo mutace protrombinu je statisticky

nevýznamný ($p=0,48$ pro Leidenskou mutaci, $p=0,59$ pro mutaci protrombinu) statistické významnosti by rozdíl nedosáhl ani po vyřazení 1 pacienta s již diagnostikovaným myeloproliferativním onemocněním před vznikem CVT). Přesto mutace JAK2, i když je obdobně častá, nepatří mezi běžný trombofilní screening u pacientů s CVT. Přitom její význam pro pacienta je mnohem podstatnější. Zatímco pozitivita Leidenské mutace nebo mutace protrombinu v heterozygotní formě vede nanejvýš k mírnému prodloužení následné antikoagulační terapie (jak doporučují guidelines z r. 2010 ¹⁸⁹), přítomnost mutace JAK2 znamená dlouhodobé sledování, často provedení trepanobiopsického vyšetření kostní dřeně a prolongaci perorální antikoagulační terapie nebo alespoň zajištění antiagregační terapií v případě podezření na možný rozvoj myeloproliferativního onemocnění. Tedy mnohem intenzivnější postup, než u tradičních trombofilních mutací. Cena vyšetření se přitom výrazněji neliší.

Trombóza (arteriální i venózní) představuje hlavní faktor morbidity pacientů s myeloproliferativním onemocněním. Její prevence je proto základem správné terapie myeloproliferací. Pacienti s CVT a diagnostikovaným myeloproliferativním onemocněním se řadí automaticky do velmi rizikové skupiny co do rekurence trombózy ²¹⁴. U těchto pacientů je nezbytná dlouhodobá terapie antiagregační nebo antikoagulační obvykle v kombinaci s terapií myeloproliferace. Rekurence trombózy u myeloproliferativních nemocí dosahuje 7,6% ročně ¹¹². Jak častý a jak rychlý je ale přechod JAK2 pozitivního pacienta s prodělanou CVT do myeloproliferace samozřejmě nelze s našich dat s jistotou říci. Tři z pěti našich pacientů splnili kritéria pro myeloproliferativní chorobu, jeden pacient tato kritéria nejspíše splní. Přechod JAK2 pozitivních pacientů do myeloproliferace se nám proto jeví jako pravděpodobný, i když vzorek pěti JAK2 pozitivních pacientů s CVT je malý. Pacienti s CVT a pozitivní mutací JAK2 by měli být sledováni a při přechodu do myeloproliferativního onemocnění by měli mít včas nasazenu adekvátní terapii (antiagregační/antikoagulační a event. cytoredukční).

13.3 Faktory krevního obrazu

Složky krevního obrazu vykazují při CVT změny uvedené ve výsledkové části. Pokud jde o leukocyty, je jejich počet významně zvýšen v akutní fázi CVT (u pacientů oproti kontrolám), což je očekávaný a obvyklý nález u řady akutních

chorob. Reaktivní leukocytóza obvykle doprovází akutní stavy. Stejně tak logická je i negativní závislost doby do diagnózy a počtu leukocytů. Hemoglobin byl u našich nemocných v normálním rozmezí, srovnatelný v souboru pacientů i kontrol.

Podrobněji byl zkoumán jako možný parametr aktivace střední objem destiček (MPV). Tomuto jednoduše zjistitelnému ukazateli je v poslední době věnována značná pozornost. Destičky mají důležitou úlohu v komplikovaném procesu koagulační rovnováhy. Přesný patogenetický sled dějů, kterým zvýšený MPV ovlivňuje nebo aktivuje prokoagulační proces, není do detailů prozkoumán, ale je známo několik pozoruhodností. Při aktivaci destiček se mění její tvar, tvoří se pseudopodia, dochází k degranulaci a ke zvýšení jejího objemu. Větší destičky jsou metabolicky i enzymaticky aktivnější, nežli malé – obsahují více protrombotického materiálu, mají vyšší hladinu tromboxanu A₂ and B₂ na jednotku objemu a také více exprimovaný receptor pro glycoprotein IIb – IIIA^{167, 215, 216}. Obsahují více alfa-granulí, které mohou uvolňovat “protrombin-like” substance, P-selectin a destičkový růstový factor^{217, 218}.

Statisticky významně zvýšený MPV byl zaznamenán u cévních mozkových příhod, diabetiků nebo u kardiaků^{163, 164}. U pacientů s již diagnostikovanou žilní trombózou je MPV v porovnání s kontrolami také statisticky významně vyšší^{178, 179}. MPV jsme porovnali u pacientů v akutní fázi CVT s krevním obrazem v chronické fázi (minimálně po 30 dnech) a s MPV kontrol. V našem souboru se MPV v porovnání akutní a chronické fáze sice poněkud zmenšil, ale ne statisticky významně. Při porovnání MPV u pacientů a kontrol byl dokonce MPV u kontrol větší.

Možností, jak vysvětlit tento výsledek, je několik. Již publikované výsledky naznačují značnou ovlivnitelnost tohoto parametru formou odběru a použitou metodou¹⁷⁵. Jde především o odběr vzorku, což může podstatně ovlivnit výsledky. V naší studii jsme (jako ve většině studií) používali jako antikoagulans EDTA, kde již bylo prokázáno, že v důsledku „swelling“ (zduření) destiček, dochází k zvětšení MPV a to závisle na čase²¹⁶. Měření jsme provedli na přístroji Sysmex 2100 impedanční metodou. Měření impedanční metodou dává nižší výsledky než měření optickou metodou. Při porovnání hodnot MPV v našem souboru by ale tento fakt neměl hrát roli neboť pacienti i kontroly byli měřeni stejnou metodou.

Dalším momentem, který nejspíše ovlivňuje výsledek, je samotný rozsah trombózy. V porovnání s velikostí žilního řečiště dolních končetin jsou mozkové

trombózy spíše menšího rozsahu a tudíž ani změna MPV nemusí být významná. Také byla nalezena nepřímá závislost mezi počtem destiček (množstvím produkce) a MPV ^{176, 177}. Je tedy možné, že akutní stav s vyšší konzumací destiček (a vyšší produkcí) bude spojen s menším MPV.

Lze tedy shrnout, že není zcela jisté, jestli trombóza má vliv na MPV (a naopak). Bylo publikováno několik prací, které uvádějí pozitivní změny MPV u několika chorob – viz výše, včetně prací, kde jde o aktivaci hemokoagulačního systému nebo při trombózách ^{163, 164, 176, 178, 179}, existují však i práce, kde nebyly nalezeny pozitivní výsledky a někteří autoři pochybují o významu vyšetření MPV u CVT ¹⁷⁷. V naší práci nebyl zjištěn vliv CVT na MPV.

13.4 Rekanalizace

Podle literatury není význam rekanalizace u CVT zcela jasný. U hluboké žilní trombózy byla nepřítomnost rekanalizace potvrzena jako rizikový faktor rekurence ²¹⁹. Spolu s D-dimery měřenými měsíc po ukončení perorální hormonální terapie jsou tyto 2 parametry možným vodítkem k posouzení intenzity další terapie. V případě CVT je situace odlišná. Rychlost rekanalizace se liší - u hluboké žilní trombózy dochází k postupné rekanalizaci postupně po delší době, zatímco u CVT k rekanalizaci dochází obvykle v prvních 3 měsících po příhodě ^{202, 219}. Ani klinický dopad rekanalizace u CVT není plně objasněn. Studie Putaala et al., 2010 uzavírá, že nepřítomnost rekanalizaci není spjata s horší prognózou ²⁰³. Nižší stupeň rekanalizace je spjat s věkem nad 37 let a s chronickým začátkem obtíží.

V naší studii dosáhlo částečné nebo kompletní rekanalizace 83% pacientů, což odpovídá publikovaným údajům ²⁰². Podobně jako ve studii Putaala et al., 2010 jsme rozdělili pacienty do dvou skupin dle věku (zvoleno do 40 let a nad 40 let, 41 vs 17 pacientů) ²⁰³. Horšího stupně rekanalizace dosáhli starší pacienti ($p=0,041$).

Na rozdíl od studie Putaala et al., 2010 jsme neprokázali souvislost doby do stanovení diagnózy a stupně rekanalizace ²⁰³. Studie těchto autorů zvolila rozdělení do 3 skupin - akutní případy (0-2 dny), subakutní (2-30 dnů) a chronické (30 dnů a déle) dle doby do diagnózy ²⁰³. Toto rozdělení je dosti subjektivní. Často začátek onemocnění nelze přesně určit – např. bolest hlavy může začít jako akutní, ale také se pozvolně vyvíjí. Pacient pak udává začátek onemocnění až po dosažení určitého

stupně intenzity obtíží, i když onemocnění již nějakou dobu probíhalo. Rozdělili jsme i náš soubor do výše uvedených skupin, ale významnou závislost rekanalizace a doby do stanovení diagnózy jsme nepozorovali.

Základní otázkou je, má-li rekanalizace vztah k výslednému klinickému stavu po trombóze. Rozdělili jsme pacienty dle mRS skóre na skupinu s kompletním uzdravením (skóre 0) a ostatní pacienty (skóre 1 a více). Pacienti s nižším mRS skórem dosáhli lepšího stupně rekanalizace než ostatní pacienti ($p=0,022$). Stejně tak i pacienti s kompletní rekanalizací mají nižší skóre mRS ($p=0,006$). Rekanalizace tedy klinický význam má.

K interpretaci je ale nutné zmínit i omezení nejčastěji používaného mRS systému. Většina nemocných dosahuje skóre 0-1 a tak šestistupňové rozdělení zůstává vlastně nevyužito. V této práci bylo do skupiny 0 nebo 1 zařazeno 58 pacientů a do dalších skupin jen 6 pacientů. Do skupiny 0 spadají pacienti zcela bez obtíží a do stupně 1 pacienti s jakýmkoli (často subjektivním) reziduem. Nejčastěji jde o bolest hlavy, kdy převážně u žen nelze odlišit, jedná-li se o následek prodělané trombózy nebo dřívější obtíže bez souvislosti s CVT. V naší práci byl 16x stav dle mRS hodnocen stupněm 1, z toho v 10 případech na podkladě právě přetrvávající bolesti hlavy. I studie Putaala et al., 2010 nakonec uzavírá, že nepřítomnost kompletní rekanalizace je svázána především s reziduální bolestí hlavy, k čemuž se kloníme i my²⁰³. Bližší rozlišení na relativně malém vzorku pacientů bohužel není možné.

Prokázali jsme také souvislost (lepší prognózu) v případech užívání hormonální antikoncepce a rekanalizace v souboru žen. Při porovnání uživatelek hormonální antikoncepce a pacientek bez této léčby vyšla kompletní rekanalizace častější v souboru uživatelek hormonální antikoncepce ($p=0,018$). Užívání hormonální antikoncepce posuzováno samo o sobě nejspíše způsobuje méně významný trombofilní defekt než jiné trombofilní stavy (příčiny CVT), a je proto spojeno s menším rozsahem trombózy a lepší prognózou. Dokladem tohoto tvrzení je i častější negativita D-dimerů u pacientek s hormonální antikoncepcí jako jediným rizikovým momentem¹⁵⁶. Menší rozsah trombózy je u pacientek s hormonální antikoncepcí zřejmě spojen s nižším množstvím D-dimerů. Dalším faktorem pozitivně ovlivňujícím prognózu pacientek užívajících hormonální antikoncepci je snadná a rychlá odbouratelnost tohoto faktoru ihned po začátku onemocnění CVT. Vliv má i věk pacientek s HAK – uživatelky HAK jsou v souboru žen mladší. Věk do 40 let byl také spojen s lepší rekanalizací.

Je možné (logické), že i rekurence trombózy je pro uživatelky hormonální antikoncepce bez jiných rizikových faktorů nižší - ve studii CEVETIS užívání hormonálních preparátů jako rizikové pro rekurenci potvrzeno nebylo ²⁰⁶. Studie autorů Agnelli et al., 2008 u pacientů s hlubokou žilní trombózou potvrzuje vyšší riziko rekurence trombózy v prvním roce u pacientů s trvalým trombofilním faktorem (genetický faktor, malignita...) oproti přechodnému faktoru (např. imobilizace, hormonální antikoncepce) (14% vs 3%) ²²⁰.

13.5 Vstupní příznaky, trombofilie

Nejčastějším projevem CVT je perzistentní, obvykle gradující bolest hlavy. Na tomto závěru se shoduje naše studie s ostatními pracemi ^{3, 79, 181}. I ostatní klinické projevy odpovídají již publikovaným studiím.

Pro ověření významu tíže vstupních příznaků jsme příznaky seřadili dle našeho skórovacího systému a toto skóre následně porovnali s jinými parametry. Logickou závislost s tíží vstupních příznaků vykazuje terapie trombolýzou (která je indikována v nejtěžších případech) a doba do diagnózy. Pacienti s chronickým začátkem onemocnění se do nemocnice dostávají později, v lepším celkovém stavu a až po dosažení určité intenzity příznaků, které obvykle postupně narůstají. Tíže vstupního stavu nejeví souvislost s prognózou onemocnění (mRS), mozkovým krvácením, pohlavím nebo přítomností laboratorních trombofilních faktorů. Důležitým srovnávaným parametrem je zde tíže vstupního stavu a stavu po prodělané trombóze CNS (měřeno pomocí mRS), kde nebyla prokázána souvislost. Je tedy možné, že i ty nejtěžší stavy při správně vedené terapii mají dobrou prognózu. Souvislost hladiny D-dimerů s tíží stavu se v našem souboru nepodařilo se statistickou významností prokázat. Při rozdělení pacientů do dvou skupin (s patologickou hladinou D-dimerů a druhá skupina s normální hladinou D-Dimerů), bylo Rankinovo skóre (mRS) sice vyšší ve skupině s pozitivitou D-dimerů, ale statistická významnost nebyla dosažena ($p=0,098$).

Z trombofilních faktorů je zcela nejčastějším rizikovým faktorem užívání perorální kombinované hormonální antikoncepce (59% ze skupiny žen). Kombinovaná perorální hormonální antikoncepce, hormonální terapie v přechodu a těhotenství jsou příčinou CVT v 69% případů u žen, následují genetické faktory

(Leidenská mutace, mutace protrombinu a mutace JAK2. U 19% případů se nepodařilo zjistit žádný trombofilní faktor. To jsou výsledky srovnatelné s výsledky publikovanými v doposud největší studii ISCVT z roku 2004³ i s daty ze studie CEVETIS z r. 2012²⁰⁶. Hlavní rozdíl naší studie a studie CEVETIS byl zaznamenán ve výskytu mutace protrombinu (10% v naší studii vs 19,1% v CEVETIS). Rozdíl je nejspíš dán menší velikostí našeho souboru. I jiní autoři popsali rozdíl ve výskytu mutací u hluboké žilní trombózy a CVT. Zatímco u hluboké žilní trombózy je častější Leidenská mutace faktoru V nežli mutace protrombinu (20% vs 10%), u CVT se jeví častější mutace protrombinu²²⁻²⁴. Příčina tohoto rozdílu je nejasná, nejspíše zde hrají roli rozdíly (kvantitativní a/nebo kvalitativní) venózního řečiště dolních končetin a CNS.

13.6 Čas do diagnózy, D-dimery

Normální hladina D-dimerů je velmi cenná, protože obvykle umožňuje vyloučit zvažovanou CVT. V případě hluboké žilní trombózy dosahuje sensitivita D-dimerů až 95% a dokonce pozitivně koreluje s rozsahem trombózy¹⁵¹. Vezmeme-li v úvahu, že i při typických příznacích CVT bývá stanovena diagnóza jen v 10-20%^{155, 157}, byl by jednoduchý a vysoce senzitivní test velmi přínosný. Dentali et al., 2012 v metaanalýze zjistili senzitivitu D-dimerů u CVT v 89,1 %¹⁶⁰. Publikace citované v této metaanalýze udávaly senzitivitu v rozmezí 60-100%, přičemž náš nálezn odpovídá zhruba průměru tohoto rozmezí. V našem souboru byla sensitivita pouze 80,6%, bez započítání chronických CVT, kde však byl nálezn vždy negativní. Metaanalýza dále uvádí rozdíl v senzitivitě, jestliže byl soubor rozdělen na podskupiny, např. na skupinu pacientů s chronickou CVT nebo pacienty s lehkými příznaky (především izolovaná bolest hlavy). Rozdíl mezi naším pozorováním a uvedenou metaanalýzou může tedy být ve spektru pacientů, ale i v jiných detailech, např. v době do diagnózy.

Výše uvedené práce tedy uvádějí vyšší senzitivitu D-dimerů při hluboké žilní trombóze nežli při CVT. Příčin bude nejspíše více. Žilní řečiště CNS se od žil dolních končetin významně liší. A to kvalitativně – stavbou stěny vén, nepřítomností chlopní, rozdílným gravitačním gradientem, nekomprimovatelností, ale také kvantitativně. Celkový objem žilního řečiště v CNS je menší než je tomu u dolních

končetin. Rozsah trombózy při hluboké žilní trombóze (jak již bylo zmíněno) pozitivně koreluje s množstvím D-dimerů ¹⁵¹. Rozdílný je i časový faktor. Zatímco na dolních končetinách se trombóza projeví záhy tvorbou kolaterál asymetrického otoku, u CNS může často probíhat skrytě pouze pod obrazem bolestí hlavy. Právě izolovaná bolest hlavy a chronicita CVT je častěji spjata s vyšším počtem falešně negativních výsledků ¹⁶⁰. Obdobný závěr podporuje i naše práce.

Při vyšetřování hladiny D-dimerů závisí na čase od diagnózy, zvýšená hladina obvykle v čase klesá ¹⁶⁰. Proto jsme i tento parametr důsledně zjišťovali. Často je ale obtížné určit přesný čas prvních příznaků. Medián doby do diagnózy v našem souboru byl 5 dnů, což odpovídá publikovaným datům – medián 4 dny do přijetí a 7 dnů do diagnózy ³. V našem souboru se však nepodařilo prokázat statisticky významnou závislost mezi dobou od stanovení diagnózy a hodnotami D-dimerů. U našich pacientů s chronickou CVT, tj. po 30 dnech od začátku choroby, byla měřena hladina D-dimerů ve třech případech a byla vždy negativní. U dalších chronických pacientů sledována nebyla. Pokud jsme však soubor rozdělili dle doby do diagnózy do 2 částí (1-7 dnů vs 8 a více dnů do stanovení diagnózy), byla (statisticky významně) v souboru D-dimerů měřených do konce prvního týdne od prvních příznaků hodnota vyšší ($p=0,029$). Protože je tento závěr logický, domníváme se, že při větším souboru pacientů by tento trend byl významnější a mohla by vzniknout podobná závislost i u skupiny pacientů diagnostikovaných po 1. týdnu od začátku choroby. S přibývajícím časem od diagnózy tedy hodnota D-dimerů klesá. Logickým předpokladem je i pozitivní korelace mezi množstvím D-dimerů a rozsahem trombózy CNS. Toto ale naše studie nehodnotila.

Zajímavým výsledkem této studie jsou nestejně hodnoty D-dimerů ve skupinách pacientů rozdělených podle modifikované Rankinovy stupnice (mRS, ²⁰⁵) na mRS stupeň 0 oproti mRS 1 a více. Ve skupině pacientů s nulovým mRS (výstupním stavem bez jakéhokoliv přetrvávajícího postižení) byla vstupně hodnota D-dimerů nižší na hranici statistické významnosti ($p=0,050$). Na základě tohoto výsledku předpokládáme, že větší rozsah trombózy je spojen s vyšším množstvím D-dimerů a i horší prognózou.

13.7 Klinický stav po trombóze

CVT mají obecně dobrou prognózu. V našem souboru bylo 65% pacientů při ukončení studie zcela bez obtíží a jen 9% pacientů mělo mRS skóre větší než 1. Nejčastější přetrvávající obtíží byla bolest hlavy. V největší publikované studii³ bylo bez obtíží 65% pacientů a 19% pacientů mělo těžké následky. Naše studie má o něco lepší výsledky stran úmrtí a těžkých následků (1x úmrtí, 5x doživotní následky hodnoceny mRS 2 a více). Tento rozdíl ale není příliš veliký.

Práce autorů Ferro et al., 2004 dále odhalila vstupní koma, mozkové krvácení, malignitu, mužské pohlaví, věk nad 37 let, CNS infekci a postižení hlubokého žilního systému jako prognosticky nepříznivé faktory³. Tato publikace však porovnává zmíněné parametry s těžkými následky a smrtí, což v našem souboru není možné (příliš málo pacientů s tak těžkými následky). Všechny uvedené faktory se ovšem jeví logické a naše studie je nevyvrací.

Jako prediktor dobré prognózy (mRS skóre 0) jsme identifikovali přítomnost rekanalizace, užívání hormonální antikoncepce a nízké D-dimery. Nemůžeme vyloučit ani přítomnost epileptického záchvatu, jako faktoru zhoršujícího prognózu (byla zjištěna tendence k horší prognóze při vstupním epileptickém záchvatu, ale nedocílila statistická významnost). Dalším logickým faktorem (i když v našem souboru nebyl prokázán s požadovanou statistickou významností) se nám obdobně jeví věk (mladší by mohli mít lepší prognózu) a pohlaví (ženy by mohly mít lepší prognózu).

Uvedené výsledky naší práce i publikované studie určují faktory špatné prognózy. Otázka vlivu vstupního stavu je však v literatuře zatím stále otevřená. Při porovnání vstupního stavu pacientů rozdělených do dvou skupin dle výsledného klinického stavu nebyl v naší studii signifikantní rozdíl zjištěn. Je však možné, že při hodnocení většího počtu pacientů tíže vstupního stavu bude spjata s horší prognózou. Správně vedená terapie (a to zřejmě především radikální – trombolýza, intervenční terapie) dokáže dosáhnout rychlejšího zprůchodnění trombozovaných splavů a tím zvrátit nepříznivý vývoj onemocnění¹⁸⁹.

13.8 Terapie

Terapie CVT je souhrn komplexních terapeutických postupů. Jedná se o kauzální snahu o zprůchodnění trombozované žíly antikoagulační terapií, trombolýzou nebo intervenčními metodami. Dnes platná doporučení vycházejí obvykle z předpokladu, že rychlé zprůchodnění venózního systému trombolýzou zabraňuje progresi dalších změn a umožňuje reparaci již zasažené tkáně. Indikováni jsou pacienti ve špatném celkovém stavu, u kterých dochází k selhání základních životních funkcí. Trombolýza vede k rychlému zprůchodnění uzavřené vény, jak prokázaly studie s rekombinantním aktivátorem tkáňového plazminogenu (rtPA) ^{221, 222}. V těchto studiích bylo použito 135mg a 46mg rtPA aplikovaného mikrokatectrem přímo do místa trombózy. Kompletní rekanalizace dosáhly 2/3 pacientů. Na možné vedlejší účinky trombolýzy upozorňují autoři Canhao et al., 2003 ¹⁹². Ze souboru 169 pacientů (trombolýza převážně urokinázou) zemřelo 5 % pacientů a 7 % ztratilo soběstačnost. Nitrolební krvácení bylo potvrzeno u 17 % případů, extrakraniální krvácení u 21 % případů. Autoři Dentali et al., 2010 se souborem 156 pacientů s CVT, léčených trombolýzou, udávají letalitu 9,2 % ²²³. Intrakraniální krvácení bylo potvrzeno u 7,6 % případů (s letalitou přes 50 %). Výše uvedené výsledky svědčí pro úspěch trombolýzy u CVT co do zprůchodnění venózního systému. Podání trombolýzy je však spojeno se zvýšeným rizikem závažného mozkového krvácení. Srovnání terapie trombolýzou a hepariny z publikovaných prací není možné, neboť k trombolýze je indikována jiná, prognosticky závažnější skupina pacientů s CVT.

Po zvládnutí akutní fáze CVT antikoagulační terapií hepariny nebo trombolýzou je doporučeno pokračovat v léčbě perorálními antikoagulanty ¹⁸⁹. I zde se doporučení odvíjejí od zkušeností s trombózami hlubokého žilního systému. V průměru byla perorální antikoagulační terapie předepisována na více než 7 měsíců od příhody ³. Cílem je dosáhnout plné rekanalizace venózního systému, úplné úpravy klinického stavu a zabránit případné rekurenci trombózy. K rekanalizaci dochází nejčastěji v prvních 3 měsících od příhody ²⁰². Smyslem prolongované perorální antikoagulační terapie (nad 3 měsíce) je proto spíše snížení rizika rekurence, a to především u pacientů s prokázanými závažnými trombofilními faktory nebo kombinací více rizikových faktorů. Riziko rekurence CVT je 2,2% a riziko hluboké žilní trombózy jiné lokalizace 4,3% ³ (viz níže). Autoři Einhaupl et al., 2010 ¹⁸⁹ proto doporučují tříměsíční antikoagulační terapii u pacientů s přechodným rizikovým

faktorem. U idiopatických trombóz nebo trombóz s lehkým trombofilním stavem (jako např. heterozygotní forma Leidenské nebo protrombinové mutace) by měla být antikoagulační terapie prodloužena na 6-12 měsíců. U pacientů se závažnou trombofilií (což jsou např. homozygotní formy mutací, deficity proteinu C, S, antifosfolipidový syndrom nebo kombinace více faktorů) je indikována dlouhodobá orální antikoagulační terapie. K dlouhodobé terapii jsou indikováni i pacienti s rekurencí trombózy³. Cílové INR by se mělo pohybovat mezi 2,0 - 3,0.

U našich pacientů byla nejčastěji zahajována terapie nízkomolekulárním heparinem a následně byl pacient převeden na perorální antikoagulační terapii v délce 1 rok. Takto bylo v našem souboru léčeno 41% pacientů. Našli jsme i významnou část pacientů (20%), kterým nebyla poskytnuta antikoagulační terapie vůbec, nebo jen na krátkou dobu formou nízkomolekulárních heparinů. Vzhledem k malému počtu pacientů v těchto skupinách nelze provést statistické srovnání výstupů jednotlivých typů terapií, a tak říci, že by některá skupina pacientů měla významně horší výsledný klinický výsledek. Pacienti bez zahájené terapie měli obvykle chronickou formu CVT, která byla často diagnostikována spíše jako náhodný nález při dlouhodobě trvajících obtížích. Na druhou stranu i pacienti v obzvláště závažných stavech, kteří byli léčeni pomocí trombolýzy a Merci katetru, dosáhli plného uzdravení (9% pacientů).

13.9 Rekurence

Otázka délky antikoagulační terapie není řízena pouze přítomností rizikových faktorů samotné trombózy ale také rizikem rekurence po vysazení antikoagulační terapie. Riziku rekurence CVT nebo jiné venózní trombembolie se nelze zcela vyhnout, ale optimalizací délky terapie s přihlédnutím k riziku rekurence trombózy lze některým příhodám předejít. V případě venózní trombembolie běžných lokalizací existuje 1 % riziko rekurence trombózy již při terapii warfarinem²²⁰. Po vysazení antikoagulační terapie je důležitým rizikovým faktorem rekurence původní příčina trombózy. V případě přechodného faktoru (jako například imobilizace) je riziko rekurence trombózy nízké (kolem 3% v prvním roce). Naopak v případě malignity nebo genetické trombofilie je riziko rekurence až 14% v prvním roce²²⁰. Rizikovější je také mužské pohlaví a proximální trombóza²²⁴. Z těchto rozdílů je patrné, že

nemůže existovat univerzální doporučení pro všechny skupiny pacientů. Pomůckou při vysazování antikoagulační terapie může být měření D-dimerů. Autoři Palareti et al., 2002 zjistili vysokou negativní prediktivní hodnotu D-dimerů pro rekurenci VTE měřenou 1 měsíc po vysazení perorální antikoagulační terapie ²²⁵. Následná studie autorů Palareti et al., 2006 z r. 2006 tyto závěry potvrzuje a pro pacienty se zvýšenými D-dimery doporučuje prolongovat antikoagulační terapii ²²⁶. Obdobným rizikovým faktorem rekurence venózní tromboembolie je i reziduální trombóza. Počet rekanalizací (v případě hluboké žilní trombózy) se v čase zvyšuje (38,8% v 6 měsících vs 73,8% v 36 měsících) ^{219, 220}.

V případě rekurence CVT není v literatuře k dispozici takové množství údajů. Rekurence CVT se jeví relativně vzácná – 2,2 % ^{3, 199} a to většinou v prvním roce po vysazení antikoagulační terapie. Ferro et al., 2004 udávají riziko rekurence CVT včetně venózní tromboembolie jiných lokalizací 6,5% ³. Toto riziko je ale vyšší u pacientů se zjištěnou trombofilií. Protože rekurence trombózy u pacientů s CVT je častější mimo CNS, jsou i doporučení stran prevence rekurence shodná s prevencí rekurence venózní tromboembolie běžných lokalizací. Kontrola D-dimerů a rekanalizace splavů jsou možným vodítkem pro indikaci délky antikoagulační terapie ²²⁵. V našem souboru byla rekurence trombózy zachycena jen 3x, z toho 2x mimo CNS (1x hluboká žilní trombóza na dolní končetině s plicní embolií u pacienta bez jiných rizikových faktorů CVT a 1x trombóza v. lienalis u heterozygota pro Leidenskou mutací).

Z našich případů, kterých je omezený počet, není možná definitivní analýza četnosti rekurencí trombóz CNS. Rozhodli jsme se proto zapojit do nadnárodního projektu výzkumu CVT – CEVETIS ²²⁷. Studie u 706 pacientů zachytila během sledovacího období 3171 „patient-years“ 75 rekurencí trombóz (30 CVT a 45 trombóz jiných lokalizací). Jako rizikové stran rekurence byla identifikována osobní pozitivní osobní anamnéza trombózy, malignita a trauma hlavy. Pozoruhodné je, že délka perorální antikoagulační terapie nad 1 rok nebyla spojena se snížením rekurence trombózy. Rizikové faktory rekurence shrnuje tab.29. Poznámka: Jako závažné trombofilní faktory uvádí tabulka 29: deficit antitrombinu, deficit proteinů C,S, antifosfolipidový syndrom nebo kombinace 2 a více faktorů.

Tabulka č. 29: Základní charakteristiky možných rizikových faktorů pro rekurenci VTE v jednorozměrné analýze (upraveno dle: ²²⁷)

	HR	95% CI	p
Věk při diagnóze	0.996	0.981-1.011	0.578
Pohlaví	1.365	0.829-2.246	0.221
Osobní anamnéza VTE	2.733	1.528-4.887	0.001
Rodinná anamnéza VTE	1.139	0.626-2.002	0.669
Idiopatická CVT	1.015	0.610-1.691	0.926
Trombofilní faktory	1.111	0.707 -1.746	0.648
Závažné trombofilní faktory	1.158	0.611-2.195	0.654
HAK/HRT	0.715	0.448-1.142	0.161
Malignita	2.565	0.906-3.945	0.012
Neurochirurgický zákrok před rokem a dříve	1.713	0.237-12.400	0.594
Trauma hlavy před rokem a dříve	4.197	1.926-9.146	<0.001
Místní nebo systémová infekce	0.670	0.213-1.601	0.436
Myeloproliferativní choroba	2.026	0.281-14.603	0.483
Těhotenství a doba 6 týdnů po porodu	1.045	0.480-2.276	0.911
Antikoagulační terapie nad 1 rok	1.129	0.654-1.949	0.664

Legenda: HR = Poměr rizik; CI = interval spolehlivosti; p = standardní odchylka; VTE = žilní tromboembolie; HAK = hormonální antikoncepce; HRT = hormonální léčba v přechodu; OAT = perorální antikoagulační terapie

Rekurence u těhotenských CVT je malá – k rekurenci nedošlo u 39 žen sledovaných po dobu 10 let ²²⁸. Rizikové faktory i klinická prezentace CVT jsou u těhotných obdobné jako u jiných pacientů ²²⁹. Autoři v doporučení z r. 2010 doporučují další těhotenství až po roce od vysazení perorální antikoagulační terapie ¹⁹⁸. U pacientek s přechodným rizikovým faktorem (např. imobilizace, hormonální antikoncepce) stačí profylaxe LMWH v době poporodní na 4-6 týdnů. U pacientek se závažnou trombofilií je pak vhodná prevence LMWH po celé těhotenství i v puerperiu. Čtyři pacientky ze souboru byly v následném období těhotné. Těhotenství probíhala bez větších komplikací, 2 pacientky byly zajištěny profylaktickou dávkou LMWH ¹⁹⁸.

14 Závěry

Cíle studie byly splněny. Byl vyhledán, prostudován a dlouhodobě sledován soubor nemocných s nízkou incidencí a stále málo známým onemocněním (CVT) o počtu 64 pacientů.

Primární cíle studie - výsledky

1. *Přítomnost mutace JAK2* je v našem souboru 64 pacientů s trombózou žil CNS oproti kontrolnímu souboru zdravých jedinců zvýšena bez ohledu na přítomnost myeloproliferativního onemocnění v době diagnózy.
2. *Klinický význam mutace JAK2*: U většiny pacientů (v době ukončení studie 3/5) byla mutace JAK2 spojena s myeloproliferativním onemocněním, které bylo přítomno již při diagnóze nebo bylo diagnostikováno ve sledovaném období.
3. *Význam vrozených a získaných trombofilních faktorů*:
 - Geneticky podmíněné trombofilie se na etiologii CVT podílely z 25%. Nejčastějším získaným trombofilním faktorem je užívání antikoncepčních hormonálních přípravků (59% z pozitivních vyšetřených). Poměrně vysoký byl i počet tzv. idiopatických CVT – bez zjištěného trombofilního faktoru (19%)
 - Navíc oproti studijnímu plánu jsme se připojili k velké mezinárodní studii CEVETIS ²⁰⁶ a naše výsledky ve výskytu trombofilních mutací (i když na menším počtu nemocných) odpovídají výsledkům studie CEVETIS. Jediný větší rozdíl je ve výskytu mutace protrombinu (10% v naší studii vs 19,1% v CEVETIS)

Sekundární cíle studie - výsledky

1. Nejčastějším příznakem CVT byla bolest hlavy (67% případů), V ohrožení života bylo při diagnóze 8% pacientů. Pacienti v těžším stavu byli časněji diagnostikováni (kratší doba do diagnózy), byli častěji léčeni trombolýzou a měli i vyšší D-dimery vstupně (i když staticky na hranici významnosti).

2. Prokázali jsme souvislost rekanalizace, hormonální antikoncepce a D-dimerů s dobrým konečným klinickým stavem po prodělané CVT. Práce dále popisuje vztahy mezi jednotlivými možnými sledovanými parametry, které mají vztah k prognóze pacienta, rekanalizaci a etiologii trombózy.
3. Senzitivita D-dimerů byla spočítána na 80,6%. Hodnota D-dimerů je nejvyšší při včasné diagnóze a s časem klesá. Hodnota D-dimerů má vztah i k prognóze onemocnění.
4. Rekanalizace dosáhlo v našem souboru 83% pacientů. Přítomnost rekanalizace byla častější u pacientů s lepším klinickým stavem po trombóze, u mladších pacientů a u uživatelék hormonální antikoncepce. Naopak trombofilní stav (genetické mutace, hyperhomocysteinémie, antifosfolipidový syndrom) byl častěji spojen s horším stupněm rekanalizace.
5. V rámci hledání rizikových faktorů rekurence CVT jsme se zapojili do nadnárodní studie CEVETIS (kam jsme přispěli 45 pacienty). Jako rizikové byly identifikovány tyto faktory: trauma, malignita, osobní anamnéza VTE.

15 Literatura

1. PEISKER, T. & BARTOŠ, A. Mozková žilní trombóza - stále opomíjené onemocnění. *Neurol. prax*, 2006, vol. 7, no. 3, s. 170-173. ISSN 1213-1814
2. BOUSSER, M. G. & FERRO, J. M. Cerebral venous thrombosis: an update. *Lancet Neurol*, 2007, vol. 6, no. 2, s. 162-170. ISSN 1474-4422 (Print) 1474-4422 (Linking)
3. FERRO, J. M., CANHAO, P., STAM, J., BOUSSER, M. G. & BARINAGARREMENTERIA, F. Prognosis of cerebral vein and dural sinus thrombosis: results of the International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis (ISCVT). *Stroke*, 2004, vol. 35, no. 3, s. 664-670. ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking)
4. KHEALANI, B. A., WASAY, M., SAADAH, M., SULTANA, E., MUSTAFA, S., KHAN, F. S. & KAMAL, A. K. Cerebral venous thrombosis: a descriptive multicenter study of patients in Pakistan and Middle East. *Stroke*, 2008, vol. 39, no. 10, s. 2707-2711. ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking)
5. QI, X., YANG, Z., BAI, M., SHI, X., HAN, G. & FAN, D. Meta-analysis: the significance of screening for JAK2V617F mutation in Budd-Chiari syndrome and portal venous system thrombosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, vol. 33, no. 10, s. 1087-1103. ISSN 1365-2036 (Electronic) 0269-2813 (Linking)
6. WEBERSINKE, G. & RUMPOLD, H. Pathogenetic and clinical impact of JAK2 mutations in chronic myeloproliferative diseases. *Magazine of european medical oncology*, 2009, vol. 2, no. 89-93. ISSN
7. RIBES, M.F. Des recherches faites sur la phlebite. *Revue Medical Francais et Etrangere en Journal de clinique de l'Hotel Dieu et de la Charite de Paris*, 1825, vol. 3, no. 5, s. 5-40.
8. ABERCROMBEI, J. Superior sagittal thrombosis in puerperium 83. *Pathological and Practical Researches of the Brain and Spinal Cord*, 1828, s. 83-85
9. TOWBIN, A. The syndrome of latent cerebral venous thrombosis: its frequency and relation to age and congestive heart failure. *Stroke*, 1973, vol. 4, no. 3, s. 419-430. ISSN 0039-2499 (Print) 0039-2499 (Linking)

10. SYMONDS, C. P. Cerebral Thrombophlebitis. *Br Med J*, 1940, vol. 2, no. 4158, s. 348-352. ISSN 0007-1447 (Print)
0007-1447 (Linking)
11. PEISKER, T. & BARTOŠ, A. Mozková žilní trombóza - stále opomíjené onemocnění. *Neurol. prax*, 2006, vol. 7, no. 3, s. 170-173. ISSN 1213-1814
12. FAUKNEROVÁ, M., PEISKER, T., MEDOVÁ, E. & DOLEŽIL, D. Nitrolební žilní trombóza maskovaná migrénou. *Interní Med.*, 2010, vol. 10, no. 12, s. 506-508. ISSN 1210-7859
13. PRAKASH, C. & BANSAL, B.C. Cerebral Venous Thrombosis. *J Indian Acad Clin Med*, 2000, vol. 5, no. 1, s. 55-61.
14. DAHLBACK, B., CARLSSON, M. & SVENSSON, P. J. 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, vol. 90, no. 3, s. 1004-1008. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking)
15. BERTINA, R. M., KOELEMAN, B. P., KOSTER, T., ROSENDAAL, F. R., DIRVEN, R. J., DE RONDE, H., VAN DER VELDEN, P. A. & REITSMA, P. H. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 1994, vol. 369, no. 6475, s. 64-67. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking)
16. POORT, S. R., ROSENDAAL, F. R., REITSMA, P. H. & BERTINA, R. 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, vol. 88, no. 10, s. 3698-3703. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking)
17. MARTINELLI, I., BATTAGLIOLI, T., PEDOTTI, P., CATTANEO, M. & MANNUCCI, P. M. Hyperhomocysteinemia in cerebral vein thrombosis. *Blood*, 2003, vol. 102, no. 4, s. 1363-1366. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking)
18. CANTU, C., ALONSO, E., JARA, A., MARTINEZ, L., RIOS, C., FERNANDEZ MDE, L., GARCIA, I. & BARINAGARREMENTERIA, F. Hyperhomocysteinemia, low folate and vitamin B12 concentrations, and methylene tetrahydrofolate reductase mutation in cerebral venous thrombosis. *Stroke*, 2004, vol. 35, no. 8, s. 1790-1794. ISSN 1524-4628 (Electronic)

0039-2499 (Linking)

19. BERTINA, R. M. Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clin Chem*, 1997, vol. 43, no. 9, s. 1678-1683. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147 (Linking)

20. KVASNICKA, J., HAJKOVA, J., BOBČIKOVA, P., KVASNICKA, T., DUSKOVA, D., POLETINOVA, S. & KIEFEROVA, V. [Prevalence of thrombophilic mutations of FV Leiden, prothrombin G20210A and PAI-1 4G/5G and their combinations in a group of 1450 healthy middle-aged individuals in the Prague and Central Bohemian regions (results of FRET real-time PCR assay)]. *Cas Lek Cesk*, 2012, vol. 151, no. 2, s. 76-82. ISSN 0008-7335 (Print)

0008-7335 (Linking)

21. DENTALI, F., CROWTHER, M. & AGENO, W. Thrombophilic abnormalities, oral contraceptives, and risk of cerebral vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood*, 2006, vol. 107, no. 7, s. 2766-2773. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking)

22. MARGAGLIONE, M., BRANCACCIO, V., DE LUCIA, D., MARTINELLI, I., CIAMPA, A., GRANDONE, E. & DI MINNO, G. Inherited thrombophilic risk factors and venous thromboembolism: distinct role in peripheral deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Chest*, 2000, vol. 118, no. 5, s. 1405-1411. ISSN 0012-3692 (Print)

0012-3692 (Linking)

23. MARTINELLI, I., BATTAGLIOLI, T., RAZZARI, C. & MANNUCCI, P. M. Type and location of venous thromboembolism in patients with factor V Leiden or prothrombin G20210A and in those with no thrombophilia. *J Thromb Haemost*, 2007, vol. 5, no. 1, s. 98-101. ISSN 1538-7933 (Print)

1538-7933 (Linking)

24. EROGLU, A., SERTKAYA, D. & AKAR, N. The Role of Factor V Leiden in Adult Patients With Venous Thromboembolism: A Meta-Analysis of Published Studies From Turkey. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2011, ISSN 1938-2723 (Electronic)

1938-2723 (Linking)

25. LIBOUREL, E. J., TEN KATE, M. K., BROUWER, J. L., VEEGER, N. J. & VAN DER MEER, J. Contribution of multiple thrombophilic and transient risk factors in the development of cerebral venous thrombosis. *Thromb Res*, 2007, vol. 121, no. 3, s. 301-307. ISSN 0049-3848 (Print)

0049-3848 (Linking)

26. JADAON, M. M. Epidemiology of Prothrombin G20210A Mutation in the Mediterranean Region. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2011, vol. 3, no. 1, s. e2011054. ISSN 2035-3006 (Electronic)

2035-3006 (Linking)

27. CEELIE, H., SPAARGAREN-VAN RIEL, C. C., BERTINA, R. M. & VOS, H. L. G20210A is a functional mutation in the prothrombin gene; effect on protein levels and 3'-end formation. *J Thromb Haemost*, 2004, vol. 2, no. 1, s. 119-127. ISSN 1538-7933 (Print)

1538-7836 (Linking)

28. MELTZER, M. E., LISMAN, T., DE GROOT, P. G., MEIJERS, J. C., LE CESSIE, S., DOGGEN, C. J. & ROSENDAAL, F. R. Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 1, s. 113-121. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking)

29. MARCHIORI, A., MOSENA, L., PRINS, M. H. & PRANDONI, P. The risk of recurrent venous thromboembolism among heterozygous carriers of factor V Leiden or prothrombin G20210A mutation. A systematic review of prospective studies. *Haematologica*, 2007, vol. 92, no. 8, s. 1107-1114. ISSN 1592-8721 (Electronic)

0390-6078 (Linking)

30. KOVAC, M., MITIC, G., MIKOVIC, Z., ANTONIJEVIC, N., DJORDJEVIC, V., MIKOVIC, D., MANDIC, V., RAKICEVIC, L. & RADOJKOVIC, D. Type and location of venous thromboembolism in carriers of Factor V Leiden or prothrombin G20210A mutation versus patients with no mutation. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2010, vol. 16, no. 1, s. 66-70. ISSN 1938-2723 (Electronic)

1076-0296 (Linking)

31. GRIFFIN, J. H., EVATT, B., ZIMMERMAN, T. S., KLEISS, A. J. & WIDEMAN, C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest*, 1981, vol. 68, no. 5, s. 1370-1373. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking)

32. COMP, P. C. & ESMON, C. T. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med*, 1984, vol. 311, no. 24, s. 1525-1528. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking)

33. BERECZKY, Z., KOVACS, K. B. & MUSZBEK, L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin Chem Lab Med*, 2010, vol. 48 Suppl 1, no. S53-66. ISSN 1434-6621 (Print)
1434-6621 (Linking)
34. MOSNIER, L. O., ZLOKOVIC, B. V. & GRIFFIN, J. H. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 8, s. 3161-3172. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking)
35. TAIT, R. C., WALKER, I. D., REITSMA, P. H., ISLAM, S. I., MCCALL, F., POORT, S. R., CONKIE, J. A. & BERTINA, R. M. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost*, 1995, vol. 73, no. 1, s. 87-93. ISSN 0340-6245 (Print)
0340-6245 (Linking)
36. DYKES, A. C., WALKER, I. D., MCMAHON, A. D., ISLAM, S. I. & TAIT, R. C. A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol*, 2001, vol. 113, no. 3, s. 636-641. ISSN 0007-1048 (Print)
0007-1048 (Linking)
37. DE STEFANO, V., SIMIONI, P., ROSSI, E., TORMENE, D., ZA, T., PAGNAN, A. & LEONE, G. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with inherited deficiency of natural anticoagulants antithrombin, protein C and protein S. *Haematologica*, 2006, vol. 91, no. 5, s. 695-698. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking)
38. BROUWER, J. L., LIJFERING, W. M., TEN KATE, M. K., KLUIN-NELEMANS, H. C., VEEGER, N. J. & VAN DER MEER, J. High long-term absolute risk of recurrent venous thromboembolism in patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C or antithrombin. *Thromb Haemost*, 2009, vol. 101, no. 1, s. 93-99. ISSN 0340-6245 (Print)
0340-6245 (Linking)
39. KENET, G., LUTKHOFF, L. K., ALBISETTI, M., BERNARD, T., BONDUEL, M., BRANDAO, L., CHABRIER, S., CHAN, A., DEVEBER, G., FIEDLER, B., FULLERTON, H. J., GOLDENBERG, N. A., GRABOWSKI, E., GUNTHER, G., HELLER, C., HOLZHAUER, S., IORIO, A., JOURNEYCAKE, J., JUNKER, R., KIRKHAM, F. J., KURNIK, K., LYNCH, J. K., MALE, C., MANCO-JOHNSON, M., MESTERS, R., MONAGLE, P., VAN OMMEN,

- C. H., RAFFINI, L., ROSTASY, K., SIMIONI, P., STRATER, R. D., YOUNG, G. & NOWAK-GOTTL, U. Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Circulation*, 2010, vol. 121, no. 16, s. 1838-1847. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking)
40. SAADATNIA, M., FATEHI, F., BASIRI, K., MOUSAVI, S. A. & MEHR, G. K. Cerebral venous sinus thrombosis risk factors. *Int J Stroke*, 2009, vol. 4, no. 2, s. 111-123. ISSN 1747-4949 (Electronic)
1747-4930 (Linking)
41. BOMBELI, T., BASIC, A. & FEHR, J. Prevalence of hereditary thrombophilia in patients with thrombosis in different venous systems. *Am J Hematol*, 2002, vol. 70, no. 2, s. 126-132. ISSN 0361-8609 (Print)
0361-8609 (Linking)
42. PATNAIK, M. M. & MOLL, S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia*, 2008, vol. 14, no. 6, s. 1229-1239. ISSN 1365-2516 (Electronic)
1351-8216 (Linking)
43. BUCCIARELLI, P., ROSENDAAL, F. R., TRIPODI, A., MANNUCCI, P. M., DE STEFANO, V., PALARETI, G., FINAZZI, G., BAUDO, F. & QUINTAVALLA, R. Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antithrombin, protein C, protein S deficiency, or activated protein C resistance: a multicenter collaborative family study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, vol. 19, no. 4, s. 1026-1033. ISSN 1079-5642 (Print)
1079-5642 (Linking)
44. DEN HEIJER, M., LEWINGTON, S. & CLARKE, R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost*, 2005, vol. 3, no. 2, s. 292-299. ISSN 1538-7933 (Print)
1538-7836 (Linking)
45. JACQUES, P. F., BOSTOM, A. G., WILLIAMS, R. R., ELLISON, R. C., ECKFELDT, J. H., ROSENBERG, I. H., SELHUB, J. & ROZEN, R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*, 1996, vol. 93, no. 1, s. 7-9. ISSN 0009-7322 (Print)
0009-7322 (Linking)

46. GOUVEIA, L. O. & CANHAO, P. MTHFR and the risk for cerebral venous thrombosis--a meta-analysis. *Thromb Res*, 2010, vol. 125, no. 4, s. e153-158. ISSN 1879-2472 (Electronic)
0049-3848 (Linking)
47. ROSENDAAL, F. R., HELMERHORST, F. M. & VANDENBROUCKE, J. P. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb Haemost*, 2001, vol. 86, no. 1, s. 112-123. ISSN 0340-6245 (Print)
0340-6245 (Linking)
48. ROSENDAAL, F. R., VAN HYLCKAMA Vlieg, A., TANIS, B. C. & HELMERHORST, F. M. Estrogens, progestogens and thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2003, vol. 1, no. 7, s. 1371-1380. ISSN 1538-7933 (Print)
1538-7836 (Linking)
49. KEMMEREN, J. M., ALGRA, A., MEIJERS, J. C., TANS, G., BOUMA, B. N., CURVERS, J., ROSING, J. & GROBBEE, D. E. Effect of second- and third-generation oral contraceptives on the protein C system in the absence or presence of the factor VLeiden mutation: a randomized trial. *Blood*, 2004, vol. 103, no. 3, s. 927-933. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking)
50. VANDENBROUCKE, J. P., ROSING, J., BLOEMENKAMP, K. W., MIDDELDORP, S., HELMERHORST, F. M., BOUMA, B. N. & ROSENDAAL, F. R. Oral contraceptives and the risk of venous thrombosis. *N Engl J Med*, 2001, vol. 344, no. 20, s. 1527-1535. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking)
51. DULICEK, P. [Hormonal contraception and thromboembolic disease--pathophysiologic findings and practical recommendations]. *Ceska Gynekol*, 2001, vol. 66, no. 5, s. 363-368. ISSN 1210-7832 (Print)
1210-7832 (Linking)
52. DULÍČEK, P. Riziko venózního tromboembolizmu (u žen s trombofilním stavem užívajících hormonální antikoncepci). *Moderní gynekologie a porodnictví*, 2010, vol. 19, no. 1, suppl. B, s. 86-92. ISSN
53. VAN DEN BOSCH, M. A., KEMMEREN, J. M., TANIS, B. C., MALI, W. P., HELMERHORST, F. M., ROSENDAAL, F. R., ALGRA, A. & VAN DER GRAAF, Y. The RATIO study: oral contraceptives and the risk of peripheral arterial disease in young women. *J Thromb Haemost*, 2003, vol. 1, no. 3, s. 439-444. ISSN 1538-7933 (Print)

1538-7836 (Linking)

54. Acute myocardial infarction and combined oral contraceptives: results of an international multicentre case-control study. WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet*, 1997, vol. 349, no. 9060, s. 1202-1209. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking)

55. KEMMEREN, J. M., TANIS, B. C., VAN DEN BOSCH, M. A., BOLLEN, E. L., HELMERHORST, F. M., VAN DER GRAAF, Y., ROSENDAAL, F. R. & ALGRA, A. Risk of Arterial Thrombosis in Relation to Oral Contraceptives (RATIO) study: oral contraceptives and the risk of ischemic stroke. *Stroke*, 2002, vol. 33, no. 5, s. 1202-1208. ISSN 1524-4628 (Electronic)

0039-2499 (Linking)

56. DELOUGHERY, T. G. Estrogen and thrombosis: controversies and common sense. *Rev Endocr Metab Disord*, 2011, vol. 12, no. 2, s. 77-84. ISSN 1573-2606 (Electronic)

1389-9155 (Linking)

57. VAN HYLCKAMA VLIEG, A. & MIDDELDORP, S. Hormone therapies and venous thromboembolism: where are we now? *J Thromb Haemost*, 2011, vol. 9, no. 2, s. 257-266. ISSN 1538-7836 (Electronic)

1538-7836 (Linking)

58. No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation*, 2003, vol. 107, no. 8, s. 1117-1122. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking)

59. Oral contraception and thrombo-embolic disease. *J R Coll Gen Pract*, 1967, vol. 13, no. 3, s. 267-279. ISSN 0035-8797 (Print)

0035-8797 (Linking)

60. LIDEGAARD, O., LOKKEGAARD, E., SVENDSEN, A. L. & AGGER, C. Hormonal contraception and risk of venous thromboembolism: national follow-up study. *BMJ*, 2009, vol. 339, no. b2890. ISSN 1468-5833 (Electronic)

0959-535X (Linking)

61. VAN HYLCKAMA VLIEG, A., HELMERHORST, F. M., VANDENBROUCKE, J. P., DOGGEN, C. J. & ROSENDAAL, F. R. The venous thrombotic risk of oral

contraceptives, effects of oestrogen dose and progestogen type: results of the MEGA case-control study. *BMJ*, 2009, vol. 339, no. b2921. ISSN 1468-5833 (Electronic) 0959-535X (Linking)

62. KEMMEREN, J. M., ALGRA, A. & GROBBEE, D. E. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. *BMJ*, 2001, vol. 323, no. 7305, s. 131-134. ISSN 0959-8138 (Print) 0959-535X (Linking)

63. FARMER, R. D., LAWRENSEN, R. A., TODD, J. C., WILLIAMS, T. J., MACRAE, K. D., TYRER, F. & LEYDON, G. M. A comparison of the risks of venous thromboembolic disease in association with different combined oral contraceptives. *Br J Clin Pharmacol*, 2000, vol. 49, no. 6, s. 580-590. ISSN 0306-5251 (Print) 0306-5251 (Linking)

64. JICK, S. S., HAGBERG, K. W. & KAYE, J. A. ORTHO EVRA and venous thromboembolism: an update. *Contraception*, 2010, vol. 81, no. 5, s. 452-453. ISSN 1879-0518 (Electronic) 0010-7824 (Linking)

65. VAN HYLCKAMA VLIEG, A., HELMERHORST, F. M. & ROSENDAAL, F. R. The risk of deep venous thrombosis associated with injectable depot-medroxyprogesterone acetate contraceptives or a levonorgestrel intrauterine device. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, vol. 30, no. 11, s. 2297-2300. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking)

66. VANDENBROUCKE, J. P., KOSTER, T., BRIET, E., REITSMA, P. H., BERTINA, R. M. & ROSENDAAL, F. R. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet*, 1994, vol. 344, no. 8935, s. 1453-1457. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking)

67. HERINGS, R. M., URQUHART, J. & LEUFKENS, H. G. Venous thromboembolism among new users of different oral contraceptives. *Lancet*, 1999, vol. 354, no. 9173, s. 127-128. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking)

68. FARMER, R. D., LAWRENSEN, R. A., THOMPSON, C. R., KENNEDY, J. G. & HAMBLETON, I. R. Population-based study of risk of venous thromboembolism associated with various oral contraceptives. *Lancet*, 1997, vol. 349, no. 9045, s. 83-88. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking)

69. DULICEK, P., MALY, J., PECKA, M., BERANEK, M., CERMAKOVA, E. & MALY, R. Venous thromboembolism in young female while on oral contraceptives: high frequency of inherited thrombophilia and analysis of thrombotic events in 400 czech women. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2009, vol. 15, no. 5, s. 567-573. ISSN 1938-2723 (Electronic)

1076-0296 (Linking)

70. DULÍČEK, P., MALÝ, J. & BERÁNEK, M. Protrombin G20210A – výskyt u žen s venózním tromboembolismem v časové souvislosti s užíváním hormonální antikoncepce. *Vaskulárna medicína*, 2010, vol. 2, suppl.3, no. 22. ISSN

71. HANNAFORD, P. C. Epidemiology of the contraceptive pill and venous thromboembolism. *Thromb Res*, 2011, vol. 127 Suppl 3, no. S30-34. ISSN 1879-2472 (Electronic)

0049-3848 (Linking)

72. MARTINELLI, I., TAIOLI, E., BUCCIARELLI, P., AKHAVAN, S. & MANNUCCI, P. M. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, vol. 19, no. 3, s. 700-703. ISSN 1079-5642 (Print)

1079-5642 (Linking)

73. VAN HYLCKAMA VLIEG, A. & ROSENDAAL, F. R. Interaction between oral contraceptive use and coagulation factor levels in deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2003, vol. 1, no. 10, s. 2186-2190. ISSN 1538-7933 (Print)

1538-7836 (Linking)

74. WU, O., ROBERTSON, L., TWADDLE, S., LOWE, G. D., CLARK, P., GREAVES, M., WALKER, I. D., LANGHORNE, P., BRENKEL, I., REGAN, L. & GREER, I. Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic review and cost-effectiveness analysis. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) study. *Health Technol Assess*, 2006, vol. 10, no. 11, s. 1-110. ISSN 1366-5278 (Print)

1366-5278 (Linking)

75. COSMI, B., LEGNANI, C., BERNARDI, F., COCCHERI, S. & PALARETI, G. Value of family history in identifying women at risk of venous thromboembolism during oral contraception: observational study. *BMJ*, 2001, vol. 322, no. 7293, s. 1024-1025. ISSN 0959-8138 (Print)

0959-535X (Linking)

76. LIJFERING, W. M., VEEGER, N. J., MIDDELDORP, S., HAMULYAK, K., PRINS, M. H., BULLER, H. R. & VAN DER MEER, J. A lower risk of recurrent venous thrombosis in women compared with men is explained by sex-specific risk factors at time of first venous thrombosis in thrombophilic families. *Blood*, 2009, vol. 114, no. 10, s.

2031-2036. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking)

77. CHRISTIANSEN, S. C., CANNegiETER, S. C., KOSTER, T., VANDENBROUCKE, J. P. & ROSENDAAL, F. R. Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *JAMA*, 2005, vol. 293, no. 19, s. 2352-2361. ISSN 1538-3598

(Electronic)

0098-7484 (Linking)

78. PROCHÁZKA, M., PROCHÁZKA, V., LUBUŠKÝ, M., PROCHÁZKOVÁ, J. & HRBÁČ, T. Mozková žilní trombóza u uživatelék hormonální antikoncepce. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2007, vol. 70/103(6), no. 678-684. ISSN

79. KRAJÍČKOVÁ, D., KOŠTÁL, M., KRAJINA, A., KLZO, L., DULÍČEK, P. & KUBÍKOVÁ, M. Mozková flebotrombóza – analýza série 33 nemocných. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2010, vol. 73/106(4), no. 402-408. ISSN

80. EHLER, E., KOPAL, A., MRKLOVSKY, M. & KOSTAL, M. Cerebral venous thrombosis after a cesarean delivery. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2010, vol. 53, no. 2, s. 109-113. ISSN 1211-4286 (Print)

1211-4286 (Linking)

81. CUSHMAN, M., KULLER, L. H., PRENTICE, R., RODABOUGH, R. J., PSATY, B. M., STAFFORD, R. S., SIDNEY, S. & ROSENDAAL, F. R. Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. *JAMA*, 2004, vol. 292, no. 13, s. 1573-1580. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking)

82. ANDERSEN, L. F., GRAM, J., SKOUBY, S. O. & JESPERSEN, J. Effects of hormone replacement therapy on hemostatic cardiovascular risk factors. *Am J Obstet Gynecol*, 1999, vol. 180, no. 2 Pt 1, s. 283-289. ISSN 0002-9378 (Print)

0002-9378 (Linking)

83. DOUKETIS, J. D., JULIAN, J. A., CROWTHER, M. A., KEARON, C., BATES, S. M., BARONE, M., PIOVELLA, F., MIDDELDORP, S., PRANDONI, P., JOHNSTON, M., COSTANTINI, L. & GINSBERG, J. S. The effect of prothrombotic blood abnormalities

- on risk of deep vein thrombosis in users of hormone replacement therapy: a prospective case-control study. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2011, vol. 17, no. 6, s. E106-113. ISSN 1938-2723 (Electronic)
1076-0296 (Linking)
84. ROSSOUW, J. E., ANDERSON, G. L., PRENTICE, R. L., LACROIX, A. Z., KOOPERBERG, C., STEFANICK, M. L., JACKSON, R. D., BERESFORD, S. A., HOWARD, B. V., JOHNSON, K. C., KOTCHEN, J. M. & OCKENE, J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 2002, vol. 288, no. 3, s. 321-333. ISSN 0098-7484 (Print)
0098-7484 (Linking)
85. DIETEL, M. Hormone replacement therapy (HRT), breast cancer and tumor pathology. *Maturitas*, 2010, vol. 65, no. 3, s. 183-189. ISSN 1873-4111 (Electronic)
0378-5122 (Linking)
86. RAVDIN, P. M., CRONIN, K. A., HOWLADER, N., BERG, C. D., CHLEBOWSKI, R. T., FEUER, E. J., EDWARDS, B. K. & BERRY, D. A. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med*, 2007, vol. 356, no. 16, s. 1670-1674. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking)
87. TROUSSEAU, A. Phlegmasia alba dolens. *Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris*, 1865, vol. 3, no. 654-712. ISSN
88. MILLER, G. J., BAUER, K. A., HOWARTH, D. J., COOPER, J. A., HUMPHRIES, S. E. & ROSENBERG, R. D. Increased incidence of neoplasia of the digestive tract in men with persistent activation of the coagulant pathway. *J Thromb Haemost*, 2004, vol. 2, no. 12, s. 2107-2114. ISSN 1538-7933 (Print)
1538-7836 (Linking)
89. NOBLE, S. & PASI, J. Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. *Br J Cancer*, 2010, vol. 102 Suppl 1, no. S2-9. ISSN 1532-1827 (Electronic)
0007-0920 (Linking)
90. SHOJI, M., HANCOCK, W. W., ABE, K., MICKO, C., CASPER, K. A., BAINE, R. M., WILCOX, J. N., DANAVE, I., DILLEHAY, D. L., MATTHEWS, E., CONTRINO, J., MORRISSEY, J. H., GORDON, S., EDINGTON, T. S., KUDRYK, B., KREUTZER, D. L. & RICKLES, F. R. Activation of coagulation and angiogenesis in cancer:

immunohistochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. *Am J Pathol*, 1998, vol. 152, no. 2, s. 399-411. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking)

91. KHORANA, A. A., AHRENDT, S. A., RYAN, C. K., FRANCIS, C. W., HRUBAN, R. H., HU, Y. C., HOSTETTER, G., HARVEY, J. & TAUBMAN, M. B. Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 2007, vol. 13, no. 10, s. 2870-2875. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking)

92. UNO, K., HOMMA, S., SATOH, T., NAKANISHI, K., ABE, D., MATSUMOTO, K., OKI, A., TSUNODA, H., YAMAGUCHI, I., NAGASAWA, T., YOSHIKAWA, H. & AONUMA, K. Tissue factor expression as a possible determinant of thromboembolism in ovarian cancer. *Br J Cancer*, 2007, vol. 96, no. 2, s. 290-295. ISSN 0007-0920 (Print)

0007-0920 (Linking)

93. YU, J. L., MAY, L., LHOTAK, V., SHAHRZAD, S., SHIRASAWA, S., WEITZ, J. I., COOMBER, B. L., MACKMAN, N. & RAK, J. W. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*, 2005, vol. 105, no. 4, s. 1734-1741. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking)

94. ZWICKER, J. I., LIEBMAN, H. A., NEUBERG, D., LACROIX, R., BAUER, K. A., FURIE, B. C. & FURIE, B. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res*, 2009, vol. 15, no. 22, s. 6830-6840. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking)

95. BLOM, J. W., DOGGEN, C. J., OSANTO, S. & ROSENDAAL, F. R. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA*, 2005, vol. 293, no. 6, s. 715-722. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking)

96. CHEW, H. K., WUN, T., HARVEY, D., ZHOU, H. & WHITE, R. H. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Arch Intern Med*, 2006, vol. 166, no. 4, s. 458-464. ISSN 0003-9926 (Print)

0003-9926 (Linking)

97. PRANDONI, P., LENSING, A. W., PICCIOLI, A., BERNARDI, E., SIMIONI, P., GIROLAMI, B., MARCHIORI, A., SABBION, P., PRINS, M. H., NOVENTA, F. &

- GIROLAMI, A. Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood*, 2002, vol. 100, no. 10, s. 3484-3488. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking)
98. KHORANA, A. A., KUDERER, N. M., CULAKOVA, E., LYMAN, G. H. & FRANCIS, C. W. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 10, s. 4902-4907. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking)
99. NAESS, I. A., CHRISTIANSEN, S. C., ROMUNDSTAD, P., CANNegiETER, S. C., ROSENDAAL, F. R. & HAMMERSTROM, J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost*, 2007, vol. 5, no. 4, s. 692-699. ISSN 1538-7933 (Print)
1538-7836 (Linking)
100. WEILL-ENGERER, S., MEAUME, S., LAHLOU, A., PIETTE, F., SAINT-JEAN, O., SACHET, A., BEINIS, J. Y., GALLINARI, C., GRANCHER, A. S., VINCENT, J. P., NAGA, H., BELMIN, J., SALVATORE, R., KAZES, M., PAUTAS, E., BOIFFIN, A., PIERA, J. B., DUVIQUET, M., KNAFO, D., PIAU, A., MIRIC, D., JEAN, A., BELLAMY, V., TISSANDIER, O. & LE BLANCHE, A. F. Risk factors for deep vein thrombosis in inpatients aged 65 and older: a case-control multicenter study. *J Am Geriatr Soc*, 2004, vol. 52, no. 8, s. 1299-1304. ISSN 0002-8614 (Print)
0002-8614 (Linking)
101. VAN DEN AKKER, M., BUNTINX, F., METSEMAKERS, J. F., ROOS, S. & KNOTTNERUS, J. A. Multimorbidity in general practice: prevalence, incidence, and determinants of co-occurring chronic and recurrent diseases. *J Clin Epidemiol*, 1998, vol. 51, no. 5, s. 367-375. ISSN 0895-4356 (Print)
0895-4356 (Linking)
102. ENGBERS, M. J., VAN HYLCKAMA Vlieg, A. & ROSENDAAL, F. R. Venous thrombosis in the elderly: incidence, risk factors and risk groups. *J Thromb Haemost*, 2010, vol. 8, no. 10, s. 2105-2112. ISSN 1538-7836 (Electronic)
1538-7836 (Linking)
103. MAHMOODI, B. K., GANSEVOORT, R. T., VEEGER, N. J., MATTHEWS, A. G., NAVIS, G., HILLEG, H. L. & VAN DER MEER, J. Microalbuminuria and risk of venous

- thromboembolism. *JAMA*, 2009, vol. 301, no. 17, s. 1790-1797. ISSN 1538-3598
(Electronic)
0098-7484 (Linking)
104. CHEW, H. K., DAVIES, A. M., WUN, T., HARVEY, D., ZHOU, H. & WHITE, R. H.
The incidence of venous thromboembolism among patients with primary lung cancer.
J Thromb Haemost, 2008, vol. 6, no. 4, s. 601-608. ISSN 1538-7836 (Electronic)
1538-7836 (Linking)
105. IHLE, J. N. Cytokine receptor signalling. *Nature*, 1995, vol. 377, no. 6550, s.
591-594. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking)
106. SKODA, R. Update on the impact of the JAK2 mutation on signalling pathways
in myeloproliferative disorders. *Eur J Haematol Suppl*, 2007, vol. no. 68, s. 5-8.
ISSN 0902-4506 (Print)
0902-4506 (Linking)
107. KHWAJA, A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological
malignancy. *Br J Haematol*, 2006, vol. 134, no. 4, s. 366-384. ISSN 0007-1048
(Print)
0007-1048 (Linking)
108. HEIM, M. H. The Jak-STAT pathway: specific signal transduction from the cell
membrane to the nucleus. *Eur J Clin Invest*, 1996, vol. 26, no. 1, s. 1-12. ISSN
0014-2972 (Print)
0014-2972 (Linking)
109. TEFFERI, A. & PARDANANI, A. JAK inhibitors in myeloproliferative neoplasms:
rationale, current data and perspective. *Blood Rev*, 2011, vol. 25, no. 5, s. 229-237.
ISSN 1532-1681 (Electronic)
0268-960X (Linking)
110. SCOTT, L. M. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am J
Hematol*, 2011, vol. 86, no. 8, s. 668-676. ISSN 1096-8652 (Electronic)
0361-8609 (Linking)
111. VANNUCCHI, A. M. JAK2 mutation and thrombosis in the myeloproliferative
neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep*, 2010, vol. 5, no. 1, s. 22-28. ISSN 1558-822X
(Electronic)
1558-8211 (Linking)

112. DE STEFANO, V., ZA, T., ROSSI, E., VANNUCCHI, A. M., RUGGERI, M., ELLI, E., MICO, C., TIEGHI, A., CACCIOLA, R. R., SANTORO, C., GERLI, G., VIANELLI, N., GUGLIELMELLI, P., PIERI, L., SCOGNAMIGLIO, F., RODEGHIERO, F., POGLIANI, E. M., FINAZZI, G., GUGLIOTTA, L., MARCHIOLI, R., LEONE, G. & BARBUI, T. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica*, 2008, vol. 93, no. 3, s. 372-380. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking)
113. PAPADAKIS, E., HOFFMAN, R. & BRENNER, B. Thrombohemorrhagic complications of myeloproliferative disorders. *Blood Rev*, 2010, vol. 24, no. 6, s. 227-232. ISSN 1532-1681 (Electronic)
0268-960X (Linking)
114. BARBUI, T., CAROBBIO, A., RAMBALDI, A. & FINAZZI, G. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? *Blood*, 2009, vol. 114, no. 4, s. 759-763. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking)
115. PATRIARCA, A., POMPETTI, F., MALIZIA, R., IULIANI, O., DI MARZIO, I., SPADANO, A. & DRAGANI, A. Is the absence of JAK2 mutation a risk factor for bleeding in essential thrombocythemia? An analysis of 106 patients. *Blood Transfus*, 2010, vol. 8, no. 1, s. 21-27. ISSN 1723-2007 (Print)
1723-2007 (Linking)
116. LUSSANA, F., CABERLON, S., PAGANI, C., KAMPHUISEN, P. W., BULLER, H. R. & CATTANEO, M. Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review. *Thromb Res*, 2009, vol. 124, no. 4, s. 409-417. ISSN 1879-2472 (Electronic)
0049-3848 (Linking)
117. DAHABREH, I. J., ZOI, K., GIANNOULI, S., ZOI, C., LOUKOPOULOS, D. & VOULGARELIS, M. Is JAK2 V617F mutation more than a diagnostic index? A meta-analysis of clinical outcomes in essential thrombocythemia. *Leuk Res*, 2009, vol. 33, no. 1, s. 67-73. ISSN 0145-2126 (Print)
0145-2126 (Linking)

118. ZIAKAS, P. D. Effect of JAK2 V617F on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: measuring the uncertain. *Haematologica*, 2008, vol. 93, no. 9, s. 1412-1414. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking)
119. CAMPBELL, P. J., SCOTT, L. M., BUCK, G., WHEATLEY, K., EAST, C. L., MARSDEN, J. T., DUFFY, A., BOYD, E. M., BENCH, A. J., SCOTT, M. A., VASSILIOU, G. S., MILLIGAN, D. W., SMITH, S. R., ERBER, W. N., BAREFORD, D., WILKINS, B. S., REILLY, J. T., HARRISON, C. N. & GREEN, A. R. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*, 2005, vol. 366, no. 9501, s. 1945-1953. ISSN 1474-547X (Electronic)
0140-6736 (Linking)
120. CAROBBIO, A., FINAZZI, G., GUERINI, V., SPINELLI, O., DELAINI, F., MARCHIOLI, R., BORRELLI, G., RAMBALDI, A. & BARBUI, T. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 6, s. 2310-2313. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking)
121. ANTONIOLI, E., GUGLIELMELLI, P., PANCRACCI, A., BOGANI, C., VERRUCCI, M., PONZIANI, V., LONGO, G., BOSI, A. & VANNUCCHI, A. M. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia*, 2005, vol. 19, no. 10, s. 1847-1849. ISSN 0887-6924 (Print)
0887-6924 (Linking)
122. WOLANSKYJ, A. P., LASHO, T. L., SCHWAGER, S. M., MCCLURE, R. F., WADLEIGH, M., LEE, S. J., GILLILAND, D. G. & TEFFERI, A. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol*, 2005, vol. 131, no. 2, s. 208-213. ISSN 0007-1048 (Print)
0007-1048 (Linking)
123. LAUW, M. N., BUS, E. W., VAN WULFFTEN PALTHE, A. F., COPPENS, M., HOMBURG, C. H., MIDDELDORP, S., VAN DER SCHOOT, C. E., KOENE, H. R. & BIEMOND, B. J. Relevance of the JAK2V617F mutation in patients with deep vein thrombosis of the leg. *Ann Hematol*, 2012, vol. 91, no. 1, s. 103-107. ISSN 1432-0584 (Electronic)
0939-5555 (Linking)

124. RODGER, M. A., KEKRE, N., LE GAL, G., KAHN, S. R., WELLS, P. S., ANDERSON, D. A., CHAGNON, I., SOLYMOSS, S., CROWTHER, M., PERRIER, A., WHITE, R., VICKARS, L., RAMSAY, T., BETANCOURT, M. T. & KOVACS, M. J. Low prevalence of JAK2 V617F mutation in patients with first unprovoked venous thromboembolism. *Br J Haematol*, 2011, vol. 155, no. 4, s. 511-513. ISSN 1365-2141 (Electronic)
0007-1048 (Linking)
125. DENTALI, F., SQUIZZATO, A., BRIVIO, L., APPIO, L., CAMPIOTTI, L., CROWTHER, M., GRANDI, A. M. & AGENO, W. JAK2V617F mutation for the early diagnosis of Ph- myeloproliferative neoplasms in patients with venous thromboembolism: a meta-analysis. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 22, s. 5617-5623. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking)
126. XU, X., ZHANG, Q., LUO, J., XING, S., LI, Q., KRANTZ, S. B., FU, X. & ZHAO, Z. J. JAK2(V617F): Prevalence in a large Chinese hospital population. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 1, s. 339-342. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking)
127. WAUTIER, M. P., EL NEMER, W., GANE, P., RAIN, J. D., CARTRON, J. P., COLIN, Y., LE VAN KIM, C. & WAUTIER, J. L. Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythemia vera is mediated by laminin alpha5 chain and Lu/BCAM. *Blood*, 2007, vol. 110, no. 3, s. 894-901. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking)
128. ARELLANO-RODRIGO, E., ALVAREZ-LARRAN, A., REVERTER, J. C., VILLAMOR, N., COLOMER, D. & CERVANTES, F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica*, 2006, vol. 91, no. 2, s. 169-175. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking)
129. ROBERTSON, B., URQUHART, C., FORD, I., TOWNEND, J., WATSON, H. G., VICKERS, M. A. & GREAVES, M. Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: relationships with JAK2 V617 F status, clonality, and antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost*, 2007, vol. 5, no. 8, s. 1679-1685. ISSN 1538-7933 (Print)

1538-7836 (Linking)

130. ARELLANO-RODRIGO, E., ALVAREZ-LARRAN, A., REVERTER, J. C., COLOMER, D., VILLAMOR, N., BELLOSILLO, B. & CERVANTES, F. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol*, 2009, vol. 84, no. 2, s. 102-108. ISSN 1096-8652 (Electronic)

0361-8609 (Linking)

131. FALANGA, A., MARCHETTI, M., VIGNOLI, A., BALDUCCI, D., RUSSO, L., GUERINI, V. & BARBUI, T. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol*, 2007, vol. 35, no. 5, s. 702-711. ISSN 0301-472X (Print)

0301-472X (Linking)

132. DE STEFANO, V. & MARTINELLI, I. Splanchnic vein thrombosis: clinical presentation, risk factors and treatment. *Intern Emerg Med*, 2010, vol. 5, no. 6, s. 487-494. ISSN 1970-9366 (Electronic)

1828-0447 (Linking)

133. ACOSTA, S., ALHADAD, A., SVENSSON, P. & EKBERG, O. Epidemiology, risk and prognostic factors in mesenteric venous thrombosis. *Br J Surg*, 2008, vol. 95, no. 10, s. 1245-1251. ISSN 1365-2168 (Electronic)

0007-1323 (Linking)

134. DENTALI, F., GALLI, M., GIANNI, M. & AGENO, W. Inherited thrombophilic abnormalities and risk of portal vein thrombosis. a meta-analysis. *Thromb Haemost*, 2008, vol. 99, no. 4, s. 675-682. ISSN 0340-6245 (Print)

0340-6245 (Linking)

135. MAHMOUD, MOHAMED ABDEL LATIF & ELBEBLAWY, MOATAZ MOHAMED SAMY. The Role of Multidetector CT Venography in Diagnosis of Cerebral Venous Sinus Thrombosis. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2009, vol. 4, no. 284-289. ISSN

136. RIZZO, L., CRASTO, S. G., RUDA, R., GALLO, G., TOLA, E., GARABELLO, D. & DE LUCCHI, R. Cerebral venous thrombosis: role of CT, MRI and MRA in the emergency setting. *Radiol Med*, 2010, vol. 115, no. 2, s. 313-325. ISSN 1826-6983 (Electronic)

0033-8362 (Linking)

137. SCHALLER, B., GRAF, R., SANADA, Y., TOLNAY, M., ROSNER, G., WIENHARD, K. & HEISS, W. D. Hemodynamic changes after occlusion of the posterior superior sagittal sinus: an experimental PET study in cats. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2003, vol. 24, no. 9, s. 1876-1880. ISSN 0195-6108 (Print)

0195-6108 (Linking)

138. KHANDELWAL, N., AGARWAL, A., KOCHHAR, R., BAPURAJ, J. R., SINGH, P., PRABHAKAR, S. & SURI, S. Comparison of CT venography with MR venography in cerebral sinovenous thrombosis. *AJR Am J Roentgenol*, 2006, vol. 187, no. 6, s. 1637-1643. ISSN 1546-3141 (Electronic)

0361-803X (Linking)

139. WETZEL, S. G., KIRSCH, E., STOCK, K. W., KOLBE, M., KAIM, A. & RADUE, E. W. Cerebral veins: comparative study of CT venography with intraarterial digital subtraction angiography. *AJNR Am J Neuroradiol*, 1999, vol. 20, no. 2, s. 249-255. ISSN 0195-6108 (Print)

0195-6108 (Linking)

140. FERRO, J. M. [Cerebral venous thrombosis]. *J Neuroradiol*, 2002, vol. 29, no. 4, s. 231-239. ISSN 0150-9861 (Print)

0150-9861 (Linking)

141. SURENDRABABU, N. R., SUBATHIRA & LIVINGSTONE, R. S. Variations in the cerebral venous anatomy and pitfalls in the diagnosis of cerebral venous sinus thrombosis: low field MR experience. *Indian J Med Sci*, 2006, vol. 60, no. 4, s. 135-142. ISSN 0019-5359 (Print)

0019-5359 (Linking)

142. AYANZEN, R. H., BIRD, C. R., KELLER, P. J., MCCULLY, F. J., THEOBALD, M. R. & HEISERMAN, J. E. Cerebral MR venography: normal anatomy and potential diagnostic pitfalls. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2000, vol. 21, no. 1, s. 74-78. ISSN 0195-6108 (Print)

0195-6108 (Linking)

143. ALPER, F., KANTARCI, M., DANE, S., GUMUSTEKIN, K., ONBAS, O. & DURUR, I. Importance of anatomical asymmetries of transverse sinuses: an MR venographic study. *Cerebrovasc Dis*, 2004, vol. 18, no. 3, s. 236-239. ISSN 1015-9770 (Print)

1015-9770 (Linking)

144. STOLZ, E. P. Role of ultrasound in diagnosis and management of cerebral vein and sinus thrombosis. *Front Neurol Neurosci*, 2008, vol. 23, no. 112-121. ISSN 1660-4431 (Print)
0300-5186 (Linking)
145. RIES, S., STEINKE, W., NEFF, K. W. & HENNERICI, M. Echocontrast-enhanced transcranial color-coded sonography for the diagnosis of transverse sinus venous thrombosis. *Stroke*, 1997, vol. 28, no. 4, s. 696-700. ISSN 0039-2499 (Print)
0039-2499 (Linking)
146. DELCKER, A., HAUSSERMANN, P. & WEIMAR, C. Effect of echo contrast media on the visualization of transverse sinus thrombosis with transcranial 3-D duplex sonography. *Ultrasound Med Biol*, 1999, vol. 25, no. 7, s. 1063-1068. ISSN 0301-5629 (Print)
0301-5629 (Linking)
147. VALDUEZA, J. M., HOFFMANN, O., WEIH, M., MEHRAEIN, S. & EINHAUPL, K. M. Monitoring of venous hemodynamics in patients with cerebral venous thrombosis by transcranial Doppler ultrasound. *Arch Neurol*, 1999, vol. 56, no. 2, s. 229-234. ISSN 0003-9942 (Print)
0003-9942 (Linking)
148. STOLZ, E., GERRIETS, T., BODEKER, R. H., HUGENS-PENZEL, M. & KAPS, M. Intracranial venous hemodynamics is a factor related to a favorable outcome in cerebral venous thrombosis. *Stroke*, 2002, vol. 33, no. 6, s. 1645-1650. ISSN 1524-4628 (Electronic)
0039-2499 (Linking)
149. KOCHHAR, R., KHANDELWAL, N., SINGH, P. & SURI, S. Arterial contamination: a useful indirect sign of cerebral sino-venous thrombosis. *Acta Neurol Scand*, 2006, vol. 114, no. 2, s. 139-142. ISSN 0001-6314 (Print)
0001-6314 (Linking)
150. DI NISIO, M., SQUIZZATO, A., RUTJES, A. W., BULLER, H. R., ZWINDERMAN, A. H. & BOSSUYT, P. M. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review. *J Thromb Haemost*, 2007, vol. 5, no. 2, s. 296-304. ISSN 1538-7933 (Print)
1538-7836 (Linking)
151. ESCOFFRE-BARBE, M., OGER, E., LEROYER, C., GRIMAUX, M., LE MOIGNE, E., NONENT, M., BRESSOLLETTE, L., ABGRALL, J. F., SORIA, C., AMIRAL, J., ILL, P.,

- CLAVIER, J. & MOTTIER, D. Evaluation of a new rapid D-dimer assay for clinically suspected deep venous thrombosis (Liatest D-dimer). *Am J Clin Pathol*, 1998, vol. 109, no. 6, s. 748-753. ISSN 0002-9173 (Print)
0002-9173 (Linking)
152. TALBOT, K., WRIGHT, M. & KEELING, D. Normal d-dimer levels do not exclude the diagnosis of cerebral venous sinus thrombosis. *J Neurol*, 2002, vol. 249, no. 11, s. 1603-1604. ISSN 0340-5354 (Print)
0340-5354 (Linking)
153. LALIVE, P. H., DE MOERLOOSE, P., LOVBLAD, K., SARASIN, F. P., MERMILLOD, B. & SZTAJZEL, R. Is measurement of D-dimer useful in the diagnosis of cerebral venous thrombosis? *Neurology*, 2003, vol. 61, no. 8, s. 1057-1060. ISSN 1526-632X (Electronic)
0028-3878 (Linking)
154. TARDY, B., TARDY-PONCET, B., VIALLO, A., PIOT, M., GARNIER, P., MOHAMED, R., GUYOMARC'H, S. & VENET, C. D-dimer levels in patients with suspected acute cerebral venous thrombosis. *Am J Med*, 2002, vol. 113, no. 3, s. 238-241. ISSN 0002-9343 (Print)
0002-9343 (Linking)
155. KOSINSKI, C. M., MULL, M., SCHWARZ, M., KOCH, B., BINIEK, R., SCHLAFER, J., MILKEREIT, E., WILLMES, K. & SCHIEFER, J. Do normal D-dimer levels reliably exclude cerebral sinus thrombosis? *Stroke*, 2004, vol. 35, no. 12, s. 2820-2825. ISSN 1524-4628 (Electronic)
0039-2499 (Linking)
156. CRASSARD, I., SORIA, C., TZOURIO, C., WOIMANT, F., DROUET, L., DUCROS, A. & BOUSSER, M. G. A negative D-dimer assay does not rule out cerebral venous thrombosis: a series of seventy-three patients. *Stroke*, 2005, vol. 36, no. 8, s. 1716-1719. ISSN 1524-4628 (Electronic)
0039-2499 (Linking)
157. TANISLAV, C., SIEKMANN, R., SIEWEKE, N., ALLENDORFER, J., PABST, W., KAPS, M. & STOLZ, E. Cerebral vein thrombosis: clinical manifestation and diagnosis. *BMC Neurol*, 2011, vol. 11, no. 69. ISSN 1471-2377 (Electronic)
1471-2377 (Linking)
158. D'ANGELO, A., D'ALESSANDRO, G., TOMASSINI, L., PITTET, J. L., DUPUY, G. & CRIPPA, L. Evaluation of a new rapid quantitative D-dimer assay in patients with

- clinically suspected deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*, 1996, vol. 75, no. 3, s. 412-416. ISSN 0340-6245 (Print)
0340-6245 (Linking)
159. KURUVILLA, J., WELLS, P. S., MORROW, B., MACKINNON, K., KEENEY, M. & KOVACS, M. J. Prospective assessment of the natural history of positive D-dimer results in persons with acute venous thromboembolism (DVT or PE). *Thromb Haemost*, 2003, vol. 89, no. 2, s. 284-287. ISSN 0340-6245 (Print)
0340-6245 (Linking)
160. DENTALI, F., SQUIZZATO, A., MARCHESI, C., BONZINI, M., FERRO, J. M. & AGENO, W. D-Dimer Testing in the Diagnosis of Cerebral Vein Thrombosis: a Systematic Review and a Meta-Analysis of the Literature. *J Thromb Haemost*, 2012, vol. no. ISSN 1538-7836 (Electronic)
1538-7836 (Linking)
161. VIZIOLI, L., MUSCARI, S. & MUSCARI, A. The relationship of mean platelet volume with the risk and prognosis of cardiovascular diseases. *Int J Clin Pract*, 2009, vol. 63, no. 10, s. 1509-1515. ISSN 1742-1241 (Electronic)
1368-5031 (Linking)
162. KUTER, D. J. & ROSENBERG, R. D. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood*, 1995, vol. 85, no. 10, s. 2720-2730. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking)
163. MUSCARI, A., PUDDU, G. M., CENNI, A., SILVESTRI, M. G., GIUZIO, R., ROSATI, M., SANTORO, N., BIANCHI, G., MAGALOTTI, D. & ZOLI, M. Mean platelet volume (MPV) increase during acute non-lacunar ischemic strokes. *Thromb Res*, 2009, vol. 123, no. 4, s. 587-591. ISSN 0049-3848 (Print)
0049-3848 (Linking)
164. YILMAZ, M. B., SARICAM, E., BIYIKOGLU, S. F., GURAY, Y., GURAY, U., SASMAZ, H. & KORKMAZ, S. Mean platelet volume and exercise stress test. *J Thromb Thrombolysis*, 2004, vol. 17, no. 2, s. 115-120. ISSN 0929-5305 (Print)
0929-5305 (Linking)
165. BATH, P. M. & BUTTERWORTH, R. J. Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1996, vol. 7, no. 2, s. 157-161. ISSN 0957-5235 (Print)

0957-5235 (Linking)

166. MARTIN, J. F., TROWBRIDGE, E. A., SALMON, G. & PLUMB, J. The biological significance of platelet volume: its relationship to bleeding time, platelet thromboxane B2 production and megakaryocyte nuclear DNA concentration. *Thromb Res*, 1983, vol. 32, no. 5, s. 443-460. ISSN 0049-3848 (Print)

0049-3848 (Linking)

167. CHU, S. G., BECKER, R. C., BERGER, P. B., BHATT, D. L., EIKELBOOM, J. W., KONKLE, B., MOHLER, E. R., REILLY, M. P. & BERGER, J. S. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*, 2010, vol. 8, no. 1, s. 148-156. ISSN 1538-7836 (Electronic)

1538-7836 (Linking)

168. DE LUCA, G., SANTAGOSTINO, M., SECCO, G. G., CASSETTI, E., GIULIANI, L., FRANCHI, E., COPPO, L., IORIO, S., VENEGONI, L., RONDANO, E., DELL'ERA, G., RIZZO, C., PERGOLINI, P., MONACO, F., BELLOMO, G. & MARINO, P. Mean platelet volume and the extent of coronary artery disease: results from a large prospective study. *Atherosclerosis*, 2009, vol. 206, no. 1, s. 292-297. ISSN 1879-1484

(Electronic)

0021-9150 (Linking)

169. MARTIN, J. F., BATH, P. M. & BURR, M. L. Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction. *Lancet*, 1991, vol. 338, no. 8780, s. 1409-1411. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking)

170. DEMIRTUNC, R., DUMAN, D., BASAR, M., BILGI, M., TEOMETE, M. & GARIP, T. The relationship between glycemic control and platelet activity in type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*, 2009, vol. 23, no. 2, s. 89-94. ISSN 1873-460X (Electronic)

1056-8727 (Linking)

171. BATH, P., ALGERT, C., CHAPMAN, N. & NEAL, B. Association of mean platelet volume with risk of stroke among 3134 individuals with history of cerebrovascular disease. *Stroke*, 2004, vol. 35, no. 3, s. 622-626. ISSN 1524-4628 (Electronic)

0039-2499 (Linking)

172. BUTTERWORTH, R. J. & BATH, P. M. The relationship between mean platelet volume, stroke subtype and clinical outcome. *Platelets*, 1998, vol. 9, no. 6, s. 359-364. ISSN 0953-7104 (Print)

0953-7104 (Linking)

173. O'MALLEY, T., LANGHORNE, P., ELTON, R. A. & STEWART, C. Platelet size in stroke patients. *Stroke*, 1995, vol. 26, no. 6, s. 995-999. ISSN 0039-2499 (Print)
0039-2499 (Linking)

174. D'ERASMO, E., ALIBERTI, G., CELI, F. S., ROMAGNOLI, E., VECCI, E. & MAZZUOLI, G. F. Platelet count, mean platelet volume and their relation to prognosis in cerebral infarction. *J Intern Med*, 1990, vol. 227, no. 1, s. 11-14. ISSN 0954-6820 (Print)

0954-6820 (Linking)

175. TROWBRIDGE, E. A., REARDON, D. M., HUTCHINSON, D. & PICKERING, C. The routine measurement of platelet volume: a comparison of light-scattering and aperture-impedance technologies. *Clin Phys Physiol Meas*, 1985, vol. 6, no. 3, s. 221-238. ISSN 0143-0815 (Print)

0143-0815 (Linking)

176. BRAEKKAN, S. K., MATHIESEN, E. B., NJOLSTAD, I., WILSGAARD, T., STORMER, J. & HANSEN, J. B. Mean platelet volume is a risk factor for venous thromboembolism: the Tromso Study, Tromso, Norway. *J Thromb Haemost*, 2010, vol. 8, no. 1, s. 157-162. ISSN 1538-7836 (Electronic)

1538-7836 (Linking)

177. BIINO, G., PORTAS, L., MURGIA, F., VACCARGIU, S., PARRACCIANI, D., PIRASTU, M. & BALDUINI, C. L. A population-based study of an Italian genetic isolate reveals that mean platelet volume is not a risk factor for thrombosis. *Thromb Res*, 2011, vol. no. ISSN 1879-2472 (Electronic)

0049-3848 (Linking)

178. GULCAN, M., VAROL, E., ETLI, M., AKSOY, F. & KAYAN, M. Mean Platelet Volume Is Increased in Patients With Deep Vein Thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2011, vol. no. ISSN 1938-2723 (Electronic)

1076-0296 (Linking)

179. CIL, H., YAVUZ, C., ISLAMOGLU, Y., TEK BAS, E. O., DEMIRTAS, S., ATILGAN, Z. A., GUNDUZ, E., BENLI, E. D. & TANRIVERDI, H. Platelet Count and Mean Platelet Volume in Patients With In-Hospital Deep Venous Thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2012, vol. no. ISSN 1938-2723 (Electronic)

1076-0296 (Linking)

180. KOSTRUBIEC, M., LABYK, A., PEDOWSKA-WLOSZEK, J., HRYNKIEWICZ-SZYMANSKA, A., PACHO, S., JANKOWSKI, K., LICHODZIEJEWSKA, B. & PRUSZCZYK, P. Mean platelet volume predicts early death in acute pulmonary embolism. *Heart*, 2010, vol. 96, no. 6, s. 460-465. ISSN 1468-201X (Electronic)
1355-6037 (Linking)
181. AGOSTONI, E. Headache in cerebral venous thrombosis. *Neurol Sci*, 2004, vol. 25 Suppl 3, no. S206-210. ISSN 1590-1874 (Print)
1590-1874 (Linking)
182. DENTALI, F. & AGENO, W. Cerebral vein thrombosis. *Intern Emerg Med*, 2010, vol. 5, no. 1, s. 27-32. ISSN 1970-9366 (Electronic)
1828-0447 (Linking)
183. FERRO, J. M., CANHAO, P., BOUSSER, M. G., STAM, J. & BARINAGARREMENTERIA, F. Early seizures in cerebral vein and dural sinus thrombosis: risk factors and role of antiepileptics. *Stroke*, 2008, vol. 39, no. 4, s. 1152-1158. ISSN 1524-4628 (Electronic)
0039-2499 (Linking)
184. FERRO, J. M., CANHAO, P., BOUSSER, M. G., STAM, J. & BARINAGARREMENTERIA, F. Cerebral vein and dural sinus thrombosis in elderly patients. *Stroke*, 2005, vol. 36, no. 9, s. 1927-1932. ISSN 1524-4628 (Electronic)
0039-2499 (Linking)
185. BENTLEY, J. N., FIGUEROA, R. E. & VENDER, J. R. From presentation to follow-up: diagnosis and treatment of cerebral venous thrombosis. *Neurosurg Focus*, 2009, vol. 27, no. 5, s. E4. ISSN 1092-0684 (Electronic)
1092-0684 (Linking)
186. EINHAUPL, K. M., VILLRINGER, A., MEISTER, W., MEHRAEIN, S., GARNER, C., PELLKOFER, M., HABERL, R. L., PFISTER, H. W. & SCHMIEDEK, P. Heparin treatment in sinus venous thrombosis. *Lancet*, 1991, vol. 338, no. 8767, s. 597-600. ISSN 0140-6736 (Print)
0140-6736 (Linking)
187. DE BRUIJN, S. F. & STAM, J. Randomized, placebo-controlled trial of anticoagulant treatment with low-molecular-weight heparin for cerebral sinus thrombosis. *Stroke*, 1999, vol. 30, no. 3, s. 484-488. ISSN 0039-2499 (Print)
0039-2499 (Linking)

188. STAM, J., DE BRUIJN, S. & DEVEBER, G. Anticoagulation for cerebral sinus thrombosis. *Stroke*, 2003, vol. 34, no. 4, s. 1054-1055. ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking)
189. EINHAUPL, K., STAM, J., BOUSSER, M. G., DE BRUIJN, S. F., FERRO, J. M., MARTINELLI, I. & MASUHR, F. EFNS guideline on the treatment of cerebral venous and sinus thrombosis in adult patients. *Eur J Neurol*, 2010, vol. 17, no. 10, s. 1229-1235. ISSN 1468-1331 (Electronic) 1351-5101 (Linking)
190. VAN DONGEN, C. J., VAN DEN BELT, A. G., PRINS, M. H. & LENSING, A. W. Fixed dose subcutaneous low molecular weight heparins versus adjusted dose unfractionated heparin for venous thromboembolism. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004, vol. no. 4, s. CD001100. ISSN 1469-493X (Electronic) 1361-6137 (Linking)
191. COUTINHO, J. M., FERRO, J. M., ZUURBIER, S. M., MINK, M. S., CANHAO, P., CRASSARD, I., MAJOIE, C. B., REEKERS, J. A., HOUDART, E., DE HAAN, R. J., BOUSSER, M. G. & STAM, J. Thrombolysis or anticoagulation for cerebral venous thrombosis: rationale and design of the TO-ACT trial. *Int J Stroke*, 2012, vol. no. ISSN 1747-4949 (Electronic) 1747-4930 (Linking)
192. CANHAO, P., FALCAO, F. & FERRO, J. M. Thrombolytics for cerebral sinus thrombosis: a systematic review. *Cerebrovasc Dis*, 2003, vol. 15, no. 3, s. 159-166. ISSN 1015-9770 (Print) 1015-9770 (Linking)
193. SOLEAU, S. W., SCHMIDT, R., STEVENS, S., OSBORN, A. & MACDONALD, J. D. Extensive experience with dural sinus thrombosis. *Neurosurgery*, 2003, vol. 52, no. 3, s. 534-544; discussion 542-534. ISSN 0148-396X (Print) 0148-396X (Linking)
194. MASUHR, F., BUSCH, M., AMBERGER, N., ORTWEIN, H., WEIH, M., NEUMANN, K., EINHAUPL, K. & MEHRAEIN, S. Risk and predictors of early epileptic seizures in acute cerebral venous and sinus thrombosis. *Eur J Neurol*, 2006, vol. 13, no. 8, s. 852-856. ISSN 1468-1331 (Electronic) 1351-5101 (Linking)

195. CANHAO, P., FERRO, J. M., LINDGREN, A. G., BOUSSER, M. G., STAM, J. & BARINAGARREMENTERIA, F. Causes and predictors of death in cerebral venous thrombosis. *Stroke*, 2005, vol. 36, no. 8, s. 1720-1725. ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking)
196. LATH, R., KUMAR, S., REDDY, R., BOOLA, G. R., RAY, A., PRABHAKAR, S. & RANJAN, A. Decompressive surgery for severe cerebral venous sinus thrombosis. *Neurol India*, 2010, vol. 58, no. 3, s. 392-397. ISSN 0028-3886 (Print) 0028-3886 (Linking)
197. THEAUDIN, M., CRASSARD, I., BRESSON, D., SALIOU, G., FAVROLE, P., VAHEDI, K., DENIER, C. & BOUSSER, M. G. Should decompressive surgery be performed in malignant cerebral venous thrombosis?: a series of 12 patients. *Stroke*, 2010, vol. 41, no. 4, s. 727-731. ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking)
198. COUTINHO, J. M. & STAM, J. How to treat cerebral venous and sinus thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2010, vol. 8, no. 5, s. 877-883. ISSN 1538-7836 (Electronic) 1538-7836 (Linking)
199. SAPOSNIK, G., BARINAGARREMENTERIA, F., BROWN, R. D., JR., BUSHNELL, C. D., CUCCHIARA, B., CUSHMAN, M., DEVEBER, G., FERRO, J. M. & TSAI, F. Y. Diagnosis and management of cerebral venous thrombosis: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 2011, vol. 42, no. 4, s. 1158-1192. ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking)
200. KOOPMAN, K., UYTENBOOGAART, M., VROOMEN, P. C., VAN DER MEER, J., DE KEYSER, J. & LUIJCKX, G. J. Long-term sequelae after cerebral venous thrombosis in functionally independent patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2009, vol. 18, no. 3, s. 198-202. ISSN 1532-8511 (Electronic) 1052-3057 (Linking)
201. KOOPMAN, K., UYTENBOOGAART, M., VROOMEN, P. C., VAN DER MEER, J., DE KEYSER, J. & LUIJCKX, G. J. Development and validation of a predictive outcome score of cerebral venous thrombosis. *J Neurol Sci*, 2009, vol. 276, no. 1-2, s. 66-68. ISSN 0022-510X (Print) 0022-510X (Linking)

202. DENTALI, F., GIANNI, M., CROWTHER, M. A. & AGENO, W. Natural history of cerebral vein thrombosis: a systematic review. *Blood*, 2006, vol. 108, no. 4, s. 1129-1134. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking)
203. PUTAALA, J., HILTUNEN, S., SALONEN, O., KASTE, M. & TATLISUMAK, T. Recanalization and its correlation to outcome after cerebral venous thrombosis. *J Neurol Sci*, 2010, vol. 292, no. 1-2, s. 11-15. ISSN 1878-5883 (Electronic)
0022-510X (Linking)
204. FARRAG, A., IRFAN, M., GULIANI, G. K., TARIQ, N., TAYLOR, R. A., SURI, M. F. & QURESHI, A. I. Occurrence of post-acute recanalization and collateral formation in patients with cerebral venous and sinus thrombosis. A serial venographic study. *Neurocrit Care*, 2010, vol. 13, no. 3, s. 373-379. ISSN 1556-0961 (Electronic)
1541-6933 (Linking)
205. SULTER, G., STEEN, C. & DE KEYSER, J. Use of the Barthel index and modified Rankin scale in acute stroke trials. *Stroke*, 1999, vol. 30, no. 8, s. 1538-1541. ISSN 0039-2499 (Print)
0039-2499 (Linking)
206. DENTALI, F., POLI, D., SCODITTI, U., DI MINNO, M. N., DE STEFANO, V., SIRAGUSA, S., KOSTAL, M., PALARETI, G., SARTORI, M. T., GRANDONE, E., VEDOVATI, M. C. & AGENO, W. Long term outcomes of patients with cerebral vein thrombosis: a multicenter study. *J Thromb Haemost*, 2012, vol. no. ISSN 1538-7836 (Electronic)
1538-7836 (Linking)
207. PASSAMONTI, S. M., BIGUZZI, E., CAZZOLA, M., FRANCHI, F., GIANNIELLO, F., BUCCIARELLI, P., PIETRA, D., MANNUCCI, P. M. & MARTINELLI, I. JAK2 (V617F) mutation in patients with cerebral venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2012, vol. no. ISSN 1538-7836 (Electronic)
1538-7836 (Linking)
208. XAVIER, S. G., GADELHA, T., REZENDE, S. M., ZALCBERG, I. R. & SPECTOR, N. JAK2V617F mutation in patients with thrombosis: to screen or not to screen? *Int J Lab Hematol*, 2011, vol. 33, no. 2, s. 117-124. ISSN 1751-553X (Electronic)
1751-5521 (Linking)

209. KOOPMAN, K., MULDER, A. B., DE KEYSER, J., LUIJCKX, G. J. & VAN DER MEER, J. JAK2-V617F mutation in cerebral venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2009, vol. 7, no. 6, s. 1039-1040. ISSN 1538-7836 (Electronic)
1538-7836 (Linking)
210. BELLUCCI, S., CASSINAT, B., BONNIN, N., MARZAC, C. & CRASSARD, I. The V617F JAK 2 mutation is not a frequent event in patients with cerebral venous thrombosis without overt chronic myeloproliferative disorder. *Thromb Haemost*, 2008, vol. 99, no. 6, s. 1119-1120. ISSN 0340-6245 (Print)
0340-6245 (Linking)
211. DE STEFANO, V., FIORINI, A., ROSSI, E., ZA, T., FARINA, G., CHIUSOLO, P., SICA, S. & LEONE, G. Incidence of the JAK2 V617F mutation among patients with splanchnic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. *J Thromb Haemost*, 2007, vol. 5, no. 4, s. 708-714. ISSN 1538-7933 (Print)
1538-7836 (Linking)
212. DE STEFANO, V., ROSSI, E., ZA, T., CHIUSOLO, P. & LEONE, G. The JAK2 V617F mutation in patients with cerebral venous thrombosis: a rebuttal. *Thromb Haemost*, 2008, vol. 99, no. 6, s. 1121. ISSN 0340-6245 (Print)
0340-6245 (Linking)
213. COLAIZZO, D., AMITRANO, L., IANNACCONE, L., VERGURA, P., CAPPUCCI, F., GRANDONE, E., GUARDASCIONE, M. A. & MARGAGLIONE, M. Gain-of-function gene mutations and venous thromboembolism: distinct roles in different clinical settings. *J Med Genet*, 2007, vol. 44, no. 6, s. 412-416. ISSN 1468-6244 (Electronic)
0022-2593 (Linking)
214. AUSTIN, S. K. & LAMBERT, J. R. The JAK2 V617F mutation and thrombosis. *Br J Haematol*, 2008, vol. 143, no. 3, s. 307-320. ISSN 1365-2141 (Electronic)
0007-1048 (Linking)
215. GILES, H., SMITH, R. E. & MARTIN, J. F. Platelet glycoprotein IIb-IIIa and size are increased in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*, 1994, vol. 24, no. 1, s. 69-72. ISSN 0014-2972 (Print)
0014-2972 (Linking)
216. KAMATH, S., BLANN, A. D. & LIP, G. Y. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J*, 2001, vol. 22, no. 17, s. 1561-1571. ISSN 0195-668X (Print)

0195-668X (Linking)

217. GUTHIKONDA, S., ALVIAR, C. L., VADUGANATHAN, M., ARIKAN, M., TELLEZ, A., DELAO, T., GRANADA, J. F., DONG, J. F., KLEIMAN, N. S. & LEV, E. I. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 2008, vol. 52, no. 9, s. 743-749. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking)

218. BLAHA, M., KOSTAL, M., LANSKA, M., BLAHA, V, FORALOVA, I., FILIP, S. & MALY, J. The decrease of mean platelet volume after extracorporeal LDL-cholesterol elimination. *Atherosclerosis*, 2012, vol. accepted to the press, no. ISSN

219. PRANDONI, P., LENSING, A. W., PRINS, M. H., BERNARDI, E., MARCHIORI, A., BAGATELLA, P., FRULLA, M., MOSENA, L., TORMENE, D., PICCIOLI, A., SIMIONI, P. & GIROLAMI, A. Residual venous thrombosis as a predictive factor of recurrent venous thromboembolism. *Ann Intern Med*, 2002, vol. 137, no. 12, s. 955-960. ISSN 1539-3704 (Electronic)

0003-4819 (Linking)

220. AGNELLI, G. & BECATTINI, C. Treatment of DVT: how long is enough and how do you predict recurrence. *J Thromb Thrombolysis*, 2008, vol. 25, no. 1, s. 37-44. ISSN 0929-5305 (Print)

0929-5305 (Linking)

221. KIM, S. Y. & SUH, J. H. Direct endovascular thrombolytic therapy for dural sinus thrombosis: infusion of alteplase. *AJNR Am J Neuroradiol*, 1997, vol. 18, no. 4, s. 639-645. ISSN 0195-6108 (Print)

0195-6108 (Linking)

222. FREY, J. L., MURO, G. J., MCDUGALL, C. G., DEAN, B. L. & JAHNKE, H. K. Cerebral venous thrombosis: combined intrathrombus rtPA and intravenous heparin. *Stroke*, 1999, vol. 30, no. 3, s. 489-494. ISSN 0039-2499 (Print)

0039-2499 (Linking)

223. DENTALI, F., SQUIZZATO, A., GIANNI, M., DE LODOVICI, M. L., VENCO, A., PACIARONI, M., CROWTHER, M. & AGENO, W. Safety of thrombolysis in cerebral venous thrombosis. A systematic review of the literature. *Thromb Haemost*, 2010, vol. 104, no. 5, s. 1055-1062. ISSN 0340-6245 (Print)

0340-6245 (Linking)

224. KYRLE, P. A., MINAR, E., BIALONCZYK, C., HIRSCHL, M., WELTERMANN, A. & EICHINGER, S. The risk of recurrent venous thromboembolism in men and women. *N Engl J Med*, 2004, vol. 350, no. 25, s. 2558-2563. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking)
225. PALARETI, G., LEGNANI, C., COSMI, B., GUAZZALOCA, G., PANCANI, C. & COCCHERI, S. Risk of venous thromboembolism recurrence: high negative predictive value of D-dimer performed after oral anticoagulation is stopped. *Thromb Haemost*, 2002, vol. 87, no. 1, s. 7-12. ISSN 0340-6245 (Print) 0340-6245 (Linking)
226. PALARETI, G., COSMI, B., LEGNANI, C., TOSETTO, A., BRUSI, C., IORIO, A., PENGO, V., GHIRARDUZZI, A., PATTACINI, C., TESTA, S., LENSING, A. W. & TRIPODI, A. D-dimer testing to determine the duration of anticoagulation therapy. *N Engl J Med*, 2006, vol. 355, no. 17, s. 1780-1789. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking)
227. DENTALI, F., POLI, D., SCODITTI, U., MINNO, M. N., STEFANO, V. D., SIRAGUSA, S., KOSTAL, M., PALARETI, G., SARTORI, M. T., GRANDONE, E., VEDOVATI, M. C. & AGENO, W. Long-term outcomes of patients with cerebral vein thrombosis: a multicenter study. *J Thromb Haemost*, 2012, vol. 10, no. 7, s. 1297-1302. ISSN 1538-7836 (Electronic) 1538-7836 (Linking)
228. MEHRAEIN, S., ORTWEIN, H., BUSCH, M., WEIH, M., EINHAUPL, K. & MASUHR, F. Risk of recurrence of cerebral venous and sinus thrombosis during subsequent pregnancy and puerperium. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2003, vol. 74, no. 6, s. 814-816. ISSN 0022-3050 (Print) 0022-3050 (Linking)
229. AARON, S., ALEXANDER, M., MAYA, T., MATHEW, V., GOEL, M., NAIR, S. C., MAMMEN, J. & VIKRAM, M. Underlying prothrombotic states in pregnancy associated cerebral venous thrombosis. *Neurol India*, 2010, vol. 58, no. 4, s. 555-559. ISSN 0028-3886 (Print) 0028-3886 (Linking)

16 Seznam příloh:

- 1/ Metodika laboratorních vyšetření
- 2/ Souhlas zástupce Pardubické krajské nemocnice s použitím dat z databáze nemocnice v této studii.

16.1 Metodika laboratorních vyšetření

16.1.1 Protrombinový čas

Princip

K citrátové plazmě se přidá tkáňový tromboplastin obsahující vápenaté ionty (Ca^{2+}). Sleduje se koagulační čas do vytvoření prvních fibrinových vláken.

Reagencie

Set: **DG-PT**, výrobce a distributor firma Grifols, katalogové číslo 213869

Balení: 6 x 10 ml (králíčí tromboplastin s kalciumem)

Pracovní postup

Provedeme identifikaci vzorků, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložíme do přístroje. Metodicky se postupuje dle návodu přístroje

Nastavení automatického koagulometru	
Plazma	50 μl
Inkubace (37 °C)	240 s
Tromboplastin s kalciumem	100 μl
Ihned po přidání tromboplastinu s kalciumem měříme koagulační čas.	

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Odečítají se koagulační časy normální kontrolní plazmy a pacienta z koagulometru.

Výpočet INR a R (vypočte se automaticky v koagulometru, případně v LIS):

$$\text{INR} = (\text{tp}/\text{tk})^{\text{ISI}}$$

tp - čas pacienta
tk - čas normální kontrolní plazmy
ISI - index citlivosti tromboplastinu

$$\text{Poměr R} = (\text{tp}/\text{tk})$$

Způsob vydávání výsledků:

Časy kontroly a pacienta v sekundách, hodnota poměru R, hodnota INR (hodnoty poměru R a INR zaokrouhlit na dvě desetinná místa). U léčených kumarinovými deriváty by se měla vydávat hodnota INR, u neléčených hodnota R.

Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: poměr R = 0,80 – 1,20

16.1.2 Aktivovaný parciální trombinový čas

Princip

V přítomnosti purifikovaných fosfolipidů destičkového typu (kefalin), vápenatých iontů a povrchového aktivátoru na bázi křemičitanů dochází v plazmě chudé na destičky k aktivaci mediátorů vnitřní cesty přeměny protrombinu na trombin. Vzniklý trombin aktivuje následně přeměnu fibrinogenu na fibrin.

Reagencie

Set: **PTT- Automate 10**, výrobce firma Diagnostica Stago, distributor firma A. L. Instruments, katalog. číslo distributora: 00482

Balení: 12 x 10 ml reagencie PTT-Automate (lyofilizovaná směs fosfolipidů z mozkové tkáně v pufrované suspenzi křemičitanového aktivátoru s přidanými stabilizátory)

Pracovní postup

Provedeme identifikaci vzorků, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložíme do přístroje. Metodicky se postupuje dle návodu přístroje

<hr/>	
Nastavení automatického koagulometru	
Plazma	50 µl
Reagencie PTT-Automate	50 µl
Inkubace (37 °C)	240 s
0,025 mol/l CaCl ₂	50 µl
Ihned po přidání kalcia začít měřit koagulační čas	

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Odečítají se koagulační časy normální kontrolní plazmy a pacienta z koagulometru.

Výpočet poměru R (vypočte se automaticky v automatickém koagulometru, případně v LIS) :

$$R_{\text{APTT}} = \frac{\text{Čas pacienta}}{\text{Čas normální kontrolní plazmy}}$$

Způsob vydávání výsledků:

Časy pacienta a kontroly v sekundách a jejich poměr R (hodnotu poměru APTT zaokrouhlit na dvě desetinná místa).

Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: poměr R = 0,90 – 1,10

16.1.3 Fibrinogen

Princip

Zředěná vyšetřovaná plazma je inkubována s nadbytkem trombinu. Naředěním se potlačí vliv inhibitorů koagulace. V takto uzpůsobeném systému je pak koagulační čas závislý na množství fibrinogenu.

Reagencie

Set: **DG-FIB L Human**, výrobce a distributor firma Grifols, katalogové číslo 218049
Balení: 3 x 5 ml reagencie obsahující lidský trombin (50 IU/ml) v pufovaném roztoku s obsahem chloridu vápenatého, stabilizátorů a konzervačních látek

Pracovní postup

Provést identifikaci vzorku, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložit do přístroje (používá se neředěná plazma, ředění Owren-Kollerovým pufrům je automaticky provedeno v přístroji). Metodicky se postupuje podle návodu k obsluze přístroje (viz SOPT 002 *Návod na obsluhu STA Compact/SOPT 001 Návod na obsluhu STA-R*).

Nastavení koagulometru	
Plazma	100 µl
Naředěná pufrům	1/10
Inkubace (37 °C)	240 s
DG-FIB	50 µl

Měřit koagulační čas do vytvoření fibrinového vlákna.

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

K naměřenému koagulačnímu času analyzátor z kalibrační křivky odečte příslušnou koncentraci fibrinogenu v plazmě. Výsledné hodnoty jsou ověřeny, individuálně posouzeny a expedovány z laboratoře.

Způsob vydávání výsledků:

V g/l (výsledek se zaokrouhlí na jedno desetinné místo).

Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: 2,0 – 4,0 g/l

16.1.4 Antitrombin

Princip

Testovaná plazma je v přítomnosti heparinu inkubována při 37 °C s přebytem aktivovaného faktoru X. AT přítomný ve vyšetřované plazmě vytvoří s heparinem a faktorem Xa trimerní komplex. Zbytekový FXa v dalším kroku reaguje se substrátem a uvolňuje z něj žlutě zbarvený chromofor (p-nitroanilin). Intenzita zabarvení je nepřímě úměrná koncentraci AT v plazmě a je detekována spektrofotometricky při 405 nm.

Reakční schéma:

AT + heparin → /AT * Heparin/

/AT * Heparin/ + FXa (přebytek) → /AT * Heparin * FXa/ + FXa (reziduální)

Substrát-pNA + FXa (reziduální) → pNA (žluté zabarvení) + produkt

Reagencie

Set: **BIOPHEN AT (LRT) - CE**, výrobce firma Hyphen BioMed, distributor firma Diagnostica, a. s., katalogové číslo distributora: 221111

Balení:

- 4 x 5 ml reagencie aktivovaného faktoru X
- 4 x 3 ml chromogenního substrátu SXa - 11

Pracovní postup

Provést identifikaci vzorku, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložit do přístroje (používá se neředěná plazma, ředění Owren-Kollerovým pufrém je automaticky provedeno v přístroji). Metodicky se postupuje podle návodu k obsluze přístroje (viz SOPT 002 *Návod na obsluhu STA Compact*/SOPT 001 *Návod na obsluhu STA-R*).

Nastavení koagulometru:

Plazma (ředěná pufrém 1/10): 25 µl

FXa: 200 µl

Inkubace (při 37 °C): 90 s

Chromogenní substrát: 75 µl

Monitorovat změnu absorbance po dobu 60 s.

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

K naměřené hodnotě změny absorbance analyzátor z kalibrační křivky odečte příslušnou funkční aktivitu AT. K hodnocení se používají procenta funkční aktivity inhibitoru v plazmě. Výsledné hodnoty jsou ověřeny, individuálně posouzeny, zaevidovány a expedovány z laboratoře.

Způsob vydávání výsledků:

V procentech (hodnota AT se zaokrouhlí na celá čísla).

Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: 80 – 120 %

16.1.5 D-dimery

Princip

Paprsek monochromatického světla se střetne se suspenzí mikrolatexových částic pokrytých specifickou protilátkou. Jestliže je vlnová délka světla větší než průměr latexových částic (není přítomen antigen D-dimerů), dochází pouze ke slabé absorpci. V přítomnosti antigenu dochází k aglutinaci a vzniku agregátů větších než vlnová délka procházejícího světla. Tím dochází i k vyšší absorpci světla, která je úměrná koncentraci antigenu ve vzorku.

Reagencie

Set: **STA-LIATEST® D-DI**, výrobce firma Diagnostica Stago, distributor firma A. L. Instruments, katalogové číslo distributora 00515

Balení: 6 x 5 ml reagencie 1 (TRIS pufr)

6 x 6 ml reagencie 2 (suspenze mikrolatexových částic potažených dvěma různými myšími monoklonálními protilátkami proti lidským D-dimerům).

Pracovní postup

Provést identifikaci vzorku, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložit do přístroje (používá se neředěná plazma, ředění Owren-Kollerovým pufrům je automaticky provedeno v přístroji). Metodicky se postupuje podle návodu k obsluze přístroje (viz SOPT 002 *Návod na obsluhu STA Compact/SOPT 001 Návod na obsluhu STA-R*).

Přenosem z LISu nebo manuálně zvolíme v analyzátoru metodu D-DI H, v případě, že naměřená hodnota D-dimerů je menší než 1,5 mg/l, je nutné vzorek přeměřit citlivější metodou - zkratka D-DI.

Plazma	50 µl	50 µl
Nastavení koagulometru (metoda D-DI)		Nastavení koagulometru – vyšší ředění (závislá metoda D-DI H)
Ředění plazmy	1/1 (neředěná)	1/5
TRIS pufr	100 µl	100 µl
Inkubace (37 °C)	240 s	240 s
Latexová suspenze	150 µl	150 µl

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Monitoruje se změna absorpance při 540 nm při 37 °C a stanoví se kvantitativní zastoupení D-dimerů v plazmě odečtením z kalibrační křivky.

Hodnoty vydané analyzátořem jsou ověřeny, individuálně posouzeny a expedovány z laboratoře.

Způsob vydávání výsledků:

V mg/l FEU (výsledná hodnota se zaokrouhluje na dvě desetinná místa).

Koncentrace D-dimerů je udávána jako mg/l fibrinogenového ekvivalentu (FEU) a je vztažena k množství fibrinogenu používaného k přípravě standardu D-dimerů.

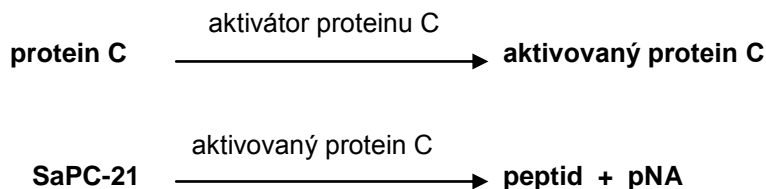
Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické meze: 0,0 – 0,5 mg/l FEU

16.1.6 Protein 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. Intenzita zabarvení je přímo úměrná aktivitě proteinu C v plazmě.



Reagencie

Set: **BIOPHEN Protein C 5**, výrobce firma Hyphen BioMed, distributor firma Diagnostica, a. s., katalogové číslo distributora: 221205

Balení:

- 4 x 5 ml aktivátoru proteinu C
- 4 x 5 ml specifického chromogenního substrátu

Pracovní postup

Provedeme identifikaci vzorku, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložíme do analyzátoru. Metodicky se postupuje dle návodu k obsluze (viz SOPT 002 *Návod na obsluhu STA Compact*/SOPT 001 *Návod na obsluhu STA-R*).

Nastavení koagulometru:

Nastavení koagulometru	
Plazma	30 µl
Aktivátor PC	125 µl
Inkubace při 37 °C	300 s
Specifický substrát	125 µl
Měřit změnu absorbance po dobu 60 s.	

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

K naměřené hodnotě změny absorbance analyzátor z kalibrační křivky odečte příslušnou aktivitu proteinu C. K hodnocení se používají procenta normálního zastoupení inhibitoru v plazmě.

Způsob vydávání výsledků: procenta funkční aktivity proteinu C (aktivita PC se zaokrouhlí na celá čísla).

Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické meze: 70 – 130 % (0,70 – 1,30)

16.1.7 Protein S

Princip

Ředěná vyšetřovaná plazma je inkubována s protein S deficitní plazmou, aktivovaným proteinem C a aktivovaným faktorem V. Aktivovaný protein C společně s proteinem S (kofaktor) inhibuje faktor Va. Po přidání vápenatých iontů se sleduje stupeň prodloužení koagulačního času způsobený inaktivací faktoru Va. Prodloužení koagulačního času je přímo úměrné aktivitě proteinu S ve vyšetřovaném vzorku plazmy.

Reagencie

Set: STA - STACLOT® PROTEIN S, výrobce firma Diagnostica Stago, distributor firma A. L. Instruments, katalogové číslo distributora: 00746

Balení:

2 x 1 ml reagencie 1 (protein S deficitní plazma)

2 x 1 ml reagencie 2 (aktivovaný protein C)

2 x 1 ml reagencie 3 (aktivovaný faktor V)

Pracovní postup

Provedeme identifikaci vzorku, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložíme do analyzátoru (používá se neředěná plazma, ředění Owren-Kollerovým puřrem je automaticky provedeno v přístroji).

Metodicky se postupuje dle návodu k obsluze (viz SOPT 002 *Návod na obsluhu STA Compact/SOPT 001 Návod na obsluhu STA-R*).

Nastavení koagulometru:

Nastavení koagulometru	
Plazma (ředěná Owren-Kollerovým puřrem 1/10)	30 μ l
Reagencie 1	30 μ l
Reagencie 2	30 μ l
Reagencie 3	30 μ l
Inkubace při 37 °C	240 s
0,025 mol/l CaCl ₂	30 μ l
Měřit koagulační čas.	

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

K naměřené hodnotě koagulačního času analyzátor z kalibrační křivky přiřadí příslušnou aktivitu proteinu S. K hodnocení se používají procenta normálního zastoupení proteinu S v plazmě.

Způsob vydávání výsledků:

procenta funkční aktivity proteinu S (aktivita proteinu S se zaokrouhlí na celá čísla).

Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické meze: 65 – 140 % (0,65 – 1,40)

16.1.8 Lupus antikoagulans

Princip

V přítomnosti purifikovaných fosfolipidů destičkového typu (kefalin), vápenatých iontů a povrchového aktivátoru (silika) dochází v plazmě chudé na destičky k aktivaci mediátorů vnitřní cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin. Vzniklý trombin aktivuje následně přeměnu fibrinogenu na fibrin. Přítomnost protilátky typu lupus antikoagulans v plazmě způsobí prodloužení koagulačního testu.

Reagencie

Set: **PTT- LA**, výrobce firma Diagnostica Stago, distributor firma A. L. Instruments, katalogové číslo distributora: 00599

Balení: 6 x 2 ml reagentie obsahující kefalin, aktivátor (silika) a pufr (glycin)

Pracovní postup

Provést identifikaci vzorku, zkumavku s vyšetřovanou plazmou vložit do přístroje. Metodicky se postupuje podle návodu k obsluze přístroje (viz SOPT 002 *Návod na obsluhu STA Compact*/SOPT 001 *Návod na obsluhu STA-R*).

Nastavení koagulometru	
Testovaná plazma	50 µl
Reagencie APTT-LA	50 µl
Inkubace (37 °C)	240 s
CaCl ₂	50 µl
Měřit koagulační čas.	

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Odečítá se čas kontrolní a vyšetřované plazmy z koagulometru. Koagulometr automaticky vypočítá poměr R.

Výpočet poměru R:

$$R_{\text{APTT-LA}} = \frac{\text{Čas pacienta}}{\text{Čas kontroly}}$$

Způsob vydávání výsledků:

Časy pacienta a kontroly v sekundách a jejich poměr R (hodnotu poměru APTT-LA zaokrouhlit na dvě desetinná místa)

Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: poměr = 0,80 – 1,20

16.1.9 dRVVT

Princip

Přidáním jedu Russelovy zmiže k testované plazmě chudé na destičky dojde k aktivaci FX v přítomnosti Ca^{2+} . Aktivovaný faktor X za přítomnosti purifikovaných fosfolipidů destičkového typu (kefalin) následně aktivuje přeměnu protrombinu na trombin, vzniklý trombin dále aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin.

Reagencie

DRVVtest – výrobce firma American Diagnostica, distributor firma Diagnostica a. s., katalogové číslo: 825

Balení: 10 x 5 ml lyofilizované reagencie

Pracovní postup

Provést identifikaci vzorku, mikrozkušavku s vyšetřovanou plazmou vložit do přístroje. Metodicky se postupuje podle návodu k obsluze přístroje (viz SOPT 002 *Návod na obsluhu STA Compact*/SOPT 001 *Návod na obsluhu STA-R*).

Nastavení koagulometru – metoda RVVT	
Plazma	80 μl
Inkubace	240 s
Reagencie DRVVtest	80 μl
Měřit koagulační čas.	

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Odečítá se čas kontrolní a vyšetřované plazmy z koagulometru. Vypočítá se poměr R.

Výpočet poměru R:

$$R = \frac{\text{Čas pacienta}}{\text{Čas normální kontrolní plazmy}}$$

Způsob vydávání výsledků:

Časy pacienta a normální kontrolní plazmy v sekundách, poměr R.

Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty: poměr R = 0,80 – 1,20

Vše se vyšetřuje na automatických koagulometrech STA-R a Compact firmy Diagnostica Stago.

16.2 Souhlas zástupce Pardubické krajské nemocnice s použitím dat z databáze nemocnice v této studii.

Od: Edvard Ehler/pkn
Datum: 26.9.2012 15:51
Předmět: dizertace

Souhlasím s použitím dat našich nemocných v dizertační práci MUDr. Milana Košťála.

doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc., přednosta neurologické kliniky PKN, a.s.