

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA UNIVERZITY
KARLOVY**

V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

**LÉČBA TROMBOFILNÍCH STAVŮ Z HLEDISKA
PROBLÉMU FERTILITY**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Zdeňka Hajšmanová

Hradec Králové, 2007

Radka Nováková

Děkuji MUDr. Z. Hajšmanové za odborné vedení, poskytnutí informací a pomoc při sestavování bakalářské práce.

Paní doc. MUDr. Z. Ulčové – Gallové, DrSc. děkuji za poskytnutí studijních materiálů.

Zarovně bych chtěla poděkovat panu doc. RNDr. V. Semeckému, CSc. za konzultace spojené s bakalářskou prací.

Prohlašuji, že jsem na této bakalářské práci pracovala samostatně,
a že jsem použila jen uvedenou literaturu.

1. ÚVOD	5
2. HEMOSTÁZA	6
2.1. Aktivátory.....	8
2.2. Inhibitory.....	15
3. TROMBOFILNÍ STAVY	19
3.1. Vrozené.....	23
3.1.1 Rezistence na aktivovaný protein C.....	23
3.1.2 Defekt 20210A alely protrombinu.....	26
3.1.3 Hyperhomocysteinémie.....	26
3.2. Získané.....	29
3.2.1 Antifosfolipidový syndrom.....	29
4. TĚHOTENSTVÍ A ŠESTINEDĚLÍ	32
4.1. Fyziologické.....	32
4.2. Patologické.....	33
5. ANTITROMBOTICKÁ LÉČBA	34
5.1. Antiagregační.....	35
5.2. Antikoagulační.....	36
5.3. Trombolytická.....	37
6. LABORATORNÍ VYŠETŘOVACÍ METODY	37
6.1. Screeningové.....	37
6.2. Speciální.....	38
6.3. Analyzátoary.....	40
7. STUDIE	40
7.1. Cíl studie.....	40
7.2. Grafické zpracování.....	43
8. DISKUZE	46
9. ZÁVĚR	47
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
SOUHRN	49
SUMMARY	50

1. ÚVOD

Incidence trombofilních stavů a tromboembolických příhod vykazuje v posledních letech stoupající charakter. Jedná se o velkou skupinu populace s podobnými klinickými manifestacemi.

2. HEMOSTÁZA

Hemostáza je schopnost organismu zastavit krvácení.

*Je to jeden z mechanismů zajišťující integritu vnitřního prostředí organismu. Jedná se o velice složitý, ale komplexní děj, na kterém se podílí řada různých složek a mechanismů s rozličnými vstupy a účinky, a celou řadou pozitivních a negativních zpětných vazeb. Hemostatická rovnováha je zaručena normální funkcí cévní stěny, krevních destiček a plazmatických činitelů koagulačního a fibrinolytického systému včetně jejich **aktivátorů** a **inhibitorů**.³⁾*

Narušení této rovnováhy může vést jak k hypokoagulačním stavům, tak i k hyperkoagulačním stavům.

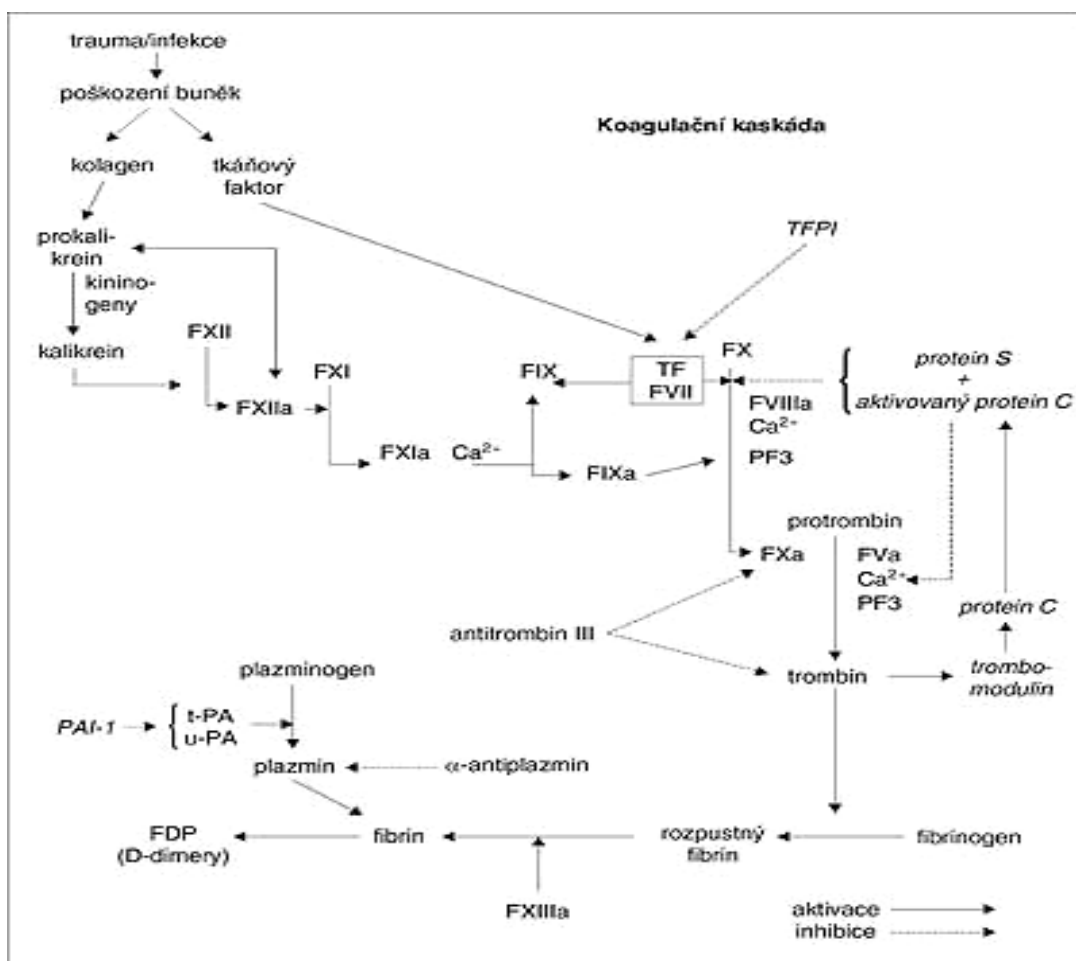
Proces srážení, tedy hemokoagulace probíhá ve třech fázích:

Iniciační,

Amplifikační,

Propagační.

Proces koagulační kaskády:



Hemostáza je u zdravého jedince vždy lokalizována na místo cévního postižení.

2.1. Aktivátory

Fosfolipidy (PI), jsou lipidy, jejichž polární skupina je tvořena zbytkem *kyseliny fosforečné*, na níž je navázán malý organický zbytek. Protože mají jeden konec molekuly polární a druhý nepolární, patří mezi tzv. *amfipatické lipidy*, které jsou součástí cytoplazmatické membrány.

V membráně *hydrofilní* konce směřují vně a dovnitř buňky, tj. *polární* část obsahující fosfátovou složku s pozitivním nábojem, kdežto uvnitř membrány se stýkají konce *hydrofóbní* tzn. *nepolární* část tvořena 2 řetězci mastných kyselin spodní části molekuly.

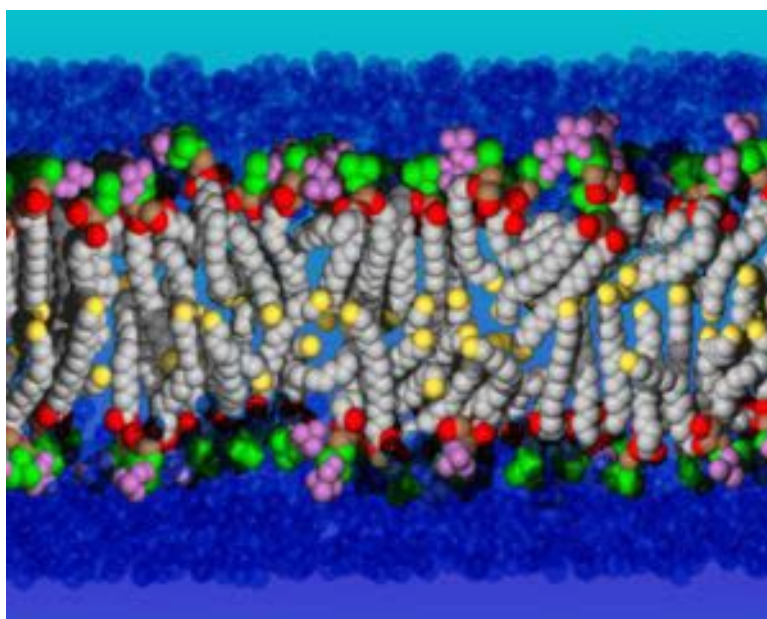
Jsou **asymetricky** uspořádány do **dvojvrstvy**.

Vnější polovina membrány je tvořena převážně z fosfatidylcholinu (PtdCho) a sfingomyelinu, zatímco vnitřní část tvoří fosfatidyletanolamin (PtdEtn) a fosfatidylserin (PtdSer).

Mezi membránové fosfolipidy dále patří fosfatidylinositol (PtdIns), fosfatidylinositol 4,5-bifosfát (PtdIns(4,5)P₂), fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát (PtdIns(3,4,5)P₃).¹⁾

Molekuly fosfolipidů mají schopnost *difúze podél dvojvrstvy* nebo po *aktivaci* trombocytu může dojít k přetočení dvojvrstvy destičkové membrány k tzv. *flip-flop fenoménu*. Dochází při tom k přetočení vnitřní a vnější části fosfolipidové membrány a vně buňky se tak dostává větší množství *fosfatidyletanolamin (PtdEtn)* a *fosfatidylserin (PtdSer)*.^{1),2),8)}

Asymetrické uspořádání lipidů do dvojvrstvy: ¹²⁾



Fosfolipidové molekuly, se svými vodooodpudivými (*lipidickými*) částmi, které jsou tu znázorněny světle, sdružují směrem k sobě. Postupně se tím vytvoří rovinný útvar, dávající vznik membráně. Na jejím povrchu, obrácené do vodné části, jsou fosfátové části molekuly, a ostatní hydrofilní části molekul, které jsou na obrázku naznačeny živými barvami. **Klíč:** PO₄ = zelená, N(CH₃)₃ = fialová, voda = modrá, koncový metyl = žlutá, O₂ = červená, glycolový C = hnědá, C v řetězci = šedá

Kalcium (FIV), vlastně jeho ionty Ca²⁺ jsou nezbytné pro celou řadu reakcí ve všech systémech hemokoagulace. Jeho nejmenší možná koncentrace pro hemostázu je **0,5 mmol/l**.

Faktorům závislých na vitamínu K zprostředkovávají připojení γ -karboxylové skupiny kyseliny glutamové na fosfolipidy.

Na přítomnosti vápennatých iontů jsou závislá uspořádání koagulačně aktivních komplexů *vnitřní [VIIIa . IXa]* a *vnější [VIIa . TF] tenázy* a *protrombinázy [Va . Xa]* a zároveň i tvorba některých *inhibičních komplexů* jako *[TFPI . Xa . VIIa . TF]*.

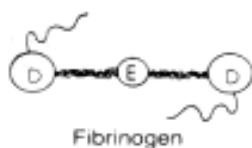
Faktor von Willebrandův, (vWF), glykoprotein o molekulové hmotnosti 270-280 kDa tvořený a skladovaný v buňkách endotelu a krevních destičkách, do kterých přechází z megakaryocytů. Endotelový a destičkový vWF nejsou funkčně a strukturálně rovnocenné, ale oba typy jsou uvolňovány na humorální podnět. V případě poškození endotelu vytváří vWF interakce s trombocyty.

vWF je dimer, který vzájemným spojováním vytváří makromolekuly.

V plazmě patří k největším molekulám a tvoří zde tzv. multimery. Jeho molekula nese řadu vazebných míst pro FVIII, heparin, glycoproteiny : GPIb, GPIIb/IIIa a kolagen. Jeho koncentrace se pohybuje mezi 1,0 až 1,6 IU/ml a s FVIII tvoří v plazmě komplex.

Fibrinogen, je glykoprotein o molekulové hmotnosti 340 kDa syntetizovaný v játrech a přítomen jak v plazmě, tak i v granulích krevních destiček. Biologický poločas je 64-96 hodin a množství v plazmě je 2-4 g/l.

Molekulou je dimer, který je tvořen 3 rozdílnými páry polypeptidových řetězců α , β , γ vzájemně spojených disulfidickými



můstky.

Pro udržení struktury fibrinogenu je nutná přítomnost Ca^{2+} . Minimální koncentrace v plazmě pro hemostázu je 0,5-1,0 g/l.

Fibrinogen je vychytáván trombocyty a uchováván v jejich α -granulích.

Je *substrátem* pro trombin a plazmin, ale zároveň i pro trombinu podobných enzymů především hadích jedů např. reptilázu. Fibrinogen je hlavním krevním proteinem podporující agregaci trombocytů pomocí interakcí s destičkovými receptory na sousedících destičkách GP IIb/IIIa.

Patří mezi bílkoviny *akutní fáze*. Při infarktu myokardu, akutní infekci, chirurgickém zákroku či cévním poškození dojde v průběhu několika hodin ke zvýšené syntéze fibrinogenu v játrech a jeho hladina se během 3-5 dnů zvýší na 3-5násobek původní hodnoty. Poté se vrací k normálu.

Fyziologicky se jeho hladina v plazmě zvyšuje během těhotenství nebo za patologických stavů u trombofilií.³⁾

Tkáňový faktor (TF), je integrální transmembránový glykoprotein s 263 aminokyselinami a o molekulové hmotnosti 37 kDa. Řadí se do 2.třídy rodiny cytokinových receptorů a jeho koagulační aktivita kolísá podle druhu tkáně a způsobu přípravy.

Tkáňový faktor obsahuje extracelulární část, hydrofóbní transmembránovou část a C-terminální cytoplazmatickou oblast. Molekula je vysoce asymetrická, její extracelulární část je tvořena 2 doménami typu fibronektinu III se dvěma fosforylačními místy. Tato část je v přítomnosti fosfolipidů a Ca^{2+} zodpovědná za vazbu v koagulačně aktivním komplexu [TF . VIIa]. TF je hydrofóbní částí své molekuly pevně zakotven ve fosfolipidové membráně, což vysvětluje jeho nerozpustnost. Snadno se váže na membránový povrch nebo fosfolipidové molekuly a tím si zajišťuje aktivitu v suspenzi.

Je transformován na povrchu řady buněk a extrahuje se z tkáně s největší aktivitou v mozku, v plicích, placentě, ale samozřejmě i v jiných orgánech. TF je ve velkém množství exprimován na subendoteliálních buňkách v subendoteliálních strukturách. Pokud dojde k porušení celistvosti cévní stěny jsou schopny fibroblasty a svalové buňky expresí TF okamžitě spustit aktivaci hemostázy. Zdrojem extravaskulárního TF zjištěného v ateromatózních plátech jsou pravděpodobně makrofágy a buňky hladké svaloviny. Buněčná membrána podléhá apoptotickým změnám a dochází ke zvýšení aktivity tkáňového faktoru.

Za normálních okolností endotelové buňky a leukocyty TF neexprimují.

Za zdroj TF v cirkulující krvi jsou považovány monocyty.³⁾

Monocyty jsou stimulovány za patologických stavů některými buňkami např. u nádorových onemocnění přímo nádorovými nebo leukemickými buňkami nebo jinými stimuly jako růstové hormony, endotoxin, cytokiny, TNF nebo IL-1.

TF uvolněný z monocytů je schopen vyvolat trombózu u traumat, operací převážně ortopedických, ale i při chronických infektech, u gram negativní sepsí, endokarditidy a nestabilní anginy pectoris.

V membráně buněk hladkého svalstva byla zjištěna i neaktivní tzv. *kryptogenní* forma TF. Tato forma představuje tzv. *latentní* pool koagulačního TF, který je působením kolagenu přeměněn na aktivní a je tak schopen podporovat vznik trombózy.

Faktor V, (FV), je jednořetězcový glykoprotein o molekulové hmotnosti 330 kDa s biologickým poločasem 12-15 hodin. Syntetizuje se v játrech a megakaryocytech a poměrně snadno se váže na povrch buněčných membrán. V plazmě je jeho koncentrace 8-14 mg/l, biologickou aktivitu má 65-150% a v α granulích krevních destiček je

asi 20%. Minimální aktivita potřebná k zástavě krvácení je 10-15%. Svým složením je podobný FVIII a stejně jako on je stabilizován vápenatými ionty. Je aktivován limitovanou proteolýzou FIIa nebo FXa. Zároveň může být aktivován v nízkých koncentracích i plazminem, elastázou neutrofilů, destičkovým kalpainem či jedem Russelovy zmije.

Aktivovaný faktor Va tvoří dva řetězce, lehký s molekulovou hmotností 74 kDa a doménami B, A3, C1, C2 a těžký s molekulovou hmotností 94 kDa s doménami A1 a A2, které jsou spojeny vápenatými ionty.

Jeho funkcí je společně s Ca^{2+} a fosfolipidy v systému *protrombinázy* [*Va . Xa . Ca^{2+} . Pl*] urychlovat proteolytické štěpení protrombinu FXa až 200 000krát.

Faktor VIII, (FVIII), jinak též antihemofilický faktor A, je plazmatický glykoprotein – β globin o 2332 aminokyselinách s molekulovou hmotností 330 kDa a biologickým poločasem 15-20 hodin. Koncentrace v plazmě je 0,1-0,2 mg/l a biologická aktivita se pohybuje v rozmezí mezi 50 až 150%. V plazmě se molekula FVIII váže svým vazebným místem, které má v oblasti svého lehkého řetězce, na molekulu vWF, poblíž N-konce jeho molekuly. Tento komplex nejspíš chrání molekulu FVIII před jeho štěpením pomocí ACP nebo FXa. Kontaktem s fosfolipidy nebo trombinem je z této vazby uvolňován a současně dojde k uvolnění vazebného místa na strukturu fosfolipidů. Minimální aktivita nutná k zástavě krvácení je 25%.

Gen pro FVIII je poměrně velký a nachází se na vrcholu dlouhého raménka X chromosomu. Funkční faktor je charakterizován 3 doménami A, B, C a 2 kyselými peptidy a1 a a2. Stejně jako FVa je

tvořen 2 řetězci spojenými v přítomnosti fosfolipidů vápenatými ionty. Těžký řetězec o molekulové hmotnosti 92-210 kDa je tvořen A1, A2 a B doménou a lehký řetězec o MW 80 kDa s doménami A3, C1 a C2. K jeho aktivaci dochází limitovanou proteolýzou trombinem nebo spolu s fosfolipidy může být aktivován i FXa.

FVIIIa působí jako proteinový kofaktor ve vnitřní cestě aktivace protrombinu, při vzniku koagulačně aktivního komplexu *tenázy* [VIIIa . IXa . Pl . Ca²⁺], nezbytné k aktivaci FX. V přítomnosti všech těchto složek je reakce urychlena asi 10 000krát.

Při nedostatku FVIII nebo při jeho funkční nedostatečnosti může docházet k těžkému krvácivému stavu *hemofilii A*. Naopak jeho hladina se zvyšuje při zánětech, chronických infekcích, při stresu a fyziologicky v těhotenství. Vysoká hladina je jedním z faktorů ovlivňující sklon k *trombofilii*.

Faktor XII, Hagemanův faktor, glykoprotein o molekulové hmotnosti 80 kDa, který je syntetizován játry a patří mezi *serinové proteázy*. Jeho koncentrace v plazmě je 30-40 mg/l s aktivitou 70-130% a biologickým poločasem 50-70 hodin. Nachází se v plazmě i séru. Protože se vyskytuje v podobě zymogenu, tak za fyziologických podmínek s povrchem cévní stěny, endotelem, nereaguje.

K jeho aktivaci dochází stykem se subendoteliálními strukturami při poškození povrchu cévní stěny. Aktivačním povrchem *in vivo* může být i kloubní chrupavka, kůže, mastné kyseliny, endotoxiny, kyselina elagová nebo *in vitro* sklo, kaolin, celit. Právě testy *in vitro* vedly MacFarlaneho v roce 1964 k nesprávným úvahám o spouštění *vnitřní cesty* koagulačních procesů *in vivo* faktorem XIIa.

Dnes je jeho deficit spjat spíše s trombofilií než s krvácením.³⁾

2.2. Inhibitory

Systém proteinu C je společně s AT a inhibítorem tkáňového faktoru TPF1 nejučinnějším inhibičním systémem hemostázy.

Systém proteinu C je tvořen proteinem C, proteinem S a trombomodulinem. Tento systém je klíčovou složkou přirozené antikoagulační cesty, která je aktivována na povrchu endotelových buněk trombinem navázaným k trombomodulinu, tj. tkáňovému faktoru (TF) . Systém proteinu C je schopen inaktivovat některé faktory krevního srážení, faktor VIIIa a Va, a tím reguluje tvorbu trombinu.

Protein C, (PC), je jednořetězcový plazmatický glykoprotein o molekulové hmotnosti 62 kDa [APC 56 kDa], který vzniká v játrech za účasti vitamínu K a pravděpodobně i v endotelu, biologický poločas má 5-7 hodin. Jeho koncentrace v plazmě 4-5 mg/l je jak u mužů, tak u žen stejná a s věkem mírně vzrůstá.

Tento řetězec o 461 aminokyselinách se štěpí na 2 polypeptidové řetězce, těžký a lehký, které jsou navzájem propojeny disulfidickými můstky. Asi 10% proteinu C se v plazmě nachází v jednořetězcové podobě. Obsahuje podobnou homologní strukturu jako protrombin a některé další serinové proteázy. Je známo více než 160 mutací genu tohoto proteinu.

Aktivovaná forma proteinu C vykazuje úzce specifickou účinnost serinové proteázy, což znamená že v přítomnosti fosfolipidů a Ca^{2+} proteolyticky štěpí a tím zároveň inaktivuje plazmatické faktory FVa a FVIIIa navázané na membráně.

Navázání proteinu C k fosfolipidovým povrchům, např. k membráně poškozených epitelíí nebo k membráně krevních destiček, umožňuje protein S, který zde působí jako kofaktor. Komplex, který tvoří protein S a APC v poměru 1: 1, urychluje reakci 3-10x.

Aktivovaný protein C působí navíc i fibrinolyticky tím, že zvyšuje uvolňování tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) z vazby na inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI-1) v cévních endoteliích, s kterým tvoří komplex.

K *inaktivaci proteinu C* dochází z důvodu přítomnosti:

- přirozeného inhibitoru proti APC (Protein C Inhibitor)
- lehkých řetězců faktoru Va
- lupus antikoagulans
- alfa2- makroglobulinu
- alfa1- antitrypsinu

Protein S je jednořetězcový glykoprotein o molekulové hmotnosti 69 kDa a biologickým poločasem 60 hodin. Stejně jako protein C vzniká v játrech za přítomnosti vitamínu K, dále může vznikat v endoteliích a megakaryocytech.

Gen pro protein S je přítomen na 3. chromozomu. Většina proteinu S se nachází v α granulích trombocytů a v endotelu, odkud může být působením protrombinázy a tenázy uvolněn. V plazmě se koncentrace celkového proteinu S (antigenu) u žen pohybuje 20 – 40 mg/l, u mužů je asi o 10 – 15% vyšší, s věkem u obou pohlaví roste a jeho funkční aktivita je 65 – 130%. Volného proteinu S se v plazmě vyskytuje 10 mg/l, což odpovídá 40% a pouze tato forma může být kofaktorem proteinu C, která je schopna se vázat na APC. Vázaná část, které je 60%, je vázána složkou komplementu C4-bBP v komplexu [PS.C4-bBP] a není schopna vazby s APC.

Protein S má v přítomnosti Ca^{2+} afinitu k fosfolipidovým povrchům a jako kofaktor APC, na který se váže v poměru 1:1, usnadňuje vazbu APC k fosfolipidovým povrchům trombocytů a endotelií. Jeho aktivita může být v přítomnosti $\beta_2\text{GPI}$ zvýšena. Protein S je inaktivován trombinem proteolytickým štěpením v místě řetězce s NH_2 ukončením.

Protein S má vlastní inhibiční aktivitu nezávislou na APC. Vázaná forma inhibuje F Xa a volná forma se váže ještě na FV, FVa, PS a FVIII. Na faktor VIII se váže i ve formě komplexu [C4-bBP.PS] a má k němu vyšší afinitu než volný PS. Vyvázáním se na tyto faktory blokuje PS vznik tenázy a protrombinázy a tím inhibuje aktivaci FXa a trombinu. V malé míře se protein S váže i na FVIII v komplexu [FVIII.vWF].

C4-bBP složka komplementu je vysokomolekulární regulační protein cesty komplementu. Jeho vazbu na povrch buněk zprostředkovává v komplementu s největší pravděpodobností protein S. C4-bBP je protein akutní fáze, to znamená, že se jeho hladina zvyšuje při zánětech, akutních stavech a u žen užívající antikoncepci (léčba steroidy). Při takových stavech dochází k tvorbě komplexu [C4-bBP.PS], čímž se hladina PS v plazmě podstatně sníží.

Trombomodulin, (TM), je integrální transmembránový glykoprotein o molekulové hmotnosti 74 kDa, který je trvale přítomen na cévním endotelu a váže trombin. Takto vázaný trombin ztrácí svůj prokoagulační účinek a naopak aktivuje protein C, který štěpením FV a FVIII podstatně inhibuje koagulační procesy. Je součástí membrány endoplazmatického retikula a vylučuje se z tkáně s největší aktivitou v mozku, v plicích, placentě, ale i jiných orgánech.

Z povrchu endotelu je trombomodulin proteolytickým štěpením uvolňován do krve elastázou aktivovaných neutrofilů. Jeho hladina je závislá na stavu endotelových buněk a při poškození se zvyšuje. Tak

se stává trombomodulin markerem endoteliálního poškození malých i velkých cév. Mutace v jeho molekule mohou být příčinou některých arteriálních trombóz.

Při hemostáze se TM uplatňuje jako kofaktor pro aktivaci PC trombinem, v poměru 1:1 vzniká komplex [TM.Trombin], který nevyžaduje Ca^{2+} a reakce se urychlí asi 1500krát. Snížená koncentrace FVa urychluje vazbu PC na komplex [TM.Trombin] a ten aktivuje faktory XIII, VIII, V a krevní destičky. Trombomodulin inhibuje proteolýzu trombinu na makromolekulární substráty. Obsahuje-li jeho molekula galaktosaminoglykan, urychluje TM inaktivaci trombinu působením AT.³⁾

Annexin V je intracelulární protein obsahující 319 aminokyselin a patří do skupiny jedenácti annexinových komponent s odlišnými funkcemi. Hojně se nalézá v umbilikálních vénách v endoteliálních buňkách, avšak koncentrace annexinu V v plazmě je extrémně nízká (0-5 ng/ml).

Bylo zjištěno, že patří mezi možné antikoagulační látky. Působí jako inhibitor koagulačních reakcí na fosfolipidech závislých díky své vysoké afinitě k negativně nabitým fosfolipidům, např. fosfatidylserinu. Funkce kalcium-dependentního annexinu V jako kompetitivní inhibitor pro vazbu koagulačních faktorů na membránu exponovanou fosfatidylserinem může být vyjádřena jako regulátor-modulátor účinku fosfolipázy A2. Zdá se, že i zabraňuje proinflamačním reakcím dependentních membrán.

Placentární koagulační protein, annexin V, je antikoagulant, který díky své afinitě k anionickým fosfolipidům, je schopný vytlačit různé koagulační faktory z povrchu cévního endotelia. Evidentně chrání cévní výstelku od prokoagulačních proteinů.

Proto lze předpokládat, že antiannexinové protilátky budou způsobovat selhávání v reprodukci. Jejich sledování bude mít v imunologii reprodukce nezastupitelný význam z hlediska předcházení těhotenských ztrát zvláště u rizikových skupin jako je infertilitas, u párů s autoimunitním onemocněním, u opakovaných neúspěchů při in vitro fertilizaci, u preeklampsie, esenciální hypertenze, u idiopatické trombocytopenie, u HELLP syndromu a u HIV pozitivních pacientů.^{5),6)}

Lidský placentární antikoagulační protein (PP4) vzniká v placentě, která svou sekreční aktivitou zásobuje tímto proteinem i mateřský krevní oběh. Ukázalo se, že má antikoagulační vlastnosti, které mají schopnost vázat fosfolipidy a též inhibovat fosfolipázu A2. PP4 dokáže inhibovat koagulační kaskádu a má mnohé vlastnosti podobné Lupus Antikoagulas.

3.TROMBOFILNÍ STAVY

Protože je hemostáza fyziologický děj, tak narušením její hemostatické rovnováhy může docházet k **trombotickým nebo trombofilním stavům.**

Trombotické stavy

Trombotické stavy, jsou chorobné stavy charakterizované příhodami nitrocévního srážení (trombózami), tedy opak krvácivých stavů, kde se hemostatická rovnováha narušuje opačným směrem. Protože, obecně jejich příčina tkví v postižení cévní stěny, v porušení hemodynamiky a ve složení a funkci krve, rozlišujeme trombózy žilní a arteriální.

Arteriální – při níž se uplatňuje především poškození endotelu a zvýšená agregabilita trombocytů. Aterosklerotická cévní stěna stimuluje trombocyty, dochází k jejich aktivaci a adhezi. Současně dochází k aktivaci vnějšího systému koagulační kaskády tkáňového faktoru (TF) uvolněným z obnaženého subendotelu. Po změně konformace membránových glykoproteinů krevní destičky dochází k agregaci trombocytů s následnou tvorbou nástěnného trombu. Stabilita trombu je dána obsahem fibrinu, který je úměrný intenzitě aktivace koagulačního systému. Nástěnné tromby ve velkých tepnách, jenž jsou vystaveny rychlému toku okolní krve, jsou zdrojem embolů s hlavním podílem agregovaných trombocytů, krystalů cholesterolu a ateromatózní drti. Představují hlavní patogenetický mechanismus vzniku akutních koronárních syndromů – infarktu myokardu (IM) a anginy pectoris.

K prevenci se s výhodou využívá acetylsalicylová kyselina (ASA) a další inhibitory destičkových funkcí, jako *antiagregační léčby*.³⁾

Žilní – jejíž příčinou jsou především dva faktory, krevní stáza a hyperkoagulace v plazmatickém systému. Je to neregulovaná aktivace koagulačního systému, ke které vede selhání inhibitorů koagulačního

nebo fibrinolytického systému, kontrolující hemostázu Stagnační tromby, bohaté na fibfin a erytrocyty, pocházejí spíše ze srdce, případně ze stagnačních městků v žilách dolních končetin a pánve. Embolizují do mozku buď z levého srdce, nebo vzácně z žil velkého oběhu v případě otevřeného foramen ovale. Vzniklá koagula zůstávají určitou dobu na místě vzniku, ale mohou se uvolnit a s proudem krve odcestovat jako emboly. Žilním tromboembolismem je rozuměna hluboká žilní trombóza či plicní embolie. Vznik tromboembolické nemoci (TEN) je vždy multifaktoriálním procesem, s podílem dočasných, získaných či prostředím podmíněných rizik a vrozených determinant.

Mezi získané rizikové faktory venózní trombózy se řadí věk nad 45 let, obezita, velké operace, ortopedické operace, poranění, popáleniny, imobilizace, nádorová onemocnění, TEN v anamnéze, varixy, kouření, hormonální léčba a těhotenství.

Jako *antikoagulační léčba* se užívá nefrakcionovaný a nízkomolekulární heparin či kumariny.³⁾

Trombofilní stavy

Trombofilie je vrozená nebo získaná porucha hemostatického mechanismu, která je příčinou zvýšeného sklonu k trombóze nebo hyperkoagulačního stavu.

Pojem *trombofilie* zahrnuje velmi heterogenní skupinu poruch. Mechanismus, který může být příčinou trombózy není vždy zcela jasný. Ke vzniku trombózy disponuje řada vrozených i získaných defektů krevního srážení, které představují systémovou příčinu nezřídka velmi závažné povahy.

Z dosud známých *vrozených* defektů je třeba jmenovat defekty inhibitorů krevního srážení – antitrombinu, proteinu C, proteinu S, trombofilní bodové mutace faktoru V Leden (FVL), variantního protrombinu (FII G20210A), polymorfismus FXIII, PAI-I, destičkové receptory a mutace methylenetetrahydrofolátreduktázy (MTHFR C677T), která sama o sobě nejspíš nemá zátěžový charakter. Ze systémových dispozic je dále významným nálezem zvýšení faktoru VIII, zvýšení von Willebrandova faktoru, defekt faktoru XII, dysfibrinogemie a hyperhomocysteinemie, které mohou být jak vrozené, tak získané.⁴⁾

Závažnou *získanou* poruchou koagulace je anifosfolipidový syndrom (APA syndrom), diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) a mohou jí být i mikroangiopatické hemolytické syndromy.

Hyperkoagulačním stavem je provázeno těhotenství a zvláště jeho komplikace, dále malignity, infekce, septické stavy, metabolické rozvraty, otravy, operace, popáleniny, traumata. Zároveň řada léčebných režimů je provázena velmi významnými hyperkoagulačními změnami, čímž se hyperkoagulační stavy stávají závažným problémem. Jejich nejvýznamnější klinickou manifestací je žilní tromboembolismus.

Existuje několik varovných signálů pro vznik trombofilie:

- trombóza neobvyklé lokalizace
- trombóza bez jasné předcházející příčiny
- trombóza v mladistvém věku (žilní tr. před 45.rokem a tepenná tr. před 35.rokem věku)
- trombóza v rodinné anamnéze
- recidivující trombóza
- trombóza při zavedené antikoagulační léčbě s nastavením terapeutického rozmezí

- opakovaně předčasné ukončení gravidity
- progredující AS, současná tepenná a žilní trombóza

Protože hyperkoagulační stavy jsou velmi závažná a život ohrožující onemocnění, jsou pro správné určení jejich diagnózy a následnou léčbu neméně důležité laboratorní stanovení příslušných markerů.

V laboratorní diagnostice k určení trombofilních stavů se využívá metod základních a speciálních.

Mezi základní vyšetřovací metody patří koagulační screening, tj. APTT, PT, TT, fibrinogen a AT III, D dimery, které odráží stav trombózy, ale ne trombofilii.

Ze speciálních metod to je stanovení proteinu C (PC), proteinu S a jejich inhibitorů, APC rezistence, ProC globalu, FVIII, FXII, homocysteinu a především molekulárně genetického stanovení genu V Leiden, MTHRF a genu prothrombinu.

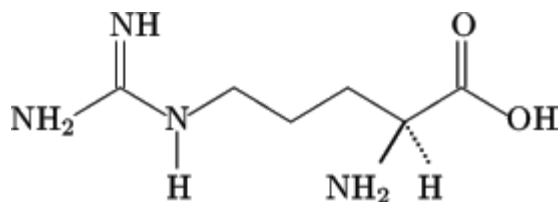
3.1. Vrozené

3.1.1 *Rezistence na aktivovaný protein C*

APC rezistence je vlastně vyvolaná rezistence faktoru Va vůči vlivu aktivovaného proteinu C. Může být, jak získaná, tak především dědičná.

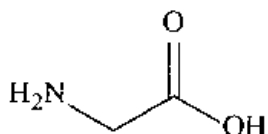
Dědičná se podle místa objevu nazývá Leidenská. Její heterozygotní forma je u nás, tedy v naší populaci, zastoupena asi v 5%, zatímco v homozygotní formě se vyskytuje jeden případ na 5000 obyvatel.

Rezistence F V Leiden vůči APC je způsobena bodovou mutací v kodonu 506, která vyvolá při syntéze FV záměnu aminokyseliny **argininu** v pozici 506



Arginin¹²⁾

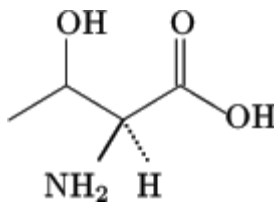
za **glycin**.



Glycin¹²⁾

Takto vzniklý FV Leiden je rezistentní vůči štěpení aktivovaným proteinem C a zároveň není schopen se s proteinem S podílet na inaktivaci aktivovaného FVIIIa v systému [APC . PS . Ca²⁺ . P1]. Vlivem této mutace nedochází v systému PC ke štěpení těžkého řetězce faktoru Va, který tak zůstává v aktivní podobě a může se podílet v komplexu protrombinázy na zvyšování hladiny trombinu, čímž také přispívá k trombofílii.

Rezistenci k aktivovanému proteinu C i když s menším klinickým dopadem způsobuje bodová mutace v kodonu 306 záměnou aminokyseliny argininu za **threonin**, která vyvolá pokles této kofaktorové aktivity v F V Cambridge.

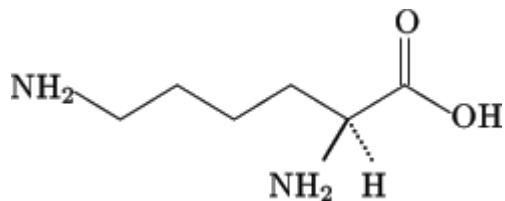


Threonin¹²⁾

APCR může být vyvolána i pouhým snížením hladiny FV. Nízká hladina FV v kombinaci s heterozygotním FV Leiden je označována jako „pseudohomozygotní APC rezistence“.

K dalším genetickým mutacím FV také patří tzv. haplotyp HR2. Jeho příčinou je polymorfismus A 4070G v exonu 13 genu FV, který způsobí záměnu histidinu za arginin v místě 1299 B domény. Tato záměna vede ke snížení FV a rezistenci k APC.

U asijské populace je možná detekce mutace argininu 306 záměnou za glycin nebo argininu 485 za **lysin** FV.



Lysin¹²⁾

APC rezistence má častěji sklon k žilním trombózám než k arteriálním, avšak k samovolnému vzniku trombózy u heterozygotní formy FV Leiden nedochází, většinou je zapotřebí kombinace s jinými protrombotickými riziky. Těmi mohou být např. dříve již zmiňovaný pooperační stav (s nedokonalou profylaxí heparinem), léčba estrogeny, patologické těhotenství, obezita, imobilizace aj.

Detekce APCR způsobené Leidenskou mutací FV se provádí screeningovými koagulačními testy, nebo lépe genetickým vyšetřením DNA.

Dysfunkce receptoru pro protein C (EPCR)

K selhání inhibitorů koagulace dochází i z důvodu existence *mutace genu endoteliálního receptoru pro protein C*, která vyvolá jeho dysfunkci a způsobí, že tento receptor neváže PC a nedochází tak k aktivaci komplexem trombin- trombomodulin.

EPCR se vyskytuje především v endotelu velkých cév žilního systému.

3.1.2 Defekt 20210A alely protrombinu

Do této skupiny dědičně podmíněných trombofilií patří trombofilie způsobená bodovou mutací v 3'- UTR (v nepřepisované oblasti) mRNA genu protrombinu 20210 záměnou glycinu za arginin, která u postižených jedinců vyvolá *zvýšení produkce protrombinu* (jeho koncentrace v plazmě je pak >130% normy), a tím i větší dispozici ke srážení krve.

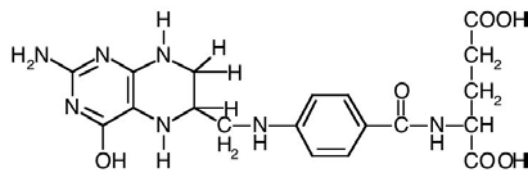
Kombinace této mutace spolu s již zmíněnou zvýšenou hladinou protrombinu se v české populaci vyskytuje mezi 1 až 2%. U heterozygotů se riziko vzniku žilní trombózy zvyšuje asi 2-3krát.

Tuto mutaci lze prokázat molekulárně genetickým vyšetřením. ⁴⁾

3.1.3 Hyperhomocysteinémie

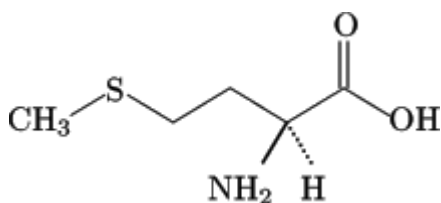
Zvýšená hladina homocysteinu v krvi je primárně způsobena *mutací genu pro cystathion β -syntázu* nebo *genu pro reduktázu 5,10 metylentetrahydrofolátu (MTHFR)*, což vede k blokování metabolismu jak methioninu, tak i homocysteinu.

Vrozená hyperhomocysteinémie je způsobena většinou přítomností mutované termolabilní formy MTHFR



Tetrahydrofolát¹²⁾

Odhaduje se, že tato mutace je způsobena záměnou cytosinu 677 za tymin, a v kavkazské populaci se vyskytuje v homozygotní formě asi v 8 až 10%. Homozygotní “defekty” jsou spojovány s těžkou hyperhomocysteinémií a doprovázeny řadou neurologických a psychických poruch a časnou chorobou cév, včetně TEN. U heterozygotů se vyskytuje lehká až středně těžká forma zvýšené hladiny homocysteinu v krvi. Při poruše konverze homocysteinu na netoxický methionin se jeho hladina zvyšuje až 25%.

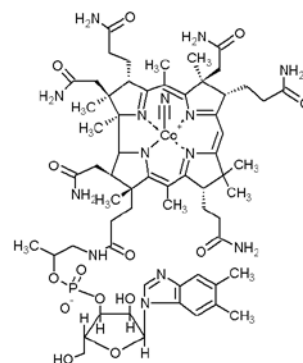
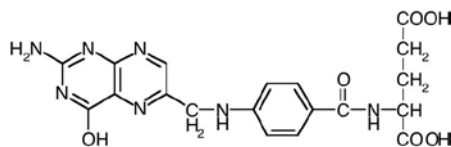
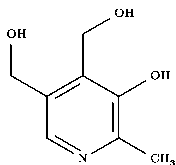


Methionin¹²⁾

Riziko žilní trombózy narůstá u nositelů této mutace zejména v šestinedělí, přičemž svou roli zde hraje i deficit kyseliny listové po dobu gravidity.

Druhotně se může vyskytovat zvýšená hladina homocysteinu při chronickém nedostatku vitamínu B₁₂, kyseliny listové nebo vitamínu

B₆, způsobené jejich nedostatkem v potravě.



Pyridoxin-B₆

Kyselina listová- B₉

Kobalamin-B₁₂¹²⁾

Homocystein podněcuje expresi tkáňového faktoru na monocytech a makrofázích, čímž zvyšuje trombofílii jak v žilním, tak v arteriálním řečišti. Také v buňkách endotelu a hladké svaloviny indukuje produkci inhibitoru fibrinolýzy PAI-1, snižuje tak fibrinolytickou aktivitu a vyvolává zvýšenou syntézu a uvolňování TF. Na endotelu inhibuje expresi trombomodulinu a následně aktivaci proteinu C.

Hyperhomocysteinémie je v plazmě provázena zvýšenou aktivitou F XII a FV.

Projevuje se jako rizikový faktor převážně u mladších lidí.

Jeho fyziologické hodnoty v krvi lidí mladších 30 let jsou 4,6 – 8,1 umol/l; mezi 30 – 59 rokem u žen 4,5 – 7,9 umol/l a mužů 6,3 – 11,2 umol/l a lidí nad 59 let věku jsou 5,8 – 11,9 umol/l.

3.2 Získané

3.2.1 Antifosfolipidový syndrom

Antifosfolipidový syndrom (APS) vyvolávají *protilátky proti negativně nabitým fosfolipidovým povrchům*, jsou přítomny na většině buněk v lidském organismu, proti proteinům vázajícím fosfolipidy nebo proteinům (kofaktorům) v případě, že nejsou fosfolipidy přítomny. Inhibují i protektivní antitrombotický vliv annexinu V.³⁾

Antifosfolipidové protilátky se rozdělují na **autoimunitní**, které se vyskytují v séru 20-50% pacientů se systémovým lupusem erythematodes, méně často s jiným onemocněním pojivové tkáně a jsou spojovány s opakovanými žilními i arteriálními trombózami, trombocytopenií a u žen s opakovanými spontánními potraty. Druhou skupinou protilátek jsou **alloimunní** protilátky, které se přechodně vyskytují u některých infekčních a maligních onemocnění, ale klinicky se nemanifestují. Nalézají se v 8% běžné populace a s věkem jejich hladina stoupá.

Tyto APA protilátky tím, že vyřazují fosfolipidy ze hry v rámci koagulačních procesů se výrazným, ale zároveň rozdílným způsobem podílejí na procesu krevního srážení, jehož výsledkem je zpravidla **trombofílie**.

K vážné komplikaci APS může docházet během těhotenství, kdy se syndrom vždy zhorší. Někdy se může syndrom v této době i prvně manifestovat.⁴⁾ U těhotných žen dochází vlivem APA či LA k trombotizaci nejen v jejich žilním nebo arteriálním řečišti, ale zároveň i v placentě.

Antifosfolipidový syndrom (APS) je charakterizován nejen přítomností venózních i arteriálních trombóz v mikrocirkulaci, trombocytopenií, ale i *nepříznivým průběhem těhotenství vedoucí k spontánnímu potratu, výskytem růstové retardace plodu nebo placentární insuficiencí směřující k předčasnému porodu*. Komplikací těhotných může být také krvácení způsobené autoimunitní trombocytopenií.

Zatím není zcela zřejmé jestli přítomnost antifosfolipidových protilátek APA má přímou součinost s patologickými stavy nebo jen tyto stavy či onemocnění doprovází.

Předpokládá se několik *mechanismů účinku APA*:

- tvoří komplexy s fosfolipidy protrombinového komplexu koagulační kaskády, čímž vzniká hyperkoagulační stav,
- brání uvolňování kyseliny arachidonové z endotelu cév, dochází tak ke snížené tvorbě prostacyklinu jako přirozeného antikoagulantu, zvyšuje se agregace trombocytů a dochází k trombóze,
- inhibují účinek prekalikreinu s následným poškozením fibrinové "clearance", čímž zase zvyšují možnost trombózy,
- inhibují působení trombomodulinu při aktivaci proteinu C trombinem, a tím se ztrácí zpětnovazebná inhibice koagulace,
- dochází k přímému poškození trombocytů protilátkami typu *Lupus antikoagulans*, zvyšuje se adhezivní schopnost trombocytů a následně trombóza.

Protože u nemocných se systémovým *lupus erythematoses (SLE)* na přítomnost APA upozorní prodloužení testu APTT, jsou tyto protilátky též nazývány jako "**lupus antikoagulans**" (LA).

LA protilátky mohou vykazovat specifickou aktivitu i proti

koagulačním faktorům jako je FVIII, vWF, faktorům protrombinového komplexu aj., a zároveň tak podporovat sklony ke krvácení.

LA se vyskytují především u pacientů s SLE, tj. asi 30% nemocných, nebo s jinými systémovými poruchami pojiva, hlavně u žen.

Mimo již výše zmíněných faktorů mohou být protilátky vyvolány i některými léky, např. chlorpromazinem nebo atakou bakteriálního či virového agens. Velmi často se nacházejí u pacientů s revmatickým onemocněním.⁴⁾

K APA se také řadí **antikardiolipinové protilátky (ACLA)** tvořené imuno-globulíny třídy IgG nebo IgM, vzácně pak IgA.

Kardiolipin je kyselý fosfolipid, který je *součástí vnitřní membrány mitochondrií*. *Protilátky proti němu namířené reagují s fosfodiesterovou skupinou kardiolipinu* a reprezentují tak pouze jeden člen skupiny protilátek, které se mohou vázat na fosfolipidy na rozdíl od negativně nabitých fosfolipidů, na které se váží LA protilátky. Tento zásadní rozdíl je klinicky velice důležitý.

Klinické projevy APS jsou značně heterogenní, většinou ale způsobují trombotické příhody, tj. asi 60% tvoří žilní trombózy, 30% cévní mozkové příhody a asi v 10% jde o jiné arteriální trombózy. LA reagují nejen s fosfolipidy trombocytů a buněk endotelu, které tím aktivují, ale zároveň s vrstvou heparanů endotelu, které inhibují trombin, a ruší tak ochranný štít tvořený annexinem V. Takto aktivované endotelie ve zvýšeném množství exprimují adhezivní molekuly jako E-selektin, P-selektin a třeba ICAM-1, dochází k jejich aktivaci a následně sklonem k trombóze.

Tyto protilátky jsou velmi často nepoznanou příčinou spontánních potratů.

Především přítomnost vysokého titru APA-IgG může způsobit potrat nebo intrauterinní odumření plodu či fetální růstovou retardaci apod.

Je prokázáno, že pacientky s vysokými hodnotami hladiny APA v 80-90% potrácejí, dvě třetiny těchto ztrát spadají do období prvního trimestru. Většina postižených žen potrací v prvním trimestru, tedy v období, kdy transplacentární přenos protilátek je velmi nedokonalý. Vysoké hladiny APA-IgG jsou významnější než APA-IgM.^{6),10)}

Během těhotenství může být těmito LA poškozena přímo trofoblastická vrstva, protože se v současnosti potvrzuje předpoklad o *cytotrofoblastických buňkách*, které mají vytěsňovat fosfatidylserin na svůj povrch, a ten pak splňuje funkci *epitopu*. Tím dochází k možnému *poškození trofoblastu přímo*.¹⁰⁾

Hodnoty APA a ACA mohou během těhotenství kolísat a to tak, že nejvyšší hodnoty jsou přítomny na začátku těhotenství, a v dalším průběhu těhotenství již nestoupají. Proto je podle úspěšných studií doporučována imunopresivní léčba *prednisolem*.

Dle závažnosti stavu pacientky se k léčbě používají kortikosteroidy, orální antikoagulanca, antiagregační léky nebo heparin.

4. TĚHOTENSTVÍ A ŠESTINEDĚLÍ

4.1. Fyziologické těhotenství

Během přibližně 280 dnů těhotenství se v těle matky z vajíčka vyvine plod o průměrné hmotnosti 3500 g obklopený cca 800 ml amniové tekutiny. K zajištění kvalitní výživy plodu je nutné, aby se mateřský organismus těmito potřebám přizpůsobil. Tyto adaptace jsou převážně vyvolány a řízeny komplexní interakcí hormonů, která vede k výrazným změnám metabolismu.⁷⁾

Během těhotenství dochází v cévním řečišti ženy z hlediska hemostázy ke zpomalení krevního toku a k nárůstu trombofilní tendence, která je v tomto období fyziologická, protože je směřována k co nejmenším krevním ztrátám při porodu. Tato narůstající trombofilní dispozice sebou přináší i narůstající riziko tromboembolických komplikací. Ve 2. a 3. trimestru se snižuje hladina proteinu S a zároveň se projevuje i relativní insuficience APC způsobená zvýšenou tvorbou protrombinu. Vlivem zejména estrogenu se zvyšuje hladina fibrinogenu, FV, FVII, FVIII a vWF. Zvyšuje se také koncentrace inhibitorů fibrinolýzy PAI-1 a PAI-2 a TAFI (trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy). Některé tyto inhibitory produkuje placenta.

Organismus gravidní ženy se fyziologicky brání této „hyperkoagulaci“ hemodilucí nebo zvýšením aktivity některých přirozených inhibitorů koagulace, proto stoupá hladina TFPI a annexinu V, který produkuje placenta. Ve 2. a 3. trimestru dochází ke snížení zánětlivých adhezivních molekul E-selektinu a ICAM-1.

Uvedené mechanismy kompenzace fyziologického těhotenství přestávají platit po ukončení gravidity, to je po porodu a pak v šestinedělí. Tato období jsou z hlediska tromboembolických komplikací hrožení těhotné vznikem trombózy nejrizikovější.⁴⁾

4.2. Patologické těhotenství

Při **patologickém těhotenství** nedochází ke kompenzaci hyperkoagulace fyziologického těhotenství, ale naopak dochází neinhibovanou expresí tkáňového faktoru (TF) k posílení hyperkoagulačních tendencí. K takovým situacím dochází především při traumatu dělohy, při embolii plodovou vodou nebo při „syndromu mrtvého plodu“. Také intrauterinní infekce navozují patologický trombofilní stav. Zánětlivé cytokíny (interleukíny IL 1 β , TNF α a IFN γ)

aktivují entotel, který spolu s aktivovanými monocyty začne uvolňovat TF. Následný zánět pak může vyvolat děložní kontrakce nebo i předčasný porod.

Oba tyto stavy spojené s patologickou expresí TF, nadbytkem koagulačních faktorů, APC rezistencí, deficitem PS a zvýšením inhibitorů fibrinolýzy vedou k nadprodukci trombinu. K tomu může dojít i z vytvořeného retroplacentárního hematomu při odlučování placenty, přičemž tento stav může vyústit až v DIC syndrom provázenou trombotizací cév v mikrocirkulaci a spotřební koagulopatií v systémové cirkulaci. ⁴⁾

Rizikovou skupinou těhotných žen s vyšším sklonem k žilní trombofilii a intravaskulární porodní koagulopatii patří také ženy s gestačním diabetem a preeklamsií, které mají hladinu fibrinogenu zvýšenu o dalších 10-20%.

5. ANTITROMBOTICKÁ LÉČBA

Při léčbě TE komplikací se podáním účinné látky se může

- zabránit narůstání trombu
- umožnit rozpuštění koagula
- zamezit dalšímu shlukování trombocytů
- snížit hyperkoagulabilitu systému.

Antitrombotickou léčbu dělíme na *antikoagulační, trombolytickou a antiagregační*.

5.1. Antiagregační

Příčinou vzniku destičkového trombu je porušení rovnováhy pro- a antiagregačních mechanismů.

Protideštičková nebo též *antiagregační léčba* slouží tedy k inhibici primární hemostázy. Je zaměřena na omezení shlukovací schopnosti krevních destiček.

Krevní destičky můžeme inhibovat jak ve fázi jejich adheze, aktivace nebo agregace, případně můžeme potencovat jejich stabilitu:

- *blokáda adheze trombocytů na subendotel*
- *blokáda aktivačních cest a cyklů*
- *stabilizace trombocytů*
- *blokáda agregace trombocytů – blokátory GP IIb/III*

U žen s anamnézou prodělané preeklampsie či abortu při pozitivitě APA volíme k prevenci destičkových trombů nízké dávky kyseliny acetylsalicylové (50-100 mg denně per os)

Kyselina acetylsalicylová (ASA), Anopyrin, inhibuje **blokádu aktivačních cest a cyklů** trombocytu. Antiagregační účinek je dán interferencí s biosyntézou cyklických prostanoidů v cyklu kyseliny arachidonové. Vyvolá **nevratnou inhibici cyklooxygenázy** a následné potlačení syntézy tromboxynu A₂ a dalších prostaglandinů. Její plazmatický poločas je cca 20 minut.

5.2. Antikoagulační

Antikoagulační léčba zabraňuje vzniku trombu inhibicí geneze trombinu a následné přeměně fibrinogenu na fibrin.

Antikoagulancia slouží k inhibici plazmatických koagulačních faktorů.

Patří k nim:

- preparáty kumarinového typu (Warfarin)
- nefrakcionovaný heparin (UFH)
- frakcionovaný heparin (LMWH)
-

Preparáty kumarinu, *antagonisté vitamínu K*, brání vzniku plně funkčních koagulačních faktorů.

Nefrakcionovaný heparin jako nepřímý inhibitor trombinu způsobuje prostřednictvím antitrombinu inaktivaci FIIa a FXa, zatímco *frakcionovaný heparin* působí, též prostřednictvím antitrombinu, pouze inhibicí FXa. ³⁾

Z hlediska léčby trombotických komplikací v těhotenství a šestinedělí lze užít jen některých antikoagulancií.

V praxi již převládá použití nízkomolekulárního heparinu, který pro svůj jednoduchý způsob aplikace, s.c. jednou denně, nahradil tzv. standardní, nefrakcionovaný heparin. ¹¹⁾

Bylo prokázáno, že **nízkomolekulární hepariny** jsou v s.c. aplikaci účinné nejen při profylaxi, ale i při léčbě hluboké žilní trombózy včetně léčby trombembolismu. Perorální antikoagulancia jako **warfarin** se těhotných žen běžně nepodávají, protože procházejí placentární bariérou a v I. trimestru hrozí riziko **teratogenity**.¹¹⁾

V prevenci TEN se používají proto pouze u gravidních žen s chlopenními srdečními vadami nebo s implantovanou umělou srdeční chlopní a to po celou dobu těhotenství. Riziko trombogeneze totiž dalece převyšuje riziko teratogenity.

5.3. Trombolytická

Trombolytická léčba spočívá v terapeutickém potencování fibrinolýzy.

6. LABORATORNÍ VYŠETŘOVACÍ METODY

6.1. Screeningové

Mezi **základní koagulační vyšetření** při vyšetřování vrozené trombofilie, ale i při kontrole účinnosti antikoagulační léčby v případě tromboembolických komplikací patří již zmiňované testy: APTT, PT, TT, hladina fibrinogenu, AT III a hladina D-dimerů a počet trombocytů.

APTT je aktivovaný parciální tromboplastinový test, který sleduje vnitřní cestu aktivace přeměny protrombinu na trombin.

PT je protrombinový test zachycující vnější cestu aktivace přeměny protrombinu na trombin.

Oba testy se startujeme vápenatými ionty a měří se koagulační čas. Tyto testy měříme na fotooptickém koagulometru Sysmex 6000.

Trombinový test je screeningový test stanovující polymeraci fibrinu. Reakce se startuje roztokem trombinu. Měřený čas je odvislý na koncentraci trombinu.

Fibrinogen stanovujeme koagulační metodou podle Clause. V přítomnosti nadbytku trombinu je koagulační čas ředěné plazmy

závislý na množství fibrinogenu. TT a fibrinogen na našem pracovišti měříme analyzátozem Sysmex 6000.

Antitrombin III je stanovován chromogenní metodou na principu měření intenzity zabarvení pNA při vlnové délce 405 nm (absorbance), kterou vykazuje odštěpený pNA po proběhlé reakci enzym – substrát. Jeho aktivitu stanovujeme též na analyzátozu Sysmex 6000.

D-dimery tvoří s latexovou reagentií a firemním puftrem aglutinaci. Ta způsobí pokles intenzity procházející světla a vzrůstá tak turbidita. Hodnoty koncentrace ve vzorku odečítáme z kalibrační křivky. Tuto metodu stanovujeme na koagulometru Sysmex 1500.

Trombocyty stanovujeme analyzátozem krevních částic **Coulter LH 755** na základě impedančního principu.

6.2. Speciální

V rámci vyšetření trombofilní dispozice dále vyšetřujeme: test Pro C global, protein C-aktivita i antigen, protein S-aktivita i antigen, hladina F VIII:C a příp. hladina F XII.

Principem koagulačního *ProC Global testu* je inkubace vyšetřované plazmy s hadím jedem (aktivátorem PC) jako aktivátorem vnitřní koag.cesty. *Aktivita PS* se stanovuje smícháním protein S deficitní plazmy s plazmou pacienta, aktivovaným PC a FVa a koagulační proces je startován vápenatými ionty. Detekce je založena na principu nefelometrie.

Protein C aktivitu vyšetřujeme již zniňovanou chromogenní metodou na fotooptickém koagulometru Sysmex 1500.

Hladiny *faktorů VIII a XII* stanovujeme koagulační metodou na stejném koagulometru. Principem metod je smíchání vyšetřované

plazmy s příslušnou firemně dodávanou deficitní plazmou příslušného faktoru, tzn. že obsahuje všechny koagulační faktory v nadbytku mimo stanovovaného, ten vůbec neobsahuje. Stanovovaný faktor obsahuje jen plazma pacienta. Po přidání APTT reagentie, která obsahuje aktivátor, fosfolipidy a vápenaté ionty se měří koagulační čas. Výsledky funkční aktivity odečítáme z kalibrační křivky.

Pro *výzkumné účely* provádíme stanovení: plazminogen (Plg)-aktivita, antiplazmin (AP)-aktivita, PAI-1 aktivita; PAI-1-antigen, TM-antigen, t-PA-antigen.

Kvantitativní stanovení testů *PAI-1 Ag*, *t-Pa Ag*, *TM Ag* je prováděno sendvičovými metodami ELISA s využitím mikrotitračních destiček s 96 jamkami a vyhodnocením na ELISA readeru.

Princip sendvičové ELISA metody: během inkubace vzorku v jamce dojde k vyvázání antigenu příslušnou myší monoklonální protilátkou, která je již komerčně navázána v jamkách. Poté se přidá konjugát této protilátky a enzym peroxidáza, jenž se váže na zachycený antigen vzorku. Vzniká tak sendvičový komplex, který pomocí peroxidázy reaguje s chromogenním substrátem tetrametylbenzidinem. Reakce je zastavena přidávkem kyseliny sírové a intenzita vzniklého zbarvení se měří na mikrodestičkovém fotometru READER 530 při 450nm. Čím vyšší je naměřená absorbance, tím vyšší je koncentrace antigenu, která se odečítá z kalibrační křivky.

Metody *Plg akt*, *AP akt* a *PAI-1 aktivita* se stanovují chromogenní metodou na již zmiňovaném analyzátoru Sysmex 1500.

6.3. Analyzátořy

Analyzátořy SYSMEX CA - 1500 a SYSMEX CA - 6000

Jsou fotooptické koagulometry, které monitorují a vyhodnocují průběh koagulačních měření na principu nefelometrie.

Principem nefelometrie je, že paprsek vycházející ze světelného zdroje a procházející reakční kvyetou se směsí vzorku a činidla, je touto směsí rozptylován. Kvyeta s reakční směsí je osvětlována červeným světlem o vlnové délce 605 nm a detektor umístěný v úhlu 90° od zdroje světla rozptýlené světlo zachycuje a přeměňuje na elektrický signál.

7. STUDIE

Pro svoji práci jsem si vybrala část ze souboru pacientek, které jsou vyšetřovány v grantové studii, která v současnosti probíhá a jejímž hlavním řešitelem je doc.MUDr.Z. Ulčová-Gallová Dr.Sc. Tato studie se zabývá objasňováním příčin imunologických, hemokoagulačních či genetických při opakovaně neúspěšně probíhajících graviditách.

7.1. Cíl studie

Cílem mé práce je posoudit vývoj šesti sledovaných koagulačních parametrů skupiny žen, které byly v souvislosti s touto studií vyšetřovány před otěhotněním a v průběhu jejich těhotenství.

Pro tuto práci jsem vytvořila soubor, který vznikl spojením dvou skupin pacientek, za účelem využití většího množství dat.

Jedná se o jednu skupinu žen, jimž byla odebrána krev na vyšetření sledovaných koagulačních parametrů v době, kdy plánovaly koncepci, ale ještě nebyly těhotné (HCG < 500) a po koncepci, kdy jim byla krev odebírána celkem 4x: v době do 10.týdne, od 10. do 19. týdne, od 20. do 29.týdne a od 30.týdne do porodu. Druhou skupinu tvoří ženy, které byly vyšetřeny až v průběhu těhotenství, a kterým tudíž chybí náběr před těhotenstvím.

Charakteristika souboru:

- 32 žen (anamnéza 1-5 abortů)
- Interval sledování: > 280 dnů od vstupu do studie
- Věk (23-40 let)
- BMI (18-35)
- Anamnéza TEN (4x pozitivní, z toho 3x HAK)
- IVF (9 žen, jedna žena 5x)
- Kouření (5 kuřaček – 2-15 cigaret denně)
- Vrozená trombofilní dispozice (3x LM)
- Získaná trombofilní dispozice (12x APS)
- Léčba LMWH (nadroparin event. enoxaparin)
- Porod 29x – 36.-40. týden gravidity
- Předčasně skončená gravidita 3x (9., 13. a 21. týden gravidity)

Sledovanými koagulačními parametry jsou:

fibrinogen, D-dimery, FVIII:C, Antitrombin, PC akt, PS akt.

Zdrojová data pro grafy:

Jméno	FBG	ATIII	D-D	FVIII	PC akt	PS akt
Referenční rozmezí	2 – 4 g/l	80-120 %	0-0,4 mg/ml	50-150%	70-149 %	55-123 %
0	3,77	90	0,09	148	120	62
1K	3,77	90	0,09	148	120	62
A	3,20	81,33	0,21	195,5	121,3	60,67
2K	4,06	96,84	0,26	195	126,7	64,11
3K	4,25	94,12	0,7	235	124,5	55,24
4K	5,37	99,63	0,6	294,6	124,5	44,7

Legenda: 0- náběr v době, kdy žena nebyla gravidní

1- náběr v době gravidity do 10.týdne

2- náběr v době gravidity v 11.-20.týdnu

3- náběr v době gravidity v 21.-30.týdnu

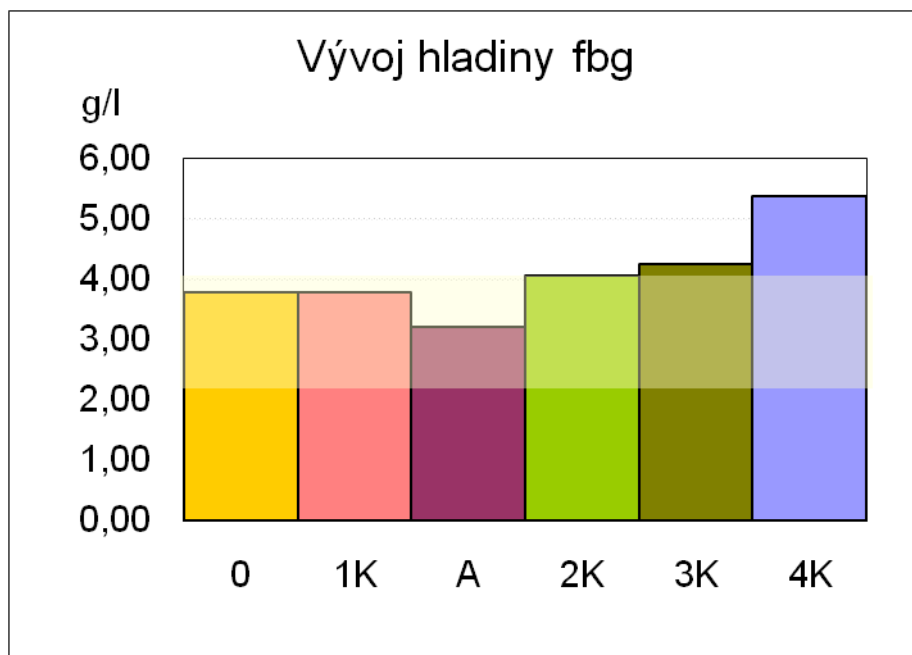
4- náběr v době gravidity od 31.týdne až do porodu pacientky

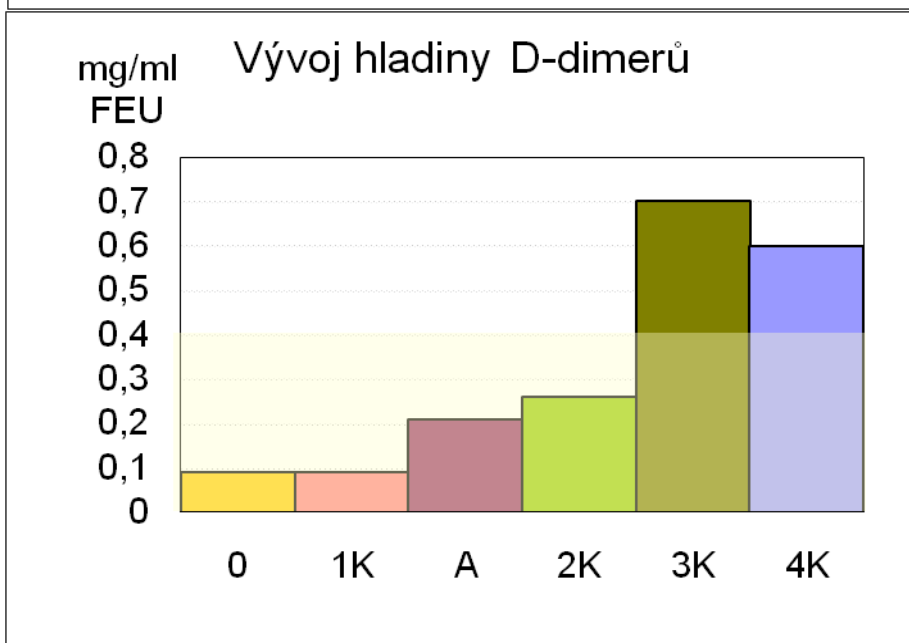
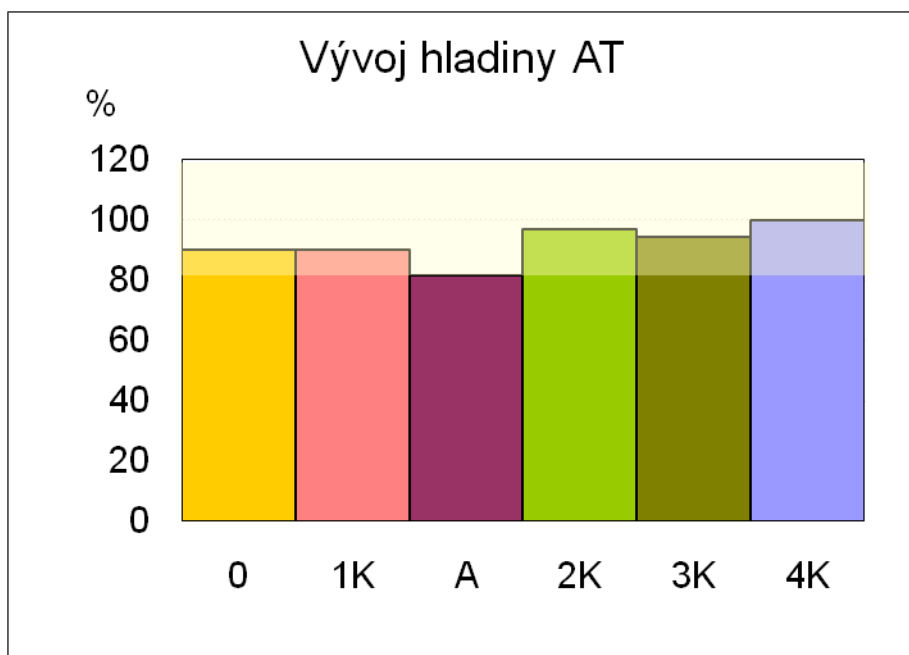
A- pacientky, které prodělaly abort

V- vstup

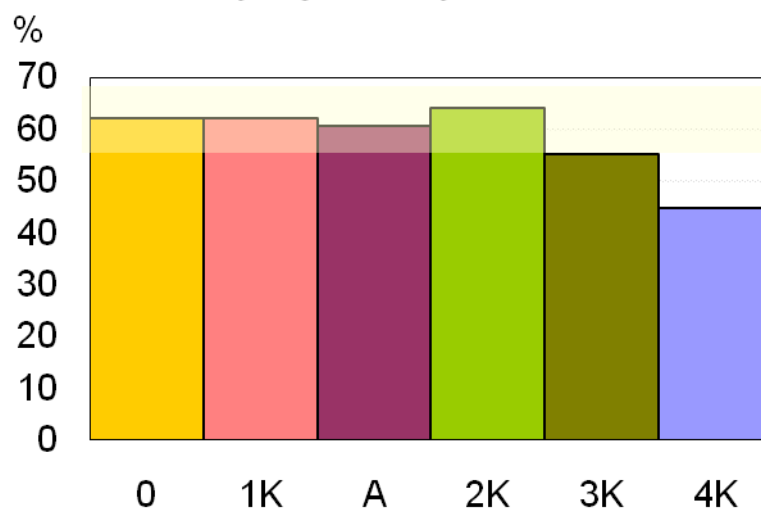
K- kontrola

7.2. Grafické zpracování

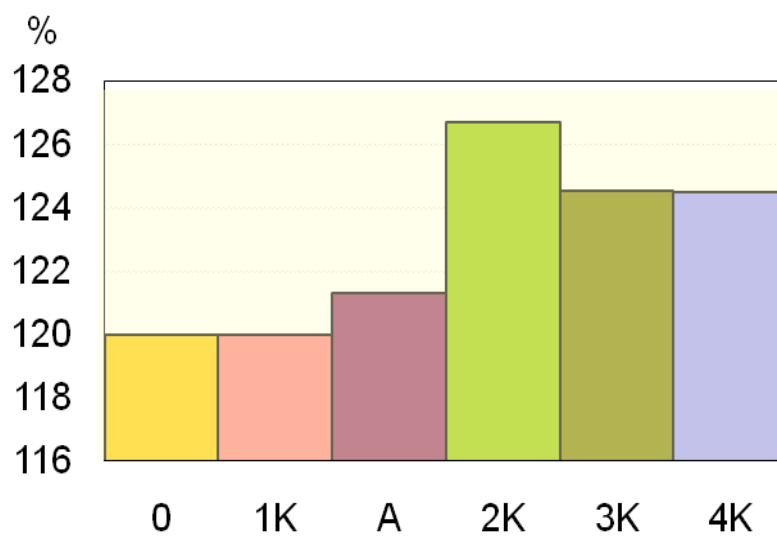




Vývoj aktivity PS



Vývoj aktivity PC



8. DISKUZE

Porovnáním jednotlivých náběrů v průběhu těhotenství u 35 pacientek a u nich šesti sledovaných koagulačních parametrů vyplývá následující:

- podle očekávání se stoupající hyperkoagulační aktivitou stoupaly hladiny fibrinogenu, D-dimerů a FVIII:C
- se zvyšující zátěží organismu dle očekávání klesala hladina PS
- hladiny AT III a PC jako inhibitorů hemostázy sice stoupaly, ale nepřekročily hladinu referenčních mezí

Většina změn potvrdila korelaci se známou skutečností, že hladiny koagulačních faktorů a markerů fibrinolýzy koncem gravidity fyziologicky stoupají.

Z celého souboru potratily tři těhotné ženy. U jedné pacientky není potrat neočekávaný vzhledem k anamnéze vrozeného deficitu AT a IUFD v 21. týdnu gravidity, u zbývajících dvou pacientek není zatím původ abortu objasněn.

9. ZÁVĚR

Mezi jedny z příčin opakovaných potratů a zároveň snížené plodnosti patří také trombotické a trombofilní stavy vrozené a získané.

Z tohoto důvodu jsem se ve své práci snažila o zdokumentování, jak je možné nabyté teoretické zkušenosti smysluplně uplatnit v každodenní praxi za pomoci dokonalých laboratorních metod a přístrojů.

Zároveň se tak možná podílet, byť jen částečně, na objasnění možných příčin opakovaných abortů, které přivádějí některé ženy do složitých životních situací.

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

- 1) **Pecka, M.:** Laboratorní hematologie v přehledu I, FINIDR s.r.o., Český Těšín, 2002, s.18-19
- 2) **Pecka, M.:** Laboratorní hematologie v přehledu II, FINIDR s.r.o., Český Těšín, 2006, s.103-131
- 3) **Pecka, M.:** Laboratorní hematologie v přehledu III, FINIDR s.r.o., Český Těšín, 2004, s.1-237
- 4) **Kvasnička, J.:** Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi, GRADA Publishing a.s., Praha, 2003,s.37-60, 197-202
- 5) **Ulčová – Gallová, Z.:** Annexin V a protilátkyproti annexinu V v souvislosti se selháváním lidské reprodukce, Moderní gynekologie a porodnictví 11, 2002, č.4, s.561-564
- 6) **Ulčová – Gallová, Z.:** Neplodnost – útok imunity, GRADA Publishing a.s., Praha, 2006, s.74-87
- 7) **Racek, J.:** Klinická biochemie, druhé přepracované vydání, GALÉN, Praha, 2006, s.281
- 8) **Pecka, M :**Přehled laboratorní hematologie II.-Bílá krevní řada, Krevní destička, GALÉN, Praha, 1996, s.103, 111
- 9) **Hájek, Z.:** Rizikové a patologické těhotenství, GRADA Publishing a.s., Praha, 2004, s.173-186
- 10) **Ulčová – Gallová, Z.:** Antifosfolipidové protilátky (APA)
Ulčová v gynekologii a porodnictví, Česká Gynekologie 59, 1994, č.1, s.28-34
- 11) <http://www.porodnice.cz>, 27.9.2006
- 12) <http://cs.wikipedia.org/wiki>, 20.4.2007
- 13) <http://www.solen.cz>, 12.3.2007

SOUHRN:

Trombofilní stavy jsou vrozené nebo získané poruchy, patofyziologicky a statisticky spojené se zvýšeným rizikem vzniku trombů v žilách nebo v arteriích. Při žilní trombóze hraje hlavní roli zástava krve a hyperkoagulace, při arteriální trombóze aktivace krevních destiček a dysfunkce endotelu při arterioskleróze. Nejvýznamnější klinickou manifestací trombofilie je venózní tromboembolizmus (VTE).

K vrozeným poruchám patří deficiencie antitrombinu, proteinu C a proteinu S, Leidenská mutace genu V. faktoru a mutace genu protrombinu 20210A. Také získaná APC rezistence, hyperhomocysteinemie, syndrom lepkavých destiček a zvýšená hladina faktorů VIII, IX a XI je spojena s vyšším rizikem VTE.

K získaným trombofilním poruchám řadíme především antifosfolipidový syndrom a maligní nádory.

Dlouhodobá antikoagulační léčba warfarinem v primární prevenci není u nosičů trombofilii doporučována, ale krátkodobá profylaxe nízkomolekulárním heparinem v rizikových situacích je plně indikovaná.

U žen s trombofiliemi je cca 2x vyšší riziko ztráty plodu, intrauterinní retardace růstu plodu, placentární abrupce, těžké preeklampsie a HELLP syndromu. Porodnické komplikace, zejména opakované spontánní potraty nebo intrauterinní úmrtí plodu, mohou být první manifestací antifosfolipidového syndromu. U pacientek s trombofilními poruchami a komplikacemi předchozích gravidit je během dalších těhotenství užitečná farmakologická tromboprolaxe.¹³⁾

SUMMARY:

Thrombophilic disorders are defined as inherited or acquired defects, pathophysiologically and statistically associated with an increased risk to the occurrence of thrombosis in veins and arteries thrombosis. In venous thrombosis, ceased blood flow and hypercoagulation are the main culprits, on the contrary, platelet activation and endothelial dysfunction in atherosclerosis are responsible in arterial thrombosis. Venous thromboembolism (VTE) is the most prominent manifestation of thrombophilia.

Inherited abnormalities include deficiencies of antithrombin, protein C, and protein S, factor V Leiden mutation, and the prothrombin G20210A mutation. Acquired APC resistance, hyperhomocysteinemia, sticky platelet syndrome and elevated levels of factors VIII, IX and XI also have been associated with an increased risk of VTE.

Acquired thrombophilic disorders are represented by antiphospholipid syndrome and cancer.

Long-term anticoagulant therapy with warfarin is not recommended in primary prevention for the thrombophilia carriers, however, short-term prophylaxis with low-molecular-weight heparin in high risk conditions is indicated.

For women with thrombophilic defects, the risk of pregnancy loss, intrauterine growth retardation, placental abruption, severe pre-eclampsia and the HELLP syndrome is increased about 2-fold. Obstetric complications, particularly recurrent spontaneous abortions or intra-uterine fetal death, may be the first manifestation of the antiphospholipid antibody syndrome. The pharmacological thromboprophylaxis during pregnancy is useful in patients with thrombophilic disorders and previous pregnancy complications.¹³⁾