

Obsah

1. Úvod a cíl práce	2
2. Teoretická část	3
2. 1. Úvod	3
2.1.1. Hemostáza (srážení krve) - fyziologie a funkce	3
2.1.1.1. Cévní stěna	4
2.1.1.2. Krevní destička - trombocyt	4
2.1.1.3. Plazmatický koagulační systém	5
Vnější cesta aktivace přeměny protrombinu na trombin	6
Vnitřní cesta aktivace přeměny protrombinu na trombin	6
Fibrinogen (faktor I)	7
Faktor V (proakcelerin)	8
Faktor VII (prokonvertin)	9
2.1.1.4. Systémy inhibitorů hemostázy	10
Antitrombin	11
Systém proteinu C	12
2.1.4.5. Fibrinolytický systém	13
Fibrinové monomery	14
D-dimery	15
3. Praktická část	16
3.1. Materiál	16
3.1.1. Odběr krve pro koagulační stanovení	16
3.1.2. Odběr krve pro stanovení počtu trombocytů	16
3.1.3. Příprava a vyšetření koagulačních vzorků	16
3.2. Metody	17
3.2.1. Protrombinový test	17
3.2.2. APTT	17
3.2.3. Stanovení fibrinogenu	18
3.2.4. Stanovení faktoru V	19
3.2.5. Stanovení faktoru VII	19
3.2.6. Stanovení antitrombinu	19
3.2.7. Stanovení proteinu C	20
3.2.8. Stanovení fibrinových monomerů	20
3.2.9. Stanovení D-dimerů	20
3.2.10. Test ke sledování euglobulinové lýzy	21
3.3. Přístroje	22
3.3.1. Koagulační analyzátor COMPACT	22
3.3.2. Koagulační analyzátor BCS	22
3.3.3. Analyzátor krevních částic LH-750	23
4. Výsledky	25
4.1. Tabulky	25
4.2. Grafy	33
5. Diskuse	38
Změny v hemostáze před provedením TXJ	38
Změny v hemostáze během TXJ	40
Změny v hemostáze nejméně 1 měsíc po TXJ	41
6. Závěr	42
7. Literatura	44
8. Seznam použitých symbolů a zkratk	46

1. Úvod a cíl práce

Tato práce se zabývá problematikou sledování změn hemostázy u nemocných zařazených do programu k transplantaci jater pro různý stupeň selhání jaterního parenchymu. Ve studii jsme se zaměřili na některá vyšetření, která popisují vnější a vnitřní cestu aktivace přeměny protrombinu na trombin. V další části jsme sledovali hladiny některých činitelů z oblasti plazmatických koagulačních faktorů, inhibitorů a fibrinolytického systému. Pacienti byli rozděleni do 3 skupin podle typu onemocnění : jaterní cirhóza různé etiologie, chronická virová hepatitida B, onemocnění žlučových cest.

Cílem práce bylo monitorovat změny hemostatických mechanismů u těchto nemocných se závažným jaterním onemocněním před, v průběhu a po transplantaci jater a zjistit, zda dochází k úpravě a normalizaci parametrů, které sledují změny hemostatických mechanismů.

2. Teoretická část

2. 1. Úvod

Pro existenci živého organismu je zcela nezbytné zachování krevního oběhu a přítomnost krve v tekutém stavu. Krev je oddělena od vnějšího prostředí cévní stěnou. Při poškození cévní výstelky se začíná uplatňovat hemostatický mechanismus, který přemění tekutou krev na krevní sraženinu, která cévu uzavře. Po určité době se rána postupně zhojí, koagulum se rozpustí a obnoví se původní cirkulace tekuté krve. Systém krevního srážení je proto důležitý pro zachování celistvosti oběhového systému (Pecka, 2004).

2.1.1. Hemostáza (srážení krve) - fyziologie a funkce

Po jakémkoli poškození endotelu cévní stěny (mechanické, chemické, biologické) je zahájen proces srážení kombinovanou adhezivní reakcí, která zahrnuje jak krevní destičky, tak i ostatní buňky nebo látky podílející se na hemostáze. K zástavě krvácení dochází bezprostředně po ataku tvorbou primární hemostatické zátky, která se aktivováním dalších procesů zpevní a po jejím smrštění se vytvoří definitivní krevní zátka.

Primární hemostáza, tj. vytvoření destičkové zátky a **sekundární hemostáza**, tj. stabilizace trombu fibrinovou sítí jsou funkce důležité pro udržení integrity cévní stěny a cirkulace krve. V primární hemostáze zaujímají klíčovou roli trombocyty, dominantním momentem sekundární hemostázy je dostatečná tvorba serinové proteázy trombinu, vedoucí k polymeraci fibrinogenu. Oba pochody tvoří jeden navzájem se prolínající celek. Konečnou fází hemostatického děje je fibrinolýza, která umožní rozpuštění trombu, rekanalizaci poškozeného úseku a obnovení plně funkčního průtoku. Současně s tímto dějem dochází k inicializaci procesů, které vedou k proliferaci

poškozených tkání a nakonec k celkovému zhojení poškozené cévy (Levy – Toledano a spol., 1997).

Požadavky kladené na hemostatické mechanismy se liší podle toho, zda tyto mechanismy probíhají v arteriální nebo venózní části cévního řečiště. Krevní tlak v arteriích vyžaduje pohotovou interakci **koagulačních faktorů s destičkami** při tvorbě krevního uzávěru. V žilách je naopak důležitá účast **inhibitorů plasmatických koagulačních faktorů**, které brání růstu krevní sraženiny a její propagaci do cévního řečiště. Na lokalizaci krevní zátky a především na jejím odbourávání se výrazně podílí **fibrinolytické mechanismy**. (Bultas a Karetová, 2004)

2.1.1.1. Cévní stěna

Cévní stěna s endoteliální výstelkou hraje v hemostáze důležitou úlohu. Endotel kontroluje jak protrombotické děje v případě poškození cévy, tak udržuje fluiditu krve za fyziologických podmínek. Vedle modulace hemostázy má při poškození cévní stěny význam i vazokonstrikce, která nejen sníží průtok krve a zmenší riziko krvácení, ale umožní lokálně zvýšit protrombotické působky.

2.1.1.2. Krevní destička - trombocyt

Krevní destičky se zúčastňují hemostatických procesů tím, že zprostředkují řadu interakcí mezi krví a cévní stěnou, ale hlavně se uplatňují v primární hemostáze. Dále krevní destičky poskytují fosfolipidový povrch pro navázání koagulačních faktorů závislých na vitaminu K přes Ca^{2+} můstky. Navíc se krevní destičky zúčastňují hemostázy tím, že specificky váží F VIII a F V a jsou schopny přímo aktivovat F XII a F XI (Chap a spol., 1987).

2.1.1.3. Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém představuje skupinu dějů, které vedou ke vzniku nerozpustného fibrinu. Dochází postupně k přeměně fibrinogenu na fibrin, dále na fibrinové monomery, které spontánně polymerují. Polymery fibrinu se pak propojují kovalentními vazbami působením aktivovaného faktoru XIII (F XIIIa) - vzniká nerozpustný fibrin. Fibrin vytváří vláknitou síť, ve které se zachycují krevní buňky – tvoří se krevní sraženina tzv. **stabilní fibrinová zátka**, na jejímž stažení v poslední fázi hemostázy a tím i na stažení okrajů rány a její hojení se podílejí krevní destičky.

Převážná část koagulačních činitelů je **tvořena v játrech**, některé potřebují k syntéze **vitamin K**. V játrech dochází v přítomnosti vitamínu K k jejich další karboxylaci. V případě jaterní poruchy, snížení hladiny vitamínu K, nebo při antikoagulační léčbě preparáty kumarinového typu ke karboxylaci nedochází. Místo aktivních faktorů zůstávají koagulačně neaktivní tzv. **PIVKA** (Protein induced by vitamin K absence or vitamin K antagonists) faktory (Sussman, 1992).

Většina z plazmatických koagulačních faktorů, mimo faktory I a II se nachází v plazmě ve velmi nízkých koncentracích v podobě proenzymu (koenzymu). K aktivaci dochází proteolytickým štěpením, při kterém se odštěpí aktivační peptid a obnaží se aktivní místo, z původního proenzymu tak vzniká koagulačně aktivní enzym. Pouze **F VIIa** koluje v cirkulaci v aktivní formě, ale ve velmi nízkých koncentracích. TF aktivaci nevyžaduje.

Faktory II, VII, IX, X, XI, XII a prekalkrein po rozštěpení vykazují enzymatickou aktivitu a řadí se mezi **serinové proteázy**. Jejich aktivní místo obsahuje serin. Jiné koagulační faktory se po rozštěpení účastní tvorby aktivních komplexů a chovají se jako **kofaktory**. Kofaktory se nachází ve formě **plazmatické (Faktory V a VIII, HMWK, Protein S)** nebo **vázané do buněčné**

membrány (TF). Fibrinogen tvoří substrát pro trombin, který jej štěpí (Bauer, 1997).

Vnější cesta aktivace přeměny protrombinu na trombin

Vnější systém aktivace přeměny protrombinu na trombin se spouští po expozici tkáňového faktoru na membráně aktivovaných buněk (monocyty, endotelové buňky, krevní destičky), při které dochází k vazbě F VIIa volně cirkulujícího v plazmě na TF. Vytvořený koagulačně aktivní komplex, tzv. **vnější tenáza** aktivuje F Xa, který společně s F Va, fosfolipidy a Ca^{2+} vstupuje do komplexu protrombinázy a konvertuje přeměnu protrombinu na trombin. Vzniklý trombin aktivuje štěpení fibrinogenu na fibrinové monomery, které spontánně polymerují. Fibrinový polymer se stabilizuje F XIIIa aktivovaným trombinem – vzniká nerozpustný fibrin.

K monitorování vnější cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin se využívá protrombinové testu, který může být mimo jiné ovlivněn hladinami nebo **funkčními změnami faktorů I, II, V, VII a X**.

Vnitřní cesta aktivace přeměny protrombinu na trombin

Vnitřní systém aktivace přeměny protrombinu na trombin se spouští ve fázi kontaktu. Při ní dochází k aktivaci F XII. F XIIa dále aktivuje faktory XI a IX. Během této kaskádovité reakce dochází k zesílení vyvolávajícího efektu. V další fázi jsou trombinem aktivovány faktory V a VIII. Faktor IXa společně se svým kofaktorem F VIII, fosfolipidy a Ca^{2+} tvoří tzv. **vnitřní tenázu**, která generuje dostatečné množství F Xa. F Xa společně s faktorem Va vytváří na fosfolipidovém povrchu koagulačně aktivní komplex tzv. protrombinázu, která konvertuje protrombin na trombin. Vzniklý trombin aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Vznikají podobně jako ve vnější cestě fibrinové

monomery, které polymerují a vzniklý fibrinový polymer je stabilizován aktivovanou formou F XIII za vzniku nerozpustného fibrinu (Sussman, 1992).

K monitorování vnitřní cesty aktivace koagulace používáme tzv. aktivovaný parciální tromboplastinový test (aPTT). Hodnoty tohoto testu mohou být mimo jiné ovlivněny hladinami a **funkčními změnami faktorů II, V, VIII, IX, X, XI, XII.**

Fibrinogen (faktor I)

MW: 340 000

Biologický poločas: 64 - 96 hodin

Fyziologické hodnoty v plazmě: 1,8- 3,5 g/l

(minimální plazmatická koncentrace fibrinogenu pro hemostázu je 0,5 – 1,0 g/l)

Fibrinogen je nejlépe charakterizovaný glykoprotein přítomný, jak v plazmě, tak i v granulích krevních destiček. Je syntetizován v játrech.

Molekula fibrinogenu tvoří dimer, který se skládá se ze 3 rozdílných párů polypeptidových řetězců $A\alpha$, $B\beta$ a γ , které jsou vzájemně vázány disulfidickými můstky. Důležitou úlohu v udržení struktury fibrinogenu hrají Ca^{2+} .

Specifická vazebná místa na molekule fibrinogenu jsou často skrytá a jsou dostupná až po konformační změně molekuly a to buď přeměnou fibrinogenu na fibrin nebo odštěpením fibrinopeptidů B, případně vazbou na pevný povrch. Fibrinogen má 3 vazebná místa pro navázání Ca^{2+} . Jsou-li tato místa obsazena je fibrinogen chráněn před štěpením plazminem. Cukerné složky navázané na β a γ jsou nezbytné při polymerizaci fibrinových vláken (Shafer a Higgins, 1988). Fibrinogen může podobně jako některé další makromolekulární proteinové struktury zprostředkovat agregaci krevních destiček prostřednictvím interakce s destičkovými receptory na membráně krevní destičky (GP IIb/IIIa).

Fibrinogen patří mezi proteiny akutní fáze (cévní poškození, chirurgický zákrok, akutní infekce, infarkt myokardu). V průběhu několika hodin po

navození těchto stavů dojde ke zvýšení syntézy fibrinogenu v játrech a jeho hladina se v průběhu 3 až 5 dnů zvýší na 3 - 5 násobek výchozí hodnoty. Po této době se vrací k normálu. Hladina nad 4,5 g/l je považována za trombofilní riziko. Snížené hodnoty se nachází u takových stavů jako jsou afibrinogémie, hypofibrinogémie, u některých dysfibrinogemií a dále u některých získaných koagulopatií (DIC), při fibrinolytické léčbě a u některých **těžších poruch jaterního parenchymu**.

Faktor V (proakcelerin)

MW: 330 kDa

Biologický poločas: 12 - 15 hodin

Koncentrace v plazmě: 8 - 14 mg/l

Fyziologické hodnoty: 70 - 120 %

Faktor V je jednořetězcový glykoprotein, který vzniká v játrech a megakaryocytech a váže se poměrně snadno na povrch buněčných membrán. Aktivní forma faktoru V je složena z těžkého a lehkého řetězce, které jsou vzájemně propojeny Ca^{2+} můstky. F V je přítomen v plazmě cirkulující krve a v α granulích krevních destiček (asi 20 %). Minimální aktivita nezbytná k zástavě krvácení je 10 – 15 %. FV je kofaktorem krevního srážení a svým složením je podobný F VIII. Aktivuje se limitovanou proteolýzou trombinem nebo F Xa. Inhibitorem FVa je aktivovaný protein C, který jej štěpí na neaktivní složky. K inaktivaci F Va dochází také účinkem plazminu. Aktivovaný faktor V tvoří společně s F Xa, fosfolipidy a Ca^{2+} koagulačně aktivní komplex protrombinázu. V komplexu protrombinázy je FVa chráněn před účinkem plazminu.

Faktor Va je jedním z důležitých parametrů pro posouzení **funkce jaterního parenchymu**. Bývá snížen u parenchymatózních lézí (současně s FII,

FIX a FX, AT a krevními destičkami). Současné snížení FV a zvýšení FVIII je nepříznivým prognostickým markerem.

Faktor VII (prokonvertin)

MW: 50 kDa

Biologický poločas: 4 – 6 hodin

Koncentrace v plazmě: 2 - 5 mg/l

Fyziologické hodnoty: 70 - 120%

Lidský faktor VII cirkuluje v krvi ve formě zymogenu jako jednořetězcový glykoprotein o 406 aminokyselinách, vyskytuje se i v séru. Na N-konci se nachází doména bohatá na γ karboxylové skupiny glutamové kyseliny – gla oblast. Karboxylace probíhá za účasti vitamínu K v jaterní buňce (celkem je karboxylováno 10 *Glu*). F VII se řadí mezi serinové proteázy – endopeptidázy s gla oblastí.

Při aktivaci je neaktivní F VII proteolyticky štěpen na aktivní serinovou proteázu F VIIa. K aktivaci dochází v přítomnosti trombinu nebo některého z faktorů: IXa, Xa a XIa. Molekula F VII se štěpí v místě *Arg 152* za vzniku dvou řetězců (lehký o 20 kDa a těžký o 30 kDa) spojených jednoduchou disulfidickou vazbou. Aktivní forma FVII (FVIIa) je stabilní po dobu asi 2,5 hodiny. Minimální hemostatická hladina se pohybuje kolem 10 %. Aktivovaný faktor VII (FVIIa) se nachází volně v cirkulaci v koncentraci odpovídající přibližně 1% celkového množství proteinu F VII. Množství volného aktivovaného F VII (FVIIa) v plazmě se postupně s věkem zvyšuje.

F VIIa je velmi slabou serinovou proteázou. Plný enzymatický potenciál FVIIa se projeví teprve až v komplexu s TF. Po vyvázání na tkáňový faktor se její aktivita zvyšuje více než milionkrát. FVIIa a TF vytváří na negativním

fosfolipidovém buněčném povrchu na kalcium závislý komplex [VIIa . TF . Ca²⁺. PL]. Tento komplex tzv. vnější tenáza, katalyzuje přeměnu faktoru IX na IXa a faktoru X na Xa. Nejsou dosud popsány inhibitory aktivovaného F VII, pouze komplexu [VIIa . TF], mezi které patří TFPI a AT. Hladina FVII, vzhledem k jeho poločas rozpadu 2-5 hod, klesá ze skupiny plazmatických koagulačních faktorů nejdříve (Bauer 1977).

Aktivita FVII se pomalu zvyšuje s věkem a v těhotenství. U **jaterních poruch** a u koagulopatií s vrozeným nebo získaným nedostatkem faktoru VII. Současné snížení FVII, FII, FIX, FX, PC a PS se nachází u **cholestázy**. (aktivace těchto proteinů je závislá na přítomnosti vitamínu K – rozpustného v tucích).

2.1.1.4. Systémy inhibitorů hemostázy

Inhibitory krevního srážení jsou součástí a zároveň i základním regulačním mechanismem koagulace. Po proběhnutí celé koagulační kaskády se docílí značného zesílení prvotního aktivačního impulsu. Tento sled reakcí by v krátké době mohl vést k masivnímu srážení krve, k ucpání cév a následně ke smrti. Udržování dynamické hemokoagulační rovnováhy je základním principem procesů krevního srážení. Podílí se na něm celá řada mechanismů a při jeho regulaci je nejvýznamnějším účinek **fyziologických inhibitorů** koagulačního a fibrinolytického systému (Pecka, 2004).

Inhibitory krevního srážení jsou přirozené složky krve, které tlumí antikoagulačními mechanismy proces jejího srážení vyvolaný plazmatickým koagulačním systémem a fibrinolýzou. Tyto látky inhibují aktivní složky hemostatického procesu - proteolytické enzymy (hlavně serinové proteázy). V organismu slouží inhibitory k zabránění nekontrolovatelného srážení a tím k udržení dynamické koagulační rovnováhy. Všechny známé inhibitory plazmatického koagulačního systému jsou obsaženy v plazmě a jejich specifická

je velmi nízká. Vedle hlavního substrátu inhibují v menší míře většinu ostatních faktorů (serinových proteáz).

Z fyziologických inhibitorů krevního srážení se v plazmatickém koagulačním systému nejvíce uplatňují **Antitrombin, systém proteinu C a TFPI**. AT společně s kofaktorem heparinu II odpovídá za 80 % inhibiční koagulační aktivity.

Antitrombin

MW: 58 kDa

Biologický poločas: 65 - 70 hod (68 hodin).

Fyziologické hodnoty: 80 – 120 %

Koncentrace v plazmě: 0.10 - 0.25 g/l

Antitrombin je jednořetězcový α_2 glykoprotein o 424 aminokyselinách, který se tvoří v játrech, ale byl zjištěn i v endotelových buňkách. Jedná se o antikoagulačně nejúčinnější látku, která je schopna neutralizovat účinek trombinu. Nepůsobí však okamžitě, ale má opožděný účinek (15 - 30 minut).

Syntéza AT má spojitost se syntézou fibrinogenu. Štěpení fibrinogenu je důsledkem aktivace koagulačních mechanismů, při kterých dochází k poklesu AT. Štěpení fibrinogenu dává tedy signál k následné syntéze AT. AT působí jako nejdůležitější **fyziologický inhibitor serinových proteáz**, tak že vyvazuje trombin a jiné plazmatické proteázy (v poměru 1:1) za vzniku komplexu, který je odbouráván v MFS. Rychlost vzniku tohoto komplexu může být mnohonásobně zvýšena navázáním heparinu nebo proteoglykanů z endotelových buněk.

Serinové aktivní centrum trombinu má zásadní význam pro jeho reakci s AT. Trombin štěpí argininové vazby v bílkovinách (zejména v molekule fibrinogenu). Bazické oblasti AT (zejména v místech *Lys* a *Arg*) přitahují

záporně nabitě oblasti molekuly heparinu. AT funguje jako velmi potentní inhibitor trombinu. Podobně samotný AT může vyvazovat i F Xa. Ostatní proteázy vyvazuje účinněji jen v přítomnosti heparinu. Reakce s trombinem trvá kolem 35 sekund, s ostatními proteázami kolem 25 minut. AT zasahuje i do regulace systému komplementu (Lechner a Kyrle, 1995).

Snížené množství AT bývá při jeho nízké produkci v játrech, při zvýšené spotřebě při intravaskulárních trombózách, sepsích nebo při nefrotickém syndromu. Je **indikátorem poruchy jaterní buňky** a diseminované intravaskulární koagulace. Hladina AT u mužů klesá s věkem, u žen po menopauze je nižší než u mužů. Děti do půl roku života mají sníženou hladinu, poté hladina AT dosáhne normálních hodnot.

System proteinu C

System proteinu C je tvořen proteinem C, proteinem S a trombomodulinem.

Protein C

MW: 62 kDa (APC 56 kDa)

Biologický poločas: 5 - 7 hodin

Koncentrace v plazmě: 4 – 5 mg/l

Fyziologické hodnoty: dospělí 70 - 140 %

PC je jednořetězcový plazmatický glykoprotein, který vzniká v játrech za účasti vitamínu K a pravděpodobně i v endotelu. Tento řetězec o 461 aminokyselinách je následně štěpen. Molekula proteinu C pak sestává ze 2 polypeptidových řetězců, těžkého a lehkého, které jsou navzájem propojeny disulfidickými můstky. Lehký řetězec slouží pro navázání k fosfolipidovému povrchu a pro připojení Proteinu S. Katalytické místo PC je umístěno na těžkém

řetězci. Je známo již více než 160 mutací v genu PC. Většina těchto mutací nemá klinický význam.

Protein C je proenzymem serinové proteázy. K neúčinnější aktivaci dochází in vivo na povrchu cévních endotelií, kde je navázán specifický endoteliální receptor trombinu trombomodulin, který váže trombin. Trombin navázaný na trombomodulin již není koagulačně aktivní, ale umožňuje aktivaci PC. Aktivace trombinem v komplexu s trombomodulinem probíhá více než 1500 - 2000 krát rychleji, než se samotným trombinem. Aktivace proteinu C samotným trombinem je velmi pomalý a neefektivní proces. **Protein C ovlivňuje koagulační proces štěpením F Va a F VIIIa v přítomnosti Proteinu S**, který je také proteinem závislým na vitamínu K (Esmon a spol., 1982).

Při aktivaci proteinu C dojde k odštěpení peptidu o 12 aminokyselinách z N - konce jeho molekuly - vzniká tzv. **aktivní protein C** (*Activated Protein C* - APC). APC má biologický poločas kolem 15 minut. K inaktivaci aktivovaného proteinu C dochází v přítomnosti přirozeného inhibitoru proti APC - PCI (Protein C Inhibitor).

Nedostatek proteinu C může vést k trombóze. Snížené hladiny proteinu C se nachází u DIC a u trombofilních stavů, dále u **jaterních nemocí (hepatitida, cirhosa)**, u septických stavů. Děti mají fyziologicky nižší hladiny proteinu C.

2.1.4.5. Fibrinolytický systém

Fibrinolytický systém je odpovědný za lýzu fibrinového koagula, ale hraje také podstatnou úlohu při degradaci kolagenu, u metastáz tumoru. Lidská krev obsahuje enzymový systém schopný rozpouštět krevní fibrinovou sraženinu. Za fyziologických podmínek systém udržuje hemostatickou rovnováhu. Fibrinové koagulum výrazně omezuje krevní tok, což může vést při nekontrolovatelné aktivaci i k uzavření cévy.

Fibrinolýza je v řadě svých aktivačních a inhibičních mechanismů podobná plazmatickému koagulačnímu systému. Základní složkou fibrinolytického systému je plazminogen, který je proenzymem serinové proteázy – **plazminu**.

Na fibrinové koagulum nebo na přítomnost fibrinových vláken reaguje organismus aktivací fibrinolytického systému. Plazminogen se váže na krevní koagulum, je aktivován na plazmin působením aktivátorů uvolněných z endotelu. Plazmin proteolyticky štěpí fibrinová vlákna a je nakonec inaktivován cirkulujícími antiplazminy. Fibrinolýza je fyziologicky vázána na místo poranění, plazmin je generován pouze na povrchu koagula (Heimark a spol., 1980).

Zvýšení fibrinolytických schopností krve může vést ke krvácení, snížení fibrinolýzy může naopak vyvolat trombotické stavy.

Fibrinové monomery

Fyziologické hodnoty: 0 – 7 mg/l

Fibrinové monomery vznikají při přeměně fibrinogenu na fibrin působením serinové proteázy trombinu. Při proteolytickém štěpení dochází k uvolnění dvou fibrinopeptidů A a dvou fibrinopeptidů B. Tím se obnaží vazebná místa v centrální E doméně fibrinogenu. Na tato místa se váží D domény jiného monomeru a postupně vznikají dvouvláknové protofibrily, ve kterých jsou jednotlivé monomery v sousedních vláknech navzájem posunuty o polovinu délky molekuly monomeru – vzniká **rozpustný fibrin**. Působením aktivovaného faktoru XIII (XIIIa) dochází k vytvoření kovalentních vazeb mezi dvěma D doménami za vzniku **nerozpustného fibrinu**. F XIII je aktivován trombinem (Heimark a spol., 1980).

D-dimery

Fyziologické meze: 0 – 280 µg/l

Plazmin štěpí vazby mezi E a D doménami fibrinových vláken, ale není schopen štěpit kovalentní dvojnou vazbu mezi dvěma D-doménami. Vznikají různě dlouhé řetězce s charakteristickými dvěma D doménami, tzv. **D-dimery**.

D-dimery slouží jako markery trombofilních stavů, protože splňují všechna kritéria, které by indikátory takovýchto stavů měly obsahovat. U trombofilních stavů dochází ke zvýšené produkci trombinu, který následně vede ke zvýšené tvorbě nerozpustného fibrinu a tím se výrazněji uplatňuje fibrinolýza a následně tvorba D-dimerů. Zvýšená hodnota D-dimerů může upozornit na proběhlou tromboembolickou příhodu. Nachází se u hluboké žilní trombózy, plicní embólie, DIC, **jaterní cirhózy** a u některých maligních onemocnění (Matýšková a spol., 1999).

3. Praktická část

3.1. Materiál

3.1.1. Odběr krve pro koagulační stanovení

Na všechny vyšetření týkající se správné funkce hemostázy se odběr provádí do modré 5 ml zkumavky (VACUETTE[®], Greiner). Vakuovým systémem se provede odběr krve po rysku na zkumavce. 5 ml zkumavka obsahuje 0,5 ml 3,2 % citrátu sodného jako antikoagulancia).

3.1.2. Odběr krve pro stanovení počtu trombocytů

Odběr se provádí do antikoagulačního roztoku K₃EDTA (1,5 g na 1 litr krve). Odběr se provádí do fialové 2 ml zkumavky (VACUETTE[®], Greiner). Vakuovým systémem se provede odběr krve po rysku na zkumavce. Krev se dokonale promísí několikerým převrácením obsahu odběrové nádoby a před vyšetřením na analyzátoru se promíchává na valivé třepače.

3.1.3. Příprava a vyšetření koagulačních vzorků

Odebraná krev pro koagulační stanovení byla ihned po doručení do laboratoře centrifugována (2500 x g, 15 minut, centrifuga Allegra X-12). Plazma byla vyšetřena nejpozději do dvou hodin po odběru nebo zamražena na – 80 °C (zamraženou plazmu lze skladovat až 1 měsíc při –20 °C). Před vyšetřením plazmu rozmrazíme, temperujeme na 37 °C a zpracujeme nejpozději do 2 hodin.

Vyšetření vzorku plazmy bylo provedeno na koagulačních analyzátorech (STA-Compact, Stago a BCS, Dade Behring). Pipetované objemy vzorku a

reagencií byly nastaveny podle doporučení výrobce. Měřicí systém je pravidelně sledován v interním a externím systému kontroly kvality.

Všechny výsledky měřené na analyzátorech jsou zajištěny 2-mi hladinami interní kontroly kvality. U FV a FVII a FM byla vždy před měřením provedena kalibrace. Ostatní parametry byly nakalibrovány pro používanou šarži reagentů.

3.2. Metody

3.2.1. Protrombinový test

Fyziologické hodnoty: ratio **0,80 - 1,20**

Princip: K citrátové plazmě se přidá tkáňový tromboplastin obsahující vápenaté ionty (Ca^{2+}). Sleduje se koagulační čas do vytvoření prvních fibrinových vláken. Výsledek testu se vyjadřuje poměrem času pacienta ku času kontrolní plazmy (R_{PT}).

$$R_{PT} = \frac{t_P}{t_N}$$

t_P - čas pacienta, t_N - čas normální plazmy

PT se využívá k **diagnóze poruch jaterního parenchymu** a ke sledování koagulopatií jiného typu s poruchou tvorby aktivátorů protrombinu.

3.2.2. APTT

Fyziologické hodnoty: ratio = 0,8 – 1,2

Princip: V přítomnosti purifikovaných fosfolipidů destičkového typu (např. kefalín - slouží jako náhrada fosfolipidové membrány krevních destiček), kalcia 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. Výsledek se vyjadřuje podobně jako u protrombinového testu:

$$R_{APTT} = \frac{t_P}{t_N}$$

t_P čas pacienta, t_N čas normální plazmy

Plazmy s poklesem hladiny koagulačních faktorů VIII, IX, XI a XII přibližně na hodnoty kolem 40 % dávají ještě normální koagulační časy. Poklesne – li kterýkoliv z těchto faktorů pod hodnotu 40 %, dochází zpravidla k prodloužení testu. Prodloužení času APTT vyvolá i přítomnost heparinu při dostatečné hladině antitrombinu v plazmě.

APTT se využívá k diagnóze koagulopatií s poruchou faktorů vnitřní cesty přeměny protrombinu na trombin. Prodloužené časy se nachází u **jaterních nemocí**, při poruchách faktorů vnitřního koagulačního systému (VIII, IX, XI a XII), u hemofilí a při nedostatku vitamínu K. APTT však **nepostihuje** faktory VII a XIII a kvantitativní a kvalitativní **změny krevních destiček**. Na hodnoty APTT má vliv i přítomnost FDP a D-dimerů.

3.2.3. Stanovení fibrinogenu

Princip: Vyšetřovaná plazma je inkubována s nadbytkem trombinu. V takovém systému je koagulační čas závislý na množství fibrinogenu. Látky, které mohou inhibovat funkci trombinu neovlivňují výsledek testu. Při použití reagentie Multifibren U od firmy Dade Behring není nutno plazmu ředit, protože tato reagentie obsahuje peptid, který zpomaluje rychlost přeměny fibrinogenu na fibrin.

3.2.4. Stanovení faktoru V

Princip: Zředěná vyšetřovaná plazma chudá na destičky se smísí s deficitní plazmou (STA deficient V, Stago) zbavenou faktoru V. Po přidání tromboplastinu s kalciem se měří čas do vytvoření fibrinového vlákna. Rychlost přeměny protrombinu na trombin je v tomto systému úměrná hladině faktoru V ve vyšetřované plazmě.

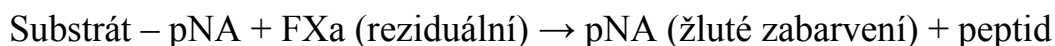
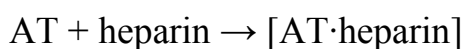
3.2.5. Stanovení faktoru VII

Princip: Zředěná vyšetřovaná plazma chudá na destičky se smísí s deficitní plazmou (DG-FVII, Grifols) zbavenou faktoru VII. Po přidání tromboplastinu s kalciem se měří čas do vytvoření fibrinového vlákna. Rychlost přeměny protrombinu na trombin je v tomto systému přímo úměrná hladině faktoru VII ve vyšetřované plazmě.

3.2.6. Stanovení antitrombinu

Princip: využívá se dvoustupňové koagulační metody, ve které je testovaná plazma inkubována v přítomnosti heparinu při 37 °C s přebytkem aktivovaného faktoru X (Xa). AT přítomný ve vyšetřované plazmě vytvoří s FXa a heparinem trimerní komplex (AT * heparin * FXa). Nevyvázaný FXa v dalším kroku reaguje se substrátem (S-2772, Chromogenix) a uvolňuje z něj žlutě zbarvený chromofor (p-nitroanilin). Intenzita zbarvení je nepřímo úměrná koncentraci AT v plazmě a je detekována fotometricky při 405 nm.

Reakční schéma:



3.2.7. Stanovení proteinu C

Princip: Protein C je aktivován v přítomnosti specifického aktivátoru (COAMATIC R, Chromogenix) extrahovaného z jedu hada *Agkistrodon contortrix contortrix*. Aktivovaný protein C štěpí chromogen pyro Glu-Pro-Arg-pNA*HCl tak, že odštěpí z peptidu pNA (p-nitroanilin). Intenzita zbarvení je přímo úměrná při spektrofotometrickém stanovení hladině funkčního proteinu C.

3.2.8. Stanovení fibrinových monomerů

Princip: Využívá LIA testu, který používá latexové mikročástice potažené monoklonální protilátkou specifickou k fibrinovým monomerům. Při styku latexových částic s testovanou plazmou dochází k jejich aglutinaci. Nárůst absorpance je přímo úměrný hladině fibrinových monomerů ve vyšetřovaném vzorku.

3.2.9. Stanovení D-dimerů

Princip: vychází z LIA stanovení. Paprsek monochromatického světla se střetne se suspenzí mikrolatexových částic (COAMATIC D, Chromogenix) pokrytých specifickou monoklonální 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 většímu zeslabení světelného záření, které je úměrné hladině antigenu ve vzorku.

3.2.10. Test ke sledování euglobulinové lýzy

Fyziologické hodnoty: 120 - 240 minut (i delší)

Princip: Sledování lýzy (rozpuštění) z plazmy vysrážené euglobulinové frakce za specifických podmínek. Bílkovinná frakce plazmy (skládá se z fibrinogenu, fibrinolytických enzymů, protrombinu - respektive trombinu) se za přítomnosti iontů vápníku vysráží na fibrin a sleduje se doba, za kterou se fibrinové koagulum euglobulinové frakce rozpustí. Z plazmy se v isoelektrickém bodě vysráží 2 % kyselinou octovou euglobulinová bílkovinná frakce obsahující plazminogen. Vysrážená frakce se rozpustí v boritanovém pufru o pH 8,2 a koagulační proces se startuje přidáním roztoku 0,025 mol/l CaCl_2 – dochází k tvorbě fibrinové sraženiny. Měří se čas do rozpuštění fibrinové sraženiny.

Při zvýšené fibrinolýze (**při poruchách jaterního parenchymu**) se nachází zkrácené časy (kratší než 120 minut), někdy kratší než 30 minut. U hypofibrinogenémií nelze touto metodou sílu fibrinolytického potenciálu vůbec zachytit, neboť chybí substrát ke sledování účinku plazminu. U těchto stavů je nutné dodat fibrinogen do systému.

Zvýšení fibrinolytické aktivity nastává při trombolytické léčbě, u DIC, některých **cirhóz**, u aktivace primární fibrinolýzy, latentně při některých duševních a tělesných zátěžích.

3.3. Přístroje

3.3.1. Koagulační analyzátor COMPACT

Compact (Stago) je plně automatický a volně programovatelný koagulometr pro provádění in vitro testů koagulačních, chromogenních, hematoimunologických. Měření koagulačních testů je prováděno na elektromagnetickém principu, u chromogenních a imunoturbidimetrických testů je využíváno změny intenzity světla halogenové lampy, které prochází kyvetou.

Princip: koagulační měření je založeno na tvorbě viskózního koagula během srážecího procesu. Zvýšená viskozita klade odpor ocelové kuličce, která se v systému pohybuje ve dvou úvratích. Změna pohybu kuličky je detekována elektromagneticky – dojde k zastavení časového čidla.

3.3.2. Koagulační analyzátor BCS

Analyzátor BCS (Dade, Behring) je vysokokapacitní, plně automatický a volně programovatelný koagulometr pro provádění in vitro testů koagulačních, chromogenních, hematoimunologických, založený na optickém principu měření změny intenzity světla procházejícího kyvetou.

Princip: Analyzátor BCS pracuje na principu optické metody detekce vzniku koagula, založené na změně intenzity světla, rozptýleného při průchodu vzorkem. Umožňuje i měření chromogenních a imunoturbidimetrických stanovení (dáno možností využívat vlnové délky 340, 405 a 570 nm – chylosní a ikterické vzorky).

3.3.3. Analyzátor krevních částic LH-750

LH 750 (Beckman Coulter) je automatický analyzátor krevních částic s 5-ti populačním diferencíálem s možností automatického podavače vzorků. Je určen k přímému měření krevního obrazu z plné krve. Pro měření kompletního krevního obrazu včetně pětipopulačního diferenciálu využívá tzv. VCS technologii (analýza částic v třírozměrném prostoru tří, na sobě vzájemně nezávislých, fyzikálních veličin: impedance, vysokofrekvenční střídavé elektromagnetické pole a modifikovaná laserová průtoková cytometrie). K měření počtu trombocytů se využívá impedančního principu.

Impedanční princip - Měření probíhá v komoře, do které je nasát vzorek naředěný isotonickým roztokem. Odměřené množství ředěného vzorku je pomocí vakua z komůrky nasáto do měřicí kyvety otvorem, jehož průměr je jen několiknásobně větší než je velikost buňky. Vně a uvnitř apertury jsou umístěny elektrody, na které je vložen stejnosměrný proud. Při průchodu buňky je ze vstupního otvoru apertury vytlačena část diluentu a změní se měrný odpor, který se projeví změnou napětí na vloženém voltmetru. Velikost změny napětí odpovídá přímo úměrně velikosti objemu částice procházející aperturou.

obr.č.1 - Výstup z analyzátoru LH-750

Patient Tests - [Results & Graphics]

File Edit View Sample Window Help

Navigation: All

Patient ID: [] Last Name: [] First Name: [] Seq #: []

Sample ID: P115348576
CBC(+Diff.+Retic)
 Retic Only

Cass / Pos: 001908 Date: 11/05/2007 10:23:05 Time: 10:23:05 Status: Completed Instrument: LH750-1 Listname: 37J58F33 Elapsed Time: []

Parameters Demographics CBC Data Diff Data Retic Data

RBC Histogram

PLT Histogram

WBC Histogram

Suspect / Definitive

WBC	5.22	5.12	5.25	5.28	5.22	HGB Voltages	
RBC	4.179	4.197	4.190	4.151	5.22	Blank	8.672
MCV	91.28	91.87	90.33	91.64	5.22	Read	4.655
RDW	12.67	12.53	12.52	12.97	5.22		
PLT	280.6	285.3	283.8	272.6	5.22		
MPV	8.79	8.92	8.55	8.91	5.22		

Uncorrected: 5.22

Default Type: CD
 Predilute (CBC) Random Access Body Fluid (CBC)

User: LABADMIN Process Type: AUTO ANALYSIS Barcode: []

11/05/2007 11:51

4. Výsledky

4.1. Tabulky

Tabulka 1 - Hodnoty některých parametrů u pacientů č. 1 - 7

1.	Datum	PC (%)	F V (%)	F VII (%)	Eugl.lýza (minuty)	Ddimery (ug/l)	FM (mg/l)
		HM	1970	dg. Jiná neurčená cirhóza			
před TXJ	15.6.2006	36	32	30	80	374	
během TXJ	15.6.2006				240		
po TXJ	3.4.2007	93	98	79		295	5
2.	LJ	1962	dg. Alkoholická cirhóza				
před TXJ	9.3.2007	42	45	26	90	3016	
během TXJ	9.3.2007				120		
po TXJ	3.4.2007	144	140	148		3733	7,97
3.	DH	1956	dg. Alkoholická cirhóza				
před TXJ	20.4.2004	47	40	46	55	339	
během TXJ	20.4.2004	56			95		
po TXJ	3.4.2007	122	128	114		259	5
4.	JJ	1944	dg. Primární biliární cirhóza				
před TXJ	21.6.2005	36	36	23	225	2912	
během TXJ	22.6.2005				240		
po TXJ	3.4.2007	89	111	100		478	5
5.	DV	1977	dg. Zánět žlučových cest				
před TXJ	24.2.2007	106	124	96	240	1556	
během TXJ	25.2.2007				240		
po TXJ	3.4.2007	108	97	103		852	6,89
6.	MN	1996	dg. Artrézie žlučových cest				
před TXJ	2.10.2005	43	60	35	160	615	
během TXJ	3.10.2005				150		
po TXJ	3.4.2007	67	84	83		333	5,09
7.	KP	1982	dg. Zánět žlučových cest, virová hepatitida B				
před TXJ	14.1.2006	68	89	89	210	428	
během TXJ	15.1.2006				240		
po TXJ	3.4.2007	82	92	87		211	5

Tabulka 2 - Hodnoty některých parametrů u pacientů č. 8 - 17

8.	Datum	PC (%)	F V (%)	F VII (%)	Eugl.lýza (minuty)	Ddimery (ug/l)	FM (mg/l)
	ŘM	1951	dg. Alkoholická cirhóza				
před TXJ	17.5.2005	26	24	31	60		
během TXJ	17.5.2005				320		
po TXJ	3.4.2007	124	106	105		248	5
	ŘJ	1948	dg. Alkoholická cirhóza				
před TXJ	16.11.2004	42	49	35	45	2641	
během TXJ	17.11.2004	52			120	705	
po TXJ	3.4.2007	124	106	105		200	9,16
	FJ	1951	dg. Alkoholická cirhóza				
před TXJ	14.12.2005	52	54	44	140	4188	
během TXJ	15.12.2005				240		
po TXJ	3.4.2007	108	127	112		283	5
	NV	1945	dg. Chronická virová hepatitida B				
před TXJ	9.3.2006	18	62	40	110	2755	
během TXJ	10.3.2006						
po TXJ	3.4.2007	92	104	94		435	15,38
	LP	1948	dg. Jiná neurčená cirhóza				
před TXJ	22.2.2007	46	101	62	170	986	
během TXJ	23.2.2007				70		
po TXJ	3.4.2007	164	164	150		2630	6,08
	FM	1957	dg. Alkoholická cirhóza				
před TXJ	5.10.2006	29	52	53	240	30354	
během TXJ	6.10.2006				240		
po TXJ	3.4.2007	94	85	98		200	5
	PJ	1947	dg. Karcinom jaterních buněk				
před TXJ	21.6.2006	52	66	70	240	276	
během TXJ	22.6.2006				220		
po TXJ	3.4.2007	147		128		444	7,49

Tabulka 3 - Hodnoty některých parametrů u pacientů č. 18 - 24

18.	Datum	PC (%)	F V (%)	F VII (%)	Eugl.lýza (minuty)	Ddimery (ug/l)	FM (mg/l)
	HD	1936	dg. Akutní selhání jater				
před TXJ	29.6.2006		23	5	240		
během TXJ	30.6.2006				180		
po TXJ	3.4.2007	60	114	52		200	6,17
	ŠP	1947	dg. Chronická virová hepatitida B				
před TXJ	23.8.2006	59	72	67	60	341	
během TXJ	24.8.2006				240		
po TXJ	3.4.2007	144	140	148		200	5
	ZJ	1956	dg. Chronická virová hepatitida B				
před TXJ	27.2.2007	31	47	54	60	2958	
během TXJ	27.2.2007	62			240		
po TXJ	3.4.2007	113	87	110		1782	7,25
	GV	1972	dg. Zánět žlučových cest				
před TXJ	12.12.2006	43	45	21	240	1007	32,9
během TXJ	12.12.2006				60		
po TXJ	3.4.2007	56	95	63		517	5
	HV	1950	dg. Primární biliární cirhóza				
před TXJ	7.12.2006	43	81	60	200	1453	
během TXJ	7.12.2006				200		
po TXJ	3.4.2007	96	110	108		219	5
	PI	1952	dg. Alkoholická cirhóza				
před TXJ	6.12.2006	27	30	21	65	4821	
během TXJ	6.12.2006				240		
po TXJ	3.4.2007	183	110	121		200	5

Tabulka 4 – Fyziologická rozmezí jednotlivých testů

Testy (jednotky)	Fyziologické hodnoty
PT (ratio)	0,8 – 1,2
APTT (ratio)	0,8 – 1,2
Fbg (g/l)	1,8 – 3,5
AT (%)	80 – 130
Plt (*10 ⁹ /l)	130 – 380
F V (%)	70 – 120
F VII (%)	70 – 120
Euglobulinová lýza (min)	120 - 240
D-Dimery (ug/l)	0 - 280
FM (mg/l)	0 - 7
PC (%)	70 – 140

Tabulka 5 – Nemocní s jaterní cirhózou před provedením TXJ

Testy (jednotky)	Změny v hodnotách testů	%
PT (ratio)	prodloužený čas u 10 z 11 pacientů	91
APTT (ratio)	prodloužený čas u 7 z 11 pacientů	64
Fbg (g/l)	snížená hodnota 2 z 11 pacientů	18
	zvýšená hodnota 2 z 11 pacientů	18
AT (%)	snížená hodnota 11 z 11 pacientů	100
Plt (*10 ⁹ /l)	snížená hodnota 10 z 11 pacientů	91
F V (%)	snížená hodnota 9 z 11 pacientů	82
F VII (%)	snížená hodnota 11 z 11 pacientů	100
Euglobulinová lýza (min)	snížená hodnota 6 z 11 pacientů	55
D-Dimery (ug/l)	zvýšená hodnota 10 z 10 pacientů	100
PC (%)	snížená hodnota 11 z 11 pacientů	100

Tabulka 6 – Nemocní s hepatitidou B před provedením TXJ

Testy (jednotky)	Změny v hodnotách testů	%
PT (ratio)	prodloužený čas u 2 ze 4 pacientů	50
APTT (ratio)	prodloužený čas u 2 ze 4 pacientů	50
Fbg (g/l)	snížená hodnota u 1 ze 4 pacientů	25
	zvýšená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
AT (%)	snížená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
Plt (*10 ⁹ /l)	snížená hodnota u 4 ze 4 pacientů	100
F V (%)	snížená hodnota u 3 ze 4 pacientů	75
F VII (%)	snížená hodnota u 3 ze 4 pacientů	75
Euglobulinová lýza (min)	snížená hodnota u 3 ze 4 pacientů	75
D-Dimery (ug/l)	zvýšená hodnota u 4 ze 4 pacientů	100
PC (%)	snížená hodnota u 4 ze 4 pacientů	100

Tabulka 7 – Nemocní s cholestázou před provedením TXJ

Testy (jednotky)	Změny v hodnotách testů	%
PT (ratio)	prodloužený čas u 2 ze 4 pacientů	50
APTT (ratio)	prodloužený čas u 3 ze 4 pacientů	75
Fbg (g/l)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
	zvýšená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
AT (%)	snížená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
Plt (*10 ⁹ /l)	snížená hodnota u 3 ze 4 pacientů	75
	zvýšená hodnota u 1 ze 4 pacientů	25
F V (%)	snížená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
F VII (%)	snížená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
Euglobulinová lýza (min)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
D-Dimery (ug/l)	zvýšená hodnota u 4 ze 4 pacientů	100
PC (%)	snížená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50

Tabulka 8 – Nemocní s jaterní cirhózou v průběhu TXJ

Testy (jednotky)	Změny v hodnotách testů	%
PT (ratio)	prodloužený čas u 6 z 11 pacientů	55
APTT (ratio)	prodloužený čas u 10 z 11 pacientů	91
Fbg (g/l)	snížená hodnota 1 z 11 pacientů	10
	zvýšená hodnota 1 z 11 pacientů	10
AT (%)	snížená hodnota 10 z 10 pacientů	100
Plt (*10 ⁹ /l)	snížená hodnota 11 z 11 pacientů	100
Euglobulinová lýza (min)	snížená hodnota 4 z 11 pacientů	36

Tabulka 9 – Nemocní s hepatitidou B v průběhu TXJ

Testy (jednotky)	Změny v hodnotách testů	%
PT (ratio)	prodloužený čas u 2 ze 4 pacientů	50
APTT (ratio)	prodloužený čas u 3 ze 4 pacientů	75
Fbg (g/l)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
	zvýšená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
AT (%)	snížená hodnota u 3 ze 4 pacientů	75
Plt (*10 ⁹ /l)	snížená hodnota u 4 ze 4 pacientů	100
Euglobulinová lýza (min)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0

Tabulka 10 – Nemocní s cholestázou v průběhu TXJ

Testy (jednotky)	Změny v hodnotách testů	%
PT (ratio)	prodloužený čas u 2 ze 4 pacientů	50
APTT (ratio)	prodloužený čas u 3 ze 4 pacientů	75
Fbg (g/l)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
	zvýšená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
AT (%)	snížená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
Plt (*10 ⁹ /l)	snížená hodnota u 3 ze 4 pacientů	75
Euglobulinová lýza (min)	snížená hodnota u 1 ze 4 pacientů	25

Tabulka 11 – Nemocní s jaterní cirhózou po TXJ

Testy (jednotky)	Změny v hodnotách testů	%
PT (ratio)	prodloužený čas u 0 z 11 pacientů	0
aPTT (ratio)	prodloužený čas u 0 z 11 pacientů	0
Fbg (g/l)	snížená hodnota 0 z 11 pacientů	0
	zvýšená hodnota 6 z 11 pacientů	55
AT (%)	snížená hodnota 0 z 11 pacientů	0
Plt (*10 ⁹ /l)	snížená hodnota 1 z 11 pacientů	10
	zvýšená hodnota 1 z 11 pacientů	10
F V (%)	snížená hodnota 0 z 11 pacientů	0
F VII (%)	snížená hodnota 0 z 11 pacientů	0
FM (mg/l)	zvýšená hodnota 1 z 11 pacientů	10
D-Dimery (ug/l)	zvýšená hodnota 3 z 11 pacientů	27
PC (%)	snížená hodnota 0 z 11 pacientů	0

Tabulka 12 – Nemocní s virovou hepatitidou B po TXJ

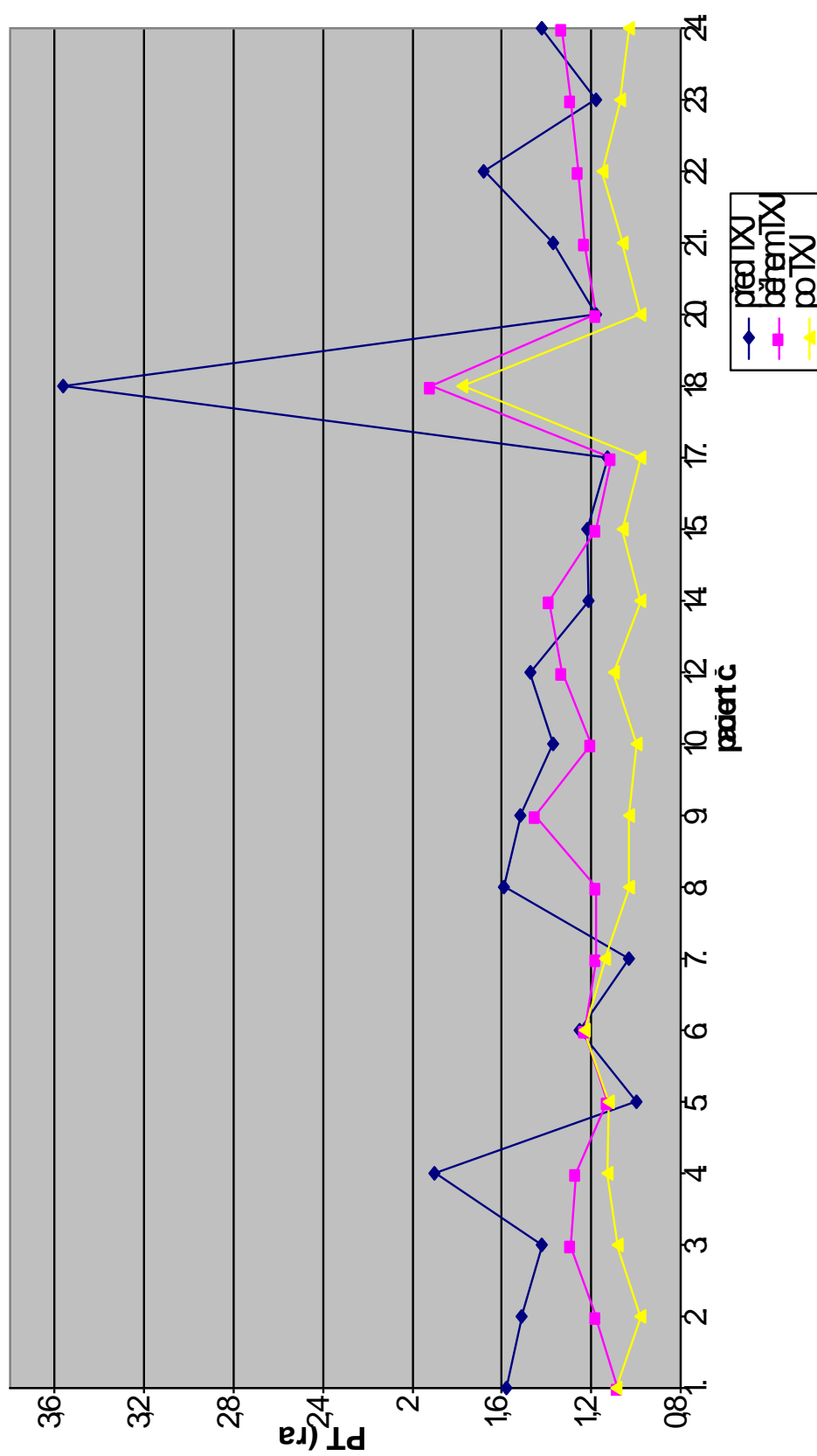
Testy (jednotky)	Změny v hodnotách testů	%
PT (ratio)	prodloužený čas u 0 ze 4 pacientů	0
aPTT (ratio)	prodloužený čas u 0 ze 4 pacientů	0
Fbg (g/l)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
	zvýšená hodnota u 1 ze 4 pacientů	25
AT (%)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
Plt (*10 ⁹ /l)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
F V (%)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
F VII (%)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
FM (mg/l)	snížená hodnota u 1 ze 4 pacientů	25
D-Dimery (ug/l)	zvýšená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
PC (%)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0

Tabulka 13 – Nemocní s cholestázou po TXJ

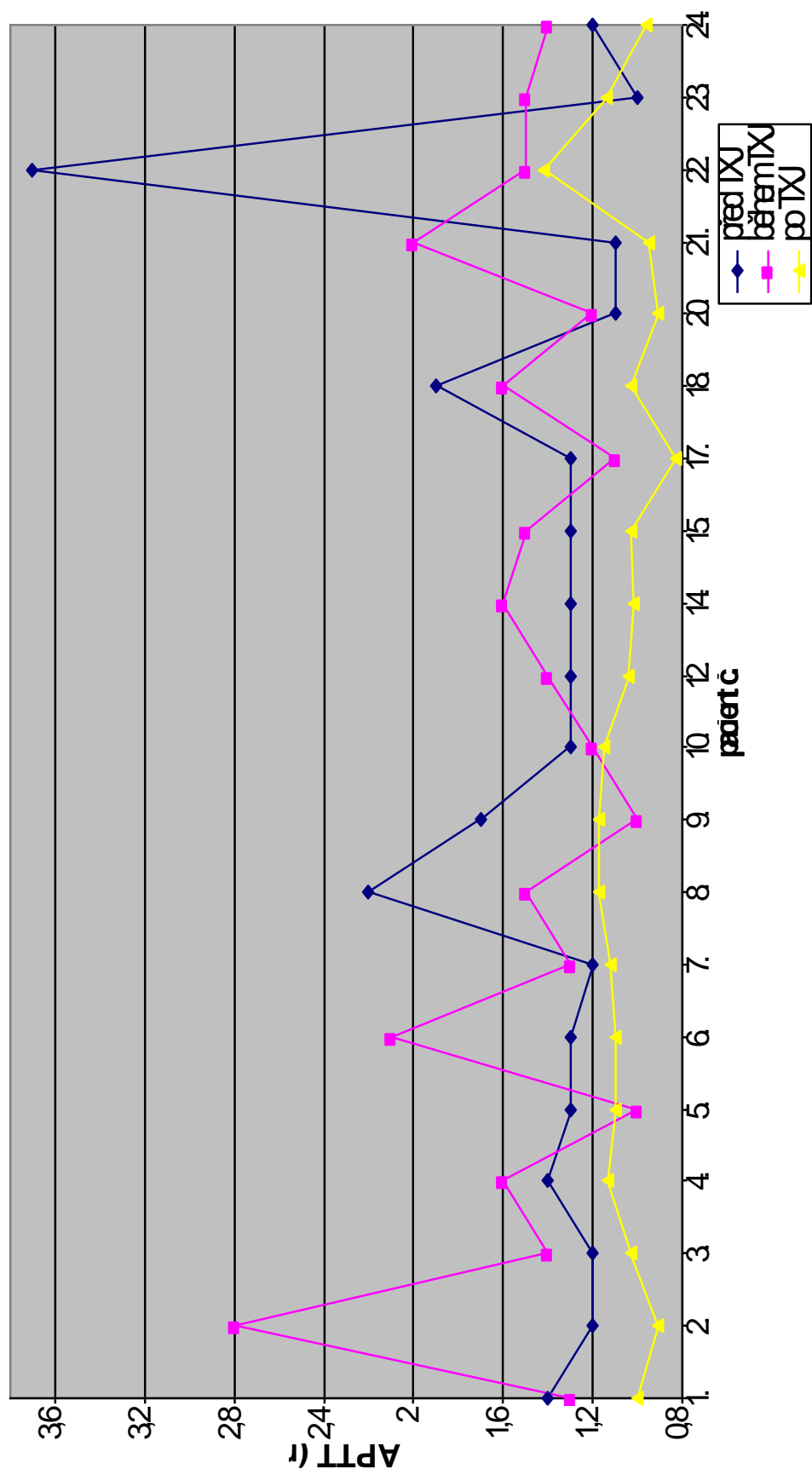
Testy (jednotky)	Změny v hodnotách testů	%
PT (ratio)	prodloužený čas u 1 ze 4 pacientů	25
aPTT (ratio)	prodloužený čas u 1 ze 4 pacientů	25
Fbg (g/l)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
	zvýšená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
AT (%)	snížená hodnota u 1 ze 4 pacientů	25
Plt (*10 ⁹ /l)	snížená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
F V (%)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
F VII (%)	snížená hodnota u 1 ze 4 pacientů	25
FM (mg/l)	snížená hodnota u 0 ze 4 pacientů	0
D-Dimery (ug/l)	zvýšená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50
PC (%)	snížená hodnota u 2 ze 4 pacientů	50

4.2. Grafy

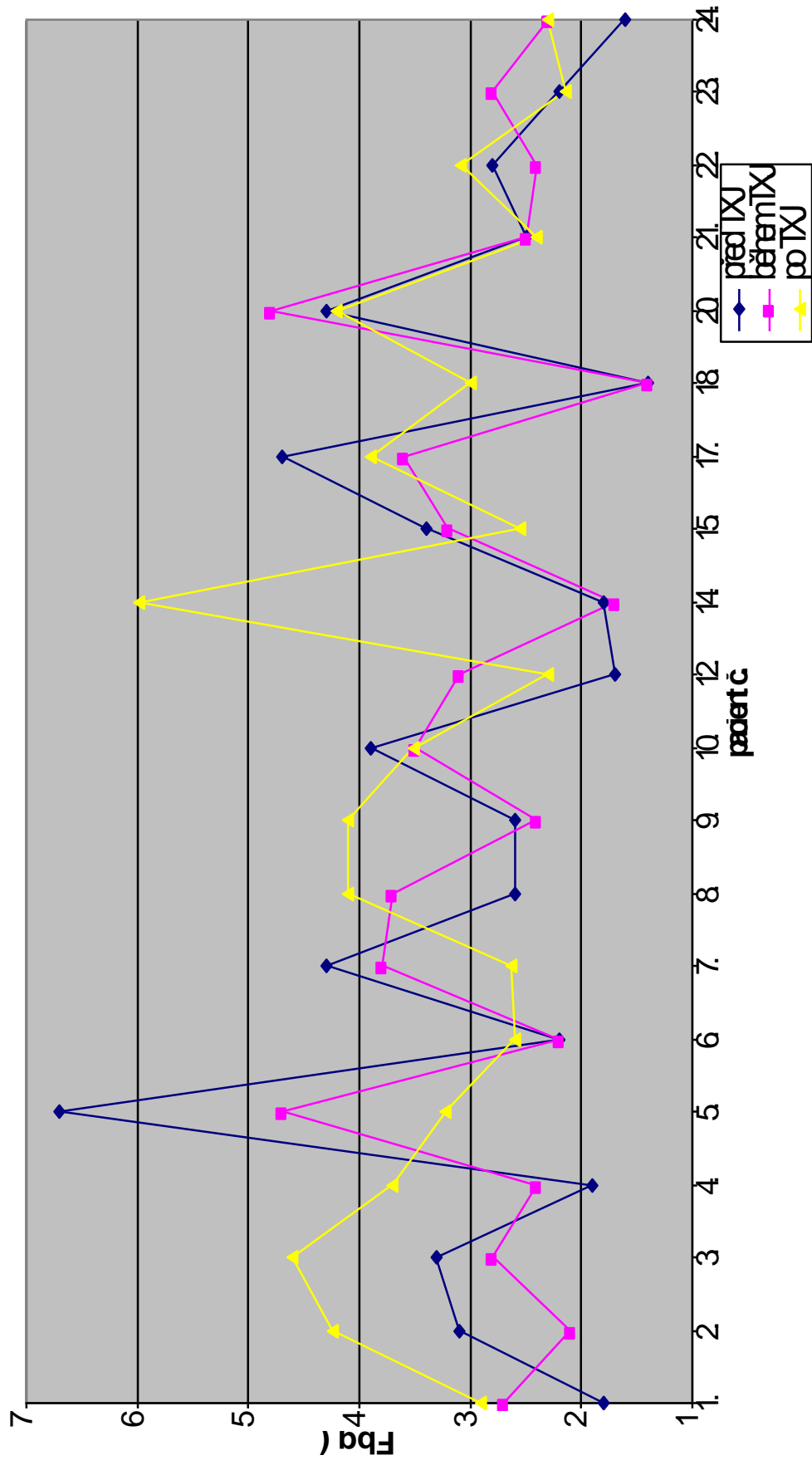
graf č.1 Hodnoty PT (ratio) u transplantovaných pacientů



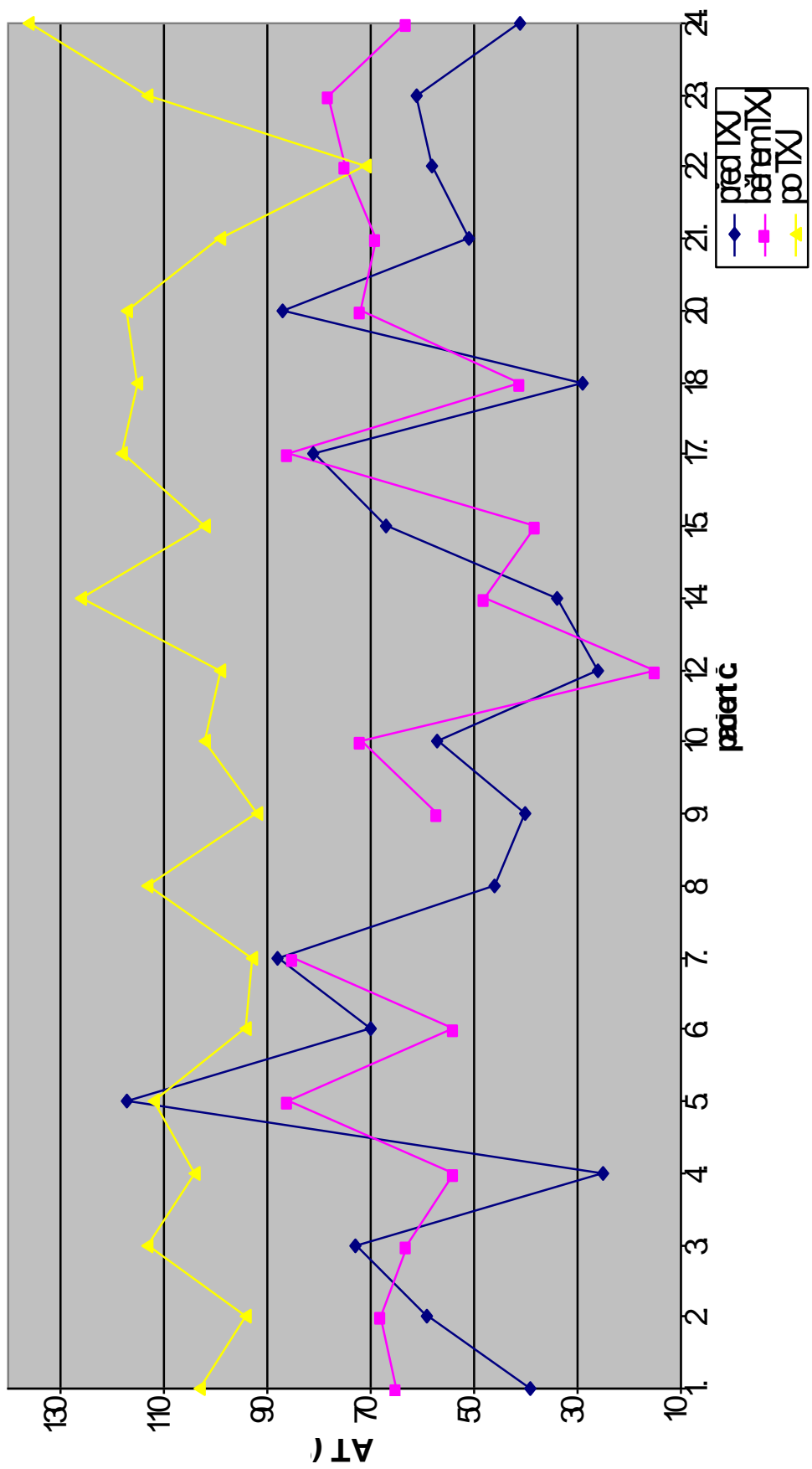
graf č.2 Hodnoty aPTT u transplantovaných pacientů



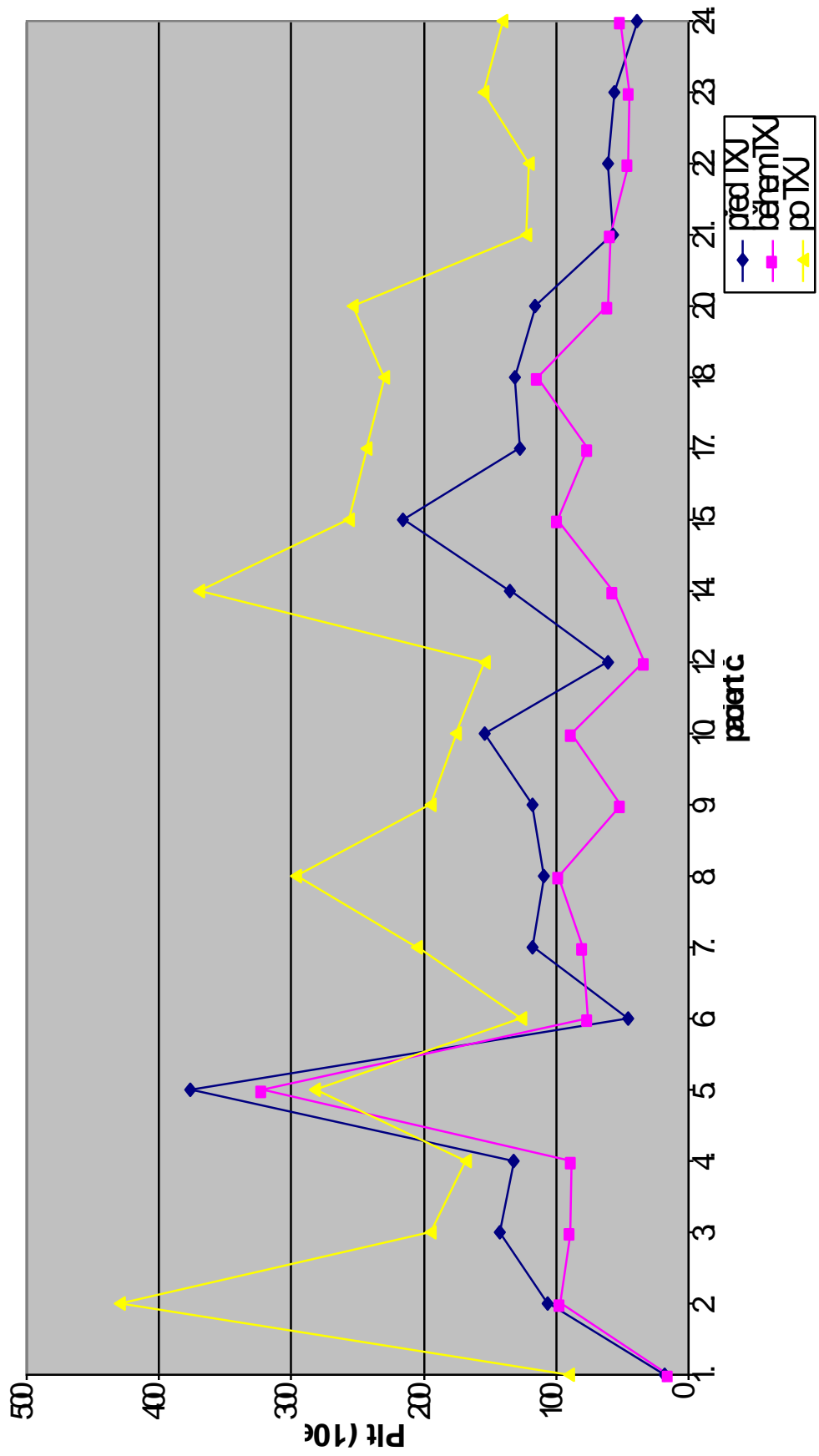
graf č.3- Hodnoty Flgutransportovaných pacientů



graf č.4- Hodnoty AT u transportovaných pacientů



graf č.5- Hodnoty PIt u transportovaných pacientů



5. Diskuse

Studie se zabývá problematikou sledování změn hemostázy u nemocných zařazených do programu k transplantaci jater pro různý stupeň selhání jaterního parenchymu. Cílem práce bylo monitorovat změny hemostatických mechanismů u těchto nemocných se závažným jaterním onemocněním před, v průběhu a po transplantaci jater a zjistit, zda dochází k úpravě a normalizaci parametrů, které sledují změny hemostatických mechanismů.

Do studie jsme zařadili 20 dospělých pacientů transplantovaných v IKEM, Praha 4 - Krč v uplynulých 2 letech. Průměrný věk nemocných byl 49,3 let a pohyboval se v rozmezí 20 až 70 let. Pacienty jsme rozdělili podle základních diagnóz do 3 skupin: jaterní cirhóza různé etiologie, chronická virová hepatitida B a onemocnění žlučových cest. K hodnocení výsledků měření byly použity pro jednotlivé vyšetřovací postupy následující fyziologické meze (viz tabulka 4).

Hepatocyty syntetizují velké množství plazmatických proteinů, včetně většiny faktorů koagulačního a fibrinolytického systému. Metabolický obrat je však u jednotlivých faktorů různý, proto z jejich stanovení můžeme usuzovat na rozsah postižení funkce jaterního parenchymu (Kang, 1993). Na poruchu jaterní buňky můžeme pomýšlet již při prodloužení některých skupinových testů plazmatického koagulačního systému (PT, aPTT).

Změny v hemostáze před provedením TXJ

Do skupiny nemocných s **jaterní cirhózou** bylo zařazeno celkem 11 pacientů. V této skupině mělo 7 pacientů diagnózu Alkoholická jaterní cirhóza, 2 nemocní Primární biliární cirhózu a 2 pacienti blíže neurčenou cirhózu. Hodnoty jednotlivých testů s procentuálními ukazateli patologické změny jsou zpracovány v tabulce 5. U pacientů s jaterní cirhózou jsou viditelné změny v koagulačním i fibrinolytickém systému vlivem jejich nedostatečné tvorby nebo kvalitativní změny v buňkách jaterního parenchymu. V literatuře se uvádí,

že snížení koagulačních faktorů odpovídá míře rozvoje onemocnění (Bureš a Horáček, 2003). V našem souboru pacientů čekajících na TXJ byl F V snížen u 82 % a F VII u 100 %. Všichni pacienti z této skupiny měli sníženou hladinu antitrombinu, proteinu C, dále zvýšenou hladinu D dimerů v plazmě a nízký počet trombocytů. Většina měla prodloužený čas PT (91 %). Naopak u aPTT byla hodnota testu zvýšena pouze u 64 % - faktory vnitřní cesty nejsou patrně sníženy tak výrazně jako faktory vnější cesty. Navíc v konečných stádiích jaterní cirhózy bývá jako nepříznivý prognostický ukazatel zvýšena hladina F VIII a snížena hodnota F V (Kang, 1993). Změny v koncentraci fibrinogenu nejsou jednoznačně interpretovatelné. Více než u poloviny pacientů byly zkráceny časy euglobulinové lýzy. Abnormity ve fibrinolytickém systému jsou výsledkem poškozené syntézy a změněné clearance fibrinolytických faktorů. Jako nejvýznamnější změna je popisována nerovnováha mezi tPA a PAI-1, jejíž výsledkem je zvýšení volného tPA v plazmě a snížení α_2 -antiplazminu. Tyto hodnoty nebyly ale u sledovaných pacientů transplantační jednotkou požadovány.

V další části studie jsme se zaměřili nemocné, kteří prodělali **chronickou virovou hepatitidu B**. Do této skupiny byli zařazeni 4 pacienti. Rozsah poruch hemostázy u akutních nebo chronických hepatitid či toxických poškození je dán stupněm závažnosti těchto onemocnění (Masopust, 1998).

STUPĚŇ ZÁVAŽNOSTI ONEMOCNĚNÍ	ZMĚNY V HEMOSTÁZE
Mírný	Žádné změny. Snížení F VII
Střední	Snížení faktorů závislých na vitamínu K. Mírná aktivace fibrinolýzy.
Těžký	Deficit všech faktorů. Aktivace fibrinolýzy

Ve sledovaném souboru (tabulka 6) má polovina pacientů prodloužené časy PT (50 %) a APTT (50 %) a sníženou hodnotu antitrombinu (50 %). Stupeň poškození jaterního parenchymu je možno zřetelněji sledovat na změnách hodnot faktorů V (75 %) a VII (75 %) a časů euglobulinové lýzy (75 %). Všichni nemocní měli snížený počet trombocytů (100 %), sníženou plazmatickou hladinu PC (100 %) a zvýšenou hodnotu D-dimerů (100%).

Při **cholestáze** dochází k porušení přívodu žluči do střeva a je výrazně omezeno vstřebávání vitamínu K. U těchto nemocných pozorujeme snížení koagulační aktivity F VII a proteinu C (díky krátkému biologickému poločasu) a dochází k následnému snížení ostatních serinových proteáz. Pokles prokoagulačních faktorů má za následek prodloužení časů PT i APTT. V játrech jsou koagulační faktory syntetizovány, ale vzniká jejich neúčinná forma (PIVKA faktory).

U cholestázy v námi sledovaném souboru 4 nemocných (3 s diagnózou Zánět žlučových cest a 1 pacient s Artrézií žlučových cest) nebyly zjištěny výraznější změny v hemostatických ukazatelích v porovnání se soubory nemocných s jaterní cirhózou a hepatitidou typu B (tabulka 7). U poloviny nemocných byly zjištěny prosloužené časy PT (50 %) i APTT (75 %) a snížené hladiny antitrombinu v plazmě (50 %). Dále byly zjištěny snížené hodnoty F V (50 %), F VII (50 %), proteinu C (50 %) a počtu trombocytů (75 %). U všech pacientů byla nalezena vyšší hladina D-dimerů (100 %). U poloviny pacientů byla zvýšena hodnota fibrinogenu (fibrinogen se v těchto případech patrně choval jako reaktant akutní fáze). V porovnání s ostatními skupinami nebyly hodnoty testu ke stanovení euglobulinové lýzy zkráceny (známka aktivace fibrinolýzy).

Změny v hemostáze během TXJ

Během transplantace se může objevit komplex koagulačních poruch, které jsou způsobeny předoperačním stavem a hemostatickými změnami způsobenými

vlastní TXJ. Všechny tyto vlivy přispívají k riziku vážného krvácení. Také převládá riziko diluční koagulopatie, které může zhoršit krvácení při výkonu (Masopust, 1998).

Krvácení během TXJ je závislé na aktivaci fibrinolytického systému. Vyjmutí poškozených jater a rekonstrukce důležitých cév vyžaduje transfuze krve a plazmy i u relativně nekomplikovaných pacientů. Dochází k výraznému poklesu syntézy koagulačních faktorů, hrozí DIK (Ten Cate a spol., 1999). Počet krevních destiček (Plt) klesá na velmi nízké hodnoty, částečně vlivem jejich spotřeby a dilucí, částečně jejich sekvestrací ve slezině po přemostění portální vény (Bureš a Horáček, 2003).

Během TXJ jsou změny v hemostáze závislé na použité terapii (plazma, AT, hepariny, trombocyty, koncentráty faktorů aj.). Mezi jednotlivými skupinami pacientů nebyly zaznamenány podstatné změny - u všech nastalo mírné zlepšení ve všech sledovaných parametrech (tabulky 8 – 10).

Změny v hemostáze nejméně 1 měsíc po TXJ

Sledované 3 skupiny pacientů se ve výsledcích koagulačních parametrů s odstupem minimálně 1 měsíc po TXJ významně neliší (tabulky 11 – 13). U většiny z nich došlo k úpravě sledovaných parametrů, u některých dokonce až k normálním hodnotám. Pouze u fibrinogenu nedošlo u některých pacientů k úpravě nebo zlepšení jeho hodnoty, pravděpodobně z důvodu jeho reakce na akutní fázi. Hladina D-dimerů byla měřena pouze před a po transplantaci. Během transplantace se předpokládají vysoké hodnoty, které nemají žádnou výpovědní hodnotu. D-dimery ve vzorcích s odstupem minimálně 1 měsíc po TXJ byly signifikantně nižší. Stanovení fibrinových monomerů bylo v laboratoři zavedeno až v letošním roce, kdy již probíhala závěrečná měření. Z tohoto důvodů byly měřeny až ve skupině po transplantaci. U většiny výsledků FM v této skupině nepozorujeme výrazné zvýšení, tedy nedošlo k aktivaci koagulace ani fibrinolýzy.

6. Závěr

V této práci jsme sledovali změny v hemostáze u pacientů před, během a po transplantaci jater. Pacienty jsme rozdělili do 3 skupin podle typu onemocnění: jaterní cirhóza různé etiologie, chronická virová hepatitida B, onemocnění žlučových cest.

Před transplantací byly pozorovány výrazné změny v hemostáze u nemocných s jaterní cirhózou, méně výrazné u pacientů s onemocněním žlučových cest. Nejčastěji jsme nacházeli změny v prodloužení protrombinového času a ve snížených hodnotách faktorů V a VII, dále proteinu C a antitrombinu. Ke zkrácení času euglobulinové lýzy došlo pouze v 1. skupině nemocných s cirhózou a u skupiny pacientů s chronickou virovou hepatitidou. Hladina fibrinogenu se většinou pohybovala v rozmezí normálních hodnot, nejnižší hodnota 1,4 g/l byla naměřena u pacienta s akutním selháním jater.

Během transpntace jater (TXJ) jsou změny v hemostáze odvislé od na použité terapie (plazma, AT, hepariny, trombocyty, koncentráty faktorů...). Protrombinový čas je během TXJ většinou pouze mírně prodloužen. APTT se v průběhu TXJ prodlužuje v závislosti na terapeutické dávce heparinu. Fibrinogen se většinou pohybuje v normálních hodnotách, v několika případech byla jeho hladina zvýšená, patrně jako reakce na akutní fázi. Všichni pacienti měli snížený počet trombocytů a u čtvrtiny pacientů došlo ke zkrácení euglobulinové lýzy. Mezi jednotlivými skupinami pacientů v průběhu TXJ nebyly zaznamenány výraznější změny - u všech nastalo mírné zlepšení ve sledovaných parametrech, pravděpodobně především vlivem použité substituční terapie.

Po transplantaci u většiny respondentů došlo k úpravě sledovaných parametrů na normální hodnoty nebo hodnoty velmi blízké normálnímu rozmezí. Pouze u koncentrace fibrinogenu došlo u některých pacientů ke zvýšení jeho koncentrace zřejmě v důsledku jeho reakce na akutní fázi. Hladina

D-dimerů byla měřena pouze před a po transplantaci. D-dimery ve vzorcích s odstupem minimálně 1 měsíc po TXJ byly signifikantně nižší. Stanovení fibrinových monomerů bylo v laboratoři zavedeno až v letošním roce, kdy již probíhala závěrečná měření. Z tohoto důvodu byly měřeny až ve skupině po transplantaci. U většiny výsledků fibrinových monomerů nedošlo po transplantaci k jejich výraznějšímu navýšení.

Játra hrají v hemostáze nezastupitelnou roli. Na jejich poškození mohou upozornit již některé běžně používané skupinové koagulační testy (PT, APTT). Stupeň poškození je možno předpovědět stanovením počtu trombocytů a hladin některých plazmatických proteinů např. faktorů V a VII, proteinu C a antitrombinu. Hladina faktoru VII a proteinu C je díky jejich krátkému poločasu významným ukazatelem při akutním selhání jater. Během transplantace není možné funkci jater hodnotit na základě testů hemostázy, protože všichni pacienti jsou substitučně a antikoagulačně léčeni a hodnoty testů jsou v této fázi jen obtížně interpretovatelné a zkreslené vlastní terapií. Potvrdili jsme, že po úspěšně provedené transplantaci dochází u převážné části transplantovaných k normalizaci většiny hemostatických testů. Případné změny v hemostáze většinou signalizují selhávání nebo rejekci transplantovaného orgánu.

7. Literatura

- Bauer, K.A.: Activation of the factor VII - tissue factor pathway. *Tromb. Haemostat.* 78, 1997, s. 108 – 111.
- Bultas, J., Karetová, D.: Léčba trombotických stavů – kde jsme a kam se ubíráme. *Remedia* 14, 2004, č.2, s. 182 – 200.
- Bureš J., Horáček, J.: Základy vnitřního lékařství. GALÉN, Praha 2003, s. 87
- Chap, H., Perret, B., Plantavid, M. et al.: Topography of Platelet membrane phospholipids. In: MacIntyre, D.E., Gordon, J.I. (eds.). *Platelets in biology and pathology III*. Amsterdam: Elsevier Science, 1987, s. 191 – 204.
- Heimark, R.L., Kurachi, K., Fujikawa, K., Davie, E.W.: Surface activation of blood coagulation, fibrinolysis and kinin formation. *Nature* 286, 1980, s. 456 – 460.
- Kang, Y.: Coagulation and Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 25, 1993, č. 2, s. 2001 – 2005.
- Lechner, K., Kyrle, P.A.: Antithrombin III concentrates are they clinically useful? *Tromb. Haemost.* 83, 1995, č.3, s. 340- 348.
- Levy-Toledano, S., Gallet, C., Nadal, F. et al.: Phosphorylation and dephosphorylation mechanism in platelet function a tightly regulated balance. *Tromb. Haemost.* 78, 1997, s. 226 – 227.
- Masopust, J.: Klinická biochemie požadování a hodnocení biochemických vyšetření část I., KAROLINUM, Praha 1998, s.139 – 173.
- Matýšková, M., Zavřelová, J., Hrachovinová, I.: Hematologie pro zdravotní laboranty II. Díl, Krevní srážení. Brno, IDVPZ 1999, stran 176.
- Pecka, M.: Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patofyziologie hemostázy. FINIDR, Český Těšín 2004, 237 stran.
- Ten Cate, Timmerman, J.J., Levi, M.M.: The pathophysiology of disseminated intravascular coagulation. *Tromb. Haemost.* 82, 1999, č.2, s. 713 – 717.

- Sussman, I.I.: Normal pathways of coagulation. Sem. Hematol. 29, 1992, č.3, s. 157 - 158
- Shafer, J.A. a Higgins, D.L.: Human fibrinogen. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 26, 1988, s. 1.

8. Seznam použitých symbolů a zkratek

APC	Aktivovaný protein C
APTT	Aktivovaný parciální tromboplastinový test
AT	Antitrombin
DIK	Diseminovaná intravaskulární koagulopatie
Fbg	Fibrinogen
FDP	Fibrin-degradační produkty
FM	Fibrinové monomery
FII	Faktor II
FPA	Fibrinopeptid A
FPB	Fibrinopeptid B
F V	Faktor V
F Va	Aktivovaný faktor V
F VII	Faktor VII
F VIIa	Aktivovaný faktor VII
F VIII	Faktor VIII
F VIIIa	Aktivovaný faktor VIII
F X	Faktor X
F Xa	Aktivovaný faktor X
F XI	Faktor XI
F XIa	Aktivovaný faktor XI
F XII	Faktor XII
F XIIa	Aktivovaný faktor XII
F XIII	Faktor XIII
F XIIIa	Aktivovaný faktor XIII
GP	Glykoprotein
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
HMWK	Vysokomolekulární kininogen

Da	Dalton
MFS	Monocyto makrofágový systém
PC	Protein C
PCI	Inhibitor proteinu C
PIVKA	Neaktivní koagulační faktory
PLG	Plasminogen
Plt	Trombocyty
PS	Protein S
PL	Fosfolipidy
R	Ratio
TAFI	Trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TF	Tkáňový faktor
TFPI	Inhibitor tkáňového faktoru
Thr	Trombocyty
t-PA	Tkáňový aktivátor plazminogenu
TX	Transplantace
TXJ	Trasplantace jater