

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

HEMOSTÁZA A HEMOKOAGULACE

ANNA MAIEROVÁ

Vedoucí bakalářské práce: PhDr. Zdenka Kudláčková, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Poděkování

Děkuji PhDr. Zděnce Kudláčkové, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za její cenné poznámky a současně za její vstřícnost a ochotu, se kterou se mi po celou dobu věnovala. Zároveň bych ráda poděkovala MUDr. Miladě Popotrandovské, že mi umožnila do práce zahrnout obrázky z jejího pracoviště v Olomouci. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala svým přátelům zvláště Bc. Nikole Berkové za jejich pomoc a podporu při vypracování této práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 7. 7. 2021

A handwritten signature in black ink, consisting of two distinct parts. The first part is a stylized, cursive letter 'A' followed by a horizontal stroke. The second part is a more complex, cursive signature that appears to be a name or set of initials.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Anna Maierová

Vedoucí bakalářské práce: PhDr. Zdenka Kudláčková, Ph.D.

Název práce: Hemostáza a hemokoagulace

Cíl práce:

Jedním z cílů práce bylo vytvořit přehled základních poznatků o hemostáze a hemokoagulaci v jejich fyziologických aspektech. Dalším cílem práce bylo zpracovat informace o patofyziologii hemostázy a hemokoagulace s širším zaměřením na klinické projevy. Součástí práce bylo rovněž vytvořit přehled současných vyšetřovacích metod a postupů správného odběru a zpracování vzorku pro hemokoagulační vyšetření.

Hlavní poznatky:

Tato bakalářská práce přibližuje celý proces hemostázy, charakterizuje její složky a hlavní význam tak, aby bylo posléze jasné, jak jejich nedostatek případně funkční patologie ovlivňuje proces zástavy krvácení. Nedílnou součástí práce je přehled základních metod pro diagnostiku poruch v hemostáze a v neposlední řadě popis patologických stavů hemostázy. Část práce se zaměřuje také na onemocnění hemostázy související s infekcí COVID-19. Zmiňuje zvyšující se výskyt trombotických stavů s největším důrazem na koagulopatii spojenou s COVIDEM-19.

Závěr:

Z přehledu metod a technik, uváděných po charakterizaci celého procesu hemostázy je patrné, jak v současné době dochází k čím dál větší automatizaci nejen u vyšetření hemostázy. S přibývajícím počtem automatizovaných přístrojů rostou také požadavky na odborné pracovníky, kteří s nimi musí umět pracovat. Větší laboratoře, kterým se vyplatí poříditi si díky vyššímu počtu vyšetřovaných vzorků

nákladnější vybavení musí mít také dostatečně proškolený a vzdělaný personál, který je schopen s vybavením odborně zacházet.

Klíčová slova: Hemostáza, cévní stěna, erytrocyty, koagulační faktory, fibrinolytické faktory, inhibitory, hemokoagulační vyšetření, krvácivé stavy, CAC, trombotické stavy.

ABSTRACT

The Charles University, Pharmaceutical faculty in Hradec Králové

Department: Department of biology and medical science

Author: Anna Maierová

Supervisor of the bachelor thesis: PhDr. Zděnka Kudláčková, Ph.D.

Headline: Haemostasis and haemocoagulation

Background:

Main aim of the work: One of the goals was to provide an overview of the basic knowledge about homeostasis and haemocoagulation in their physiological aspects. Another goal was to elaborate information on the pathophysiology of homeostasis and haemocoagulation with broader focus on clinical signs. Part of my work included itemizing current examination methods and procedure of the proper sampling and analysing the sample for haemocoagulation check-up as well.

Main findings:

This bachelor thesis presents the whole process of hemostasis, characterizes its components and its main importance so that it is clear how their deficiency or functional pathology affects the process of bleeding arrest. An integral part of the thesis is a review of basic methods for the diagnosis of disorders in haemostasis and, last but not least, a description of pathological conditions of haemostasis. Part of the thesis also focuses on hemostasis disorders associated with COVID-19 infection. It mentions the increasing incidence of thrombotic conditions with the greatest emphasis on COVID-19 associated coagulopathy.

Conclusions:

From the overview of methods and techniques presented after the characterization of the whole haemostasis process, it is evident how nowadays there is more and more automation not only in haemostasis examinations. As the number of automated devices increases, so do the demands on the professionals who must be able to operate them. Larger laboratories, which find it worthwhile to purchase

more expensive equipment due to the higher number of samples to be tested, must also have sufficiently trained and educated staff who are able to handle the equipment competently.

Keywords: Haemostasis, vessel wall, erythrocytes, coagulation factors, fibrinolytic factors, inhibitors, haemocoagulation testing, bleeding states, CAC, thrombotic states.

OBSAH

1. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	9
2. ÚVOD.....	10
3. HLAVNÍ ČÁST.....	11
3.1 Fyziologie hemostázy.....	11
3.1.1 Složky hemostázy.....	11
3.1.2 Hemostatické děje.....	23
3.1.3 Řízení hemostázy.....	29
3.2 Vyšetření hemostázy a hemokoagulace.....	29
3.2.1 Odběr a zpracování vzorků pro hemokoagulační vyšetření.....	29
3.2.2 Přehled vyšetřovacích metod.....	35
3.3 Poruchy hemostázy a hemokoagulace.....	47
3.3.1 Krvácivé poruchy.....	47
3.3.2 Trombotické stavy.....	50
4. ZÁVĚR.....	52
5. POUŽITÉ ZKRATKY.....	53
6. SEZNAM TABULEK.....	55
7. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	56
8. POUŽITÁ LITERATURA.....	57

1. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Jedním z cílů práce bylo vytvořit přehled základních poznatků o hemostáze a hemokoagulaci v jejich fyziologických aspektech. Dalším cílem práce bylo zpracovat informace o patofyziologii hemostázy a hemokoagulace s širším zaměřením na klinické projevy. Součástí práce bylo rovněž vytvořit přehled současných vyšetřovacích metod a postupů správného odběru a zpracování vzorku pro hemokoagulační vyšetření.

2. ÚVOD

Hemostáza neboli zástava krvácení je jedním z procesů, který se podílí na homeostáze a udržuje stálost vnitřního prostředí. Při porušení cévní stěny slouží jednak k zástavě krvácení, ale také brání tomu, aby v cévách vznikaly tromby, které by bránily v průtoku krve a tím zachovává integritu (celistvost) oběhového systému. Podrobný popis celého procesu je popsán v první kapitole. Její součástí je následně i popis složek hemostázy, mezi které patří reakce cévní stěny, trombocytů, systém plazmatických koagulačních faktorů (tj. plazmatické bílkoviny), fibrinolytický systém a aktivátory a inhibitory krevního srážení. Tyto reakce zpravidla nenavazují přímo na sebe, jejich jednotlivé funkce se v čase různým způsobem prolínají a jako celek zajišťují zástavu krvácení.

V další části práce jsme se zaměřili na metody sloužící k diagnostice patologických stavů hemostázy. Tyto patologie jsou zpravidla způsobeny poruchou jedné, nebo několika z výše zmiňovaných složek a vedou ke stavům mezi které patří zvýšená krvácivost nebo naopak patologické srážení krve. Tyto stavy mohou mít vrozenou příčinu (např. vrozené chybění některé ze složek koagulační kaskády), nebo se jedná o získanou skupinu onemocnění (kam patří např. již zmiňované krvácení v důsledku poranění).

V současné době je hemostáza negativně ovlivňována hlavně přítomností nové nemoci COVID-19. Nejčastější příčiny úmrtí pacientů s COVID-19 jsou kromě diabetu mellitu (DM), obezity a s nimi související hypertenzí a kardiovaskulárních nemocí právě zmiňované patologie v oblasti hemostázy.

3. HLAVNÍ ČÁST

3.1 Fyziologie hemostázy

Jak již bylo řečeno v úvodu, hemostáza je fyziologický proces v organismu, jejímž hlavním úkolem je zástava krvácení v porušeném krevním řečišti a současně i obnova normální cirkulace v poškozené cévě. Ve své podstatě se tedy nejedná o fyziologický děj, za běžných podmínek by se krev ve zdravém organismu srážet neměla. S rezervou ale mluvíme o fyziologickém hemostatickém mechanismu, pokud se uplatňuje v případě poškození cévní stěny a tím, pomocí řady složek a mechanismů zajistí původní, fyziologickou cirkulaci krve v cévním řečišti. Pokud dojde k poškození, chybění, popřípadě aktivaci části hemostatického procesu jiným podnětem, než poškozenou cévou mluvíme o poruše v hemostatickém procesu, tedy o patologickém ději (Pecka 2004; Mohammed, Monroe, a Gailani 2020).

3.1.1 Složky hemostázy

Na procesu zástavy krvácení se podílí několik složek. Uplatňují se v různých fázích hemostázy, které uvádíme v dalších kapitolách. Mezi hlavní složky hemostázy řadíme cévní stěnu, trombocyty, koagulační faktory, fibrinolytické faktory, aktivátory a inhibitory krevního srážení (Pecka 2004; Mohammed, Monroe, a Gailani 2020).

Cévní stěna se skládá ze tří vrstev (tunica intima, media a adventicia). Pro hemostázu má největší význam **endotel**, hlavní část intimy, který je v kontaktu s krví, případně buňky hladké svaloviny, které jsou součástí střední vrstvy. Neporušená vrstva endotelových buněk vytváří na vnitřní straně cévy nesmáčivý, antikoagulační povrch, čímž udržuje správnou cirkulaci a fluiditu krve v lumenu cévy, navíc vytváří negativní náboj, kterým taktéž záporně nabitým trombocytům brání v přichycení na stěnu cév. Jedná se o endokrinní orgán. Céva skrze endotel uvolňuje do lumenu působky bránící aktivaci destiček a tím brání krevnímu srážení (přehled viz. *Tabulka 1*).

Tabulka 1 Látky fyziologicky uvolňované z endotelu cév k udržení inaktivních trombocytů

PŮSOBKY	FUNKCE
Prostacyklin (PGI ₂)	Mění průsvit cév (rozšiřuje) = vazodilatátor. Inhibuje agregaci krevních destiček.
Oxid dusnatý (NO)	Mění průsvit cév (rozšiřují) = vazodilatátor. Stimuluje přeměnu guanosintrifosfátu (GTP) na cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a tím tlumí aktivaci destiček.
Endonukleázy	Přeměňují adenosindifosfát (ADP) na adenosinmonofosfát (AMP) a tím brání aktivaci destiček, neboť ADP se podílí na aktivaci trombocytů.

Zdroj: (Pecka 2004) (Přepřacováno z textu do tabulky)

Při porušení celistvosti endotelové vrstvy dojde k odkrytí silně trombogenní, subendotelové vrstvy, čímž se zahájí celý proces srážení krve. Funkcí cévní stěny při hemostatickém procesu je v první fázi schopnost vazokonstrikce, jako endokrinní orgán je zdrojem a zásobárnou některých koagulačních faktorů, inhibitorů a dalších látek, které se v procesu hemostázy uplatňují (viz v Tabulka 2), a především se jedná o místo, kde dochází k interakci jednotlivých složek celého systému (Penka a Slavíčková 2011; Pecka 2004; Iba a Levy 2019).

Tabulka 2 Látky uvolňované z endotelu cév uplatňující se v procesu hemostázy

PROTROMBINOVÉ PŮSOBKY	ANTITROMBINOVÉ PŮSOBKY
tkáňový faktor (TF)	inhibitor tkáňového faktoru (TFPI)
von Willebrandův faktor (vWF)	vWF proteáza
plazminogen aktivátor systém 1 (PAI-1)	tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA)
tromboxan A ₂ (TXA ₂)	prostacyklin (PGI ₂)
faktor aktivující destičky (PAF)	oxid dusnatý (NO)
trombinový receptor (PAR)	trombomodulin (TM)
heparinázy	glykozaminoglykany (heparansulfát, dermatansulfát)
selektiny, cytoadhezivní molekuly	down-regulace těchto molekul
cytokiny	antagonisté, down-regulace receptorů

Zdroj: (Martínková, Penka, a Gumulec 2014)

Trombocyty neboli krevní destičky jsou bezjaderné elementy, které se fyziologicky vyskytují v krvi v neaktivní formě. Běžný počet trombocytů je Českou hematologickou společností uváděn na 150-400 x 10⁹ v jednom litru krve (členové Laboratorní sekce ČHS ČSL JEP 2021). Vznikají fragmentováním cytoplazmy ze zralých megakaryocytů v kostní dřeni, kde probíhá jejich neustálá obnova, protože žijí pouze 9-12 dnů (Mourek 2012). Tvorbu a uvolňování z kostní dřene do krevního oběhu ovlivňuje protein trombopoetin (TPO) vazbou na specifický receptor na membráně kmenových buněk megakaryocytů. Neaktivované, volně cirkulují v krevním oběhu, mají hladký, oválný tvar. Strukturně se skládají ze dvou vrstev: vnější, světlejší hyalomery a vnitřní granulomery. Granulomera obsahuje 3 typy granul, které se při aktivaci destičky shlukují a uvolňují látky v nich obsažené (jejich obsah uvolněný při aktivaci viz **Tabulka 3**). V cytoplazmě trombocytů se dále vyskytují kontraktilní elementy. Ty zajišťují jednak uvolnění obsahu výše zmíněných granulí, retrakci trombu a také změnu tvaru celé destičky z oválné, hladké buňky na buňku s výběžky. Hlavním důsledkem aktivace destiček je vytvoření primární hemostatické zátky (PHZ), ale rozmanité funkce působků, které se z destiček uvolní zajišťují i další uplatnění při vazokonstrikci, sebeaktivaci, aktivaci proteinů koagulační kaskády a následné reparaci cévní stěny. Glukóza v

plazmě je pro trombocyty jediným/hlavním zdrojem energie, kterou získávají aerobní glykolýzou (Mourek 2012; Pecka 2004; Pokorný 2002; Weisel a Litvinov 2019).

Tabulka 3 Seznam nejdůležitějších látek uvolňovaných z granulí trombocytů, které se uvolňují při aktivaci destičky a hlavní funkce těchto látek.

GRANULA	OBSAH	POPIS
Alfa-granula	von Willebrandův faktor (vWF)	Zprostředkovává vazbu mezi receptory glykoproteinové povahy na trombocytech ke kolagenním vláknům obnaženého endotelu cévy a mezi destičkami navzájem (GP IIb/IIIa).
	fibronectin	Má stejnou funkci jako vWF (zajišťuje adhezi a agregaci destiček).
	fibrinogen	Jedná se o koagulační faktor. Prekurzor fibrinu. Podílí se na tvorbě fibrinové sítě.
	destičkový faktor 4 (PF4)	Podporuje srážení a podílí se na hojení ran.
	beta tromboglobulin (β -TG)	Aktivátor plazminogenu.
	růstový faktor destiček (PDGF)	Má proliferativní účinky a podílí se tím na reparaci poraněné cévy.
	P-selektin	Část se zabudovává do membrány trombocytu, kde se předpokládá, že slouží jako receptor pro vazbu leukocytů. Část je uvolněna do plazmy.
	trombospodin	Vytvořením stabilizujících můstků mezi destičkami, zajišťuje sekundární agregaci (nevratnou).
	faktor V	Jedná se o kofaktor aktivace faktoru II.
inhibitor aktivátoru	Jedná se o hlavní inhibitor, inhibující aktivátor plazminogenu, kromě PAI-1	

	plazminogenu 1 (PAI-1)	existuje ještě PAI-2, který vzniká v placentě, v histiocytech a leukocytech.
	makroglobulin	Působí inhibičně na proteázy.
	antiplazmin	Je inhibitor plazminu.
Delta-granula (denzní)	ADP	Jeden z faktorů aktivace trombocytů. Podporuje agregaci trombocytů.
	ATP	Adenosintrifosfát, je zdrojem energie a substrát pro tvorbu ADP.
	Ca ²⁺	IV faktor koagulační kaskády, účastní se aktivace téměř všech koagulačních proteinů.
	serotonin	Pozitivně ovlivňuje vazokonstrikci.
	pyrofosfát	Ovlivňuje metabolismus vápníku, který je klíčový pro celý proces hemostázy.
	P selektin	Zajišťuje přichycení bílých krvinek na trombocyty, v jejichž membráně se nachází.
	transformující růstový faktor β	Jeho funkce nesouvisí přímo s hemostázou. Jedná se o látku, kterou vylučují kromě destiček i další buňky jako fibroblasty a další. Jejich hlavní funkcí je podpora buněčného dělení.
	katecholaminy	Působí jako neurotransmitery.
	GDP	Guanosindifosfát, vzniká štěpením GTP
	GTP	Guanosintrifosfát zajišťuje dodávání energie, štěpením na GDP.
Lambda-granula (lysosomy)	glukohydrolázy	Hydrolytické enzymy.
	hexozaminidázy	
	katepsin	
	β-glukoronidáza	
	galaktozidázy	
	fukozidázy	
	kyselá fosfatáza	

Zdroj: (Pecka 2004; Mourek 2012; Penka a Slavičková 2011; Pecka 2006; Klener 2003; Martínková 2014)

Koagulační faktory, jinak řečeno srážecí faktory, jsou nejdůležitější součástí koagulační kaskády, uplatňující se u rozsáhlejšího krvácení. Většina z nich má charakter bílkovin volně se vyskytujících v plazmě. Dále k nim řadíme ionty minerálů, konkrétně Ca^{2+} a tkáňový faktor, který jako jediný z faktorů nenajdeme v krvi, neboť se nachází na membráně buněk, se kterými přijde do styku krev, která vyšla z poraněné cévy. Ze strukturálního hlediska se kromě vápenatých iontů jedná o proteiny krevní plazmy. Biochemicky je rozlišujeme na enzymy a kofaktory. V celkovém počtu se jedná o třináct faktorů, které se označují velkým písmenem "F" a římskou číslicí v pořadí, v jakém byly objeveny. Takto značíme neaktivní formy, které se v krvi vyskytují fyziologicky, tedy pokud není aktivována koagulační kaskáda. Aktivované faktory navíc označujeme malým písmenem "a". Všechny koagulační faktory jsou běžně v krvi přítomny jako neaktivní, pouze faktor VII se v malém množství vyskytuje v krvi i aktivovaný. Řada z nich je závislá na vitamínu K, bez kterého jsou sice vytvořeny, ale nemají schopnost podílet se na koagulaci. Vzhledem k tomu, že se jedná o proteiny, většina z nich je tvořena v játrech, proto také nedostatek vitamínu K a jaterní poruchy jsou nejčastější primární příčinou patologických změn v koagulačním procesu (Ar, Balkan, a Kavaklı 2019; Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014). Základní charakteristika jednotlivých faktorů, jejich funkce, způsob aktivace, závislost na vitamínu K, je uvedena v následujícím přehledu:

F I. se nazývá **fibrinogen**. Tvoří se v játrech, vyskytuje se v plazmě a v granulích trombocytů. Aktivuje se pomocí trombinu, který štěpí fibrinogen na fibrinové monomery, které následně vytvářejí fibrinová vlákna a ty zajišťují vytvoření sítě kolem krevní sraženiny. Také má schopnost aktivovat trombocyty (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Jako **F II.** je označován **protrombin**. Patří do skupiny koagulačních faktorů, závislých na vitamínu K a jeho tvorba probíhá v játrech. Je aktivován štěpením pomocí komplexu zvaným protrombináza na trombin. Protrombináza je komplex složený z aktivovaného faktoru X, F V, krevních destiček a z vápenatých iontů. Aktivovaný faktor II (trombin) má koagulační, fibrinolytické funkce a také se účastní procesu hojení. Jeho hlavní funkcí v koagulační kaskádě je přeměna fibrinogenu na fibrin, mezi další funkce řadíme aktivaci faktoru V, VIII, IX, XIII, dále aktivuje krevní destičky a TAFI (trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy),

a tím že se podílí na tvorbě t-PA a aktivaci proteinu C se účastní i fibrinolýzy (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

F III. je značka **tkáňového tromboplastinu** neboli **tkáňového faktoru**. Jediný protein z řady koagulačních faktorů, který je součástí membrány subendotelových buněk cév, tudíž se v krvi nenachází. Díky tomu aktivuje hemostatický proces okamžitě po porušení vnitřní struktury cévy. Tkáňový faktor může být uvolňován do krve z makrofágů a hladkých svalových buněk, ale pouze za patologického stavu. Nemá enzymatickou aktivitu, pouze vytváří komplex v přítomnosti vápenatých iontů s F VIIa, čímž zahajuje vnější cestu koagulační kaskády (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014; Wenzel 2019).

Vápenaté ionty se označují jako **F IV.** a účastní se většiny dějů hemostázy. Tělo je získává z potravy a vstřebávání probíhá ve střevech. Minimální hladina pro koagulaci v krvi je 0,5 mmol/l (Pecka 2004). Jsou nutné jak pro děje zajišťující srážení krve, tak děje opačné čili inhibiční. Konkrétně se účastní aktivace tkáňového faktoru, F X. v rámci aktivace vnější cestou i vnitřní cestou, F V. a v neposlední řadě aktivuje F II. a F XIII (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Faktor V. neboli **prokalcelerin** vzniká jako většina faktorů v játrech. Jedná se o glykoprotein spadající do skupiny koagulačních faktorů, a to speciálně kofaktorů. Slouží tedy pouze k urychlení koagulační kaskády. Konkrétně se podílí na aktivaci protrombinu na trombin. Štěpení F II. na trombin urychluje až 200 000krát (Pecka 2004). Sám je aktivován trombinem, podobně jako faktor VIII (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Jako **faktor VI.** byl dříve označován aktivovaný faktor V. V současné době se toto označení nepoužívá a faktor VI. tedy není znám (Pecka 2004).

F VII. má název **prokonvertin**. Jedná se o glykoprotein, který spadá do faktorů závislých na vitamínu K. Jako jediný z faktorů se v malých koncentracích nachází v plazmě aktivní i fyziologicky. Jinak je aktivován trombinem a aktivovaným faktorem IX, X, a XI. Účastní se spolu s tkáňovým faktorem a vápenatými ionty zahájení vnější cesty koagulační kaskády a aktivuje faktor IX (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014; Göbel et al. 2018).

Antihemofilický faktor označovaný jako **F VIII.** je složen ze dvou bílkovinných řetězců, z nichž jeden se tvoří v játrech a druhý v buňkách cévní výstelky. Jedná se o kofaktor podobné struktury jako F V. Tyto řetězce se spojují při aktivaci faktoru VIII. K aktivaci je nutná přítomnost vápenatých iontů a aktivovaného faktoru II. nebo je možná F VIII. aktivovat působením F Xa, ale pouze za přítomnosti fosfolipidů. Jako kofaktor slouží až k 10 000násobnému urychlení aktivace faktoru X. v rámci vnitřní cesty. Je součástí tzv. vnitřní tenázy, která je složena z F IXa, VIIIa, PL a Ca²⁺ (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

F IX. je známý jako **Christmasův faktor**, je součástí vnitřní cesty aktivace protrombinu. Vzniká v játrech a pro jeho tvorbu je důležitý vitamín K. Je aktivován primárně F XIa nebo ho může aktivovat komplex F VIIa, F III., krevních destiček a vápenatých iontů. Jeho hlavní funkcí je aktivace protrombinu, jako součást vnitřní tenázy, kterou uvádíme výše (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

F X. neboli **Stuart-Prowerův faktor** je součástí faktorů, jejichž tvorba závisí na vitamínu K. Opět se jedná o glykoprotein tvořený v játrech. Aktivace probíhá dvěma způsoby. Jednak v rámci vnitřní koagulační cesty působením komplexem vnitřní tenázy, kterou jsem zmiňovala u faktoru VIII. a IX., jednak jako součást cesty vnější, kde jej aktivuje tzv. vnější tenáza, složená z F VIIa, F III, PL a Ca²⁺. Slouží jako součást komplexu protrombinázy ke štěpení protrombinu na trombin (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014; Allen a Byrnes 2019).

Antihemofilický faktor, značený také jako **PTA** („plasma thromboplastin antecedent“), byl objeven jako jedenáctý, proto ho označujeme **F XI.** Opět se jedná o glykoprotein tvořený v játrech. Existuje ve dvou odlišných formách. Ve formě plazmatické a trombocytární. Forma, která koluje v plazmě čili plazmatická je vázaná v komplexu s HMWK (high-molecular-weight kininogen). Aktivuje jej aktivovaný faktor XII. Ale pouze v přítomnosti HMWK a negativně nabitých povrchů, v těle se zpravidla jedná o povrch destiček, in vitro jsou tyto povrchy nahrazeny uměle např. sklem, kaolinem atd. Posléze aktivovaný slouží pro aktivaci

faktoru IX (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

F XII. je značka pro **Hagemanův faktor**, glykoprotein, který jako aktivovaný zahajuje vnitřní cestu koagulační kaskády. Tvoří se v játrech a fyziologicky koluje v plazmě i v séru a nereaguje s povrchem cévní stěny. Aktivuje jej kontakt se subendotelovým povrchem cév, který je za normálních okolností zakrytý endotelem a do kontaktu s krví se dostane pouze při poškození endotelu cévy. Takovýto povrch lze snadno in vitro nahradit sklem, kaolinem a dalšími umělými povrchy (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Jako poslední byl objeven **fibrin stabilizující faktor**, známý jako **F XIII**. Tento faktor se syntetizuje jako většina koagulačních proteinů v játrech, odkud tato část poté volně cirkuluje v plazmě. Dále je produkován megakaryocyty, ze kterých se dostává do destiček a v nich je uložena do doby jejich aktivace. Ačkoliv se F XIII. tvoří na různých místech, jeho funkce je jednotná. Je aktivován trombinem, který katalyzuje jeho hydrolýzu na aktivní formu v přítomnosti vápenatých iontů a fibrinogenu. Celý proces urychluje polymerní fibrin. Aktivovaný fibrin stabilizující faktor stabilizuje fibrinovou síť vytvořenou kolem PHZ, a jeho vedlejší funkcí je hojení ran (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Poslední dva faktory, které mají prokoagulační aktivitu, nemají klasické označení římskými číslicemi, ale díky své funkci a struktuře spadají do této skupiny. Jako první uvádíme **Prekalikrein** vznikající v játrech nebo ve slinivce břišní. Aktivují jej obě podjednotky faktoru VII a samotný kalikrein následně aktivuje F VII a zvyšuje uvolňování kininů, které působí vazodilatačně. Vyskytuje se v plazmě navázaný na **HMWK**, známý jako **vysokomolekulární kininogen**, ze kterého se díky prekalikreinu uvolňují kininy. Kininy se následně vážou na povrch poškozené cévy, kde tvoří vazebná místa pro F XII. spolu se samotným HMWK (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Fibrinolytické faktory jsou další skupinou, kterou řadíme do systému plazmatických faktorů, spolu s koagulačními faktory, aktivátory a inhibitory krevního srážení. Obecně mají opačnou funkci než koagulační faktory, a to rozpouštět krevní koagulum, aby nedošlo k ucpání krevního řečiště, krevní

sraženinou. Jediným enzymem, zajišťujícím štěpení fibrinu je **plazminogen**, respektive **plazmin**, vzniklý aktivací plazminogenu. Další faktory jako **tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA)** a **urokináza** slouží pouze k aktivaci plazminogenu (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Plazminogen je glykoprotein vznikající v játrech. Vyskytuje se částečně volně v plazmě a z části je vázán na nejrůznější povrchy v krevním řečišti. Aktivace probíhá okamžitě při zahájení koagulace (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Aktivátory a inhibitory krevního srážení jsou nedílnou součástí celého procesu hemostázy, neboť udržují rovnováhu a zabraňují nekontrolovatelnému srážení nebo naopak nadměrné fibrinolýze. Názvy a funkce těch základních jsou uvedeny v následujících odstavcích:

Jako první uvádíme protein **antitrombin (AT)**, který patří do skupiny inhibitorů koagulace. Jeho hladinu v plazmě reguluje hladina fibrinogenu. Jakmile dojde ke štěpení fibrinogenu, automaticky se snižuje i antitrombin a tím vzniká signál pro jeho tvorbu. Jedná se hlavně o inhibitor trombinu, jak je slyšet již z názvu, ale obecně inhibuje většinu složek koagulačního systému jako serinové proteázy, faktor XIa, Xa, IIa a jako kofaktor mu slouží heparin (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková a Chrobák 1990).

Heparin kofaktor II (HCII) je polysacharid, který má taktéž antikoagulační funkci, neboť slouží jako inhibitor trombinu a kofaktor antitrombinu. Vyskytuje se na endotelu cév (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková a Chrobák 1990).

Proteinázový inhibitor (ZPI) je tvořen játry. Vyskytuje se v plazmě navázaný na proteinu Z. Slouží k inhibici faktoru XIa a pokud je v komplexu s proteinem Z, Ca^{2+} a trombocyty, inhibuje také F Xa. **Protein Z (PZ)** tedy nespadá přímo mezi inhibitory, popřípadě aktivátory hemostázy, ale jedná se pouze o kofaktor ZPI. Ze strukturního hlediska je to glykoprotein závislý na vitamínu K (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková a Chrobák 1990).

Inhibitor cesty tkáňového faktoru neboli inhibitor zevní koagulační cesty (TFPI) se v malém množství vyskytuje ve vazbě na krevní destičky a uvolňuje se při jejich aktivaci. Zbytek je v plazmě vázán na komplexy lipoproteinů. Jeho funkcí je inhibice komplexu TF/F VIIa vytvořením komplexu s aktivovaným faktorem X, se kterým se následně váže na TF/F VIIa (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Protein C se tvoří v jaterních buňkách a endotelu. Má antikoagulační funkci, která se projevuje inaktivací aktivovaného faktoru V a VIII. Pro jeho aktivaci je nutná přítomnost trombomodulinu (TM), trombinu a vápenatých iontů. Jiný způsob jeho aktivace je pomocí F Xa spolu s TM a negativně nabitými trombocyty, plazminem a z exogenních látek hadím jedem. Aktivovaná PC se podílí také na fibrinolýze tím způsobem, že uvolňuje tPA. Protein C má spolu s proteinem S protizánětlivé účinky. Některé zdroje uvádí, že převážně protein S, i když se jedná pouze o kofaktor, je nejdůležitější pro regulaci hemostázy (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Hlavní funkce **proteinu S** byla zmíněna už v předchozím odstavci, jelikož je součástí systému proteinu C. Je ukládán podobně jako protein C v cévním endotelu a v granulích krevních destiček. Jeho další funkcí je inhibice tkáňového faktoru a komplexu aktivující protrombin a komplexů aktivující F X (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Trombomodulin se také vyskytuje na endotelu cév. Jedná se o glykoprotein podílejícím se na aktivaci proteinu C. K jeho dalším funkcím patří inhibice trombinu (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková a Chrobák 1990).

Výše zmíněné látky zpravidla různými způsoby inhibují vytvoření krevního koagula. Funkce **inhibitoru aktivovaného proteinu C (PCI)** závisí na tom, jaký faktor zrovna inhibuje. Kromě inhibice APC (aktivovaného proteinu C) slouží k inaktivaci F IIa, F Xa, tPA a uPA. Nachází se v tělních tekutinách (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková a Chrobák 1990).

C1 inhibitor (C1INH) je další faktor, který působí na krevní srážení jak inhibičně, tak aktivačně, neboť ovlivňuje faktory koagulační kaskády i faktory fibrinolýzy. Nachází se v plazmě a v granulích krevních destiček. Konkrétně inhibuje plazmin

a faktory kontaktu, k nimž řadíme faktor VII, XI a Prekalikrein. Jeho tvorba probíhá v játrech (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková a Chrobák 1990).

Látky ovlivňující fibrinolýzu: **Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA)** uvolňovaný z endotelu. Funkce, jak je zřejmé z názvu, je aktivace plazminogenu na plazmin. Kromě endotelových buněk jej tvoří také megakaryocyty a monocyty. Jeho uvolnění je řízeno přítomností několika látek, mezi které patří protein C, trombin, histamin, bradykinin a interleukin 1 (IL₁). Dále jeho hladinu zvyšuje také stres a fyzická zátěž. Funkčně působí pouze volně přítomný t-PA v plazmě, zbytek je vázán na inhibitor aktivátoru plazminogenu, zkráceně PAI-1 (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková 2014).

Urokinázový aktivátor plazminogenu (u-PA) je taktéž uvolňován z endotelií, ale v plazmě se nachází pouze ve volné formě. V rámci fibrinolýzy se projevuje jako kofaktor pro t-PA. Jinak je jeho hlavní funkcí štěpení extracelulární matrix a s tím související funkce (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková a Chrobák 1990).

Další skupina látek spadají do skupiny inhibitorů fibrinolýzy. Jedná se o glykoprotein **α_2 -antiplazmin (α_2 AP)**, který vzniká v játrech a působí jako primární inhibitor fibrinolýzy. Jelikož se vyskytuje v plazmě volně a v nadbytku, okamžitě po zahájení fibrinolýzy se inhibičně zapojuje do procesu, a to dvěma způsoby. V první řadě se váže na aktivovaný plazmin a tím mu brání v jeho funkci. A dále se váže na fibrin na krevním koagulu, tím způsobí, že i po vazbě plazminu na tento komplex je jeho funkce potlačena (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková a Chrobák 1990).

Inhibitory aktivátoru plazminogenu (PAI) slouží již podle názvu jako inhibitory t-PA. Rozlišujeme je podle místa jejich tvorby na 2 typy. První z nich, kterého se také v organismu nachází nejvíce (PAI-1) je tvořen v krevních destičkách, endotelu, adipocytech, jaterních buňkách, v buňkách hladkých svalů a v jaterních buňkách. PAI-2 je tvořen placentou, histiocyty a leukocyty. PAI-1 inhibuje oba typy aktivátorů plazminogenu, t-PA i u-PA, na rozdíl od PAI-2 který inhibuje pouze funkci u-PA (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková a Chrobák 1990).

Trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI) odštěpuje důležité AMK z fibrinu a tím odstraňuje na fibrinu vazebná místa pro t-PA a plazminogen. Tímto způsobem znemožňuje štěpení plazminogenu na plazmin, neboť k tomu dochází až po vazbě na fibrin. Neaktivní TAFI se vyskytuje v plazmě navázaný na plazminogen. Tvoří se v játrech jako glykoprotein a jak už říká název je aktivován trombinem (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková a Chrobák 1990).

Enzym štěpící antiplazmin (APCE) je enzym odštěpující z antiplazminu několik AMK, čímž zvyšuje jeho schopnost vázat se na fibrinovou síť. Zjednodušeně řečeno tedy zlepšuje funkci antiplazminu a tím podporuje inhibici fibrinolýzy (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Martínková a Chrobák 1990).

Plazmatický protein **α_2 -makroglobulin** ovlivňuje aktivitu prakticky všech faktorů hemostázy. Konkrétně inhibuje funkce proteáz tím způsobem, že obalí molekulu enzymu, čímž zakryje jeho aktivní místa pro navázání substrátů. V hemostáze se funkčně uplatňuje zejména potom, co se vyčerpají ostatní inhibitory hemostázy (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

3.1.2 Hemostatické děje

Hemostatické děje rozlišujeme na tři základní, z nichž každý má svou funkci a uplatňují se při něm již výše zmíněné základní složky. Všechny tyto děje jsou aktivovány víceméně současně, fyziologicky hned po poranění, kterým se obnaží endotel cévy. Teoreticky se popisují tak, že nejprve dochází k vytvoření PHZ, následuje stabilizace PHZ tvorbou fibrinové sítě a současně k inhibici tohoto procesu neboli k fibrinolýze, aby nedocházelo k ucpání cévy nekontrolovaným srážením. Pokud dojde k poranění malých cév, popřípadě kapilár, někdy stačí k jejich zhojení pouze primární hemostáza, u větších cév je nutná účast celého procesu. U velkých tepen ani celý přirozený proces zástavy krve nestačí a je nutná pomoc vnější. Jednotlivé děje a jejich podrobný popis uvádíme v následujících kapitolách.

3.1.2.1 Primární hemostáza

Primární hemostáza zajišťuje v konečném důsledku vytvoření primární hemostatické zátky (**PHZ**) neboli **bílý trombus** a tím uzavírá poraněnou cévu.

Složky, které se účastní tohoto procesu jsou trombocyty a cévní stěna (Weisel a Litvinov 2019).

Okamžitě po poranění dochází k procesu **vazokonstrikce**, kterou zajišťuje cévní stěna. Jedná se o smrštění cévy, a tím ke snížení množství krve, které touto oblastí proudí. Tím zajistí menší ztrátu krve. Jedná se o reflexní děj, který je podporovaný i některými látkami, které se uvolňují v ostatních hemostatických procesech. Mezi ty hlavní patří tromboxan A₂ (TXA₂) a serotonin. Následně po vazokonstrikci dochází k uvolnění serotoninu a derivátu kyseliny arachidonové z endotelu (Pecka 2004; Mourek 2012; Pokorný 2002).

Další děje již zajišťují výše zmíněné destičky, patří mezi ně adheze, aktivace, agregace a uvolňovací fáze. Tyto děje podobně jako všechny děje hemostázy nelze chápat pouze jako jednotlivé děje, které na sebe navzájem navazují, protože probíhají víceméně současně a navzájem se ovlivňují, podobně jako primární hemostázu ovlivňuje hemokoagulace a naopak. Celý proces by fyziologicky neměl trvat více než 5 minut (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pokorný 2002; Pecka 2006; Winter, Flax, a Harris 2017).

Jakmile dojde k poškození cévy a obnažení cévního endotelu, dochází současně s vazokonstrikcí cévy k **adhezi** destiček neboli přilnutí destiček na odkrytý endotel. Spojení trombocytu s endotelem čili s kolagenními vlákny endotelových buněk, je zajištěno bivalentními proteiny (von Willebrandovým faktorem (vWF), fibronektinem (Fb) nebo vironektinem). Tyto proteiny se tedy váží jedním koncem na receptory kolagenových vláken a na druhé straně k receptorům na trombocytech. Receptory destiček jsou glykoproteinové povahy a jedná se o glykoprotein Ib-V-IX (GP Ib/V/IX) a GP Ia/IIa/IIb (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pokorný 2002; Pecka 2006; Vinholt 2019).

Dalším dějem, který je nutný k vytvoření PHZ je **aktivace** destiček. Tento děj je podmíněný působením tzv. aktivátorů. Mezi aktivátory řadíme kolagen, který je odhalen při poškození cévní stěny a dále látky uvolňované z endotelu nebo z granulí aktivované destičky. Nejznámější a také nejdůležitější jsou ADP, TXA₂, trombin a faktor aktivující trombocyty (PAF). Aktivací destička prochází různými změnami. Jednak dojde k morfologickým změnám, destička **mění svůj tvar** na oválný s výběžky, které hrají klíčovou roli v jejich následné agregaci. Dále dochází k tzv.

flip-flop fenoménu, při kterém dojde k převrácení fosfolipidové membrány trombocytů a tím se na povrch destiček dostávají negativně nabitě fosfolipidy, čehož je využito u hemokoagulace. Kromě toho, díky morfologickým změnám, také dochází k **odhalení více glykoproteinových receptorů** (konkrétně GP IIb/IIIa) destiček, čímž je podpořena jejich adheze a agregace (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Pecka 2006; Vinholt 2019).

Další významnou funkcí aktivovaného trombocytu je sekrece aktivních látek z granulí, tuto reakci nazýváme také **uvolňovací fází**. Látky vyplavené z granulí destiček následně ovlivňují prakticky všechny kroky hemostázy, včetně aktivace (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Pecka 2006; Vinholt 2019).

Agregace destiček je podmíněna změnou jejich tvaru, expresí glykoproteinového receptoru a také uvolněním ADP z granulí destiček, popřípadě jiných látek. Zjednodušeně řečeno, agregace jsou schopné pouze aktivované destičky. Jedná se o proces vazby destiček na sebe navzájem neboli shlukování. Tyto vazby jsou podobně jako vazby na subendotelové struktury zprostředkovány bivalentními proteiny, mezi které ale patří pouze vWF a fibrinogen. Receptorem pro tuto vazbu je pouze GP IIb/IIIa. Nejprve dochází působením pouze ADP k primární agregaci a později působením dalších látek dojde k nevratné sekundární agregaci (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Pecka 2006; Vinholt 2019).

K **retrakci** neboli smrštění destiček, je nutná dodávka velkého množství energie. Jsou ji schopné zajistit pouze živé a odolné destičky. Zajišťuje ji kontraktilní systém uvnitř destiček a slouží obecně ke znovu způsobilosti cévy uzavřené PHZ (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Pecka 2006; Vinholt 2019).

3.1.2.2 Hemokoagulace

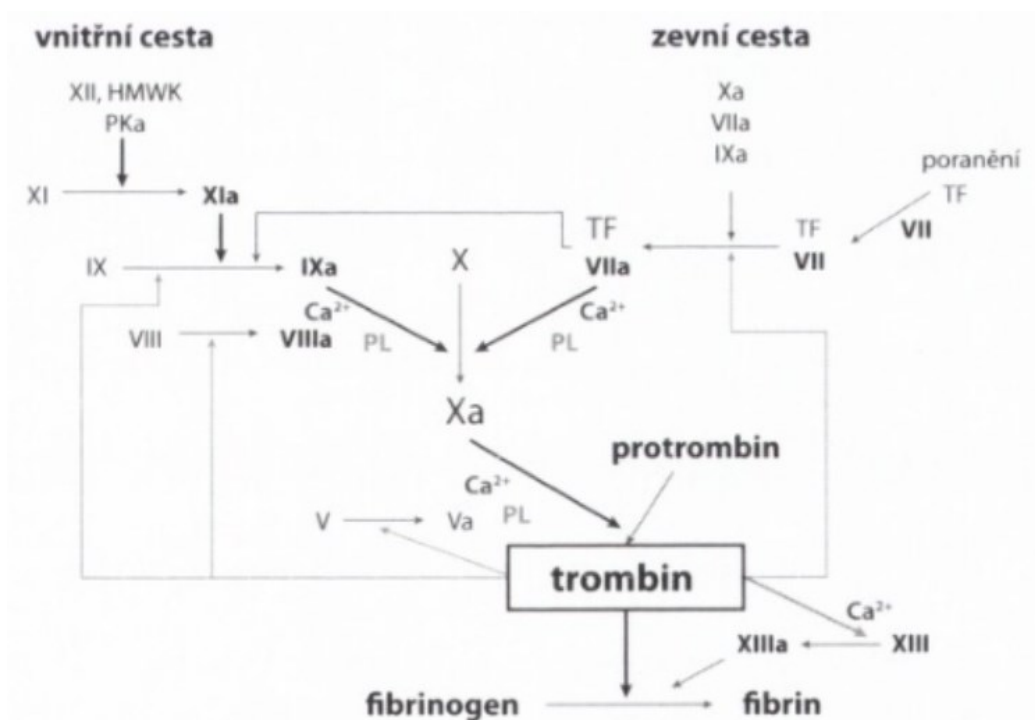
Z popisu se může zdát, že k hemokoagulaci jinak řečeno k sekundární hemostáze dochází až po vytvoření PHZ, ale není tomu tak. I tento děj nastává okamžitě po poranění. Jeho cílem je zpevnit PHZ pomocí fibrinové sítě, do které se následně zachytávají další buněčné elementy a vzniká tzv. **červený trombus**. Jedná se o sled na sebe navzájem navazujících reakcí, při kterém se aktivují jednotlivé koagulační faktory popsané výše, s cílem vytvořit fibrinová vlákna. Nejprve uvádíme model koagulace, kterému se v dnešní době začalo říkat tzv. **starý** neboli **MacFarlanův**.

Druhý model, je tzv. **nový** neboli **revidovaný** (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002).

Podle **starého modelu** z roku 1964 (Penka a Slavičková 2011) se koagulační kaskáda dělí na 2 cesty, vnitřní a vnější, které se následně spojují v cestu společnou. **Vnější cesta** je zahájena aktivací F VII. kontaktem s tkáňovým faktorem (F III.) uvolňovaným z poškozené cévy. Komplex TF/FVIIa zvaný také vnější tenáza, za přítomnosti Ca^{2+} a navázaný na membráně PL, následně aktivuje F X. Aktivace **vnitřní cesty** je zahájena aktivací faktoru XII. Ten se aktivuje kontaktem prakticky s jakýmkoliv nefyziologickým povrchem. Povrch, se kterým nereaguje je neporušená cévní stěna. V organismu, při potřebě zastavit krvácení v poškozené cévě, je aktivován odkrytou subendotelovou vrstvou. Na rozdíl od aktivace vnější cesty, u vnitřní není nutná porušená celistvost cévy. Po aktivaci F XII dochází následně ke kaskádovité aktivaci dalších faktorů. F XIIa aktivuje F XI. a ten po své aktivaci štěpí F IX. Z aktivovaného faktoru IX a VIII, navázaných na fosfolipidové membráně za přítomnosti Ca^{2+} vzniká komplex nazývaný vnitřní tenáza, která aktivuje F X. **Společnou cestu** zahajuje komplex zvaný protrombináza, složený z aktivovaného faktoru X, F Va, membrány trombocytů a z Ca^{2+} . Protrombináza štěpí protrombin na trombin. Trombin následně štěpí fibrinogen na fibrinové monomery. Tyto monomery samovolně polymerují a vytváří nestabilní fibrinovou síť, do které se zachytávají krevní elementy. Posledním krokem společné cesty je stabilizace fibrinové cesty aktivovaným F XIII., který je aktivován trombinem. Jednotlivé faktory se navzájem ovlivňují v celém procesu, přesně jsou jejich funkce popsány v kapitole 3.1.1 (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Pecka 2006; Shikdar, Vashisht, a Bhattacharya 2021).

Obrázek 1 Koagulační kaskáda – starý model

(PKa - prekalikrein)

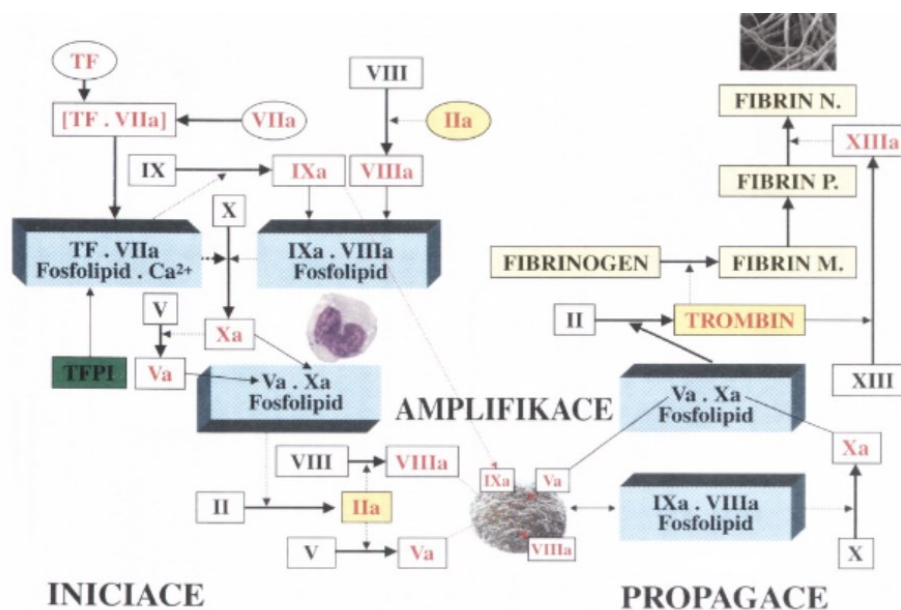


Zdroj: (Penka a Slavičková 2011)

Postupně se začíná v literatuře více objevovat tzv. **třífázový model koagulace**. Oproti starému modelu lépe popisuje proces hemostázy, který probíhá in vivo čili uvnitř organismu. Starší model dělicí hemokoagulaci na dvě cesty, lépe popisuje aktivaci faktorů při testování in vitro, také je pravděpodobně snadnější pro pochopení složitého procesu. Prakticky ale celá kaskáda je složená z dějů navzájem propletených, proto nový model více odpovídá skutečnosti. Tento novodobý model rozděluje koagulační proces na tři fáze – iniciaci, amplifikaci a propagaci. Hlavní faktor pro **iniciační fázi** je považován tkáňový faktor. K zahájení iniciační fáze je nutné uvolnění TF do cévního řečiště, buď z poškozené cévní stěny nebo aktivací monocytů, které také mohou uvolňovat svůj TF. TF uvolněný do krve následně tvoří komplex s fyziologicky přítomným, malým množstvím aktivovaného faktoru VII, který navíc je schopný sám sebe aktivovat a tím zvyšovat počet aktivních forem F VII. Komplex TF/VIIa dále aktivuje F X. a F IX. F Xa zpětně aktivuje další F VII. a navíc štěpí protrombin na trombin. Množství F Xa, vzniklé při této fázi, není tak významné, aby dokázalo vytvořit dostatečné množství trombinu k vytvoření fibrinové sítě. Vzniklý trombin, ale stačí pro ovlivnění dalších fází třífázového modelu. Při **amplifikační fázi** dochází k aktivaci kofaktorů V. a VIII. a faktoru XI.,

trombocytů a leukocytů trombinem, vzniklým při iniciaci. Na aktivované krevní buňky se váží aktivované faktory a vytváří tak část komplexu protrombinázy a vnitřní tenázy, kterou jsem popsala již ve starším modelu. V poslední fázi, **propagaci** dochází ke kompletaci komplexu vnitřní tenázy a protrombinázy a díky tomu ke vzniku dostatečného množství trombinu pro štěpení fibrinogenu a ke vzniku fibrinové sítě. Tato síť je stabilizována stejně jak už jsem popisovala výše aktivovaným faktorem XIII (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014).

Obrázek 2 Koagulační kaskáda – Třífázový model



Zdroj: (Pecka 2004)

3.1.2.3 Fibrinolytický systém

Fibrinolýza je přesný opak koagulace. Slouží k rozpuštění krevního koagula a fyziologicky k ní dochází okamžitě po zahájení tvorby hemostatické zátky. Jejím hlavním cílem je zabránit ucpání krevního řečiště nekontrolovatelným srážením krve, jinak řečeno udržuje homeostatickou rovnováhu. Hlavní složkou fibrinolýzy je plazminogen, který se při aktivaci různými aktivátory mění na funkční plazmin, který následně proteolyticky štěpí krevní koagulum. Plazminogen je aktivován t-PA a u-PA, jejichž charakteristiku uvádíme v kapitole 3.1.1. Plazminogen je aktivován až po vazbě na krevní sraženinu. Méně významnou cestou aktivace plazminogenu je přes faktor VII (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pokorný 2002; Martínková 2014; 2014).

3.1.3 Řízení hemostázy

Řízení celého procesu jak hemokoagulace, tak fibrinolýzy je důležitý krok celého procesu. Zajišťuje, že v neporušeném krevním řečišti nedochází k aktivaci žádných faktorů ani k jejich hromadění a při aktivaci usměrňují celý proces pouze do místa poranění. Rozděluje se na tři hlavní skupiny. Jedním z hlavních činitelů, který ředí krevní faktory, aby se nehromadily v místě poranění je **plynulý proud krve**. Pokud nedojde k poškození vnitřní vrstvy cévy, **neporušená cévní výstelka** zajišťuje, že se neaktivuje jediný faktor. A nejdůležitější je **regulace látková**. Působením inhibitorů jak koagulačních, tak fibrinolytických zajišťuje organismus, že nedojde ani k nadměrnému sražení, ani k přílišné fibrinolýze. Hlavní inhibitory obou hlavních dějů hemostázy jsou popsány v kapitole 3.1.1 (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pokorný 2002).

3.2 Vyšetření hemostázy a hemokoagulace

Vyšetření dějů účastnících se při hemostáze se využívá ke screeningu převážně u předoperačních vyšetření, dále k monitorování antikoagulační léčby, jako vedlejší vyšetření jaterních poruch a v neposlední řadě k diagnostice krvácivých, popřípadě trombofilních stavů (Benešová et al. 2006; Lučná 2021).


3.2.1 Odběr a zpracování vzorků pro hemokoagulační vyšetření

Podobně jako u každého vyšetření biologického materiálu i u hemokoagulačního vyšetření je nutné dodržovat určitý postup při odběru a zpracování vzorku, aby nedošlo k jeho kontaminaci a tím ovlivnění celkových výsledků.

Před odběrem by měl být pacient řádně poučen jakým potravinám a aktivitám by se měl vyhýbat, aby nedocházelo k falešně pozitivním, popřípadě negativním výsledkům. Obecně by se každý pacient měl v období jednoho dne před odběrem vyhnout konzumaci alkoholu, tučných a sladkých jídel, kouření a omezit vyšší fyzickou zátěž. Odběr se provádí nejlépe na lačno, čímž se rozumí odběr po 10-12 hodinách lačnění, v klidové fázi a odběrem v ranních hodinách. Před odběrem se doporučuje vypít neslazené nápoje, aby se zamezilo dehydrataci. Konkrétně pro hemokoagulační vyšetření je navíc vhodné v době 10 dnů před odběrem nepoužívat přípravky s obsahem kyseliny acetylsalicylové a přípravky s obsahem výtažku

z *Gingo biloba*. Před samotným odběrem je samozřejmě nutné doložit žádanku, která musí obsahovat jméno a rodné číslo pacienta, jeho zdravotní pojišťovnu, telefonní číslo, adresu, diagnózu, požadované vyšetření a typ požadovaného biologického materiálu, podpis a razítko lékaře, datum a čas odběru a v případě koagulačního vyšetření je navíc nutné uvést případnou antikoagulační léčbu. Pro ukázkou uvádíme Obrázek 3 a Obrázek 4 žádanku z pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc. (Táborská a Tmandl 2005; Hůsková a Kašá 2009; Opravilová 2018; Lučná 2021; Duchoslavová 2015; Šigutová et al. 2017; Opravilová 2018).

Obrázek 3 Žádanka o laboratorní vyšetření z pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc – přední strana

ŽÁDANKA O LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ						PRACOVIŠTĚ KLINICKÉ BIOCHEMIE A HEMATOLOGIE, s. r. o.	
Materiál odebral		Datum		Čas		 tř. Svobody 32, 779 00 OLOMOUC tel.: 585 506 122, 585 506 327 e-mail: popotrandovska@polsro.cz	
Materiál přijal		Datum		Čas			
Příjmení a Jméno						Razítko a podpis lékaře	
Číslo pojišťovny			Pojišťovna			Datum a čas odběru vzorku a příjmu vzorku do laboratoře a podpis pracovníka, který ho odebral a přijal.	
Základní dg.			Ostatní dg.				
BIOCHEMIE – krev, sérum, plazma							
4	Urea	26	Cholesterol	32	Železo	367	Androstendion
5	Kreatinin	25	HDL cholesterol	33	Vazebná kapacita Fe	326	17-OH progesteron
6	Kyselina močová	282	LDL cholesterol	307	Ferritin	306	SHBG
1	Natrium	27	Triacylglyceroly	51	Transferin	303	DHEAS
2	Kalium	43	Apo A1	265	Folát	52	Kortizol
3	Chloridy	45	Apo B	266	Vitamin B12	315	Parathormon ① ②
28	Vápník			372	Homocystein ②		
31	Fosfor					104	HIV 1,2 Ag/Ab
29	Hořčík			88	TSH	106	HBSAg
98	Lithium	8	Celková bílkovina	89	T3		
		9	Albumin	90	T4	206	PSA
11	Bilirubin celkový	188	Elfo bílkovin	316	FT3	235	f-PSA
12	Bilirubin konjug.	47	IgG	317	FT4	310	CA 15-3
13	ALT	48	IgA	240	anti-TPO	311	CA 19-9
14	AST	49	IgM	239	anti-TG	312	CA 125
15	ALP	50	IgE	293	TRAK	231	CEA
16	GMT			373	Thyreoglobulin		
7	Amyláza						
17	LD	294	C3 komplement	202	Total beta HCG	360	ANA screen
19	CK	295	C4 komplement	196	FSH	369	ENA typizace (Sm, Sni/RNP, SSA, SSB, Jo-1, Scl-70 + nucleosomy)
		154	CRP	197	LH		
93	Glukóza	219	ASLO	198	Prolaktin	361	Celiakie (anti-tTG)
38	glykovaný Hb ①	220	RF	199	Estradiol		
182	oGTT			297	Progesteron	24	Troponin I
298	C-peptid	20	Odhad GF (CKD-EPI)	305	Testosteron	35	Myoglobin
				301	f-testosteron	18	BNP ①
moč							
500	Moč + sediment	66	Kalium	92	Glukóza	Doplňující údaje pro výpočty (odpady, Hamb. sed., clearance)	
181	Hamburgerův sediment	65	Natrium	115	Bílkovina	Objem moče ml	
68	Urea	67	Chloridy	164	Mikroalbuminurie	Doba sběru hod.	
69	Kreatinin	72	Vápník	283	Kortizol	Tělesná hmotnost kg	
70	Kys. močová	73	Fosfor	178	Clearance kreat.	Výška cm	
71	Amyláza	74	Hořčík	384	Drogový test		
HEMATOLOGIE				OSTATNÍ VYŠETŘENÍ			
EDTA		CITRÁT		SKLO, NEBO PLAST BEZ GELU		186 Sedimentace erytrocytů	
K0M	Krevní obraz	349	PT	359	Krevní skupina	147	Odběr žilní krve - statice
K0D	KO + diferenciál	354	APTT	375	Protitlaky	185	Odběr žilní krve
358	Retikulocyty	23	D-Dimery ③			185	Odběr kapilární krve
① odběr jako krevní obraz ② doprava na ledu ③ odběr jako na PT							

Zdroj: vlastní fotografie z Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc

Obrázek 4 Žádanka o laboratorní vyšetření z pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc – zadní strana

POKYNY PRO PACIENTY	
Příprava před odběrem žilní krve	
Vážená paní, vážený pane,	
bude Vám proveden odběr žilní krve pro účely laboratorního vyšetření. Aby nedošlo ke zkeslení Vašich výsledků, dodržujte, prosím, následující pravidla:	
<ul style="list-style-type: none">- K odběru se dostavte ráno nalačno po 10–12 hodinách hladovění.- Odpoledne a večer před odběrem nejezte tučná jídla.- Ráno před odběrem vypijte zhruba 1/4 l vody nebo neslazeného čaje.	
Příprava před vyšetřením oGTT (glykemická křivka)	
<ul style="list-style-type: none">- 3 dny před odběrem musí denní příjem sacharidů dosahovat minimálně 150 g (neomezujte proto jejich příjem).- Na vyšetření se dostavte ráno nalačno po 10–12 hodinách hladovění.	
K odběru se můžete dostavit na tato odběrová místa:	
<ul style="list-style-type: none">- do laboratoře na Poliklinice, tř. Svobody 32, Olomouc (u tržnice) Provozní doba: 7–15 hodin, tel.: 585 506 122 Odběry krve do 13.30 hodin- na odběrové místo Palackého 3, Olomouc Provozní doba: 7–11 hodin- na odběrové místo ve Zdravotním středisku Janského 24, Olomouc Provozní doba: 7–11 hodin, tel.: 585 418 150- na odběrové místo ve Zdravotním středisku Dlouhá 34, Olomouc-Lazce Provozní doba: 7–10 hodin, tel.: 734 606 814- na odběrové místo na Horním lánu 1310, Olomouc Provozní doba: 7–11 hodin, tel.: 734 606 805- na odběrové místo ve Zdravotním středisku Lutín 87 Provozní doba: 7–15 hodin, tel.: 585 652 586 Odběry krve 7–11 hodin	
Těšíme se na Vaši návštěvu.	
Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s. r. o.	
F-030b (verze 7)	

Zdroj: vlastní fotografie z Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o Olomouc

Obrázek 5 Pracoviště pro příjem žádanek a tisk štítků při odběru biologického materiálu



Zdroj: vlastní fotografie z Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o Olomouc

Obrázek 6 Pracoviště pro odběr biologického materiálu



Zdroj: vlastní fotografie z Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o Olomouc

Obrázek 7 Pracoviště pro odběr biologického materiálu – detail pomůcek pro odběr



Zdroj: vlastní fotografie z Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o Olomouc

Pro hemokoagulační vyšetření se provádí **odběr** ze žíly. Odběr z kanyly či katetru není vhodný, neboť by kontaktem s jejich stěnou mohlo dojít k aktivaci hemostázy, zároveň by hrozilo naředění krve obsahem, který v nich zbyl. K vyšetření nejsou vhodné první 2-3 ml krve, jelikož obsahují tkáňový tromboplastin uvolněný z místa vpichu a ten by následně falešně zkrátil koagulační časy. Při odběru více vzorků se proto před odběr na hemokoagulaci předřazuje jiný odběr, nikoliv však odběr do

zkumavek obsahujících činidla aktivují koagulaci. Česká hematologická společnost doporučuje pořadí následující: odběr na hemokulturu, koagulaci, pro biochemické vyšetření s i bez koagulačního činidla, zkumavky s heparinem, zkumavky s EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) a nakonec zkumavky na vyšetření glukózy. Samotný odběr se provádí co nejšetrněji, za aseptických podmínek, do zkumavky obsahující antikoagulační činidlo 0,109 M citrát sodný v poměru 1:9 (citrát sodný: krev), přesně po risku uvedenou na zkumavce. Citrát sodný z krve vychytává Ca^{2+} , které jsou nezbytné pro většinu reakcí v hemostáze, jejich vychytání tedy zabrání aktivaci koagulační kaskády. Ihned po odběru je nutné krev s koagulačním činidlem šetrně promíchat. Obrázek 5, Obrázek 6 a Obrázek 7 ukazují odběrovou místnost na pracovišti klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc. (Táborská a Tmandl 2005; Hůsková a Kašá 2009; Lučná 2021; Duchoslavová 2015; Šigutová et al. 2017).

Obrázek 8 Typy zkumavek používaných pro odběr krve na hemokoagulační vyšetření

Zkumavky pro otevřený

Vakuové zkumavky

odběrový systém typu

zkumavka typu

zkumavky BD

Dispolabb

Sarstedt

Vacutainer

(růžové víčko)

(zelené víčko)

(modré víčko)



Zdroj: vlastní fotografie z Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc

Po odběru následuje příjem vzorku a následně transport do laboratoře. Na **příjmu** materiálu se zkontroluje, že odebraný vzorek je řádně označený a údaje na něm souhlasí s údaji na žádance. Obrázek 8 ukazuje typy zkumavek, které se mohou využít pro odběr na hemokoagulační vyšetření. Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc využívá zkumavku typu Dispolabb. Poté se veškeré informace z žádanky přepíší do laboratorního informačního systému (LIS). Například Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc používá LIS od firmy LIRS. Mezi další používané systémy v České republice patří OpenLIMS případně Infolab a další. Nakonec se zkumavka polepí kódem, ve

kterém jsou zakódované veškeré potřebné informace (Táborská a Tmandl 2005; Hůsková a Kašá 2009; Lučná 2021; Duchoslavová 2015; Šigutová et al. 2017; Anonymus 2011).

Transport do laboratoře je zprostředkován v závislosti na zařízenosti lékařského zařízení nemocničním svozem, potrubní poštou, případně přímou donáškou zajištěnou sanitářem nebo přímo pacientem. Měla by při něm být dodržena laboratorní teplota kolem 20 °C a doba by neměla za normálních okolností přesáhnout dobu dvou hodin po odběru. Vzorky pacientů léčených heparinem, by měli být dodány do jedné hodiny, jelikož se jedná o látku působící antikoagulačně a při delším stání krve by došlo k falešnému prodloužení koagulačních časů. STATIMOVÉ vzorky se transportují okamžitě po odběru. Jako STATIMY se označují vzorky pacientů se závažnými stavy a výsledek vyšetření má vliv na jejich průběh. Pro laboratoř je to známka toho, že mají vyšetření těchto vzorků provést přednostně. Jediné vzorky, které stavíme před STATIMOVÉ jsou tzv. vitální indikace, označující vzorky u pacientů s přímým ohrožením života, kde jejich výsledek má vliv na pacientovo přežití. Tyto vzorky se také laboratoři hlásí předem telefonicky (Táborská a Tmandl 2005; Hůsková a Kašá 2009; Lučná 2021; Duchoslavová 2015; Šigutová et al. 2017; Linhardt 2016; Jašková 2021).

Po příjmu do laboratoře ještě v rámci preanalytické fáze dojde k **centrifugaci** vzorku plné krve, protože v hemokoagulačním vyšetření se pracuje převážně s plasmou, plná krev se používá spíše výjimečně. Centrifugu využívanou pro tento účel na Pracovišti klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc vidíme na Obrázek 9. Plasma, která se využívá v hemokoagulační diagnostice se rozděluje na bezdestičkovou plasmu, plasmu bohatou na destičky a plasmu chudou na destičky. Všechny vyjmenované typy se připravují centrifugací, ale liší se počtem otáček a dobou centrifugace. Posléze mají rozdílnou stabilitu a použití. Jejich použití u jednotlivých testů je popsáno v kapitole 3.2.2. **Plazma bohatá na destičky (PRP)** se získává centrifugací z plné krve, která probíhá 5-10 min při 200-250 g, **plasma chudá na destičky (PPP)** se centrifuguje při 2000-2500 g 15 min. Protože obě obsahují trombocyty, nelze je zmrazit ani delší dobu skladovat. **Bezdestičková plasma (PFP)** se připravuje centrifugací při 2000-2500 g 2x 15 min, tato plasma se využívá převážně na vyšetření protilátek a jako jediná se dá zmrazit a tím získává

možnost dlouhodobého uchování (Táborská a Tmandl 2005; Hůsková a Kašá 2009; Lučná 2021; Duchoslavová 2015; Šigutová et al. 2017).

Obrázek 9 Centrifuga na pracovišti klinické biochemie a hematologie s.r.o



Zdroj: vlastní fotografie z Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o Olomouc

Výsledky jsou po proběhlé analýze zasílány převážně elektronicky, v menší míře v tištěné formě s razítkem laboratoře a podpisem oprávněné osoby laboratoře. Tzv. STATIMY jsou vyšetřovány přednostně a okamžitě po vyšetření se jejich výsledky volají osobě, která o ně žádala (Táborská a Tmandl 2005; Hůsková a Kašá 2009; Lučná 2021; Duchoslavová 2015; Šigutová et al. 2017).

3.2.2 Přehled vyšetřovacích metod

Po preanalytické fázi jsou vzorky zpracovány podle požadovaných vyšetření, zakódovaných v čárových kódech nalepených na zkumavce. Techniky využívané pro stanovení jsou uvedeny v závěru této kapitoly. V následující kapitoly jsou věnovány testům prováděných v laboratořích, jejich základním principům a použití. Obecně je řadíme do tří větších skupin, podle toho, jakou část hemostázy popisují. **Globální** testy popisují celý srážecí proces. Testy **skupinové** jsou zaměřeny na určitou část koagulačního děje, vůbec tedy neodhalí poruchy v primární hemostáze. A pomocí posledních **specifických** testů vždy vyšetříme jednu hemostatickou složku. V praxi, pokud nemáme přímo podezření na určitou poruchu v hemostáze,

se při screeningu postupuje postupně od testů globálních přes skupinové po specifické, čímž postupně zúžíme oblast, kde by se mohla vyskytovat patologie (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pecka 2006; Zima 2007; Pecka a Bláha 2010).

3.2.2.1 Testy globální

Jako první uvádíme test na zjištění **dobu krvácivosti**. Jeho principem je měření času, který je potřeba pro zástavu krvácení po standartním vpichu případně řezu. Existují různé metody určení, které se liší pomůckami používanými pro vpich a na nich závislými referenčními hodnotami. Nejstarší je metoda **podle Dukeho**, která využívá vpich do ušního lalůčku. Standartní doba potřebná k zástavě krvácení by měla být v rozmezí 3-5 min (Pecka 2004). Řez speciální lancetou se využívá u metody **podle Souliera**. U této metody, by mělo dojít k zástavě v podobném čase v rozmezí 2-4,5 min (Russeau, Vall, a Manna 2021). A posledním, v dnešní době nejvyužívanějším typem, je metoda **dle Ivyho**, využívající speciální řezné zařízení. Touto metodou se při staženém předloktí na něm provedou tři mělké řezy a k zástavě krvácení by u nich mělo dojít v do 8 min (Russeau, Vall, a Manna 2021) (Penka a Slavičková 2011; Pecka 2006; Masopust 1998; Zima 2007; Pecka a Bláha 2010).

Trombin generační test je test využívající fluorescenční stanovení. Hodnotí tvorbu trombinu v plazmě chudé nebo bohaté na destičky. Principem je měření signálu, který vzniká přeměnou substrátu na fluorofor, generovanou trombinem vznikajícím v průběhu srážení. Výstupem je křivka závislosti signálu (množství vytvořeného trombinu) na čase. Metoda se používá převážně ke sledování léčby již diagnostikovaných pacientů (Pecka a Bláha 2010; Raber 1990).

Tromboelastografie je přístrojová metoda, která zaznamenává všechny kroky hemostázy. Jejím výstupem je křivka, ze které lze vyčíst poruchy koagulačních faktorů, trombocytů i přítomnost inhibitorů. Přístroj zaznamenává změnu viskozity a pružnost sraženiny od okamžiku přidání Ca^{2+} po dobu jedné hodiny. Vyšetření se provádí z PRP i PPP a dá se využít i plná krev (Pecka 2004; Masopust 1998; Pecka a Bláha 2010; Winter, Flax, a Harris 2017).

Poslední metody, které uvádíme v rámci globálních testů slouží k hodnocení aktivity fibrinolytického systému. Jako první jmenuji **fibrinolýzu plné krve**, u které začneme měřit čas, jakmile se vytvoří krevní sraženina a měříme ho do doby jejího úplného rozpuštění. Diagnosticky jsou významné pouze snížené hodnoty hlavně pod 30 min. Fyziologicky by mělo dojít k fibrinolýze po více než 4 hodinách (Pecka a Bláha 2010). K tomuto testu se používá nativní čili srážlivá krev (Pecka 2004; Pecka a Bláha 2010; Pecka 2006).

Euglobulinová lýza je další metoda zkoumající schopnost fibrinolytického systému. Touto metodou se nejprve za specifických podmínek z plazmy chudé na destičky vysráží bílkovinná frakce. Tato frakce, jinak zvaná euglobulinová, je po vysrážení v přítomnosti Ca^{2+} složená z fibrinu, fibrinolytických enzymů a trombinu. Po sražení sledujeme čas potřebný k rozpuštění euglobulinové frakce. Doba rozpuštění by fyziologicky měla být po 4-6 hodinách (Ilich, Bokarev, a Key 2017) (Pecka 2004; Pecka a Bláha 2010; Pecka 2006).

Celková fibrinolytická kapacita je test, kterým stanovujeme frakce D-dimerů, což jsou látky vznikající štěpením fibrinu. K jejich stanovení se využívají imunoanalytické metody, konkrétně LIA metoda (chemiluminiscenční imunoanalýza) nebo aglutinace na latexových částicích. Standartní hladina D-dimerů v plazmě je 0,2 mg/l (Zhang et al. 2020) (Pecka a Bláha 2010; Pecka 2006).

Jako poslední uvádíme seznam testů, které se v dnešní době obvykle neprovádí a v některých zdrojích se ani neuvádějí. Patří mezi ně test na zjištění **dobu srážlivosti nativní krve**, který se může výjimečně využít jako tzv. bed-side test, prováděný přímo u operace. **Test na fragilitu krevních kapilár** neboli jejich rezistenci se využíval ke stanovení odolnosti cévní stěny. Stanovovala se odolnost cév na nízký, popřípadě vysoký tlak, výsledkem byly petechie vytvořené na kůži v místě působení tlaku. **Test konzumpce protrombinu** se využíval ke stanovení hladiny protrombinu, který zbyl v séru po vysrážení krve. V dnešní době je nahrazen citlivější APTT testem (aktivovaný parciální tromboplastinový test). A v neposlední řadě test **retrakce krevního koagula**. Jedná se o měření objemu tekutiny, která se uvolní z krevní sraženiny při její retrakci. Vyšetření se provádí z plazmy bohaté na destičky, výjimečně z plné krve a objem tekutiny by měl za normálních okolností zaujímat 30-50 % množství odebrané krve (Masopust 1998;

Zima 2007; Pecka a Bláha 2010; Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pecka 2006).

Některé zdroje uvádí okrajově i **vyšetření počtu trombocytů**. Obecně se vyšetřuje v rámci krevního obrazu, ale můžeme ho využít jako globální test při podezření na poruchu v rámci primární hemostázy. Referenční meze jsou od 150 do 400 x 10⁹ trombocytů v jednom litru krve (Pecka 2004; Mourek 2012).

3.2.2.2 Testy skupinové

Protrombinový test (PT) neboli Quickův test je test hodnotící vnější koagulační cestu, konkrétně se jedná o faktory VII., X., II., I. a kofaktor V. Používá se bezdestičková plazma, ke které přidáváme dvě reagensie: tzv. tkáňový tromboplastin (extrakt tkáňového faktoru) a Ca²⁺. Reagensie se do vzorku přidávají postupně (nejprve tkáňový tromboplastin), nebo současně, v závislosti na typu stanovení. Zaznamenáváme čas od přidání Ca²⁺ iontů po vytvoření fibrinového koagula. Výsledky můžeme vyjádřit několika způsoby. Pokud se uvádí v sekundách, musí se k nim připsat i čas referenční plazmy, jelikož se čas pohybuje v rozmezí 10-17 sekund (Pecka 2004) (podle jiných zdrojů 12-15 sekund (Penka a Slavíčková 2011)), v závislosti na použité reagensii. Jiným způsobem jsou procenta aktivity normální plazmy, standartně se uvádí rozmezí 70-110 %. V dnešní době už se výsledky prakticky uvádějí jen pomocí tzv. R, což je poměr času plazmy pacienta/čas normální plazmy. Pro sledování pacientů léčených warfarinem, popřípadě jinými deriváty dikumarinů se používá **INR**, jedná se o výše zmíněný poměr umocněný na **ISI** (mezinárodní index citlivosti použitého tromboplastinu). Díky standardizovanému poměru časů můžeme porovnávat výsledky z různých laboratoří. Hodnota R by se u zdravých jedinců měla pohybovat kolem 1,00 (Shikdar, Vashisht, a Bhattacharya 2021) (některé zdroje uvádí přesné rozmezí 0,8-1,2) a hodnota INR taktéž (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Masopust 1998; Zima 2007; Sahli et al. 2020; Winter, Flax, a Harris 2017).

Test monitorující vnitřní cestu aktivace protrombinu na trombin se nazývá **aktivovaný parciální tromboplastinový test** (APTT). Faktory, které ovlivňují výsledek testu jsou F XII., XI., IX., X., II., I. a kofaktor VIII., prekalkrein a HMWK. Principem testu je inkubace vyšetřovaného vzorku plazmy s kontaktním aktivátorem, který nahrazuje negativní povrchy trombocytů, dále s fosfolipidy a

celá reakce je zahájena podobně jako protrombinový test přidáním Ca^{2+} . Měří se čas potřebný pro vytvoření krevního koagula od přidání Ca^{2+} do reakční oblasti. Výsledky se udávají podobně jako PT. Čas by se měl pohybovat v oblasti 30-50 s, závisí ale podobně jako u PT na použitých reagentech, také proto se různé zdroje v přesné hodnotě neshodují. Poměr časů R je na rozdíl od konkrétního času stejný pro všechny reagenty a zároveň stejný jako u PT testu, tedy okolo 1,0 (Shikdar, Vashisht, a Bhattacharya 2021) (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Masopust 1998; Zima 2007; Sahli et al. 2020; Winter, Flax, a Harris 2017).

Trombinový test kontroluje pouze funkční schopnost přeměny fibrinogenu na fibrin. Název je odvozen od reagenty, která celý proces zahajuje čili trombin. Abnormální hodnoty tohoto testu, tedy ukazují na patologii v koncentraci případně funkčnosti fibrinogenu nebo poukazuje na přítomnost antitrombinu. Hodnotí se opět čas potřebný k vytvoření krevní sraženiny. V referenčních hodnotách se zdroje lehce rozcházejí, obecně by se měly pohybovat v čase kolem 20 s (Pecka 2004; 2006; Penka a Slavíčková 2011; Masopust 1998; Zima 2007; Sahli et al. 2020; Heid et al. 1996). Jednotná je opět hodnota R, která je fyziologicky opět kolem 1,0 (Shikdar, Vashisht, a Bhattacharya 2021).

Poslední globální test, který se v laboratořích provádí je alternativou trombinového testu a nazývá se **Reptilázový**. Stejně jako trombinový test hodnotí část společné cesty přeměny fibrinogenu na fibrin. Na rozdíl od trombinu, který se používá u TT se jako aktivátor používá proteáza získaná z hadího jedu zvaná reptiláza neboli batroxobin. Tato alternativa se využívá zejména proto, že reptiláza není ovlivněna antitrombinem a ani jedním druhem heparinu. Použitím tohoto testu tedy vyloučíme ovlivnění těmito látkami. Referenční meze jsou srovnatelné s hodnotami trombinového testu (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pecka 2006).

3.2.2.3 Testy specifické

Specifické testy se zaměřují na vyšetření funkčnosti **jednotlivých koagulačních faktorů** a dalších činitelů hemostázy případně jejich kvantitu. Slouží k přesnější diagnostice patologických stavů hemostázy. Pro jejich stanovení se využívají buď Jednorázové koagulační metody nebo spektrofotometrické metody s chromogenními substráty (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pecka a Bláha 2010).

Jednorázové koagulační metody se obecně provádí tak, že smícháme plazmu pacienta s plazmou, ve které chybí vyšetřovaný faktor a ostatní jsou v nadbytku. Dále se postupuje jako u aPTT popřípadě PT testu. Plazmy se smíchají reagensy, reakce se spustí přidáním Ca^{2+} a měříme čas potřebný k vytvoření krevního koagula. Výsledek se uvádí v procentech koagulační aktivity. Odečet se provádí z kalibrační křivky, která zobrazuje závislost koagulačních časů na procentech koagulační aktivity kalibrátorů se známou hladinou faktorů. Test se tedy využívá ke stanovení aktivity jednotlivých faktorů (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pecka a Bláha 2010).

Spektrofotometrické stanovení se používá také k hodnocení funkční aktivity jednotlivých faktorů konkrétně serinových proteáz, ale méně často než předchozí test. Jeho hlavním nedostatkem je, že využívá pouze schopnost katalytického místa na faktorů štěpit substrát na produkt, z toho důvodu nejsou schopné na rozdíl od koagulačních metod, odhalit patologii související s návazností zkoumaného faktoru na ostatních složkách koagulačního systému. Naopak výhodnější oproti koagulačnímu stanovení je jejich schopnost používat více ředěné vzorky a tím eliminovat interference s nepříznivými látkami. Výsledek se uvádí opět v procentech katalytické aktivity. Pro stanovení se využívají metody přímé a nepřímé detekce. Obě se používají v alternativách jednostupňové až třístupňové detekce. Principem **metody přímé detekce** je aktivace přímo faktoru, který stanovujeme a ten pak následně štěpí chromogenní substrát na produkt, který měříme fotometricky. Množství chromoforu (produkt štěpení chromogenního substrátu) je přímo úměrný aktivitě stanovovaného faktoru. Naopak u **metody nepřímé detekce** se stanovovaný faktor váže na aktivní složku, která se v reakční směsi vyskytuje v nadbytku a tím ji inaktivuje. Nadbytek aktivní složky poté štěpí chromogenní substrát na chromofor, jeho intenzitu opět měříme spektrofotometricky a hodnota je nepřímo úměrná množství analytu ve vzorku (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pecka a Bláha 2010).

Pokud máme **podezření na přítomnost inhibitorů v plazmě**, naředíme plazmu pacienta postupně třikrát pomocí normální plazmy a stanovíme jejich aktivitu. Pokud bude docházet k optimalizaci časů, je porucha ve funkční schopnosti faktorů, nebo v jejich množství. Naopak pokud se hodnota nebude výrazně měnit,

usuzujeme, že se v plazmě nachází inhibitor (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pecka a Bláha 2010).

Testy na vyšetření funkce a biochemie krevních destiček jsou speciální skupinou testů, které se v některých zdrojích ani neuvádí v rámci vyšetření hemostázy. Popisují, jak už je řečeno z názvu pouze schopnosti trombocytů. Rozdělujeme do čtyř skupiny podle dějů, kterých se trombocyty účastní v primární hemostáze: na vyšetření adheze trombocytů, vyšetření agregace, vyšetření jejich aktivačních působků a na vyšetření retrakce. Pro všechny metody se využívá plazma bohatá na krevní destičky případně plná krev (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pecka a Bláha 2010; Raber 1990).

K **vyšetření adheze** se používá metoda Fredina a podle Hellema. **Metoda dle Fredima** se v současné době prakticky nevyužívá. Metodou se zjišťoval počet destiček, které adherovaly na sklíčko. **Metoda podle Hellema** používá podobný princip, ale destičky u ní adherují na skleněné kuličky umístěné v hadičce, do které se tlakem vstříkují nativní krev. Změří se počet destiček v krvi po a před projití přes skleněné kuličky a z toho se vypočítá poměr neboli koeficient retence, který by se měl pohybovat od 0,1 do 0,6 (Penka a Slavíčková 2011; Zima 2007; Pecka a Bláha 2010; Raber 1990).

Vyšetření agregace se provádí buď metodou spontánní, nebo tzv. stimulovanou agregací. Spontánní agregace se měří ve skleněných zkumavkách a agregace stimulovaná se hodnotí po přidání agregačního induktoru. Měření agregace pak provádíme turbidimetrickou nebo impedanční metodou v dnešní době prakticky už jen na přístrojích nazývaných agregometry. **Optické agregometry** využívají turbidimetrický princip, měří tedy změnu optické hustoty po průchodu plazmou, ve které se tvoří agregáty. **Agregometry impedanční** využívá změnu odporu po agregaci destiček na elektrody. Výsledkem obou metod je agregační křivka závislosti hustoty plazmy na čase. Fyziologická plazma má normální průběh agregační křivky (Penka a Slavíčková 2011; Zima 2007; Pecka a Bláha 2010; Raber 1990).

K vyšetření **schopnosti trombocytů uvolňovat obsah granul** se provádí stanovení jednotlivých látek po jejich uvolnění z trombocytů, což je vyvoláno umělou stimulací trombocytů. Vyšetření se provádí převážně stanovením antigenu

imunochemickými metodami. Případně se využívají funkční testy stanovení schopnosti látek neutralizovat substrát (Penka a Slavičková 2011; Zima 2007; Pecka a Bláha 2010; Raber 1990).

Jako poslední u trombocytů kontrolujeme jejich **schopnost retrakce**. Opět existuje více typů stanovení. Pokud provádíme test z plné krve zvaný **test retrakce krevního koagula**, necháme odebranou krev srazit a stanovujeme objem tekutiny vytlačené při sražení krve, tedy stanovujeme objem séra. Fyziologicky by se mělo jednat asi o 30-50% objemu odebrané krve. Dalším způsobem je vyšetření plazmy bohaté na destičky. Tato metoda se nazývá **retrakce plazmatického koagula** neboli **metoda podle Benthouse**. Aktivace koagulace se provede přidáním tromboplastinu a Ca^{2+} . Podobně jako u předchozí metody se smrštěné destičky oddělí od séra a jeho objem se následně změří. Objem se vydává v procentech a vypočítá se z objemu vytlačené tekutiny a z délky koagula, popřípadě se odečte z převodní tabulky (Tabulka 4). Fyziologické hodnoty se udávají v rozmezí 88-100 %. Obecně u obou metod platí, že čím více se uvolní séra tím lepší mají destičky schopnost retrakce (Penka a Slavičková 2011; Zima 2007; Pecka a Bláha 2010; Raber 1990).

Tabulka 4 Referenční tabulka pro hodnocení retrakční schopnosti destiček metodou podle Benthouse

Počet dílků stupnice (počítáno po 0,1 ml)	%	Počet dílků stupnice (počítáno po 1 ml)	%
0	100	0	100
5	99,98	0,5	99,98
10	99,90	1,0	99,90
15	99,60	1,5	99,60
20	99,20	2,0	99,20
25	98,50	2,5	98,50
30	97,30	3,0	97,30
35	95,80	3,5	95,80
40	93,60	4,0	93,60
45	90,90	4,5	90,90
50	87,50	5,0	87,50
55	83,40	5,5	83,40
60	78,40	6,0	78,40
65	72,60	6,5	72,60
70	65,70	7,0	65,70
75	57,90	7,5	57,90
80	48,80	8,0	48,80
85	38,60	8,5	38,60
90	27,10	9,0	27,10
95	13,40	9,5	13,40
100	0	10,0	0

Zdroj: (Zima 2007)

3.2.2.4 Techniky používaná v laboratoři a přístrojové vybavení laboratoří

Mezi **techniky** v dnešní době nejvíce využívané pro hodnocení výše zmiňovaných testů, i proto že se dají snadno automatizovat, patří koagulační metody, spektrofotometrické metody, imunoanalytické metody, zákalové metody a gelifikační testy. Níže uvádíme jejich hlavní principy.

U většiny testů se využívá stanovení použitím **koagulačních metod**. Principem je měření času od chvíle přidání aktivátoru do vyšetřované směsi až po vytvoření krevního koagula. Kromě toho, že je tato metoda velmi snadná na provedení, její výsledek se dá hodnotit prakticky jakoukoli metodou, která se u vyšetření hemostatických dějů využívá. Patří mezi ně detekce vizuální (ta se ale již prakticky nepoužívá), detekce optická, elektrická a magnetická (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pecka a Bláha 2010).

Spektrofotometrické metody se využívají zejména pro stanovení jednotlivých složek hemostatického děje, neboť díky způsobu provedení nejsou ovlivněny dalšími složkami. Na rozdíl od koagulačních metod, ke kterým se přiklání zejména pro hodnocení určité části hemostatického děje. Základním principem je schopnost jednotlivých aktivovaných faktorů štěpit substrát za vzniku chromoforu, jehož množství následně hodnotíme spektrofotometricky, nejčastěji monochromatickým zářením. Podrobnější popis této i koagulační metody je uveden v kapitole v 3.2.2.3 (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pecka a Bláha 2010).

Imunochemické jinak známe jako imunologické metody jsou obecně charakterizovány jako reakce antigenu s protilátkou za vzniku komplexu, který v závislosti na použité metodě různým způsobem stanovujeme. Pro hemostatické vyšetření se využívá stanovení prakticky jen antigenů a protilátky jsou v metodách známé a značené. Mezi nejčastější typy imunologických metod se řadí ELISA (enzymatická imunoanalýza), EID (elektroimunodifúze) a LIA. V rámci těchto metod se často setkáváme i s tzv. aglutinačními případně hemoaglutinačními testy, využívajícími pro lepší vizuální hodnocení latexové částice. Obecně se ale častěji u hemostatických stanovení využívají koagulační a spektrofotometrické metody (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pecka a Bláha 2010).

Gelifikační testy slouží převážně ke stanovení fibrinu. Obecným principem je, že některé složky hemostatického procesu v přítomnosti určitých látek polymerují, čímž vytváří viditelný gel. Nejznámějším testem je Ethanol-gelifikační test pro stanovení již zmíněného fibrinu (Pecka 2004; Penka a Slavíčková 2011; Pecka a Bláha 2010).

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda využívaná nejen v hemostáze, slouží k mnohonásobnému zmnožení určitého úseku DNA, který pak následně

stanovujeme. U hemostatických dějů se využívá hlavně pro identifikaci různých mutací koagulačních faktorů (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pecka a Bláha 2010; Fenclová 2018).

Jako poslední metodu uvádíme **průtokovou cytometrii**, která se také využívá spíše okrajově a slouží ke stanovení převážně receptorů na buňkách, případně dokáže odlišit aktivované a nezaktivované buňky (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pecka a Bláha 2010).

V dnešní době většina i malých laboratoří provádí veškeré testy na přístrojích. Hlavním důvodem je rychlost a nenáročnost analýzy, neboť se neustále zvyšuje počet vyšetřovaných vzorků. **Manuální detekce** se prováděla mícháním zkoumaného vzorku s reagenty pomocí háčku a ve vodní lázni se okem stanovil čas kdy došlo k vytvoření koagula. V následujících kapitolách uvádíme nejzákladnější principy **detekce** nejvíce využívaných v běžné praxi. Přístroje, které tyto principy využívají se nazývají koagulometry (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pecka a Bláha 2010).

Optické koagulometry měří vlastnosti záření, procházejícího vzorkem. Používá se převážně monochromatické. Intenzita záření prošlého vzorkem nám dává informace o charakteru vzorku. Mezi optické metody řadíme i metody zákalové, uváděné v některých zdrojích namísto optických. Přístroje využívají dvou základních principů: nefelometrického a turbidimetrického. Nefelometrickými metodami stanovujeme množství záření kolmo odraženého od částic. Turbidimetrické metody měří záření prošlé vzorkem. Výstupem je křivka závislosti absorpance na čase (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pecka a Bláha 2010). Tento typ analyzátoru využívá i Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc, což ukazuje Obrázek 10, Obrázek 11 a Obrázek 12.

Elektrochemické koagulometry využívají taktéž dvě možnosti fyzikální detekce. Prvním způsobem detekce vzniklého koagula je pomocí dvou elektrod. Jakmile dojde k vytvoření sraženiny, proběhne mezi elektrodami impuls, který zastaví čas. Dalším způsobem je detekce využívající změnu viskozity plazmy, při tvorbě koagula. Využívá se kovová kulička pohybující se v magnetickém poli, která vlivem vyšší viskozity zpomalí. Změna rychlosti je převedena na elektrický impuls, který zastaví časovač (Pecka 2004; Penka a Slavičková 2011; Pecka a Bláha 2010).

Obrázek 10 STA Compact CT – automatizovaný koagulační analyzátor s optickou detekcí



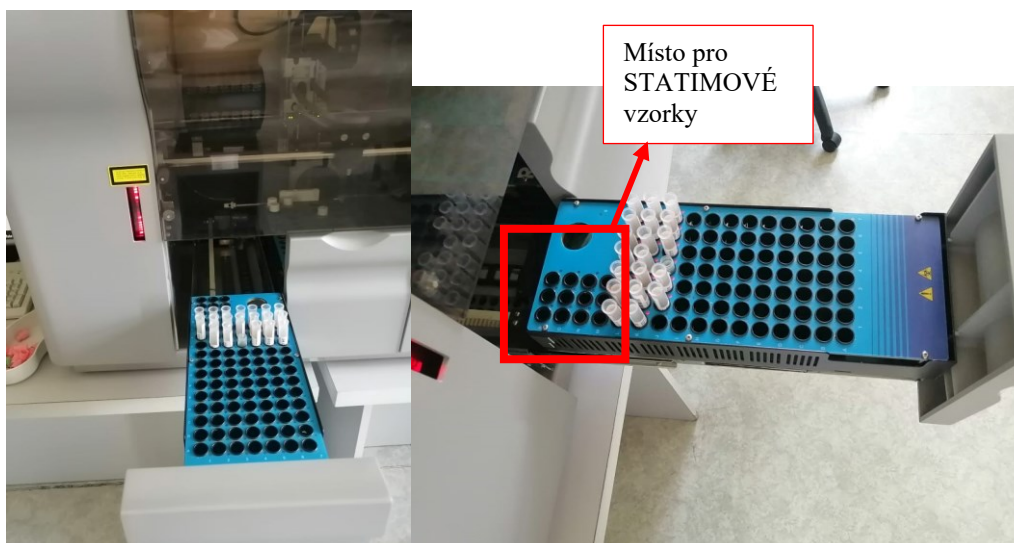
Zdroj: vlastní fotografie z Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o Olomouc

Obrázek 11 STA Compact CT – automatizovaný koagulační analyzátor s optickou detekcí – počítač pro jeho ovládání



Zdroj: vlastní fotografie z Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o Olomouc

Obrázek 12 STA Compact CT – automatizovaný koagulační analyzátor s optickou detekcí – manuální vklad zkumavek se vzorky



Zdroj: vlastní fotografie z Pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o Olomouc

3.3 Poruchy hemostázy a hemokoagulace

Patologické stavy v hemostáze rozdělujeme na dvě velké skupiny a to na: krvácivé a trombotické stavy. Ty pak můžeme rozdělit více způsoby. Nejsnazší způsob je na vrozené a získané, jinak je ale konkrétněji charakterizujeme spíše v závislosti na tom, kterou část hemostázy postihují. V jednotlivých kapitolách uvádíme v krátkosti ty nejčastější, a kromě jiného uvádíme jejich rozsáhlejší výskyt způsobený v současné době novou infekcí COVID-19.

3.3.1 Krvácivé poruchy

Krvácivé stavy jsou obecně způsobeny chybením některých složek hemostázy, nebo poruchou jejich funkce. Obě tyto skutečnosti mohou být způsobené vrozenou i získanou poruchou.

3.3.1.1 Poruchy primární hemostázy

Poruchy v primární hemostáze se zaměřují na patologii krevních destiček. Onemocnění způsobené nedostatkem trombocytů se nazývají **trombocytopenie**. Toto onemocnění je charakterizováno sníženým počtem krevních destiček pod hodnotu trombocytů 150×10^9 v jednom litru krve (Smock a Perkins 2014). Může být způsobena vyšší destrukcí trombocytů, jejich sníženou produkcí, zvýšenou spotřebou nebo vzácně i vrozenou příčinou. Ve velké míře ji vyvolávají infekční

onemocnění. I z toho důvodu se v současné době vyskytuje u pacientů s COVID-19 (Yujiao et al. 2020; Smock a Perkins 2014; Gauer a Braun 2012).

Další velkou skupinou poruch primární hemostázy jsou **trombocytopenie**, vyvolané patologií na úrovni funkčního stavu destiček. Tyto stavy jsou ve většině případů také získané. Jejich příčinou bývá poškození funkce jater, kostní dřeň případně léky. Vzácně se vyskytují i vrozené trombocytopenie spojené hlavně s nedostatkem povrchových receptorů na trombocytech. I toto onemocnění je v dnešní době považováno za rizikový faktor infekce COVID-19 (Gu et al. 2020; Holmannová 2021).

3.3.1.2 Poruchy sekundární hemostázy

Patologie vyvolávající krvácivé stavy na úrovni sekundární hemostázy zahrnuje funkční nebo kvantitativní nedostatečnost koagulačních faktorů, faktorů fibrinolýzy a případně i vyšší množství inhibitorů hemostázy. Souhrnně tyto poruchy označujeme jako **koagulopatie**. Nejčastěji se v literatuře setkáváme s rozdělením na vrozené a získané poruchy. **Vrozené** poruchy obvykle zahrnují nedostatek kvantitativní, popřípadě funkční v rámci jednoho faktoru. Chybění více faktorů je vyvoláno převážně **získanou** příčinou (Hájková 2020; Pecka 2004).

Mezi nejčastější příčiny **získané** koagulopatie patří nedostatek vitamínu K nebo porucha jeho využití, což vede k poruše syntézy některých faktorů. Dále porucha funkce jater, kde dochází k tvorbě téměř všech faktorů potřebných ke koagulaci. Mezi další, méně časté, ale neméně významné příčiny patří nádorová onemocnění, krevní transfuze pouze erytrocytů, výskyt protilátek, infekce, popřípadě nadměrná antikoagulační léčba. Pro **terapii** je nejprve důležité správně diagnostikovat primární příčinu koagulopatie a tu následně léčit (Salaj 2015; Pecka 2004).

Neznámější získaná koagulopatie se nazývá **Diseminovaná intravaskulární koagulace** (DIC). Toto onemocnění je obvykle zařazeno mezi krvácivé stavy, ale jeho rizikovým projevem je i nadměrná tvorba trombů. V některých zdrojích je navíc zvlášť uváděno onemocnění **sepsí vyvolaná koagulopatie** (SIC), které má stejný mechanismus jako DIC, pouze je konkrétně určený původní podnět, vyvolávající tuto patologii (Iba, Levy, Connors, et al. 2020). DIC je charakterizována nadměrnou aktivací koagulace, vyvolanou určitým podnětem.

Zároveň dochází k potlačení fibrinolýzy, což vyvolá nekontrolované srážení, které nakonec vede až k vyčerpání většiny složek hemostázy a rozvine se fatální krvácení. SIC je ve své podstatě typ DIC, vyvolaný bakteriální infekcí (Iba et al. 2021). Ukazatelem těchto poruch je pokles trombocytů a prodloužený PT. Podle (Hadid, Kafri, a Al-Katib 2021) se aPTT nezahrnuje do kritérií Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu, i když je často zvýšený podobně jako PT, a z toho důvodu jej neuvádíme jako ukazatel DIC (Iba, Levy, Connors, et al. 2020).

V současné době se velice často v souvislosti s poruchami hemostázy objevuje **koagulopatie asociovaná s onemocněním COVID-19 (CAC)**. Už u už výše jsme zmínili velký vliv koronaviru na zvyšující se množství onemocnění spojených s hemostázou. Koagulopatie jsou nejčastější z těchto onemocnění. Zpočátku bylo toto onemocnění zaměňováno za DIC, z toho důvodu je uvádíme mezi krvácivé stavy. Postupem času ale výzkumy ukázali na odlišný mechanismus vzniku z důvodu odlišných laboratorních výsledků a s tím souvisejících i vnějších projevů. Hlavním rozdílem v projevech oproti DIC je to, že nedochází ke krvácivým komplikacím. Hlavním a v současné době jediným známým patologickým projevem je hyperkoagulabilita. Co se týče diagnostik, u většiny případů nenajdeme snížený počet trombocytů ani prodloužený PT, případně aPTT, a když tak jsou tyto hodnoty jen mírně odkloněny od normálu. Naopak je pro toto onemocnění charakteristická zvýšená hladina D-dimerů a dalších produktů degradace fibrinu (FDP), dále přítomnost cytokinů, zvýšené hladiny vWF, fibrinogenu F VIII. a aktivovaného TF (Hadid, Kafri, a Al-Katib 2021; Bílková a Hirmerová 2020; Iba, Levy, Connors, et al. 2020). Mechanismus vzniku tohoto onemocnění podléhá neustále aktualizacím a není v současné době dokonale popsán, ale v zásadě se zdroje shodují na tom, že původní impuls logicky zajistí přítomnost viru SARS-CoV-2, který vyvolává onemocnění COVID-19. Tento patogen způsobí, že organismus do svého oběhu začnou uvolňovat protizánětlivé cytokiny a jejich nadprodukce následně vyvolává tzv. cytokinovou bouři. Současně s aktivací protizánětlivé odpovědi vir SARS-CoV-2 přímo poškozují endotel cévy. Uvolněné protizánětlivé cytokiny v další fázi tohoto onemocnění aktivují koagulační kaskádu, konkrétně se jedná o IL-6 a IL1 β . Poškozený endotel, kromě toho, že se také podílí na aktivaci hemostázy, snižuje regulaci trombomodulinu, čímž také podporuje koagulaci. Současně s výše popsány procesy coronavirová infekce v těle aktivuje

PAI-1, jehož hlavní funkcí je inhibice fibrinolýzy. Léčba tohoto onemocnění, vzhledem k tomu, že je relativně nové, není dostatečně známá. Často se doporučuje u COVID-19 diagnostikovaných pacientů podání antitrombotického léčiva po dobu hospitalizace i po ní. Nejčastěji je uváděn nízkomolekulární (LMWH) nebo nefrakcionovaný heparin (UFH). Dávky jsou ovšem velice individuální a pozitivní vliv není jistě zaručen (Iba, Levy, Levi, a Thachil 2020; Gómez-Mesa et al. 2021; Connors a Levy 2020; Iba, Levy, Connors, et al. 2020; Iba, Levy, Levi, Connors, et al. 2020; Görlinger et al. 2020; Hadid, Kafri, a Al-Katib 2021; Bílková a Hirmerová 2020).

Mezi nejčastější a zároveň nejznámější vrozené koagulopatie patří Hemofilie a Von Willebrandova choroba. **Hemofilie A** je charakterizována nedostatkem faktoru VIII. U **hemofilie B** chybí faktor IX. Oba typy hemofilie jsou recesivní poruchy vázané na chromozomu X. A v neposlední řadě **von Willebrandova choroba** je, jak je slyšet z názvu způsobena vrozeným deficitem von Willebrandova faktoru. Tuto chorobu řadíme mezi autozomálně dominantní onemocnění (Doherty a Kelley 2021).

3.3.2 Trombotické stavy

Trombotické stavy jsou naopak oproti krvácivým stavům vyvolány nadměrnou aktivitou některé ze složek hemostázy, případně poškozením cévní stěny nebo poruchou hemodynamiky. To obecně vyvolává zvýšenou aktivitu hemostázy způsobující negativní tvorbu trombů v krevním řečišti (Hájková 2020).

Obecně je rozdělujeme na vrozené a získané (sekundární). Mezi příčiny **získaných trombofilních stavů** řadíme trombocytémie, aterosklerózu, užívání látek vyvolávajících zvýšenou tendenci ke vzniku trombů (např. antikoncepci), výskyt exogenních látek v organismu, jako jsou viry a bakterie, zpomalení krevního toku, poškození cév aj (Anonymus 2019).

Mezi nejčastější **vrozené poruchy vyvolávající zvýšenou krevní srážlivost** patří Leidenská mutace a mutace 20210A v genu pro protrombin, další známé vrozené poruchy jsou poměrně vzácné. Pro příklad uvádím vrozený nedostatek antitrombinu, proteinu C, protein S a další. **Leidenská mutace** je vrozená mutace F V, která způsobí, že aktivovaný faktor V je odolný na inaktivaci proteinem C. To

způsobuje nekontrolovaný vznik trombů. Toto onemocnění se vyskytuje prakticky jen v mírné formě a nepředstavuje u většiny případů smrtelné riziko. **Mutace 20210 v genu pro protrombin** je způsobena vrozeně zvýšeným množstvím faktoru II (Dautaj et al. 2019; Momot et al. 2019).

Sraženiny vznikající z výše zmiňovaných příčin mohou vznikat kdekoli v krevním řečišti a v konečném důsledku mohou putovat krevním řečištěm do míst, kde neprojdou a způsobit tak embolii. Rizikovými faktory vzniku trombů jak u vrozených, tak u získaných koagulopatií bývá nezdravý životní styl a s ním související obezita, hypertenze, kouření, DM a v neposlední řadě v dnešní době vysoce riziková, již v předchozí kapitole uváděná coronavirová infekce (Gómez-Mesa et al. 2021; Connors a Levy 2020; Hájková 2020).

4. ZÁVĚR

V práci je popsán proces zástavy krvácení a také složky, které se na něm podílejí. Dále je její součástí přehled metod a technik, které slouží k diagnostice poruch hemostázy. Z charakteristik jednotlivých metod a technik je patrné, jak v současné době dochází k čím dál větší automatizaci nejen u vyšetření hemostázy. S přibývajícím počtem automatizovaných přístrojů rostou také požadavky na odborné pracovníky, které s nimi musí umět pracovat. Větší laboratoře, kterým se vyplatí pořídit si díky vyššímu počtu vyšetřovaných vzorků nákladnější vybavení musí mít také dostatečně proškolený a vzdělaný personál, který je schopen s vybavením odborně zacházet. V současné době se zvyšuje počet vyšetřovaných vzorků i díky nově se objevujícímu onemocnění koagulopatie spojené s COVID-19.

5. POUŽITÉ ZKRATKY

ZKRATKA	ČESKÝ VÝZNAM
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
APC	aktivovaný protein C
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
AT	antitrombin
ATP	adenosintrifosfát
β -TG	beta tromboglobulin
Ca ²⁺	vápenaté ionty
CAC	koagulopatie spojené s COVID-19
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulopatie
DM	Diabetes Mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethilendiamintetraoctová kyselina
EID	elektroimunodifúze
ELISA	enzymová imunoanalýza
Fb	fibronektin
FDP	degradační produkty fibrinu
GB	glykoprotein
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
HCII	heparin kofaktor II
HMWK	vysokomolekulární kininogen
LIA	chemiluminiscenční imunoanalýza
LIS	laboratorní informační systém
LMWH	nízkomolekulární heparin
NO	oxid dusnatý
PAF	faktor aktivující destičky
PAI-1	plazminogen aktivátor systém 1

PAR	trombinový receptor
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	růstový faktor destiček
PF ₄	destičkový faktor 4
PFP	bezdestičková plazma
PGI ₂	prostacyklin
PHZ	primární hemostatické zátka
PL	krevní destičky
PPP	plazma chudá na destičky
PRP	plazma bohatá na destičky
PTA	antihemofilický faktor C
PZ	protein Z
SIC	sepsí vyvolaná koagulopatie
TAFI	trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TFPI	inhibitor cesty tkáňového faktoru
TM	trombomodulin
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TPO	trombopoetin
TXA ₂	tromboxan A ₂
UFH	nefrakciovaný heparin
u-PA	urokinázový aktivátor plazminogenu
vWF	von Willebrandův faktor
ZPI	proteinázový inhibitor

6. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Látky fyziologicky uvolňované z endotelu cév k udržení inaktivních trombocytů.....	12
Tabulka 2 Látky uvolňované z endotelu cév uplatňující se v procesu hemostázy	13
Tabulka 3 Seznam nejdůležitějších látek uvolňovaných z granulí trombocytů, které se uvolňují při aktivaci destičky a hlavní funkce těchto látek.	14
Tabulka 4 Referenční tabulka pro hodnocení retrakční schopnosti destiček metodou podle Benthouse.....	43

7. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Koagulační kaskáda – starý model.....	27
Obrázek 2 Koagulační kaskáda – Třífázový model.....	28
Obrázek 3 Žádanka o laboratorní vyšetření z pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc – přední strana	30
Obrázek 4 Žádanka o laboratorní vyšetření z pracoviště klinické biochemie a hematologie, s.r.o. Olomouc – zadní strana.....	31
Obrázek 5 Odběry biologického materiálu – příjem žádanek	31
Obrázek 6 Odběr biologického materiálu – místo pro samotný odběr	32
Obrázek 7 Typy zkumavek používaných pro odběr krve na hemokoagulační vyšetření.....	33
Obrázek 8 Centrifuga na pracovišti klinické biochemie a hematologie s.r.o	35
Obrázek 9 STA Compact CT – automatizovaný koagulační analyzátor s optickou detekcí.....	46
Obrázek 10 STA Compact CT – automatizovaný koagulační analyzátor s optickou detekcí – počítač pro jeho ovládání	46
Obrázek 11 STA Compact CT – automatizovaný koagulační analyzátor s optickou detekcí – manuální vklad zkumavek se vzorky	47

8. POUŽITÁ LITERATURA

Allen, R. J., a A. P. Byrnes. 2019. „Interaction of Adenovirus with Antibodies, Complement, and Coagulation Factors". FEBS Letters 593 (24): 3449–60. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13649>

Anonymus. 2011. „Laboratorní a nemocniční informační systém". 31. květen 2011. <https://www.med.muni.cz/pes/index.php?id=1194>

Anonymus. 2019. „Trombofilní stavy | Lab Tests Online". 13. květen 2019. <https://www.labtestsonline.cz/trombofilni-stavy.html>

Ar, M. C., C. Balkan, a K. Kavaklı. 2019. „Extended Half-Life Coagulation Factors: A New Era in the Management of Hemophilia Patients". Turkish Journal of Hematology 36 (3): 141–54. <https://doi.org/10.4274/tjh.galenos.2019.2018.0393>

Benešová, E., B. Dlabáčková, V. Dlouhá, M. Dohnalová Havlíková, J. Heřmanová, B. Kadeřávková, G. Kadrmasová, et al. 2006. „Ošetrovatelství - Výuka - Diagnostika (Vyšetřovací metody)". 2006. <https://ose.zshk.cz/vyuka/diagnostika.aspx?id=15>

Bílková, S., a J. Hirmerová. 2020. „Coagulopathy associated with COVID-19". Vnitřní lékařství 66 (7): 402–8. <https://doi.org/10.36290/vnl.2020.118>

Connors, J. M., a J. H. Levy. 2020. „COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation". Blood 135 (23): 2033–40. <https://doi.org/10.1182/blood.2020006000>

členové Laboratorní sekce ČHS ČSL JEP. 2021. „Referenční meze krevního obrazu, retikulocytů, normoblastů a diferenciálního počtu leukocytů dospělých". 18. červen 2021. http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni_sekce/files/referencni_meze/Doporuceni_LS_CHS_CLS_JEP-Ref_meze_dospeli-KO_Diff_Ret_NRBC_v02_rev02.pdf

Dautaj, A., G. Krasi, V. Bushati, V. Precone, M. Gheza, F. Fioretti, M. Sartori, A. Costantini, S. Benedetti, a M. Bertelli. 2019. „Hereditary thrombophilia". Acta Bio

Medica : Atenei Parmensis 90 (10): 44–46. <https://doi.org/10.23750/abm.v90i10-S.8758>

Doherty, T. M., a A. Kelley. 2021. „Bleeding Disorders". StatPearls. 2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541050/>

Duchoslavová, J. 2015. „Pokyny pro pacienty a pro oddělení". Fakultní nemocnice Olomouc: 15.. https://www.fnol.cz/pdf/hok/LM_Priloha1.pdf

Fenclová, T. 2018. „Laboratorní příručka". <https://www.uhkt.cz/laboratore/narodni-referencni-laboratore-nrl/nrl-pro-papillomaviry-a-polyomaviry/laboratorni-prirucka>

Gauer, R., a M. M. Braun. 2012. „Thrombocytopenia". American Family Physician 85 (6): 612–22. <https://www.aafp.org/afp/2012/0315/p612.html>

Göbel, K., S. Eichler, H. Wiendl, T. Chavakis, Ch. Kleinschnitz, a S. G. Meuth. 2018. „The Coagulation Factors Fibrinogen, Thrombin, and Factor XII in Inflammatory Disorders—A Systematic Review". Frontiers in Immunology 9 (1): 1731. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01731>

Gómez-Mesa, J. E., S. Galindo-Coral, M. C. Montes, a A. J. Muñoz Martin. 2021. „Thrombosis and Coagulopathy in COVID-19". Current Problems in Cardiology 46 (3): 100742. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2020.100742>

Görlinger, K., D. Dirkmann, A. Gandhi, a P. Simioni. 2020. „COVID-19 associated coagulopathy and inflammatory response: what do we know already and what are the knowledge gaps?" Anesthesia and Analgesia 131 (5): 1324–33. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000005147>

Gu, S. X., T. Tyagi, K. Jain, V. W. Gu, S. H Lee, J. M. Hwa, J. M. Kwan, et al. 2020. „Thrombocytopathy and endotheliopathy: crucial contributors to COVID-19 thromboinflammation". Nature Reviews. Cardiology 18 (3): 194–209. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-00469-1>

Hadid, T., Z. Kafri, a A. Al-Katib. 2021. „Coagulation and anticoagulation in COVID-19". Blood Reviews 47 (2021): 100761. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100761>

- Hájková, E. 2020. „Poruchy srážlivosti krve, příčiny a rizikové faktory (a jeden příběh z praxe...) – IFMV". 7. květen 2020. <https://ifmv.cz/poruchy-srazlivosti-krve-priciny-a-rizikove-factory-a-jeden-pribeh-z-praxe/>
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, a P. M. Williams. 1996. „Real Time Quantitative PCR". *Genome Research* 6 (10): 986–94. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Holmannová, D. 2021. „Trombocytopatie". *uzravim.cz* (blog). 2. duben 2021. <https://www.uzravim.cz/trombocytopatie.html>
- Hůsková, J., a J. Kašá. 2009. „Ošetrovatelství - ošetrovatelské postupy pro zdravotnické asistenty“. Praha: Grada. (88). <https://www.bookport.cz/e-kniha/osetrovatelstvi-osetrovatelske-postupy-pro-zdravotnicke-asistenty-544839/#>
- Iba, T., J. M. Connors, I. Nagaoka, a J. H. Levy. 2021. „Recent advances in the research and management of sepsis-associated DIC". *International Journal of Hematology* 113 (1): 24–33. <https://doi.org/10.1007/s12185-020-03053-y>
- Iba, T., a J. H. Levy. 2019. „Derangement of the Endothelial Glycocalyx in Sepsis". *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 17 (2): 283–94. <https://doi.org/10.1111/jth.14371>
- Iba, T., J. H. Levy, J. M. Connors, T. E. Warkentin, J. Thachil, a M. Levi. 2020. „The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy". *Critical Care* 24: 360. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03077-0>
- Iba, T., J. H. Levy, M. Levi, J. M. Connors, a J. Thachil. 2020. „Coagulopathy of Coronavirus Disease 2019". *Critical Care Medicine* 48 (9): 1358–64. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004458>
- Iba, T., J. H. Levy, M. Levi, a J. Thachil. 2020. „Coagulopathy in COVID-19". *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 18 (9): 2103–9. <https://doi.org/10.1111/jth.14975>
- Ilich, A., I. Bokarev, a N. S. Key. 2017. „Global Assays of Fibrinolysis". *International Journal of Laboratory Hematology* 39 (5): 441–47. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12688>

- Jašková, J. 2021. „Urgentní vyšetření (statim, vitální indikace)". 06 2021. https://www.nemjh.cz/documents/laboratorni_prirucka_okb/HVEZDAJDQI.htm
- Klener, P. 2003. „Vnitřní lékařství“. Praha: Galén. (122). <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:511534a0-e147-11e5-984e-005056827e52?page=uuid:2c3446e0-ef6f-11e5-8745-005056825209>
- Linhardt, R. J. 2016. „Heparin and anticoagulation". 1. červen 2016. <https://doi.org/10.2741/4462>
- Lučná, P. 2021. „Labooratorní příručka". Biochemická a hematologická laboratoř MZ-BIOCHEM. <https://www.mz-biochem.cz/images/downloads/laboratorniprirucka.pdf>
- Martínková, J. 2014. „Hemostáza a její ovlivnění farmaky“. Grada. (66). <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:760a48a0-695c-11e3-8fee-005056827e51?page=uuid:215eab50-a6e9-11e3-bb86-005056825209>
- Martínková, J., I. Penka, a J. Gumulec. 2014. „Krvácení“. Praha: Grada. (336). <https://www.bookport.cz/e-kniha/krvaceni-406430/>
- Masopust, J. 1998. „Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření“. Praha: Karolinum. (408). <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:dd87cd70-f75e-11e6-8830-005056827e51?page=uuid:0ff5a820-1bce-11e7-8a18-5ef3fc9ae867&fulltext=hemost%C3%A1za>
- Mohammed, B., D. M. Monroe, a D. Gailani. 2020. „Mouse Models of Hemostasis". Platelets 31 (4): 417–22. <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1719056>
- Momot, A. P., M. G. Nikolaeva, N. N. Yasafova, M. S. Zainulina, K. A. Momot, a I. A. Taranenko. 2019. „Clinical and laboratory manifestations of the prothrombin gene mutation in women of reproductive age". Journal of Blood Medicine 10: 255–63. <https://doi.org/10.2147/JBM.S212759>
- Mourek, J. 2012. „Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů.“ 2. vyd. Praha: Grada. (685). <https://www.bookport.cz/e-kniha/fyziologie-335790/>

- Opravilová, M. 2018. „Pokyny před odběrem krve na vyšetření primární hemostázy (monitorování antiagregační léčby, vyšetření funkce trombocytů)". <https://laborator.smn.agel.cz/odbornici/hematologie/f-403-pokyny-pred-odberem-krve-na-vysetreni-primarni-hemostazy.pdf>
- Panigada, M. et al., „Hypercoagulability of COVID-19 Patients in Intensive Care Unit: A Report of Thromboelastography Findings and Other Parameters of Hemostasis", Journal of Thrombosis and Haemostasis 18 (7): 1738–1742, <https://doi.org/10.1111/jth.14850>
- Pecka, M. 2004. Laboratorní hematologie v přehledu - Fyziologie a patologie hemostázy. Český Těšín: Finidr. (248). <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:25feac80-bc7d-11e6-b7ab-005056827e52?page=uuid:b43dc190-d4a4-11e6-8f91-005056827e51>
- Pecka M.. 2006. „Laboratorní hematologie v přehledu - hemostáza. 2“. Český Těšín: FINIDR. (237). <https://dokumenty.upce.cz/uk/ke-stazeni/pecka-lh-3.pdf>
- Pecka, M., a M. Bláha. 2010. „Praktická hematologie: laboratorní metody“. Český Těšín: Infiniti art. (352). <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:c892b410-2837-11e8-baf9-005056827e52?page=uuid:311d0fc0-3e64-11e8-b52f-5ef3fc9ae867&fulltext=vy%C5%A1et%C5%99en%C3%AD%20v%20hemost%C3%A1ze>
- Penka, M., a E. Slavičková. 2011. „Hematologie a transfuzní lékařství 1.“ 1. vyd. Praha: Grada. (492). <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:197dcd30-ec94-11e8-bc37-005056827e51?page=uuid:1f0c4400-fd62-11e8-9210-5ef3fc9bb22f>
- Pokorný, J. 2002. „Přehled fyziologie člověka“. 2. Praha: Karolinum. (260). <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:7e93d5a0-4970-11e4-8113-005056827e52?page=uuid:da1d7530-6fa8-11e4-8c6e-001018b5eb5c>
- Raber, M. N. 1990. „Coagulation Tests". In Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations, editoval H. K. Walker, W. D. Hall, a J. W. Hurst, 3rd vyd. Boston: Butterworths. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK265/>

- Russeau, A. P., H. Vall, a B. Manna. 2021. „Bleeding Time". In StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537233/>
- Sahli, S. D., J. Rössler, D. W. Tscholl, J-D. Studt, D. R. Spahn, a A. Kaserer. 2020. „Point-of-Care Diagnostics in Coagulation Management". Sensors (Basel, Switzerland) 20 (15): 4254. <https://doi.org/10.3390/s20154254>
- Salaj, P. 2015. „Hemofilie a ostatní vrozené a získané koagulopatie - Zdraví.Euro.cz". 2015. <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/hemofilie-a-ostatni-vrozene-a-ziskane-koagulopatie-480296>
- Shikdar, S., R. Vashisht, a P. T. Bhattacharya. 2021. „International Normalized Ratio (INR)". In StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507707/>
- Smock, K. J., a S. L. Perkins. 2014. „Thrombocytopenia: An Update". International Journal of Laboratory Hematology 36 (3): 269–78. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12214>
- Šigutová, P, I Fátorová, I Hrachovinová, J Juráňová, M Matýšková, S Vytisková, a Členové LS ČHS JEP. 2017. „Preanalytika v hematologické laboratoři". (13). http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni_sekce/files/obecna/Dopouceni_LS_CHS_CLS_JEP-Preanalytika_v_hematologicke_laboratori_v01.pdf
- Táborská, E., a J. Tmandl. 2005. „Biochemie II: praktická cvičení“. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita. (116). <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:b30decf0-18cf-11e6-8401-005056827e51?page=uuid:e1d86d90-4fd3-11e6-8361-5ef3fc9ae867&fulltext=analyzatory%20hemokoagulace>
- Vinholt, P. J. 2019. „The Role of Platelets in Bleeding in Patients with Thrombocytopenia and Hematological Disease". Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) 57 (12): 1808–17. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0380>
- Weisel, J. W., a R. I. Litvinov. 2019. „Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis". Journal of thrombosis and haemostasis: 17 (2): 271–82. <https://doi.org/10.1111/jth.14360>

- Wenzel, P. 2019. „The regulatory role of coagulation factors in vascular function". 1. leden 2019. <http://www.bioscience.org/2019/v24/af/4731/fulltext.htm>
- Winter, W. E., S. D. Flax, a N. S. Harris. 2017. „Coagulation Testing in the Core Laboratory". *Laboratory Medicine* 48 (4): 295–313. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmx050>
- Yujiao, Z., Z. Xiaoyuan, J Yingying, L. Zongpeng, L. Qifa, Y. Jieyu, a Y. Mo. 2020. „Mechanisms involved in the development of thrombocytopenia in patients with COVID-19". *Thrombosis Research* 193: 110–15. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.06.008>
- Zhang, L., X. Yan, Q. Fan, H. Liu, X. Liu, Z. Liu, a Z. Zhang. 2020. „D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19". *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 18 (6): 1324–29. <https://doi.org/10.1111/jth.14859>
- Zima, T. 2007. „Laboratorní diagnostika“. Praha: Galén. (776). <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:7faa29b0-bb55-11e4-b2e2-005056827e52?page=uuid:b79ef4f0-dd69-11e4-a19f-001018b5eb5c&fulltext=v%C5%A1et%C5%99en%C3%AD%20v%20hemost%C3%A1ze>