

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**



**Bakalářská práce**

**Porovnání reagensů na stanovení aktivity koagulačních  
faktorů koagulační metodou**

**Marie Štorková**

**Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Sadílek, Ph.D.**

**Hradec Králové, 2023**

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce panu RNDr. Petru Sadílkovi, Ph.D., za ochotné a vstřícné jednání, trpělivost a čas, který mi věnoval během přípravy bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu a motivaci, která mi byla za celé období na vysoké škole poskytnuta.

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

V Hradci Králové 27.04.2023

.....  
Štorková Marie

# Obsah

1. Abstrakt.....	6
2. Abstract.....	7
3. Úvod.....	8
4. Zadání – cíl práce.....	9
5. Teoretická část.....	10
5.1. Hemostáza, její složky a mechanismy.....	10
5.1.1 Cévní stěna.....	10
5.1.2 Primární hemostáza.....	11
5.1.3 Sekundární hemostáza.....	12
5.1.4 Koagulační faktory.....	13
5.1.5 Serinové proteázy.....	13
5.1.6 Kofaktory.....	13
5.1.7. Popis jednotlivých koagulačních faktorů.....	14
5.1.8 Systém přirozených inhibitorů hemostázy.....	18
5.1.9 Fibrinolytický systém.....	19
5.3 Patologie hemostázy.....	20
5.4 Možnosti laboratorního stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů v plazmě....	21
5.4.1 Screeningové testy.....	21
5.4.2 Stanovení aktivity dalších koagulačních faktorů.....	23
6. Praktická část.....	26
6.1 Vyšetřovaný materiál.....	26
6.2 Automatický koagulometr STA-R Evolution.....	26
6.3 Principy metody.....	28
6.4 Použité reagensie, jejich příprava a stabilita.....	28
6.5 Nastavení přístroje.....	30
6.6 Fyziologické meze.....	31
6.7 Kalibrace metod.....	31
6.8. Kontrola kvality.....	31
6.9 Pracovní postup.....	32
6.10 Výsledky a jejich statické vyhodnocení.....	34
6.11 Hodnocení grafů.....	35
7. Diskuse.....	39
8. Závěr.....	41
9. Použité zkratky.....	42
10. Seznam obrázků.....	43

<b>11. Seznam tabulek.....</b>	<b>43</b>
<b>12. Seznam grafů .....</b>	<b>43</b>
<b>13. Použitá literatura.....</b>	<b>44</b>
<b>14. Přílohy .....</b>	<b>48</b>

# 1. Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá zavedením nových citlivějších reagensů pro stanovení aktivity plazmatických koagulačních faktorů vnitřní cesty do provozu hematologické laboratoře.

Teoretická část se zabývá stručným popisem celého procesu hemostázy, jednotlivých koagulačních faktorů, patologií hemostázy a stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů.

Praktická část je věnována provedení srovnávací studie stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů VIII, IX, XI a XII.

Tato studie porovnává výsledky jednotlivých faktorů naměřené novými reagensy STA C.K. Prest 5 v kombinaci s příslušnými imunodeficitními plazmami s výsledky získanými metodami využívajícími původní reagentie STA PTT A v kombinaci s klasickými deficitními plazmami. Naměřené hodnoty jsem následně vyhodnotila metodou lineární regrese a Bland-Altmanovým grafem, na jejichž základě jsem posoudila, zda je možné metody využívající nové reagentie zavést do provozu laboratoře. Vypočítané hodnoty korelačních koeficientů jednotlivých metod jsou vyšší než  $r = 0,98$ , což spolu s rovnicemi přímek korelačních grafů poukazuje na těsnou korelaci výsledků naměřených reagensy původními a reagensy nově zaváděnými. Obdobné výsledky ukazují i Bland-Altmanovy grafy. Výraznější rozdíly mezi výsledky se objevují pouze v oblasti významně zvýšených hodnot aktivity koagulačních faktorů. Rozdíly těchto výsledků v této oblasti však nejsou klinicky významné.

Výsledky naší srovnávací studie ukazují, že původní a nové reagentie ke stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů VIII, IX, XI a XII poskytují srovnatelné výsledky. Metody využívající nové reagentie STA C. K. Prest 5 a příslušné imunodeficitní plazmy tedy mohou být zavedeny do provozu laboratoře.

Klíčová slova: hemostáza, faktory vnitřní koagulační cesty, stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů

## 2. Abstract

This bachelor thesis deals with the introduction of new more sensitive reagents for the determination of plasma coagulation factor activity of the intrinsic pathway into the hematology laboratory.

The theoretical part deals with a brief description of the whole hemostasis process, individual coagulation factors, pathologies of hemostasis and determination of functional activity of coagulation factors.

The practical part is devoted to a comparative study of the functional activity of coagulation factors VIII, IX, XI and XII.

This study compares the results of the individual factors measured with the new STA C.K. Prest 5 reagents in combination with the respective immunodeficient plasmas with the results obtained by methods using the original STA PTT A reagents in combination with classical deficient plasmas. The measured values were then evaluated using the linear regression method and Bland-Altman plot to assess whether the methods using the new reagents could be implemented in the laboratory. The calculated values of the correlation coefficients of the individual methods are higher than  $r = 0.98$ , which together with the equations of the lines of the correlation plots indicate a close correlation between the results measured with the original reagents and those measured with the newly introduced reagents. The Bland-Altman plots show similar results. Significant differences between the results appear only in the area of significantly increased values of coagulation factor activity. However, the differences in these results in this area are not clinically significant.

The results of our comparative study show that the original and new reagents for the determination of the functional activity of coagulation factors VIII, IX, XI and XII give comparable results. Therefore, methods using the new STA C.K. Prest 5 reagents and the corresponding immunodeficiency plasmas can be introduced into the laboratory.

Keywords: haemostasis, factors of the intrinsic coagulation pathway, determination of functional activity of coagulation factors

### 3. Úvod

Hemostáza je složitý proces udržující tekutost krve v cévách a zároveň brání jejímu úniku skrze poškozené cévy. Nejprve dochází k vazokonstrikci v místě poškození cévy, kde je následně vyvolaná aktivace krevních destiček vedoucí k postupnému vzniku krevního koagula za účasti koagulačních faktorů. V poslední fázi dochází k jeho odstranění dějem nazývaným fibrinolýza.

Koagulační faktory jsou proteiny, které se přirozeně vyskytují v krevní plazmě. Většina z nich je produkována játry. Jejich hlavní funkcí je tzv. hemokoagulace neboli děj vedoucí k tvorbě fibrinového koagula.

Porušení hemostatické rovnováhy může vést ke krvácení nebo naopak k trombózám a emboliím.

Sledování stavu hemostázy lze provádět pomocí laboratorních testů. Přestože mezi nejčastější testy vyšetření hemokoagulace stále patří testy skupinové, bez specifických testů k vyšetření funkční aktivity jednotlivých koagulačních faktorů bychom se dnes neobešli.

Tato stanovení slouží nejen k diagnostice onemocnění hemostázy, ale jsou nezbytná také pro sledování vývoje onemocnění či k monitorování úspěšnosti léčby.

V současné době by se měly v klinických laboratořích používat pouze certifikované reagentie. Pokud je laboratoř nucena z jakéhokoli důvodu změnit reagentie, musí tomu předcházet provedení srovnávací studie, která prokáže, že jsou výsledky měřené původní a nově zaváděnou reagentií srovnatelné.

Tato bakalářská práce je zaměřena na zavedení nových reagentií pro stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů vnitřní cesty do provozu hematologické laboratoře.



## **4. Zadání – cíl práce**

Cílem teoretické části mé práce je popsání procesu krevního srážení, úlohy jednotlivých složek a mechanismů hemostázy, zmínit se o patologiích hemostázy a o možnostech laboratorního stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů v plazmě.

Cílem praktické části je zavedení nových reagensů na stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů vnitřní cesty do laboratorní praxe. Provést srovnávací studii, jejíž hlavním cílem bylo porovnat výsledky aktivity jednotlivých koagulačních faktorů naměřených pomocí původních, dosud používaných reagensů STA PTT A 5 s příslušnými deficitními plazmami a současně pomocí nově zaváděných reagensů STA C.K. Prest 5 a příslušných imunodeficitních plazem od firmy Stago. Naměřené výsledky statisticky vyhodnotit a potvrdit jejich vzájemnou korelaci a to, zda mohou být nové reagensie zavedeny do provozu hematologické laboratoře.

## 5. Teoretická část

### 5.1. Hemostáza, její složky a mechanismy

Je integrální součástí nespecifické obrany organismu a je nezbytná pro život. Jde o velice komplikovaný a přesně regulovatelný proces, sloužící k zástavě krvácení při poranění cévní stěny. Naopak při neporušeném cévním řečišti udržuje krev v tekutém stavu. Na hemostáze se podílejí cévy, krevní destičky a plazmatické faktory (Penka, 2011).

Tento proces můžeme rozdělit do čtyř fází. Prvním je konstrikce krevní cévy, druhým tvorba dočasné „trombocytové zátky“, třetím aktivace koagulační kaskády, a nakonec ve čtvrté fázi dochází k vytvoření „fibrinové zátky“. Jakmile se poškozené místo začne hojit, dojde k následné remodelaci a rozpuštění zátky s následným obnovením tkáně (LaPelusa, 2022).

#### 5.1.1 Cévní stěna

Cévy obsahují tři vrstvy a to intimu, medii a adventicii. Intima je tvořena jednovrstevnou výstelkou s endoteliálními buňkami. Ty se spojují s polysacharidovou intracelulární matrix, které obklopuje bazální membrána (BM), syntetizovaná fibroblasty i endoteliemi. Pod BM se nachází extracelulární matrix, jejíž hlavními buňkami jsou fibroblasty a hladké svalové buňky.

Nejdůležitějším faktorem hemostázy je integrita cévního systému. Pokud dojde k jeho porušení, dojde tak k reflexnímu spazmu arteriol, venul a dalších menších cév s relativní ischemií v okolí poškozené oblasti s následným vytvořením důležitých podmínek pro vznik primární hemostatické zátky.

Do kontaktu s krví se subendotel dostává jen při porušení endotelu. Je vysoce trombogenní a je schopen rychle aktivovat všechny systémy hemostázy. Mezi nejvýznamnější složky subendotelu řadíme kolageny a tkáňový faktor. Kolageny mají negativně nabitě povrchy, na kterých dochází k adhezi krevních destiček. K adhezi dochází díky tvorbě vazby mezi kolagenem, von Willebrandovým faktorem (vWF) a aktivovanými glykoproteinovými komplexy GP Ib/V/IX a GP IIb /IIIa na povrchu krevních destiček. GP VI může přímo vázat destičky na kolagenové struktury (Penka, 2011).

## Endotel

Nejvýznamnějším antitrombotickým prostředkem organismu je neporušený a nesmáčivý endotel.

Mezi funkce endotelu patří: udržování krve v tekutém stavu, regulace pohybu buněk a živin, tvorba nových krevních cév, řízení vývoje orgánů, přispívání k místní rovnováze mezi prozánětlivými a protizánětlivými mediátory či prokoagulační a antikoagulační aktivitou (Hajjar, 2021).

Systém endotelií tvoří velmi důležitou a metabolicky aktivní složku. Jedná se o velký povrch, na kterém se setkává krev s cévní stěnou. Endotelie nesou na svém povrchu řadu receptorů (např. receptor pro protein S, trombomodulin, fibronektin) včetně adhezivních receptorů (integrinů). Místem, kde probíhá metabolismus kyseliny arachidonové, se syntetizují látky jako jsou von Willebrandův faktor, tkáňový aktivátor plazminogenu a endotelin.

Endotelie se mohou dostat do protrombotického stavu jak přímým traumatem, tak působením řady cytokinů (jako je interleukin-1 nebo tumor nekrotizující faktor), vysokým krevním tlakem, patologicky zvýšenou hladinou homocysteinu nebo působením oxidovaných forem LDL částic (Penka, 2011).

### **5.1.2 Primární hemostáza**

Primární hemostáza je důležitý proces, při kterém dochází k tvorbě primární zátky z důvodu zacelení poraněné cévy či její obnovy.

Nejprve dochází k adhezi krevních destiček ke smáčivé ploše (subendotelu cév), kterou zajišťují strukturální součásti destičkové membrány, které obsahují fosfolipidy, glykolipidy a glykoproteiny. Po porušení celistvosti cévní stěny, dojde k odhalení jejích hlubších vrstev a odhalení receptorů kolagenních vláken poškozené cévní stěny. Glykoprotein Ib v komplexu s glykoproteinem IX má k těmto receptorům zvýšenou afinitu, a tudíž ke kolagenu přilne a způsobí adhezi. Celý proces zprostředkovává zejména vWF, který jako adhezivní protein zajistí propojení mezi krevní destičkou a kolagenem cévní stěny.

Adhezi indukuje malé množství ADP, jež pochází z perivaskulární tkáně. Vede k aktivaci trombocytů, která vyvolá transmembránový přesun dvojvrstvy fosfolipidů (tzv. flip-flop reakce), což způsobí expresi negativně nabitých fosfolipidů na povrch membrány. Ty jsou poté schopny poskytovat katalytické povrchy pro koagulační reakce.

Agregace je naopak navozena vysokým množstvím endogenního ADP z granul

trombocytů, ale i působením trombinu, kolagenu, adrenalinu nebo kyseliny arachidonové. Dochází tak ke změně tvaru a povrchových vlastností trombocytů, k tzv. lepivosti destiček a vystavení destičkového membránového receptoru GP IIb/IIIa. Na něj se naváže vWF, ale i fibrinogen, který způsobí vzájemné shlukování trombocytů, a tudíž zapříčiní vznik primární zátky (Penka, 2009).

### 5.1.3 Sekundární hemostáza

Za běžných okolností by primární zátka byla rozrušena a následně odstraněna v krevním proudu, a proto musí dojít k její přeměně na zátku definitivní. K této přeměně dochází účinkem koagulační kaskády. (Indrák, 2006).

K aktivaci celého systému dochází po vazbě FVIIa s TF. Za účasti fosfolipidů a vápenatých iontů vznikne komplex vnější tenázy [FVIIa . TF . Pl . Ca<sup>2+</sup>] sloužící k aktivaci FX. FXa pak za účasti vápenatých iontů, fosfolipidů a FVa tvoří protrombinázový komplex, sloužící k přeměně protrombinu na trombin. Tím vznikne malé množství trombinu, které nestačí na přeměnu fibrinogenu na fibrin. Vnější tenáza aktivuje současně také FIX. Tuto fázi nazýváme jako „*iniciace*“.

Se současným vznikem komplexů vnější tenázy a protrombinázy dochází k aktivaci inhibitoru pro tkáňový faktor (TFPI). Jelikož komplex vnější tenázy působí jen na povrchu buněk exprimujících TF, dojde po navázání TFPI na TF k zablokování vnější cesty koagulace.

Malé množství trombinu, vytvořené v iniciační fázi následně aktivuje koagulační faktory XI, V a VIII a také krevní destičky. Díky tomu dochází k urychlení celého procesu koagulace. Tuto fázi nazýváme jako „*amplifikace*“.

V *propagační* fázi dochází k aktivaci dalších molekul faktoru IX účinkem aktivovaného faktoru XI a k tvorbě koagulačně aktivních komplexů vnitřní tenázy [FIXa . FVIIIa . Pl . Ca<sup>2+</sup>] a protrombinázy. Ta již dokáže přeměnit dostatečné množství protrombinu na trombin a způsobit tak přeměnu fibrinogenu na fibrin (Šlechtová, 2007).

Působením trombinu na fibrinogen dojde k odštěpení fibrinopeptidů A a B z jeho molekuly a vzniku fibrinových monomerů, které začnou spontánně polymerovat a vytvářet tak fibrinová vlákna vedoucí k tvorbě fibrinové sítě, sloužící ke stabilizaci destičkové zátky. Pro tvorbu nerozpustného fibrinu je nezbytné působení aktivovaného faktoru XIII, který vytvoří příčné kovalentní vazby v molekule fibrinu a tím jej stabilizuje (Chaudhry, 2022).

### 5.1.4 Koagulační faktory

Obecně jsou koagulační faktory značeny římskými číslicemi a v případě jejich aktivace se označují písmenem „a“. Řada koagulačních faktorů se syntetizuje v játrech a část faktorů potřebuje ke své syntéze vitamin K. Kromě TF jsou veškeré faktory přítomny v plazmě jako proenzymy a pro jejich aktivaci je nutné proteolytické štěpení. Jen jediný faktor se v plazmě vyskytuje jak v aktivní, tak neaktivní formě a tím je FVIIa (Pecka, 2004).

### 5.1.5 Serinové proteázy

Mezi serinové proteázy řadíme faktory II, VII, IX, X, XI, XII a prekalikrein, které po rozštěpení vykazují enzymatickou aktivitu. Typický je pro ně výskyt serinu v aktivním místě. Řadíme sem také faktory z oblasti fibrinolýzy jako jsou plazminogen, tkáňový aktivátor plazminogenu (*t*-PA), urokináza (*u*-PA), nebo přirozený inhibitor protein C.

Pro plnou funkci těchto faktorů je důležitá tzv. „gla oblast“ neboli část molekuly glutamové kyseliny a vazba vápenatých iontů. V této části se nachází tzv.  $\gamma$  karboxy-glutamové zakončení, které je v přítomnosti vitaminu K karboxylováno pomocí enzymu  $\gamma$  glukarboxalázy.

Nezbytné je následné navázání druhé karboxylové skupiny k fosfolipidovým strukturám přes vápníkové můstky, při nichž dochází k tvorbě komplexu aktivovaného faktoru, prekursoru dalšího faktoru a také kofaktoru. Např. při jaterních poruchách či při snížené hladině vitaminu K nedochází ke  $\gamma$  karboxylaci a dochází tak ke vzniku faktorů s omezenou koagulační aktivitou tzv. PIVKA.

K aktivaci serinových proteáz dochází při rozštěpení molekuly za vzniku dvouřetězcové bílkoviny, která je spojena můstky disulfidickými či vazbou nekovalentní. Tato proteolýza nejčastěji probíhá v místě argininové nebo lysinové vazby. Výsledkem je vznik látky, která má enzymatickou aktivitu serinové proteázy s aktivním centrem v blízkosti C-oblasti molekuly (Pecka, 2004).

### 5.1.6 Kofaktory

Dělíme na dvě skupiny lišící se formou, ve které se nachází. První skupinu tvoří kofaktory plazmatické, kam řadíme faktor V a VIII, vysokomolekulární kininogen (HMWK) a Protein S. Do druhé skupiny kofaktorů vázající se do buněčné membrány řadíme tkáňový faktor (TF). Rozdíl mezi nimi je ten, že plazmatické kofaktory musí být na rozdíl od TF aktivovány.

Při této aktivaci se nespojují disulfidické můstky ani nedochází ke spojení nekovalentními vazbami, naopak ale dochází ke spojení kovalentní vazbou přes vápenaté ionty. Inaktivace faktorů V a VIII je způsobena rozštěpením molekuly v systému proteinu C (Pecka, 2004).

### 5.1.7. Popis jednotlivých koagulačních faktorů

#### Fibrinogen – FI

Jedná se o symetrickou molekulu, tvořenou třemi páry řetězců, a to dvěma  $A\alpha$ , dvěma  $B\beta$  a dvěma  $\gamma$ . Díky trombinu, který umožňuje odštěpení z molekuly fibrinogenu (FBG) fibrinopeptidy A a B mohou vznikat tzv. fibrinové monomery. Ty mohou polymerizovat a tím dát vznik primárním fibrinovým vláknům. Ty pomocí laterální adice nabývají na tloušťce a po transglutamační reakci, kterou zajišťuje aktivovaný faktor XIII, vznikne definitivní fibrinové koagulum.

Fibrinogen ovlivňuje reologické vlastnosti krve a je schopen zajistit spojení aktivovaných krevních destiček přes jejich receptory GP IIb/IIIa, což způsobí jejich agregaci. Dále je schopen vázat se na receptory aktivovaných leukocytů a endotelií, a také slouží jako nosič faktoru XIII. Mezi jeho antihemostatické funkce řadíme vazbu aktivního trombinu a schopnost potencovat aktivaci plazminogenu přes t-PA (Penka, 2014).

#### Protrombin – FII

Syntetizuje se v hepatocytech jater a je složen z 622 AMK. Než je sekretován do plazmy, podstupuje posttranslační modifikace, kdy dochází k odstranění peptidu na N-terminálním konci proteinu (Škorňová, 2021).

V předposledním kroku koagulační kaskády se protrombin proteolyticky štěpí na aktivní proteázu za účasti protrombinázového komplexu  $[FXa \cdot FVa \cdot Pl \cdot Ca^{2+}]$ . Trombin následně katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin a vytváří tak nerozpustnou fibrinovou sraženinu. Je také silným aktivátorem krevních destiček, aktivuje koagulační faktory XI, V, VIII a XIII, podílí se na aktivaci PC a ovlivňuje fibrinolýzu. Protrombin se podílí na embryonálním vývoji, jeho aktivita je zvýšená v mozkomíšním moku u pacientů s progresivním neurodegenerativním onemocněním a při antifosfolipidovém syndromu na něj cílí protilátky. Je závislý na vitamínu K (Pozzi, 2014).

### Tkáňový faktor – FIII

Jedná se o integrální membránový protein endoplazmatického retikula. Jeho nejvyšší aktivitu zaznamenáváme v mozku, placentě, plicích a dalších orgánech (Pecka, 2004).

Je exprimován na perivaskulárních a epitelálních buňkách, kde plní funkci hemostatické bariéry. Funguje také jako vysokoafinitní receptor pro FVII, kdy vzniklý komplex [TF-FVIIa] je prvním aktivačním krokem koagulační kaskády. TF je potřebný pro stabilizaci katalytického místa FVIIa na plazmatické membráně, aby mohlo dojít k optimální interakci s jeho substráty, a to FIX a FX (Grover, 2018).

Komplex [TF-FVIIa] je inaktivován TFPI, který se nachází v plazmě a je spojený s povrchem buněk cév. K jeho uvolňování z krevních destiček dochází po stimulaci trombinem (McVey, 1999).

### Vápenaté ionty – FIV

Koagulační faktor IV hraje důležitou roli v celém systému hemostázy. Podílí se na vzniku všech koagulačních a některých inhibičních komplexů. Zatímco většina koagulačních faktorů vzniká v hepatocytech, vápenaté ionty najdeme volně rozptýleny v plazmě. Umožňují připojení  $\gamma$ -karboxylových skupin vitamin K-dependentních faktorů na fosfolipidy (Barmore, 2023).

### Proakcelerin – FV

Syntetizuje se v játrech a podle některých studií ho produkují i megakaryocyty. V aktivní formě působí jako kofaktor pro FXa a vytváří protrombinázový komplex. Naopak může působit při inhibici koagulační kaskády jako cílová bílkovina pro komplex [APC-PS].

Jeho protein se skládá z šesti domén a to A1-A2-B-A3-C1-C2. Při aktivaci dochází ke štěpení a uvolnění domény B. Je tak rozdělen na těžký řetězec tvořený z domén A1-A2 a lehký řetěz z domén A3-C1-C2. Samotný faktor V se může vázat na aktivované trombocyty. K jeho aktivaci dochází působením trombinu, rozštěpením molekuly faktoru V na dvouřetězcovou strukturu. Degradace FVa je zajišťována aktivovaným proteinem C (APC) (Škorňová, 2021).

### Prokonvertin – FVII

Aktivní forma FVII se podílí na zahájení koagulační odpovědi. Asi 1 % celkového proteinu FVII se neustále vyskytuje v aktivované formě. K jeho další aktivaci dochází až po navázání na tkáňový faktor. Faktor VII může být reaktivován četnými proteázami, vytvářejícími se při koagulačních reakcích. Množství vytvořeného trombinu je závislé na koncentraci FVIIa v plazmě a také na koncentraci TF uvolněného z poškozené tkáně (Mann, 2003).

K inhibici FVII dochází ihned po zahájení koagulace pomocí TFPI. FVII je závislý na vitamínu K a je syntetizován játry. Pro snížení této syntézy se při antikoagulační léčbě užívá warfarin (Škorňová, 2021).

### Antihemofilický faktor – FVIII

Jedná se o základní protein v koagulačním systému. Defekt genu pro faktor VIII vede ke vzniku hemofilie typu A. Je syntetizován v jaterních sinusových a endoteliálních buňkách. Cirkuluje v celém těle (kromě jater) v neaktivní formě v komplexu s vWF. Po aktivaci trombinem se vyváže z komplexu a působí jako kofaktoru FIXa, kdy v přítomnosti vápenatých iontů a fosfolipidů aktivuje FX na FXa (Škorňová, 2021).

### Christmas faktor – FIX

Jde o jednořetězcový glykoprotein syntetizovaný v játrech za účasti vitamínu K. Gen pro syntézu nacházíme na X chromozomu. Při koagulaci může být aktivován pomocí komplexu [FVIIa/TF] nebo FXIa. Jeho aktivní forma je sama o sobě schopna štěpit FX na FXa. Pokud se ale štěpení zúčastní FVIIIa s fosfolipidy a vápenatými ionty, toto štěpení proběhne asi 10 000x rychleji. Tento komplex označujeme jako „vnitřní tenáza“. Pokud poklesne funkční aktivita o 20-30 %, dochází k poruchám hemostázy. V případě defektu genu pro syntézu FIX vzniká hemofilie typu B (Kvasnička, 2003).



### Stuart-Prowerův faktor – FX

Nachází se v centrální poloze koagulační kaskády a hraje tak roli ve všech drahách koagulační kaskády (vnitřní, vnější a společné). Stává se tak terapeutickým cílem pro zvýšení či snížení produkce trombinu. K jeho aktivaci dochází buďto vnitřní nebo vnější cestou. Ve společné dráze se pojí s kofaktorem FVa v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  a fosfolipidů za vzniku „protrombinázy“ neboli fyziologického aktivátoru protrombinu, který má velký vliv na tvorbu trombinu, ale i tvorbu krevních sraženin (Camire, 2021).

### Rosenthalův faktor – FXI

Jedná se o zymogen enzymu FXIa, který aktivuje FIX. Jeho strukturní rysy se liší od K dependentních koagulačních proteáz. V krvi cirkuluje v komplexu s vysokomolekulárním kininogenem (HMWK). V komplexu s HMWK cirkuluje v krvi také monomerní homolog faktoru XI prekalkrein, jež má stejnou strukturu domény (Emsley, 2010).

### Hagemanův Faktor – FXII

Přestože byl FXII identifikován jako srážecí faktor, víme dnes, že jeho přítomnost v hemostáze není nezbytná. Řadí se mezi faktory kontaktní fáze. Může být aktivován kontaktem s nefyziologickým povrchem, čehož se využívá při laboratorním stanovení zkoumajícím vnitřní dráhu koagulace. Aktivace FXII je spjata s aktivací kalikrein-kininového systému (vedoucí k produkci bradykininu), aktivací fibrinolytického systému a systému komplementu. Mimo jiné se účastní i angiogeneze (De Maat, 2016).

### Faktor stabilizující fibrin – FXIII

Jde o zymogenní formu tzv. glutaminyl-peptid  $\gamma$ -glutamyl transferázy, vyskytující se v plazmě ve vazbě s fibrinogenem, v monocytech, megakaryocytech, osteoblastech, trombocytech, játrech či placentě. Struktura FXIII se liší podle místa výskytu. FXIII přítomný v plazmě je tvořen játry a má strukturu tetrameru obsahující 2 páry podjednotek A a B. Naopak FXIII, který je tvořený a zároveň se vyskytující v těchto buňkách, má strukturu dimeru složeného ze 2 stejných A řetězců. Jednotky A v plazmě mají stejnou funkci jako jednotky A

v buňkách, kterou je zajištění stabilizace tkání s kovalentně vázanými proteiny. Naopak podjednotka B působí v regulaci aktivace FXIII.

Hlavní funkcí FXIIIa je stabilizace fibrinové sraženiny a provazování  $\alpha$  a  $\gamma$  řetězců fibrinu za současného vzniku homopolymeru. Může také ovlivňovat substráty jako jsou fibronectin, kolagen, FV, vWF a  $\alpha$ -2antiplazmin. Kromě těchto funkcí je také schopen ovlivňovat hojení ran a udržet plod v době těhotenství (Pecka, 2004).

### Prekalikrein – PK

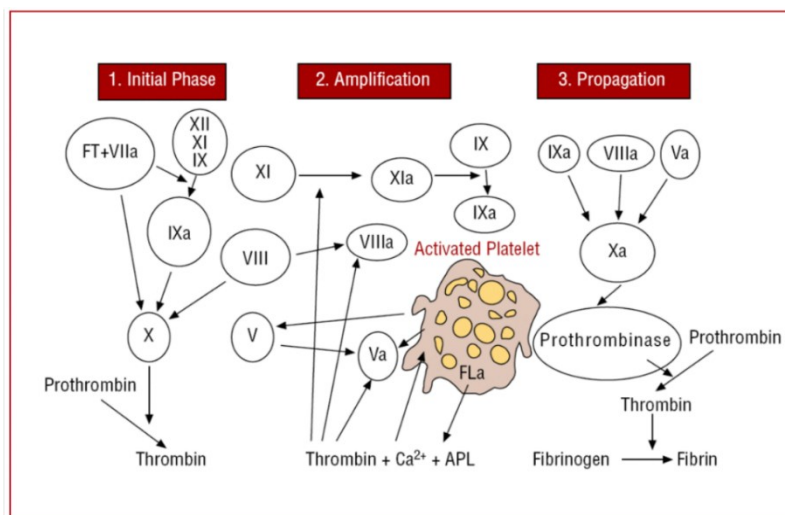
Je proteináza tvořená ve slinivce břišní a játrech. Plazmatický prekalikrein je přeměňován pomocí FXIIa na plazmatický kalikrein. Ten je schopen uvolňovat bradykinin z HMWK. Jedná se o zánětlivý peptid vyvolávající bolest a vazodilataci. Plazmatický kalikrein zároveň aktivuje FXII a vytváří tak pozitivní zpětnou vazbu aktivace (Leung, 2022).

### Vysokomolekulární kininogen – HMWK

Jako kininogeny označujeme plazmatické proteiny, jejichž syntéza probíhá v játrech a endotelu pupečnickových žil. Za účasti prekalikreinu či dalších kininogenáz vznikají z kininogenů vazoaktivní peptidy tzv. kininy. Mezi ně řadíme např. již zmiňovaný bradykinin nebo lysylbradykinin. Funkcí kininů je vázání se s FXI a prekalikreinem při poškození cévní stěny takovým způsobem, aby došlo k vytvoření správné vazebné polohy pro FXII.

Při aktivaci FXII pomocí kalikreinu je důležitá přítomnost HMWK, jelikož zde působí jako kofaktor. Umožňuje také vyvázání prekalikreinu a faktoru XI na záporně nabitě povrchy (Pecka, 2004).

**Obrázek č.1 - Nový model koagulace**



Zdroj: Převzato z (revespcardiol, <https://www.revespcardiol.org/en/the-new-coagulation-cascade-and/articulo/13114167/>, 3.5.2023)

### 5.1.8 Systém přirozených inhibitorů hemostázy

Přirozené inhibitory krevního srážení a fibrinolýzy slouží v organismu k regulaci celého procesu hemokoagulace. Jde o přirozeně se vyskytující složky v krvi, jejichž cílem je zabránit nekontrolovatelnému srážení krve a udržet tak hemostázu v rovnováze. Dělí se na specifické, jejichž cílem je inhibice jednoho či více koagulačních faktorů a nespecifické, které inhibují proteolytické enzymy ( $\alpha_2$ -makroglobulin,  $\alpha_1$ -antitrypsin a C1 – inhibitor). Mezi specifické inhibitory hemostázy řadíme antitrombin, systém aktivovaného proteinu C (kofaktorem je protein S), heparinový kofaktor II a inhibitor tkáňového faktoru (TFPI). Naopak k specifickým inhibitorům fibrinolýzy řadíme  $\alpha_2$ -antiplazmin, inhibitory aktivátorů plazminogenu (PAI) a trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI) (Dobrotová, 2006).

### 5.1.9 Fibrinolytický systém

Hlavní funkcí fibrinolytického systému je lýza stabilního fibrinového koagula. Dále hraje roli při degradaci kolagenu, metastáz tumoru, angiogenezi, účastní se nidace oplodněného vajíčka a při jeho fyziologické funkci udržuje hemostatickou rovnováhu. Vzniklé fibrinové koagulum ovlivňuje tok krve a při silné aktivaci koagulačního systému by mohlo dojít až k uzavření krevní cévy. Právě tomu fibrinolytický systém zabraňuje.

Řadou aktivačních a reakčních kroků je fibrinolýza podobná plazmatickému koagulačnímu systému. Jeho centrální složkou je plazminogen, který aktivují zejména prekurzory serinových proteáz – tkáňový aktivátor plazminogenu (*t*-Pa) a urokináza (*u*-Pa).

Principem fibrinolýzy je navázání plazminogenu na fibrinové koagulum, jeho aktivace na plazmin, působením aktivátorů uvolněných z endotelu cévy a následné proteolytické štěpení fibrinového koagula za vzniku fibrin degradačních produktů. Zbylý plazmin je nakonec inaktivován antiplazminy. Fyziologicky probíhá fibrinolýza jen v místě poranění, kdy tvorba plazimu probíhá jen na povrchu koagula. Její schopnost štěpit fibrin je zajištěna díky zvýšené afinitě plazminogenu a jeho aktivátoru k fibrinu (Šlechtová, 20007).

### 5.3 Patologie hemostázy

Snahou organismu je udržet dynamickou hemostatickou rovnováhu, protože její rozkolísání může vést ke vzniku závažných klinických projevů. Vychýlení hemostázy na stranu hypokoagulace vede ke krvácivým projevům, naopak hyperkoagulační stavy vedou k trombotickým a tromboembolickým komplikacím.

Jako krvácivé poruchy označujeme skupinu nemocí a stavů charakterizovaných zvýšeným krvácením. Vznikají na základě různých poruch na úrovni cévní stěny, trombocytů, plazmatické fáze koagulačního systému či fibrinolytického systému (Dobrotová, 2006).

Opakem krvácivých stavů jsou stavy trombotické, které vedou ke zvýšenému vzniku trombóz v cévách. K její klinické manifestaci je zpravidla nezbytná přítomnost většího počtu rizikových faktorů, než je tomu u krvácivých stavů. Mezi rizikové faktory patří: věk nad 45 let, operace, poranění, obezita, nádorová onemocnění, tromboembolická nemoc, varixy apod. Mezi vrozené trombofilie řadíme defekty přirozených inhibitorů krevního srážení, změny reologických poměrů, ovlivňující tok krve, poruchy koagulačních faktorů a fibrinolytického systému. Jedná se např. o zvýšení koncentrace fibrinogenu a FVIII, deficit proteinů C a S, deficit antitrombinu, rezistenci na aktivovaný protein C, způsobený nejčastěji Leidenskou mutací FV, či Cambridge mutací FV, mutace protrombinu, syndrom lepkavých destiček a další (Penka, 2009).

## 5.4 Možnosti laboratorního stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů v plazmě

Mezi základní screeningová vyšetření, která se běžně používají ve všech hematologických laboratořích řadíme skupinové koagulační testy. Principem stanovení je měření času potřebného k vytvoření fibrinového koagula, měřený od chvíle, kdy se k testovanému vzorku přidá startovací reagentie. Detekce vytvořeného koagula může probíhat buďto mechanicky nebo opticky. Při optické detekci se sleduje změna průchodnosti světelného paprsku přes měřicí kyvetu, ve které vzniká fibrinové koagulum. Tento typ detekce může být ovlivněn, pokud je plazma hemolytická, ikterická či chylózní. Při mechanické detekci se vznikající fibrinové koagulum detekuje změnou pohybu kovové kuličky v magnetickém poli.

Kromě skupinových testů můžeme pomocí testů specifických vyšetřit funkční aktivitu jednotlivých koagulačních faktorů. Základem jsou testy koagulační, u některých koagulačních faktorů máme navíc k dispozici metodu spektrofotometrickou, která se používá v případě, že je koagulační metoda ovlivněna nějakou interferencí. Poslední možností je vyšetření antigenu jednotlivých koagulačních faktorů (Penka, 2009).

### 5.4.1 Screeningové testy

#### Aktivovaný parciální tromboplastinový test – APTT

APTT se v praxi užívá k monitorování faktorů vnitřní cesty koagulace. Odráží aktivitu faktorů XII, XI, IX, VIII, PK, HMWK, ale také dalších faktorů, vedoucích k tvorbě fibrinového koagula (FX, FV, FII, FI) (Walker, 1990).

Vyšetřuje se z citrátové plazmy, ke které se přidá parciální tromboplastin (obsahující fosfolipidy) a záporně nabitě látky (aktivátory) jako je např. kaolin, oxid křemičitý, silika, polyfenoly, kyselina elagová a další. Aktivátor způsobí aktivaci FXII a po přidání vápenatých iontů se začne měřit čas do vytvoření fibrinového koagula. Fyziologické rozmezí se liší podle použité reagentie, nejčastěji se pohybuje v rozmezí 25–40 sekund, poměr R času pacienta/času kontrolní plazmy má fyziologické hodnoty v rozmezí 0,8-1,2. Test patří mezi základní koagulační vyšetření a používá se např. při podezření na krvácivý stav, jako předoperační vyšetření, v diagnostice diseminované intravaskulární koagulace, k získání výchozí hodnoty před zahájením antikoagulační léčby, k monitorování léčby nefrakcionovaným heparinem či při sledování léčby parenterálními přímými inhibitory trombinu jako je argatroban a hirudin.

Příčina prodloužení testu APTT může být vrozená či získaná. Mezi dědičné poruchy patří např. nedostatek FVIII; FIX nebo FXI způsobující hemofilii, nedostatek FXII; prekalkreinu nebo HMWK či defekt vWF způsobující von Willebrandovu chorobu.

Mezi získané příčiny prodloužení testu APTT řadíme: získaný von Willebrandův syndrom, Lupus antikoagulans, přítomnost získaných inhibitorů faktorů VIII; IX; XI a XII, působení heparinu; dabigatranu; argatrobanu či přímých inhibitorů pro FXa (Zehnder, 2022).

### Protrombinový test – PT

V praxi se používá pro monitorování vnější cesty koagulace a aktivace protrombinu na trombin. Zachycuje tak FII, FV, FVII, FX a fibrinogen (Walker, 1990).

Test se provádí z citrátové plazmy pacienta v přítomnosti tkáňového tromboplastinu a vápenatých iontů. Pomocí optických či elektromechanických přístrojů se měří čas od přidání startovací reagentie do vytvoření fibrinového koagula. Výsledek se vydává ve formě poměru času pacienta ku času normální kontrolní plazmy nebo jako INR.

INR je bezrozměrné číslo, které se vypočítá jako poměr času pacienta ku času normální kontrolní plazmy umocněný hodnotou „ISI“, což je mezinárodní index citlivosti použitého tromboplastinu, odvozený od mezinárodního referenčního tromboplastinu.

Hodnota INR byla vytvořena proto, aby pacientům užívající warfarin bylo umožněno porovnávat hodnoty získané v různých laboratořích.

$$INR = [PT\ pacienta \div\ kontrolní\ PT]^{ISI}$$

Protrombinový test se využívá k hodnocení nevysvětlitelného krvácení, diagnostice DIC, získání výchozí hodnoty před zahájení antikoagulační léčby, monitorování léčby warfarinem a posouzení syntetické funkce jater. Rovněž je součástí každého předoperačního vyšetření.

Příčiny prodloužení PT mohou být zapříčiněny dědičným nedostatkem FVII, získaným nedostatkem vitamínu K, nemocí jater, DIC či podáním velkého množství warfarinu (Zehnder, 2022).

### Stanovení koncentrace fibrinogenu

Pro stanovení koncentrace a vlastně i funkční aktivity fibrinogenu se užívá Claussova metoda, kdy se do zředěné vyšetřované plazmy přidá v nadbytku trombinové činidlo.

Existuje i metoda tzv. „odvozeného fibrinogenu“, umožňující odhad koncentrace fibrinogenu z PT srážecí křivky pomocí automatického optického koagulometru (Bronić, 2019).

Fyziologické hodnoty koncentrace fibrinogenu se pohybují mezi 1,8 – 4,2 g/l. Snížené hodnoty mohou poukazovat na hypofibrinogenemii, afibrinogenemii a poruchy jaterního parenchymu. Naopak zvýšené hodnoty bývají v těhotenství, při nádorových onemocněních, zánětech a pooperačních stavech (Penka, 2009).

## **5.4.2 Stanovení aktivity dalších koagulačních faktorů**

### Metoda koagulační

Pro stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů se nejvíce užívá tzv. koagulační jednofázová metoda postavená na základě testu APTT či PT.

Principem stanovení je smíchání ředěné vyšetřované plazmy s příslušnou deficitní plazmou, obsahující všechny koagulační faktory v nadbytku kromě toho, který vyšetřujeme. V případě, že vyšetřujeme faktor vnitřní cesty, nás zajímá koagulační čas v systému APTT. Směs ředěné vyšetřované plazmy a deficitní plazmy je inkubována s APTT reagentii. Reakce je po inkubaci odstartována přidávkem  $\text{Ca}^{2+}$ . U faktoru vnější cesty měříme koagulační čas v systému protrombinového testu. Ke směsi ředěné vyšetřované plazmy a deficitní plazmy je po inkubaci přidán tromboplastin s vápenatými ionty.

Vyhodnocení se provádí odečtem z kalibrační křivky, která je vyjádřena jako závislost koagulačního času na procentu koagulační aktivity. Kalibrace je prováděna pomocí firemní kalibrační plazmy s přesně deklarovanou hodnotou koagulační aktivity příslušného koagulačního faktoru (Penka, 2011).

### Metoda spektrofotometrická využívající chromogenní substrát

V případě, kdy je výsledek koagulační metody ovlivněný interferencí, např. přítomností protilátek typu lupus antikoagulans, můžeme použít metodu spektrofotometrickou, která není interferencí ovlivněna.

Tato metoda využívá schopnost aktivovaných faktorů působit jako enzym a štěpit tak specifické chromogenní substráty (Penka, 2011).

Ke stanovení se používají metody přímé a nepřímé detekce. Metoda přímé detekce je založena na aktivaci složky, která se stanovuje a její forma poté přímo štěpí chromogenní substrát na chromofor a produkt. Při nepřímé metodě se složka, kterou stanovujeme, váže do komplexu s další aktivní složkou. Následně nevyvázaná část aktivní složky je schopna štěpit substrát na produkt (Pecka, 2004).

Tato metoda se v praxi používá ke stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů VIII a IX. Při vyšetření lze použít větší ředění vzorku, což umožní potlačení vlivu interferencí, které znemožňují koagulační stanovení.

Nevýhodou je, že metoda nezahrnuje řešení problematiky strukturálního uspořádání koagulačně aktivních komplexů, což může vést k získání odlišných výsledků od hodnot získaných koagulační metodou (Pecka, 2004).

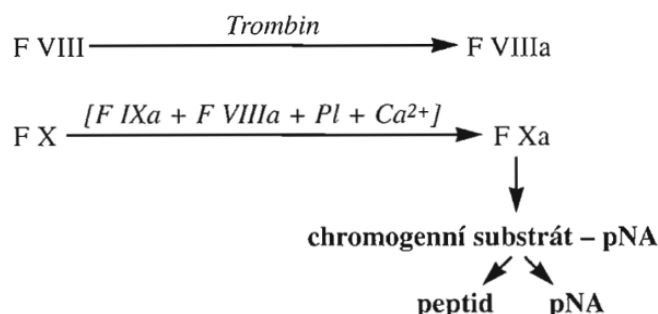
### Dvoustupňová metoda stanovení faktoru VIIIa

Jde o spektrofotometrické měření užívané pro kvantitativní stanovení aktivity faktoru VIII v lidské citrátové plazmě nebo v terapeutických koncentrátech. Principem metody je stanovení aktivity FVIII v přítomnosti vápníku a fosfolipidů. Díky jejich přítomnosti dochází k aktivaci FVIII přidaným trombinem a tvorbě komplexu s přidaným faktorem IXa. Vzniká komplex vnitřní tenázy, který aktivuje FX, ten následně hydrolyzuje chromogenní substrát a uvolní z něho paranitroanilin (pNa). Množství vyloučeného paranitroanilinu, měřeného při vlnové délce 405 nm, je přímo úměrné funkční aktivitě FVIII ve vzorku (BIOPHEN TM FVIII:C, 2022).

**Obrázek č.2 - Metoda přímé detekce**

■ **Dvoustupňová metoda**

*Faktor VIIIa*



Zdroj: Převzato z (Pecka M., 2004)



### Dvoustupňová metoda stanovení faktoru IX

Jedná se o chromogenní test užívaný pro stanovení aktivity faktoru FIX. V přítomnosti fosfolipidů a vápníku přidaný FXIa aktivuje FIX přítomný ve vzorku. Mezitím dojde k aktivaci faktoru VIII pomocí přidaného trombinu. Aktivovaný FIX vytvoří s aktivovaným FVIII komplex vnitřní tenázy, který aktivuje FX. Ten je schopen hydrolyzovat chromogenní substrát, čímž dojde k uvolnění paranitroanilinu (měřeného při vlnové délce 405 nm). Množství uvolněného pNa je přímo úměrné funkční aktivitě FIX ve vzorku (BIOPHEN TM FIX, 2021).

## 6. Praktická část

V praktické části bakalářské práce jsem se zabývala porovnáváním výsledků funkční aktivity jednotlivých faktorů vnitřní cesty koagulace, tedy FVIII, FIX, FXI a FXII, naměřených původními reagensy STA PTT A 5 s příslušnými deficitními plazmami a současně novými, testovanými reagensy STA C. K. Prest 5 v kombinaci s příslušnými imunodeficitními plazmami.

Důvodem tohoto měření bylo otestování nových reagensů před jejich zavedením do provozu laboratoře. Aby se nová reagensie mohla začít používat, je nutné provést srovnávací studii a ověřit na souboru pacientů, že nové a původní reagensie poskytují srovnatelné výsledky. Naměřené výsledky jsem porovnála a statisticky vyhodnotila.

### 6.1 Vyšetřovaný materiál

Pro vyšetření se odebírá venózní krev do plastové zkumavky s 3,2 % citrátem sodným v poměru 9:1. Zkumavka se opatrně promíchá, aby se protisrážlivý roztok dostal do celého objemu krve a co nejdříve se transportuje do laboratoře. Transport by měl proběhnout nejdéle do 2 hodin po odběru při teplotě 15-25 °C.

V laboratoři se provede centrifugace vzorku po dobu 10 minut při 3500 ot./min, stáhne se plazma a provede se vyšetření. V případě, že se plazma nepoužije ihned, může se skladovat při -20 °C po dobu jednoho měsíce a při -70 °C až 3 měsíce. Pokud je poté potřeba plazmu vyšetřit, nechá se rozmraznout při 37 °C a následně se temperuje při stejné teplotě po dobu 15 minut (SOPV 011, verze č.10).

### 6.2 Automatický koagulometr STA-R Evolution

Automatický koagulometr slouží k měření základních koagulačních testů (PT, APTT, fibrinogen, TT) a také testů založených na spektrofotometrických (antitrombin, anti-Xa aktivita) a imunoturbidimetrických principech (D-dimery). Přístroj je dále schopen vyšetřovat aktivitu koagulačních faktorů, diagnostikovat protilátky typu lupus atikoagulans a mnoho dalších.

Při měření koagulačních testů přístroj detekuje tvorbu fibrinového koagula tak, že se v kyvetě pohybuje kovová kulička a po přidání startovací reagensie se začne měřit čas.

V kyvetě se vzorek promíchává a pomalu se začínají vytvářet fibrinová vlákna. S přibývajícím množstvím fibrinu se v měřicí kyvetě zvyšuje viskozita, dochází ke zpomalení pohybu kuličky v magnetickém poli, až dojde k jejímu úplnému zastavení.

V případě spektrofotometrických a imunoturbidimetrických metod je princip detekce založen na měření změny absorbance při vlnových délkách 405 nm pro spektrofotometrické a 540 nm pro imunoturbidimetrické testy.

Přístroj obsahuje 220 pozic pro patientské vzorky, 75 pozic pro reagentie a také zásobník na 1000 měřících kyvet. Reagenční zásuvka má 3 části. Do první části R0 se vkládá kromě kalibračních a kontrolních plazem také ředící Owren-Kollerův pufr. Do části označené R1 se umisťují reagentie, které se pipetují před inkubací (pufry, APTT reagentie) a v části R2 jsou pak reagentie startovací (kalcium, trombin) (SOPT 010, verze 03, 2017).

Pro získání jednotlivých výsledků měření aktivity koagulačních faktorů, byl pro mou práci použit právě automatický koagulometr STA-R Evolution od firmy *Diagnostica Stago*, který se nachází v laboratoři IV. interní hematologické kliniky ve FN Hradec Králové, tudíž byl nezbytný jeho popis.

**Obrázek č.3 - Automatický koagulometr Star-R Evolution**



Zdroj: Převzato z (EQUIPNET, <https://www.equipnet.com/auctions/stago-sta-r-evolution-automated-hemostasis-an-listid-913705/>, 22.03.2023)

### 6.3 Principy metody

Smísením zředěné vyšetřované plazmy s deficitní plazmou bez obsahu stanovovaného faktoru (FVIII, FIX, FXI nebo FXII), ale se zvýšeným množstvím ostatních faktorů se zjišťuje čas do vytvoření fibrinového koagula v systému APTT. Čas do jeho vytvoření je nepřímo úměrný aktivitě stanovovaného faktoru v plazmě pacienta (SOPV 011, verze č.10, 2021; SOPV 027, verze č.9, 2021; SOPV 028, verze č.9, 2021; SOPV 029, verze č.9, 2021, SOPV 011, verze č.9, 2018; SOPV 027, verze č.8, 2018; SOPV 028, verze č.8, 2018; SOPV 029, verze č.8, 2018).

### 6.4 Použité reagentie, jejich příprava a stabilita

Nové, testované reagentie STA Immunodef VIII, IX, XI a XII a STA C.K. Prest 5 jsou vyrobeny firmou *Diagnostica Stago*, jejímž distributorem je firma *Biomedica* ČS. Původní, dosud používané reagentie DG-FVIII, FIX, FXI a FXII jsou od firmy Grifols a reagentie STA PTT A 5 je od firmy Diagnostica Stago. Během stanovení se kromě reagentií používá také roztok CaCl<sub>2</sub> (o koncentraci 0,025 mol/l) a Owren-Kollerův pufr (SOPV 011, verze č.10, 2021; SOPV 027, verze č.9, 2021; SOPV 028, verze č.9, 2021; SOPV 029, verze č.9, 2021).

#### Reagentie STA Immunodef VIII, IX, XI a XII

Balení obsahuje 6 x 1ml příslušné lyofilizované deficitní plazmy. Při přípravě této reagentie se do lahvičky přidá přesně 1 ml vody pro injekce, nechá se rozpouštět při laboratorní teplotě po dobu 30 minut, a nakonec se opatrně promísí (SOPV 011, verze č.10, 2021; SOPV 027, verze č.9, 2021; SOPV 028, verze č.9, 2021; SOPV 029, verze č.9, 2021).

#### Reagentie STA C. K. Prest 5

Balení obsahuje 6 x 5 ml reagentie č.1 obsahující kefalin a 6 x 5 ml reagentie č. 2 složené z pufrované suspenze kaolinu sloužící jako aktivátor. Před použitím musí dojít k promíchání reagentie č.2 a nalítí celého jejího obsahu do lahvičky s reagentií č.1. Opět se lahvička opatrně promíchá a nechá se rozpouštět při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po uplynuté době se znovu promísí, vloží se do lahvičky míchadlo a nechá se před měřením nejméně 20 minut promíchávat v přístroji (SOPV 011, verze č.10, 2021; SOPV 027, verze č.9, 2021; SOPV 028, verze č.9, 2021 SOPV 029, verze č.9, 2021).

Reagencie DG-FVIII/DG-FIX/DG-FXI/DGFXII

Balení obsahuje 5x1 ml příslušné lyofilizované deficitní plazmy. Před použitím se obsah lahvičky naředí přesně 1 ml vody pro injekce, promíchá se a nechá se 30 minut rozpouštět při laboratorní teplotě (SOPV 011, verze č.9, 2018; SOPV 027, verze č.8, 2018; SOPV 028, verze č.8, 2018; SOPV 029, verze č.8, 2018).

STA PTT A 5

Balení obsahuje 12 x 5 ml reagentie, kterou tvoří lyofilizované fosfolipidy z mozkové tkáně králíka společně se stabilizátory v pufované suspenzi křemičitanového aktivátoru. Před použitím se obsah lahvičky naředí 5 ml vody pro injekce a nechá se rozpouštět nejméně 60 minut při laboratorní teplotě. Důležité je intenzivní promíchání před vložením do přístroje (SOPV 011, verze č.9, 2018; SOPV 027, verze č.8, 2018; SOPV 028, verze č.8, 2018; SOPV 029, verze č.8, 2018).

**Tabulka č.1 - Stabilita reagentií, roztoku a pufru**

Název	Teplota (°C)	Doba stability
STA C. K. Prest 5 (lyofilizovaná)	2-8 °C	do expirace
STA C. K. Prest 5 (naředěná)	15–19 °C	24 h
	2-8 °C	7 dnů
STA PTT A 5 (lyofilizovaná)	2-8 °C	do expirace
STA PTT A 5 (naředěná)	15–19 °C	24 h
	2-8 °C	7 dnů
(FVIII, FIX, FXI nebo FXII) deficitní plazma (lyofilizovaná)	2-8 °C	do expirace
(FVIII, FIX, FXI nebo FXII) deficitní plazma – naředěná	15–19 °C	8 h
roztok CaCl <sub>2</sub>	15–19 °C	3 dny
Owren-Kollerův pufr	15–19 °C	3 dny

*Zdroj: (SOPV 011, verze č. 10, 2021; SOPV 011, verze č.9, 2018), vlastní zpracování*

## 6.5 Nastavení přístroje

**Tabulka č.2 - Nastavení přístroje pro stanovení aktivity faktorů VIII, IX, XI, a XII**

Nastavení koagulometru	Základní metoda	Závislá metoda
Vyšetřovaná plazma	50 µl	50 µl
Ředění Owern-Kollerovým pufrem	1/10	1/40
STA Immunodef	50 µl	50 µl
STA C. K. Prest 5	50 µl	50 µl
Inkubace	240 s	240 s
0,025 mol/l CaCl <sub>2</sub>	50 µl	50 µl
Měření času do vytvoření fibrinového koagula.		

*Zdroj: (SOPV 011, verze č. 10, 2021), vlastní zpracování*

Pozn.: U faktoru VIII je v současné době většina hodnot vyšetřovaných patientských vzorků nad 150 %, takže aby se nemuselo vše přeměřovat, byla vytvořena metoda závislá, která se měří jako první. Teprve v případě, že je výsledek aktivity faktoru VIII pod 100 %, přeměřuje se vzorek metodou základní. Ostatní koagulační faktory vnitřní cesty IX, XI a XII se vyšetřují pouze v režimu „základní metody“.

V případě nízké aktivity koagulačního faktoru si přístroj výsledek automaticky přeměřuje s menším ředěním. U faktoru VIII je to v případě, že je aktivita nižší než 3,3 %, dojde k přeměření vzorku s ředěním 1/2. U FIX je tomu stejně. Naopak hodnoty aktivity u FIX, které jsou vyšší než 150 % se automaticky v koagulometru přeměří s ředěním 1/40 (SOPV 011, verze č.10, 2021; SOPV 027, verze č.9, 2021).

U FXI se hodnoty aktivity pod 3,3 % automaticky přeměřují s ředěním vzorku 1/3. Pokud jsou hodnoty aktivity vyšší než 120 %, dojde k přeměření s ředěním vzorku 1/20 (SOPV 028, verze č.9, 2021).

Hodnoty aktivity FXII, které jsou nižší než 10,0 %, se automaticky přeměřují s ředěním vzorku 1/5. V případě hodnot vyšších než 130 % jsou vzorky přeměřeny v ředění 1/40. (SOPV 029, verze č.9, 2021).

## 6.6 Fyziologické meze

**Tabulka č.3 – Fyziologické meze a rozsah měření jednotlivých metod**

Faktor	Fyziologické rozmezí	Rozsah měření
VIII	50–150 %	0,7 – 600 %
IX	50–150 %	0,7 – 600 %
XI	65–135 %	1,0 – 200 %
XII	60–140 %	5,0 – 200 %

*Zdroj: (SOPV 011, verze č.10, 2021; SOPV 027, verze č.9, 2021; SOPV 028, verze č.9, 2021 SOPV 029, verze č.9, 2021), vlastní zpracování*

## 6.7 Kalibrace metod

Provádí se pomocí komerční kalibrační plazmy, která má přesně deklarované hodnoty jednotlivých faktorů vnitřní cesty (FVIII, FIX, FXI nebo FXII). Přístroj automaticky vytvoří kalibrační křivku nařazením kalibrační plazmy na jednotlivé kalibrační body a změřením koagulačních časů jednotlivých kalibračních bodů. Kalibrační křivky původních metod byly lineární. U nových metod křivky nejsou lineární (lineární je pouze u FXII), jinak jsou to polynomy 2. stupně. Po provedení kalibrace se změřením atestovaných kontrolních plazem (s deklarovanými hodnotami) zjistí, zda kalibrace proběhla v pořádku. Pro kalibraci se užívá STA Unicalibrator od firmy *Diagnostica Stago*. Příprava této kalibrační plazmy probíhá jednoduchým nařazením 1 ml vody pro injekce s rozpouštěním při laboratorní teplotě po dobu 30 minut a následným promícháním (SOPV 011, verze č. 10, 2021).

## 6.8. Kontrola kvality

Vyšetření aktivity koagulačních faktorů VIII, IX, XI a XII se zpravidla provádí v sériích, tedy po nashromáždění určitého počtu vzorků. Před vyšetřením patientských vzorků se změní kontrola přesnosti s atestovanými kontrolními plazmami, z nichž jedna je normální a druhá je patologická. Pokud se naměřené hodnoty nacházejí v deklarovaném rozmezí daném výrobcem, není potřeba provádět kalibraci. V případě, že hodnoty vyjdou mimo tato rozmezí nebo používáme reagensii s novou šarží, musí se provést nová kalibrace a poté znovu kontrola kvality. Pro kontrolu kvality používáme reagensii STA System Control N + P od firmy *Diagnostica Stago*. Balení obsahuje 2 x 12 x 1 ml této reagensie, jejíž příprava probíhá taktéž nařazením obsahu lahviček 1 ml vody pro injekce, rozpouštěním po dobu 30 minut při

laboratorní teplotě a důkladným promícháním. Stabilita naředěné reagencie STA System Control N + P je jen 8 hodin, na rozdíl od lyofilizované, která je stabilní do expirace (SOPV 011, verze č. 10, 2021).

## 6.9 Pracovní postup

Vyšetření aktivity koagulačních faktorů jsem v rámci své práce prováděla v sériích, tedy po nashromáždění určitého počtu vzorků tak, aby nebyla překročena doba odezvy, kterou má laboratoř definovanou pro všechna vyšetření.

- 1) Nejprve jsem si naředila reagencie původní i nové reagencie pro stanovení koagulační aktivity jednotlivých faktorů vnitřní cesty, tedy APTT reagencie STA PTT A 5 a STA C. K. Prest 5, a dále příslušné deficitní plazmy – původní od firmy Grifols a nové imunodeficitní od firmy Stago. Dále jsem si naředila kalibrační plazmu STA Unicalibrator (Stago) a na kontrolu přesnosti si naředila STA System Control N + P (Stago). Vše podle návodu výrobce.
- 2) Naředěné a důkladně promíchané reagencie jsem vložila do reagenční zásuvky koagulometru. Originální reagencie firmy Stago se do přístroje načítají prostřednictvím čárového kódu na lahvičce, deficitní plazmy firmy Grifols se zadávají do přístroje ručně, kde se zapisuje ID a číslo šarže reagencie, díky které se automaticky zobrazí další informace o této reagenii. Také jsem vložila diluent pro vzorky – Owren-Kollerův pufr a roztok  $\text{CaCl}_2$ .
- 3) Metody využívající nové reagencie bylo nutné nejprve nakalibrovat. Přístroj *STA-R Evolution* provede kalibraci metod sám podle nastavení, které má uložené pro každou metodu. Potřebuje znát pouze výchozí koncentraci kalibrační plazmy pro jednotlivé koagulační faktory, která je přesně daná výrobcem. Tyto hodnoty jsou však v přístroji uloženy po načtení nové šarže kalibrátoru (načtením čárového kódu z příbalového letáku). Pokud není změna šarže reagenií, spustí se rovnou kontrola kvality a když kontroly vyjdou, kalibrace se nedělá.



- 4) Dále bylo potřeba provést kontrolu přesnosti a změřit tak atestované kontrolní plazmy STA System Control N + P. V případě, že by hodnoty nevyšly v daném rozmezí od výrobce, musela by se opakovat kalibrace.
- 5) Po úspěšně provedené kontrole kvality, jsem rozmrazila plazmy jednotlivých pacientů při 37 °C a zároveň je na stejnou teplotu vytemperovala a promíchala.
- 6) Následně jsem vzorky seřadila v pořadí dle pracovního listu a ve stejném pořadí je naskládala do stojánku pro následné měření. Vzorky byly vyšetřeny současně původními i novými reagensy.
- 7) Po dokončení měření přístroj vytiskl všechny výsledky. Hodnoty naměřené původními reagensy se automaticky přenesly do LIS. Výsledné hodnoty jsem zanesla do tabulek a poté použila pro statistické vyhodnocení metodou lineární regrese a Bland-Altmanovým grafem.

## 6.10 Výsledky a jejich statické vyhodnocení

U jednotlivých pacientů jsem současně změřila aktivitu koagulačních faktorů VIII, IX, XI a XII pomocí nových, testovaných reagensů STA C.K. Prest 5 + STA Immunodef VIII/IX/XI/XII a pomocí reagensů původních STA PTT A 5 + DG-FVIII/FIX/FXI/FXII. Výsledky jsem zpracovala do tabulek č. 4, 5, 6 a 7. Stanovení aktivity koagulačního faktoru VIII bylo vyšetřeno u 40 pacientů. Stanovení aktivity FIX, FXI a FXII bylo vyšetřeno u 30 pacientů. Následně jsem provedla statistické vyhodnocení těchto výsledků metodou lineární regrese a Bland – Altmanovým grafem v Microsoft Excel.

*Lineární regrese* se nejčastěji provádí společně s korelačním měřením. Výsledkem je přímka, která předpovídá hodnotu závislé proměnné Y od hodnoty nezávislé proměnné X. (Giavarina, 2015).

Při tvorbě grafů jsem vždy na osu X vynesla hodnoty naměřené původními reagensy STA PTT A 5 + DG-FVIII/FIX/FXI/FXII. Na osu Y jsem pak vynesla hodnoty naměřené novými, zaváděnými reagensy STA C.K. Prest 5 + STA Immunodef VIII/IX/XI/XII.

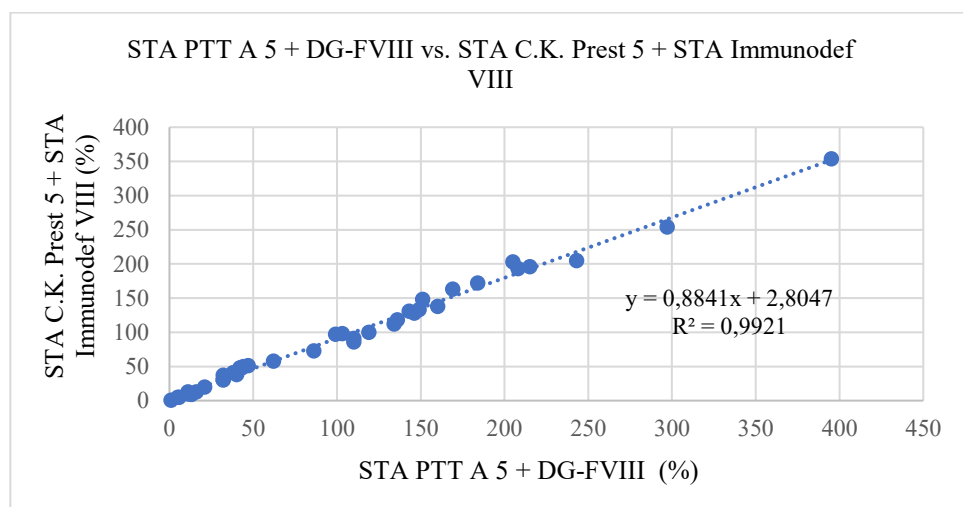
*Korelace* poukazuje na to, jak moc spolu jednotlivé páry proměnných souvisí. Jejím výsledkem je korelační koeficient značený „r“. Ten lze vypočítat jako poměr kovariance mezi proměnnými se současným součinem jejich směrodatných odchylek. Číselné hodnoty se tak pohybují od -1,0 do + 1,0. Čím blíže jsou koeficienty těmto hodnotám, tím silnější je lineární vztah. (Giavarina, 2015). Při hodnocení lineární regrese nestačí hodnotit pouze hodnotu korelačního koeficientu, musí se hodnotit také rovnice přímky.

*Bland-Altmanovy grafy* se využívají ve studiích ke srovnání metod s kvantitativními výsledky. Analyzují se průměry a rozdíly výsledných hodnot, které jsou zobrazeny v bodovém grafu s čarou, ukazující průměrný rozdíl mezi metodami (míra vychýlení) (Gerke, 2020).

Na ose Y je uveden rozdíl mezi jednotlivými výsledky měření a na ose X pak průměr těchto měření. Aby byla metoda dostatečně spolehlivá, musí se 95 % datových bodů nacházet v limitu shody, který se vypočítá jako: průměr rozdílů hodnot  $\pm 1,96 * SD$ . Hodnotíme šíři intervalu, průměr odchylek a polohu průměru odchylek (Giavarina, 2015).

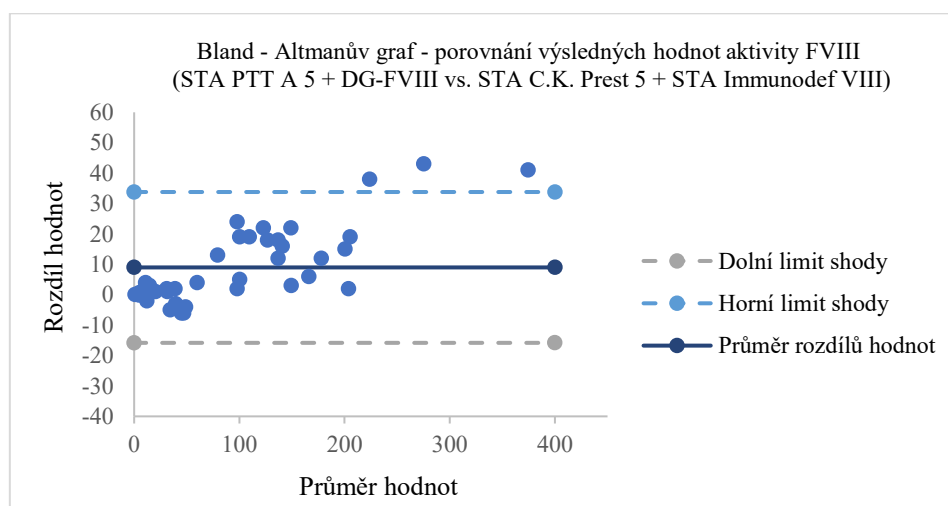
## 6.11 Hodnocení grafů

**Graf č.1 - Porovnání výsledků měření funkční aktivity FVIII metodou lineární regrese**



Zdroj: vlastní zpracování

**Graf č.2 - Bland-Altmanův graf porovnání výsledků měření hodnot aktivity FVIII**



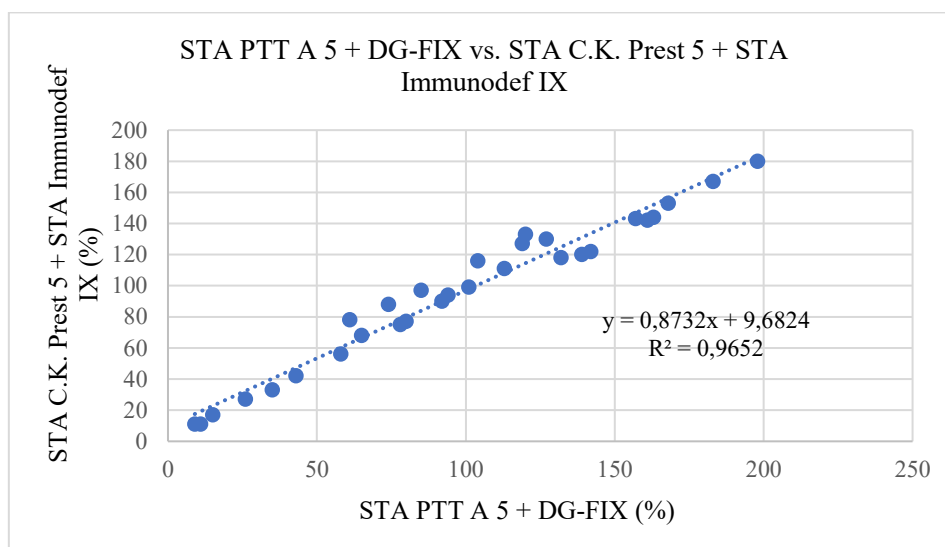
Zdroj: vlastní zpracování

Měřením aktivity koagulačního faktoru VIII původními a novými reagenčními, jsem získala při hodnocení výsledků metodou lineární regrese rovnici přímky ve tvaru  $y = 0,8841x + 2,8047$  s hodnotou  $R^2 = 0,9921$ , ze které můžeme zjistit, že korelační koeficient je roven hodnotě  $0,9960$ . V Bland-Altmanově grafu pro porovnání výsledků měření aktivity FVIII můžeme vidět, že průměr rozdílů hodnot je roven hodnotě  $8,99$ . Dolní limit shody se nachází na hodnotě  $-15,82$  a horní limit shody na hodnotě  $+33,79$ . V tomto intervalu leží  $92,5\%$  ze všech naměřených hodnot. Zbýlých  $7,5\%$  leží mimo limit shody.

Z naměřených hodnot i ze statistického vyhodnocení je patrné, že zejména v oblasti vyšších hodnot jsou výsledky naměřené původními reagenčními mírně vyšší než hodnoty naměřené novými reagenčními. Čím jsou naměřené hodnoty vyšší, tím je rozdíl mezi metodami

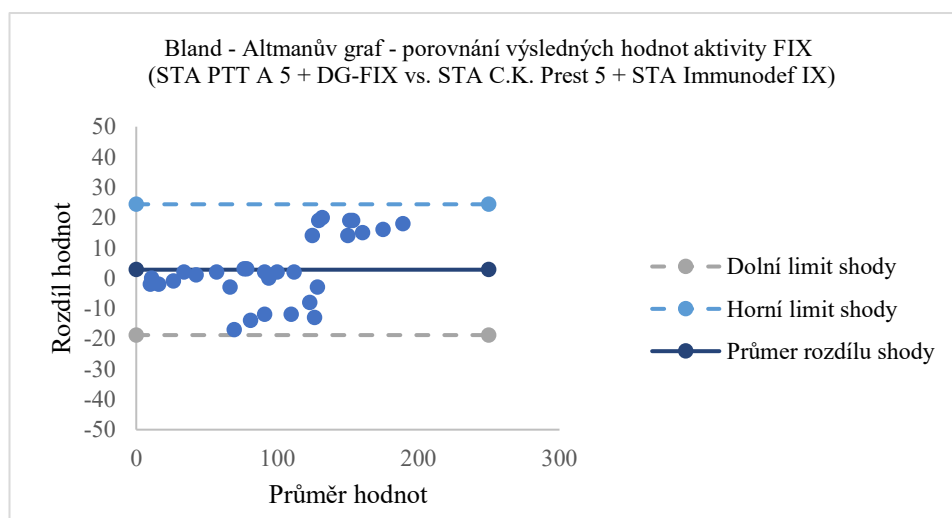
větší, nicméně z klinického pohledu nemá tento rozdíl zásadní význam.

**Graf č.3 - Porovnání výsledků měření funkční aktivity FIX metodou lineární regrese**



Zdroj: vlastní zpracování

**Graf č.4 - Bland-Altmanův graf porovnání výsledků měření hodnot aktivity FIX**

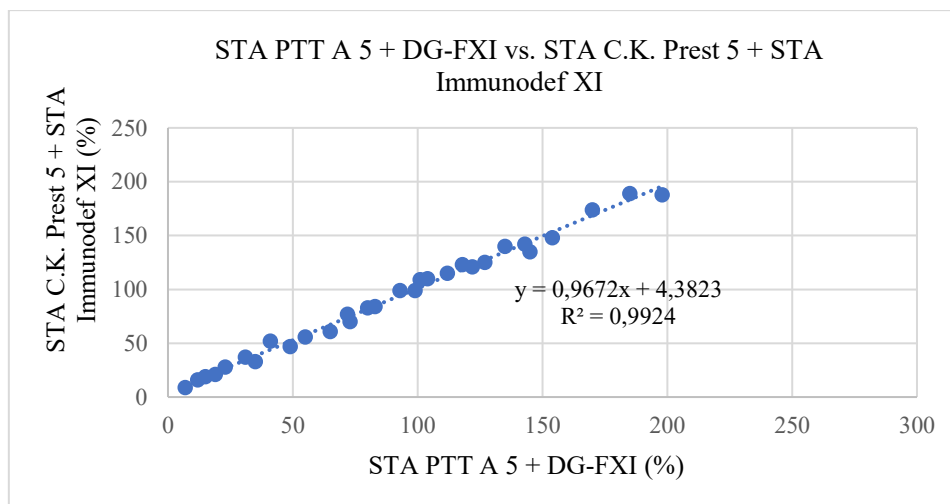


Zdroj: vlastní zpracování

V rámci hodnocení výsledků funkční aktivity FIX metodou lineární regrese jsem získala rovnici přímky ve tvaru  $y = 0,8732x + 9,6824$  s hodnotou  $R^2 = 0,9652$  a  $r = 0,9824$ . V Bland-Altmanově grafu pro porovnání výsledků aktivity FIX je průměr rozdílu hodnot roven hodnotě 2,8. Dolní limit shody leží na hodnotě -18,78 a horní limit shody na hodnotě +24,38, v tomto intervalu leží 100 % ze všech naměřených výsledků. V oblasti snížených hodnot aktivity FIX (cca do 65 %) dává metoda využívající nové reagentie prakticky shodné výsledky s metodou původní. V oblasti fyziologických hodnot jsou výsledky naměřené původními reagentiemi mírně nižší než hodnoty naměřené novými reagentiemi a v hodnotách vyšších, než horní

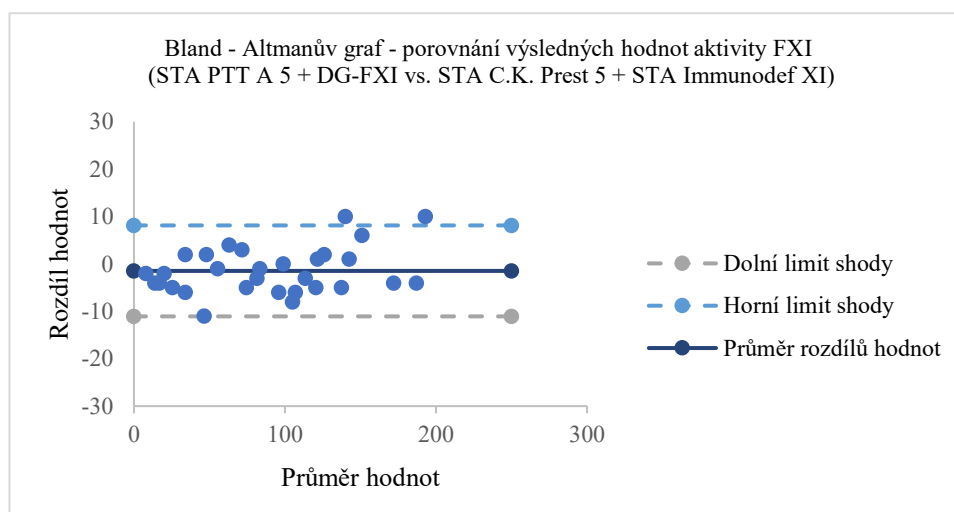
fyziologická mez jsou naopak hodnoty získané původní metodou vyšší než hodnoty získané metodou novou. Nicméně z klinického pohledu nemá tento rozdíl zásadní význam.

**Graf č.5 - Porovnání výsledků měření funkční aktivity FXI metodou lineární regrese**



Zdroj: vlastní zpracování

**Graf č.6 - Bland-Altmanův graf porovnání výsledků měření hodnot aktivity FXI**

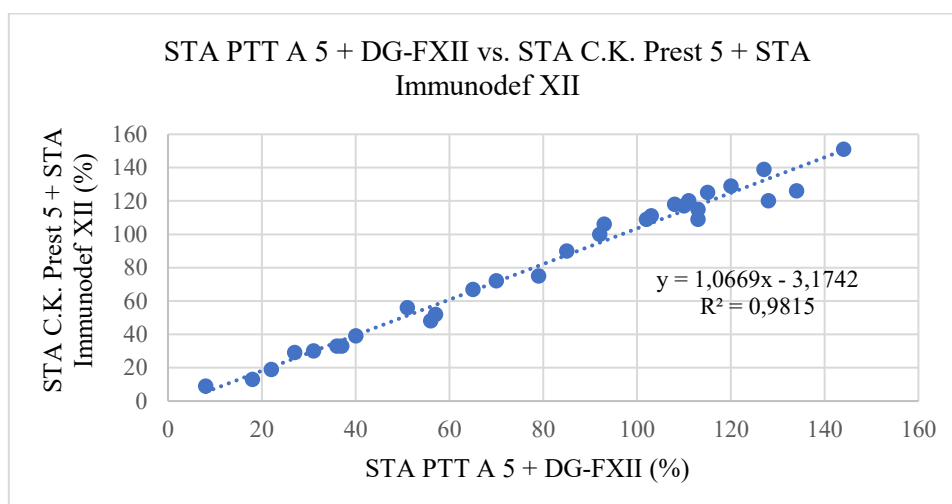


Zdroj: vlastní zpracování

Měřením aktivity koagulačního faktoru XI u 30 pacientů pomocí původních a nových reagensů jsem metodou lineární regrese získala rovnici přímky  $y = 0,9672x + 4,3823$  s  $R^2 = 0,9924$ , tedy  $r = 0,9962$ . V Bland-Altmanově grafu vidíme, že průměr rozdílů hodnot leží v hodnotě -2 a relativně úzký interval limitů shody v hodnotách od -11,07 do +8,13. V tomto intervalu leží 93,3 % ze všech naměřených výsledků.

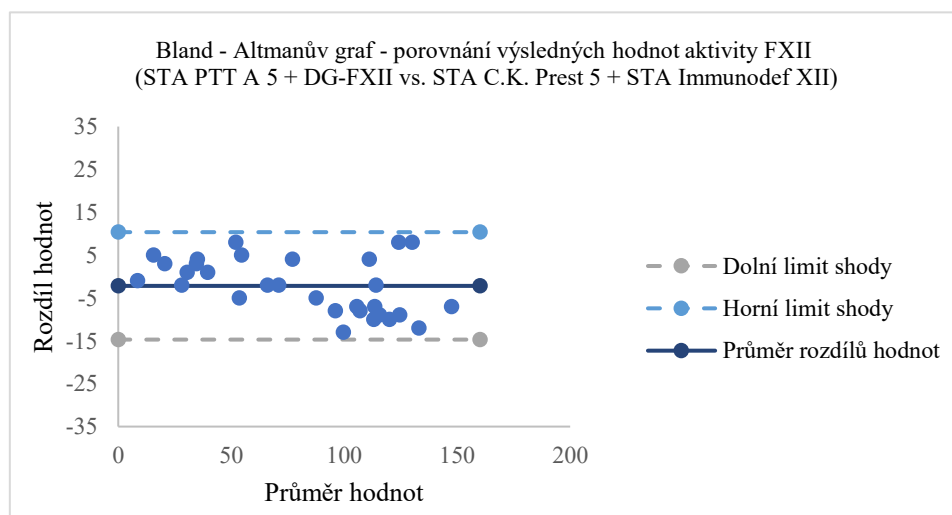
Vyhodnocením výsledků metodou lineární regrese i pomocí Bland-Altmanova grafu jsem došla k závěru, že hodnoty naměřené oběma metodami spolu v celém rozsahu měření velice dobře korelují a jsou srovnatelné.

**Graf č.7 - Porovnání výsledků měření funkční aktivity FXII metodou lineární regrese**



Zdroj: vlastní zpracování

**Graf č.8 - Bland-Altmanův graf porovnání výsledků měření hodnot aktivity FXII**



Zdroj: vlastní zpracování

Statistickým vyhodnocením výsledků aktivity koagulačního faktoru XII naměřených původními a novými reagensy jsem metodou lineární regrese získala rovnici přímky ve tvaru  $y = 1,0669x - 3,1742$  s hodnotou  $R^2 = 0,9815$ ,  $r = 0,9907$ . V Bland-Altmanově grafu je průměr rozdílů hodnot na hodnotě  $-2,17$ . Dolní limit shody leží na hodnotě  $-14,70$  a horní limit shody na hodnotě  $+10,37$ . V tomto intervalu leží 100 % ze všech naměřených hodnot.

Hodnoty naměřené oběma metodami spolu celkem dobře korelují a jsou srovnatelné. V oblasti fyziologických hodnot dává častěji nová metoda lehce vyšší hodnoty aktivity FXII než metoda původní, nicméně z klinického pohledu nemá tento rozdíl zásadní význam. V oblasti patologických hodnot (snížených) jsou výsledky prakticky srovnatelné.

## 7. Diskuse

Aktivovaný parciální tromboplastinový test je rutinní koagulační vyšetření, které se běžně používá k monitorování vnitřní koagulační cesty. Výsledek je tedy závislý na správné funkci faktorů FII, FV, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, fibrinogenu, prekalikreinu a HMWK. Výsledek může být ovlivněn také antikoagulační léčbou, přítomností specifického či nespecifického inhibitoru nebo preanalytickou fází. Pokud je potřeba vyšetřit funkční aktivitu jednotlivých koagulačních faktorů vnitřní cesty, použije se k tomu primárně koagulační metoda s faktor deficitní plazmou na principu APTT.

V současné době se v hematologických klinických laboratořích používají pouze komerční certifikované reagentie s deklarovanou kvalitou. Přesto v případě, že se laboratoř rozhodne pro změnu reagentií, musí si nejdříve provést srovnávací studii, kterou ověří, že nové reagentie poskytují srovnatelné výsledky s reagentiemi původními, dosud používanými.

V mé studii jsem porovnávala hodnoty funkční aktivity koagulačních faktorů VIII, IX, XI a XII naměřené původními reagentiemi STA PTT A 5 s příslušnými deficitními plazmami od firmy Grifols se současně zaváděnými reagentiemi STA C.K. Prest 5 v kombinaci s imunodeficitními plazmami firmy Stago.

Stanovení funkční aktivity FVIII bylo provedeno na 40 patientských vzorcích, faktory IX, XI a XII byly porovnány na 30 patientských vzorcích.

Naměřené hodnoty jsem zaznamenala do tabulek a provedla jejich statistické vyhodnocení pomocí metody lineární regrese a Bland-Altmanova grafu. Z grafů lineární regrese jsem pro každý stanovovaný faktor získala rovnici regresní přímky a vypočítala korelační koeficient, jehož hodnota byla vždy  $\geq 0,98$ . Hodnoty korelačních koeficientů i rovnice přímek ukazují na dobrou korelaci výsledků naměřenými původními a novými reagentiemi.

Rovněž Bland-Altmanovy grafy poukazují na velkou shodu mezi výsledky naměřenými pomocí původních a nových reagentií, což hodnotíme podle šíře intervalu, množství datových bodů v limitu shody a průměru rozdílů hodnot.

Ze získaných dat je možné říct, že rozdíly mezi výsledky naměřenými novými reagentiemi STA C. K. Prest 5 + STA Immunodef VIII/IX/XI/XII a původními reagentiemi STA PTT A 5 + DG-FVIII/FIX/FXI/FXII nejsou klinicky významné. Výraznější rozdíly mezi výsledky jsou totiž zejména v oblasti hodnot nad horní fyziologickou mezí. Navíc počty měření v této oblasti nejsou velké. Pro přesnější statistické vyhodnocení by bylo potřeba vyšetřit větší počet vzorků, zejména v oblasti vysokých hodnot funkční aktivity jednotlivých koagulačních faktorů. Přesto můžeme konstatovat, že nové i původní reagentie poskytují srovnatelné

výsledky.

Na základě této srovnávací studie je možné zavést nové reagentie do provozu laboratoře. Naopak nelze touto studií potvrdit ani vyvrátit tvrzení výrobce, že jsou nové reagentie ke stanovení aktivity koagulačních faktorů vnitřní cesty citlivější než původní reagentie.



## 8. Závěr

V teoretické části bakalářské práce jsem se zaměřila na základní popis hemostázy – procesu zástavy krvácení a veškerých složek, napomáhající tomuto ději. Tudiž bylo důležité podrobně rozepsat, jak celé krevní srážení probíhá, které složky se ho účastní a jakou v něm hrají roli.

Dále jsem se zmínila o patologiích hemostázy a zejména o možnostech laboratorního stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů.

V praktické části jsem se zabývala zavedením nových reagensů na stanovení funkční aktivity koagulačních faktorů vnitřní cesty (FVIII, FIX, FXI, FXII) do provozu laboratoře. V rámci srovnávací studie jsem na souboru patientských vzorků porovnávala výsledky naměřené novými reagensy STA C. K. Prest 5 + STA Immunodef VIII/IX/XI/XII a současně také reagensy původními STA PTT A 5 + DG-FVIII/FIX/FXI/FXII. Naměřené hodnoty funkční aktivity jednotlivých koagulačních faktorů jsem vyhodnotila metodou lineární regrese a Bland-Altmanovým grafem. Statistickým vyhodnocením dat jsem došla k závěru, že výsledky naměřené původními i novými reagensy spolu dobře korelují ve všech vyšetřovaných metodách. Rozdíly mezi naměřenými hodnotami nejsou klinicky významné. Původní a nové reagensy měří se srovnatelnou přesností. Nové reagensy mohou nahradit reagensy původní a být zavedeny do provozu laboratoře.

## 9. Použité zkratky

ADP	adenosindifosfát
APC	aktivovaný protein C
APTTT	activated partial thromboplastin time (aktivovaný parciální tromboplastinový čas)
BM	bazální membrána
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
FBG	fibrinogen
FI	faktor I (fibrinogen)
FII	faktor (II protrombin)
FIX	faktor IX (Christmas faktor)
FV	faktor (V proakcelerin)
FVII	faktor VII prokonvertin
FVIII	faktor VIII (antihemofilický faktor A)
FX	faktor X (Stuart-Prower faktor)
FXI	faktor XI (Rosenthalův faktor)
FXII	faktor XII (Hagemanův faktor)
FXIII	faktor XIII (faktor stabilizující fibrin)
Gla	kyselina karboxyglutamová
GP	glykoprotein
HMWK	vysokomolekulární kininogen
ISI	international sensitivity index (mezinárodní index citlivosti)
LDL	low density lipoproteins
PIVKA	Protein induced by vitamin K absence or vitamin K antagonists
PK	prekalikrein
PS	protein S
PT	prothrombin time (protrombinový čas)
TF	tkáňový faktor
TFPI	tissue factor pathway inhibitor (inhibitor tkáňového faktoru)
<i>t</i> -PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
<i>u</i> -PA	aktivátor urokinázového typu
vWF	von Willebrandův faktor

## 10. Seznam obrázků

<b>Obrázek č.1</b> - Nový model koagulace .....	18
<b>Obrázek č.2</b> - Metoda přímé detekce .....	24
<b>Obrázek č.3</b> - Automatický koagulometr Star-R Evolution.....	27

## 11. Seznam tabulek

<b>Tabulka č.1</b> - Stabilita reagensů, roztoku a pufru.....	29
<b>Tabulka š.2</b> - Nastavení přístroje pro stanovení aktivity faktorů VIII, IX, XI, a XII .....	30
<b>Tabulka č.3</b> - Fyziologické meze a rozsah měření jednotlivých metod.....	31
<b>Tabulka č.5</b> - Naměřené hodnoty funkční aktivity FVIII .....	48
<b>Tabulka č.6</b> - Naměřené hodnoty funkční aktivity FIX .....	49
<b>Tabulka č.7</b> - Naměřené hodnoty funkční aktivity FXI .....	50
<b>Tabulka č.8</b> - Naměřené hodnoty funkční aktivity FXII.....	51

## 12. Seznam grafů

<b>Graf č.1</b> - Porovnání výsledků měření funkční aktivity FVIII metodou lineární regrese .....	35
<b>Graf č.2</b> - Bland-Altmanův graf porovnání výsledků měření hodnot aktivity FVIII .....	35
<b>Graf č.3</b> - Porovnání výsledků měření funkční aktivity FIX metodou lineární regrese .....	35
<b>Graf č.4</b> - Bland-Altmanův graf porovnání výsledků měření hodnot aktivity FIX.....	36
<b>Graf č.5</b> - Porovnání výsledků měření funkční aktivity FXI metodou lineární regrese .....	37
<b>Graf č.6</b> - Bland-Altmanův graf porovnání výsledků měření hodnot aktivity FXI.....	37
<b>Graf č.7</b> - Porovnání výsledků měření funkční aktivity FXII metodou lineární regrese.....	38
<b>Graf č.8</b> - Bland-Altmanův graf porovnání výsledků měření hodnot aktivity FXII .....	38

## 13. Použitá literatura

BARMORE, Walker, Tanvir BAJWA a Bracken BURNS, 2023. Biochemistry, Clotting Factors. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [cit. 2023-05-03]. PMID: 29939627. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507850/>

*BIOPHEN TM FIX: Chromogenní metoda pro stanovení aktivity Faktor IX v plazmě nebo léčebných koncentrátech*, 2021. 06/2021. Francie: <https://www.hyphen-biomed.com/products#document-library>. Dostupné také z: <https://www.hyphen-biomed.com/products#document-library>, 2021

*BIOPHEN TM FVIII:C: Chromogenní metoda pro test faktoru VIII:C v plazmě nebo terapeutických koncentrátech*, 2022. 12/2022. Francie. Dostupné také z: <https://www.hyphen-biomed.com/products#document-library>

BRONIĆ, Ana, Desiree Coen HERAK, Sandra MARGETIĆ a Marija MILIĆ. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: National recommendations for blood collection, processing, performance and reporting of results for coagulation screening assays prothrombin time, activated partial thromboplastin time. *Biochemia medica* [online]. 2019, **29**(2), 262-283 [cit. 2023-03-07]. ISSN 18467482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2019.020503

CAMIRE, M. Rodney, 2021. Blood coagulation factor X: molecular biology, inherited disease, and engineered therapeutics. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* [online]. **52**(2), 383-390 [cit. 2023-02-24]. ISSN 0929-5305. Dostupné z: doi:10.1007/s11239-021-02456-w

DE MAAT, S. a C. MAAS, 2016. Factor XII: form determines function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. **14**(8), 1498-1506 [cit. 2023-05-08]. ISSN 15387836. Dostupné z: doi:10.1111/jth.13383

DOBROTOVÁ, Miroslava a Peter KUBISZ, 2006. *Hematológia a transfuziologie: učebnica*. Praha: Grada. ISBN 80-247-1779-4.

EMSLEY, Jonas, Paul A. MCEWAN a David GAILANI, 2010. Structure and function of factor XI. *Blood* [online]. **115**(13), 2569-2577 [cit. 2023-02-24]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2009-09-199182

GERKE, Oke, 2020. Reporting Standards for a Bland-Altman Agreement Analysis: A Review of

Methodological Reviews. *Diagnostics (Basel)* [online]. **105**, 334 [cit. 2023-03-29]. PMID: 32456091. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics10050334

GIAVARINA, Davide, 2015. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica* [online]. **25**(2), 141-151 [cit. 2023-03-28]. ISSN 18467482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2015.015

HAJJAR, Katherine A. a William C. AIRD. Endotel: primer. *UpToDate* [online]. 2021, 10.11.2021 [cit. 2023-02-23]. Dostupné z: [https://www.uptodate.com/contents/the-endothelium-a-primer?search=endothelium&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/the-endothelium-a-primer?search=endothelium&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)

CHAUDHRY, Raheel, Syed USAMA a Hani BABIKER, 2022. Physiology, Coagulation Pathways. In: *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [cit. 2023-02-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482253/>

INDRÁK, Karel, 2006. *Hematologie: Vnitřní lékařství*. 1. vydání. Praha: TRITON. ISBN 80-7254-868-9.

KVASNIČKA, Jan, 2003. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. 1. vydání. Praha: Grada. ISBN 80-716-9993-4.

LAPELUSA, Andrew a Heeransh D. DAVE, 2022. Physiology, Hemostasis. In: *PubMed: National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [cit. 2023-02-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482253/>

LEUNG, L.K. Lawrence, 2022. Overview of hemostasis. In: *UpToDate* [online]. [cit. 2023-03-01]. Dostupné z: [https://www-uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/overview-of-hemostasis?search=prekalikrein&source=search\\_result&selectedTitle=1~15&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www-uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/overview-of-hemostasis?search=prekalikrein&source=search_result&selectedTitle=1~15&usage_type=default&display_rank=1)

MANN, G. Kenneth, 2003. Factor VII-Activating Protease: Coagulation, Fibrinolysis, and Atherothrombosis. *Circulation* [online]. **107**(5), 654-655 [cit. 2023-03-07]. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/01.CIR.0000057382.68508.3D

MCVEY, JH., 1999. Tissue factor pathway: Baillieres Best Pract Res Clin Haematol. In: *PubMed: National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. London:

Haemostasis Research Group, MRC Clinical Sciences Centre, Imperial College School of Medicine [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10856975/>

GROVER, P. Steven a Nigel MACKMAN, 2018. Tissue factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. In: *American Heart Association* [online]. [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: [https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.117.309846?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.117.309846?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed)

PECKA, Miroslav, 2004. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie hemostázy* [online]. 3. dopl. vyd. Český Těšín: Finidr [cit. 2023-02-21]. ISBN 80-86682-00-5. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/uk/ke-stazeni/pecka-lh-3.pdf>

PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ, 2009. *Neonkologická hematologie. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd.* Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2299-3.

PENKA, Miroslav, Igor PENKA a Jaromír GUMULEC, 2014. *Krvácení. 1.vydání.* Praha: Grada. ISBN 978-80-247-0689-4.

PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ, 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I: Hematologie. 1. vydání.* Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.

POZZI, Nicola a Enrico DI CERA, 2014. Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities. *Expert Review of Proteomics* [online]. **11**(6), 653-655 [cit. 2023-05-03]. ISSN 1478-9450. Dostupné z: [doi:10.1586/14789450.2014.971763](https://doi.org/10.1586/14789450.2014.971763)

ŠKORŇOVÁ, Ingrid a Luděk SLAVÍK, 2021. *Hemostáza: laboratorne metódy, ich využitie a interpretácia vo vybraných klinických situáciach = laboratorní metody, jejich využití a interpretace ve vybraných klinických situacích. 2. vydání.* Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-6014-7.

ŠLECHTOVÁ, Jitka, 2007. Hemostáza - jak ji možná neznáme. In: *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2. Plzeň: Ústav klinické biochemie a hematologie LF UK a FN v Plzni, s. 97-101 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: [https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/2-07/KBM0702\\_Slechtova\\_97.pdf](https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/2-07/KBM0702_Slechtova_97.pdf)

WALKER, H. Kenneth, W. Dallas HALL a J. Willis HURST, 1990. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. In: *PubMed: National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. Boston: Butterworths [cit. 2022-11-30]. Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK265/>

ZEHNDER, James L, 2022. Clinical use of coagulation tests. In: *UpToDate* [online]. [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: [https://www-uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/clinical-use-of-coagulation-tests?search=prekalikrein&source=search\\_result&selectedTitle=2~15&usage\\_type=default&display\\_rank=2](https://www-uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/clinical-use-of-coagulation-tests?search=prekalikrein&source=search_result&selectedTitle=2~15&usage_type=default&display_rank=2)

Standardní operační postup pro vyšetření (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 011 FAKTOR VIII, verze č. 10, 12.8.2021

Standardní operační postup pro vyšetření (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 027 FAKTOR IX, verze č. 9, 1.9.2021

Standardní operační postup pro vyšetření (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 028 FAKTOR XI, verze č. 9, 1.9.2021

Standardní operační postup pro vyšetření (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 029 FAKTOR XII, verze č. 9, 1.9.2021

Standardní operační postup technický (SOPT) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 010 Návod na obsluhu, kontrolu a údržbu analyzátoru STA-R Evolution, verze č. 03, 1.9.2017

Standardní operační postup pro vyšetření (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 011 FAKTOR VIII, verze č. 9, 1.9.2018

Standardní operační postup pro vyšetření (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 027 FAKTOR IX, verze č. 8, 1.9.2018

Standardní operační postup pro vyšetření (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 028 FAKTOR XI, verze č. 8, 1.9.2018

Standardní operační postup pro vyšetření (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 029 FAKTOR XII, verze č. 8, 1.9.2018

## 14. Přílohy

***Tabulka č.4 - Naměřené hodnoty funkční aktivity FVIII***

<b>Číslo pacienta</b>	<b>STA PTT A 5 + DG-FVIII</b>	<b>STA C.K.Prest 5 + STA Immunodef VIII</b>
1	40	38
2	21	20
3	11	10
4	4,8	4,9
5	5,6	4,9
6	12,5	9,7
7	0,9	0,8
8	297	254
9	143	131
10	215	196
11	136	118
12	208	193
13	151	148
14	43	48
15	32	31
16	86	73
17	110	86
18	169	163
19	32	37
20	42	48
21	134	112
22	11	13
23	110	91
24	184	172
25	395	354
26	160	138
27	44	50
28	243	205
29	62	58
30	149	133
31	205	203
32	38	41
33	99	97
34	146	128
35	103	98
36	16	13
37	13	9
38	47	51
39	32	30
40	119	100



**Tabulka č.5 - Naměřené hodnoty funkční aktivity FIX**

<b>Číslo pacienta</b>	<b>STA PTT A 5 + DG-IX</b>	<b>STA C.K.Prest 5 + STA Immunodef IX</b>
1	104	116
2	61	78
3	74	88
4	120	133
5	85	97
6	15	17
7	9	11
8	142	122
9	94	94
10	11	11
11	163	144
12	132	118
13	139	120
14	161	142
15	157	143
16	198	180
17	183	167
18	168	153
19	80	77
20	58	56
21	43	42
22	35	33
23	26	27
24	127	130
25	101	99
26	65	68
27	113	111
28	119	127
29	78	75
30	92	90

***Tabulka č.6 - Naměřené hodnoty funkční aktivity FXI***

<b>Číslo pacienta</b>	<b>STA PTT A 5 + DG-FXI</b>	<b>STA C.K.Prest 5 + STA Immunodef XI</b>
1	93	99
2	80	83
3	99	99
4	145	135
5	198	188
6	154	148
7	12	16
8	7	9
9	72	77
10	104	110
11	83	84
12	143	142
13	101	109
14	41	52
15	31	37
16	23	28
17	19	21
18	15	19
19	73	70
20	55	56
21	35	33
22	112	115
23	135	140
24	49	47
25	127	125
26	65	61
27	170	174
28	122	121
29	185	189
30	118	123

**Tabulka č.7 - Naměřené hodnoty funkční aktivity FXII**

<b>Číslo pacienta</b>	<b>STA PTT A 5 + DG-FXII</b>	<b>STA C.K.Prest 5 + STA Immunodef XII</b>
1	115	125
2	134	126
3	111	120
4	110	117
5	51	56
6	92	100
7	18	13
8	8	9
9	103	111
10	56	48
11	102	109
12	127	139
13	93	106
14	37	33
15	108	118
16	113	115
17	128	120
18	113	109
19	40	39
20	22	19
21	85	90
22	70	72
23	79	75
24	31	30
25	65	67
26	27	29
27	36	33
28	57	52
29	120	129
30	144	151