

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**  
Autoreferát dizertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta

Přirozené inhibitory koagulačních faktorů, jejich úloha v prevenci  
trombózy a v procesech imunitní odpovědi, angiogeneze a  
karcinogeneze.

Ing. Tereza Fenclová

2024

**Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

**Obor:** Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

**Předseda oborové rady:** doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.

**Školící pracoviště:** Ústav hematologie a krevní transfuze

**Školitel:** RNDr. Ingrid Hrachovinová, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	4
<b>1. Úvod</b> .....	4
<b>2. Hypotézy a cíle práce</b> .....	6
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	6
<b>4. Výsledky a diskuze</b> .....	7
<b>5. Závěry</b> .....	13
<b>6. Seznam publikací doktoranda</b> .....	14
<b>7. Použitá literatura</b> .....	15

## Abstrakt

Přirozené inhibitory koagulace jsou významnou regulační složkou hemostázy. Vzhledem k množství funkcí nejen v regulaci hemostázy jsme se v této práci zaměřili konkrétně na protein S (PS) a práci jsme rozdělili do tří dílčích částí. Cílem první části bylo nalézt kauzální mutace v genu *PROSI* u kohorty pacientů s vrozeným deficitem PS pomocí Sangerova sekvenování a metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Deficit PS je významným známým rizikovým faktorem pro vznik žilní trombózy, nicméně vzhledem k struktuře PS lze formulovat hypotézu, že mutace v určitých částí PS budou rizikovější než v jiných. Proto jsme dále analyzovali vliv polohy mutace na riziko trombózy u v této kohortě pacientů s vrozeným deficitem PS. V druhé části práce bylo naším cílem popsat pozorované získané deficity PS u kohorty pacientů Ústavu hematologie a krevní transfuze Praha s hematologickými malignitami. Na závěr ve třetí části bylo cílem ověřit stabilitu PS a dalších koagulačních parametrů v podmínkách zmražené plazmy, což má důležitý přesah jak do každodenní laboratorní praxe, tak pro diagnostiku deficitu PS.

Kauzální mutace v genu *PROSI* byla nalezena u 73/79 (92 %) pacientů. Celkem bylo identifikováno 34 různých mutací, z nichž 15 nebylo dosud popsáno. Výskyt mutací nevykazuje soustředění v žádné oblasti genu. Velkou delecí metodou MLPA jsme identifikovali u 3 rodin (7 %), což odpovídá výskytu delecí popsanému v literatuře. Dále jsme zjistili, že poloha mutace v SHBG (sex-hormone binding globulin) doméně PS je nezávislým rizikovým faktorem pro vznik trombózy a pacienti s těmito mutacemi také prodělali trombózu v mladším věku. U pacientů se získaným deficitem se aktivita PS signifikantně lišila mezi skupinami podle diagnózy s největším podílem patologických hodnot u pacientů s akutní myelomonocytární leukémií. V poslední části práce jsme prokázali dostatečnou stabilitu všech sledovaných parametrů včetně proteinu S, pokud byly uchovávány alespoň při -80 °C a zmražení probíhalo šokově. Při těchto podmínkách byly sledované parametry stabilní po dobu 6 měsíců, kromě krátkodobé anomálie na začátku skladování, kdy APTT, PS aktivita a PS volný antigen byly zvýšené nad nejistotu metody a po určité době se vrátily na úroveň výsledků z čerstvé plazmy (pouze vzorky skladované při -80 °C a méně).

Tato práce potvrzuje význam PS a jeho molekulární diagnostiky pro lepší odhad rizika trombózy u pacientů s vrozeným deficitem a zároveň ukazuje, jakým směrem by mohly být v budoucnu zaměřeny studie tohoto multifunkčního přirozeného inhibitoru koagulace.

## Abstract

Physiological anticoagulants play a significant regulatory role in hemostasis. Due to numerous functions not only in hemostasis regulation, we focused specifically on protein S (PS) in this work, which we divided into three parts. The aim of the first part was to identify causal mutations in the *PROS1* gene in a cohort of patients with inherited PS deficiency using Sanger sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). PS deficiency is a significant known risk factor for venous thrombosis; however, considering the structure of PS, we hypothesized that mutations in certain parts of PS would carry larger thrombotic risk than in others. Therefore, we further analyzed the influence of mutation position on thrombosis risk in this cohort of patients with inherited PS deficiency. In the second part of the work, our goal was to describe the observed acquired PS deficiencies in a cohort of patients from the Institute of Hematology and Blood Transfusion in Prague with hematological malignancies. Finally, in the third part, the aim was to verify the stability of PS and other coagulation parameters in frozen plasma conditions, which has important implications for both daily laboratory practice and the diagnosis of PS deficiency.

Causal mutations in the *PROS1* gene were found in 73/79 (92%) patients. A total of 34 different mutations were identified, 15 of which had not been described previously. The distribution of mutations does not show clustering in any region of the gene. We identified a large deletion using the MLPA method in 3 families (7%), corresponding to the occurrence of deletions described in the literature. Furthermore, we found that the mutation location in the sex-hormone binding globulin (SHBG) domain of PS is an independent risk factor for thrombosis, and patients with these mutations also experienced thrombosis at a younger age. In patients with acquired deficiency, PS activity significantly differed between groups according to diagnosis, with the highest proportion of pathological values observed in patients with acute myelomonocytic leukemia. In the last part of the work, we demonstrated sufficient stability of all monitored parameters, including protein S, if stored at least at  $-80^{\circ}\text{C}$  and snap-frozen. Under these conditions, the monitored parameters remained stable for 6 months, except for short-term anomalies at the beginning of storage, when APTT, PS activity, and free PS antigen were elevated above the method's uncertainty and eventually returned to the level of results from fresh plasma (only samples stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  or lower).

This work confirms the significance of PS and its molecular diagnostics for better thrombosis risk estimation in patients with inherited deficiency and indicates future directions for studies of this multifunctional physiological coagulation inhibitor.

## 1. Úvod

Trombóza je jedním z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělém světě. Dělí se podle lokalizace na arteriální a žilní trombózu, ta pak dále na povrchovou (SVT) a hlubokou žilní trombózu (DVT). Pokud se patologický trombus uvolní a zablokuje plicní oběh nebo mikrocirkulaci jiného orgánu (např. mozku), mluvíme o embolii, souhrnně se tomuto stavu pak říká žilní tromboembolismus (VTE). Rizikových faktorů, které přispívají ke vzniku trombózy je velké množství a dají se rozdělit na vrozené a získané. Vrozenými rizikovými faktory jsou například mutace FV Leiden, mutace protrombinu G20210A, nebo deficit přirozených inhibitorů koagulace, jako jsou antitrombin, protein C nebo protein S (Mateo et al. 1997; Margaglione et al. 1998; Crowther a Kelton 2003; Dahlbäck 2008).

Tato práce je zaměřená na protein S (PS), vzhledem k jeho množství funkcí jak v regulaci hemostázy, tak jeho signalizační a další funkce mimo hemostázu. Protein S je vitamin K-dependentní jednořetězcový glykoprotein o hmotnosti přibližně 75 kDa. PS je kódován genem

*PROSI*, který obsahuje 15 exonů (16 s alternativním transkriptem) kódující jednotlivé domény PS (Schmidel et al. 1990). Protein S cirkuluje ve dvou formách. Ve volné formě je aktivní jako antikoagulant; ve vázané formě je v komplexu s C4b vazebným proteinem (C4BP) systému komplementu, resp. jeho izoformou která obsahuje  $\beta$  podjednotku, a je převážně neaktivní. Vrozený nebo získaný nedostatek proteinu S je rizikovým faktorem pro trombózu.

Plazmatický PS je syntetizován převážně hepatocyty, dále endoteliálními buňkami, megakaryocyty, Leydigovými buňkami a také osteoblasty. V plazmě cirkuluje v koncentraci ~20-25  $\mu\text{g/ml}$  (300-350  $\text{nmol/L}$ ), přičemž až 2,5 % z tohoto množství je lokalizováno v alfa granulích destiček, kde se vyskytuje PS syntetizované výlučně megakaryocyty.

Protein S má několik primárních funkcí. Za prvé je kofaktorem aktivovaného proteinu C v jeho štěpení FVa a FVIIIa, tyto reakce by bez PS byly řádově pomalejší nebo zcela nedostačující. Další funkcí PS je jeho kofaktorová úloha v aktivitě TFPI, který reguluje vnější cestu aktivace koagulace. PS urychluje přímou inhibici FXa a zároveň slouží jako kofaktor TFPI- $\alpha$  v inhibici TF-FVIIa komplexu a jím zprostředkované tvorby FXa a FIXa (Hackeng et al. 2006). Jak pro APC, tak pro TFPI-kofaktorovou funkci je kritickou oblast PS nazývaná SHBG-like doména, kde zároveň dochází k vazbě na C4BP. Kromě APC a TFPI kofaktorových funkcí byla u PS objevena i nezávislá antikoagulační funkce, kdy PS přímo inhibuje aktivitu protrombinázy a vnitřní tenázy (Chattopadhyay et al. 2012). Tato inhibiční aktivita jako jediná není ovlivněna vazbou PS na C4BP.

Protein S má primárně antikoagulační funkci, ale bylo objeveno že v určitých situacích plní také signalizační funkci. PS byl identifikován jako ligand pro unikátní receptorovou rodinu tyrosinkináz označovanou jako TAM (Tyro-3, Axl, Mer) (Lemke a Rothlin 2008). Dalším ligandem pro TAMR je Gas6 (growth-arrest-specific 6), což je glykoprotein s vysokou homologií s PS, ale nevykazující jinou než signalizační funkci (Stitt et al. 1995). Důležitá je homologie C-terminální SHBG-like oblasti, která je nezbytná pro vazbu a aktivaci TAMR (Sasaki et al. 2002). TAM receptorové kinázy (TAMR) jsou exprimované v mnoha buněčných typech, např. buňky imunitní (dendritické a NK buňky, makrofágy), nervové, reprodukčního systému, v retinálních epitelových buňkách a v buňkách vaskulární hladké svaloviny a v endotelu. Od toho se odvíjí množství signalizačních a regulačních funkcí, které je PS schopen vykonávat jako ligand těchto receptorů. Je několik důkazů pro roli PS jako negativního regulátoru zánětu, zejména prostřednictvím down-regulace transkripce prozánětlivých cytokinů v makrofázích a dendritických buňkách. PS dále také zprostředkovává rozpoznávání apoptotických tělísek makrofágy. Buňky prodávající apoptózu exprimují na svém povrchu fosfatidylserin, na který se váže PS skrz Gla doménu. TAMR na fagocytujících buňkách rozpoznává přes N-terminální imunoglobulinovou doménu SHBG-like oblast PS a způsobí tím aktivaci fagocytární aktivity (Anderson et al. 2003). PS/TAM signalizace má také důležité funkce ve vaskulogenezi a integritě endotelu, nádorovém mikroprostředí a metastatickém procesu.

Vrozený deficit proteinu S (PSD) je vzácné autosomálně dominantně dědičné onemocnění a v heterozygotní formě vede ke zvýšenému riziku žilního tromboembolismu (VTE) i v mladším věku. Vrozený PSD je častější ve východoasijské populaci než v kavkazské populaci (frekvence výskytu ~0,03–0,13 % v Evropě (ten Kate a van der Meer 2008) a ~0,48-0,63 % v japonské populaci (Adachi 2005)).

Protein S je fyziologicky snížen v graviditě, nejvíce ve třetím trimestru, dále u osob užívajících kombinovanou orální kontraceptiva obsahující estrogen. Snížení hladin PS bylo pozorováno také u nefrotického syndromu, při léčbě vitamin-K antagonisty (např. warfarin), také akutně po trombotické příhodě nebo při DIC, kdy dochází k jeho konzumaci. Snížení

hladiny PS bylo také pozorováno u mnohočetného myelomu (Deitcher et al. 1996) a u některých virových onemocnění včetně HIV (Sim et al. 2022) a COVID-19 (Stoichitoiu et al. 2020).

Diagnostika deficitu PS, jak vrozeného, tak získaného, má svá úskalí a komplikace. Vrozený deficit proteinu S se rozděluje podle fenotypu do tří typů. Typ I (kvantitativní), kde jsou snižené hodnoty volné i celkové formy PS, typ II (kvalitativní), kde je snížena pouze APC-kofaktorová aktivita PS a množství volné i celkové formy je v normálním rozmezí, a typ III (smíšený), kde je snižené množství volné frakce, ale celkové množství je zachováno. Zatím není dostupné vyšetření TFPI-kofaktorové aktivity PS, díky kterému by mohla být klasifikace deficitu PS upřesněna. Volný antigen PS je doporučován jako screeningová metoda oproti aktivitě PS, nicméně pokud je používán výhradně volný antigen, dochází k poddiagnostikování funkčních deficitů PS (typ II) (Berczky et al. 2016). Naopak screening pouze stanovením aktivity PS také není vhodný, protože ne všechny jsou ale spolehlivé vzhledem k interferencím, například přítomnosti FV Leiden.

## **2. Hypotézy a cíle práce**

Z přirozených inhibitorů koagulačních faktorů jsme se v této práci zaměřili na protein S, především kvůli jeho širokému spektru funkcí a jeho významu v diagnostice trombofilii. Konkrétní cíle práce jsou:

- Nalezení kauzálních mutací u kohorty pacientů s vrozeným deficitem PS.
- Na základě nalezených mutací popsat genotyp a fenotyp pacientů s vrozeným deficitem proteinu S v České republice a zjistit, zda se liší v porovnání s evropskou a světovou populací.
- Stanovit vliv polohy mutace (SHBG oblast vs. non-SHBG) na riziko trombózy u těchto pacientů.
- Popsat pozorované získané deficity PS u kohorty pacientů ÚHKT Praha s hematologickou malignitou v akutní fázi onemocnění a zanalyzovat, jak se lišila aktivita PS v závislosti na diagnóze.
- Ověřit stabilitu proteinu S a dalších koagulačních parametrů v podmínkách zmražené plazmy.

## **3. Materiál a metodika**

### **Stanovení PS**

Koagulační aktivita PS byla stanovena kitem STA-Sta clot Protein S assay (Diagnostica Stago) a volný antigen PS pomocí kitu STA Liatest Free Protein S (Diagnostica Stago). Celkový antigen PS byl analyzován imunoelktroforézou s použitím polyklonálních králičích anti-PS protilátek (A0384, Dako Denmark). Pro určení stability vlastností zmražené plazmy byly použity následující metody: aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), protrombinový čas (PT), stanovení aktivity fibrinogenu, antitrombinu, faktoru VIII, stanovení množství D-Dimerů a fibrin/fibrinogen degradačních produktů v plazmě, ethanol gelifikační test.

### **Genetika vrozeného deficitu PS**

Pro studijní populaci byli vybráni pacienti s opakovaně nízkými hodnotami PS aktivity a/nebo volného a celkového antigenu PS. Měření aktivity a hladiny PS je součástí trombofilního screeningu v souvislosti s prodělanou trombózou, rizikovým stavem pacienta nebo pozitivní rodinnou anamnézou. U těchto indexových pacientů a u dalších členů rodiny (pokud byli dostupní) jsme vyšetřili kromě PS také ostatní trombofilní markery (antitrombin, protein C,

zvýšený FVIII, mutace FV Leiden a protrombin G20210A). Dále u nich byl vyloučen vliv antikoagulační nebo hormonální léčby, nefrotický syndrom, recentně prodělaná trombóza nebo gravidita, testování bylo v těchto případech odloženo. Pro genetickou analýzu bylo indikováno 45 indexových pacientů a 34 blízkých příbuzných, celkem jsme tedy vyšetřili 79 pacientů.

U indikovaných pacientů jsme izolovali genomovou DNA z plné krve. Provedli jsme analýzu všech exonů genu *PROS1* pomocí Sangerova sekvenování a metody MLPA. Pro predikci kauzální povahy nově objevených mutací jsme použili několik volně dostupných predikčních softwarů.

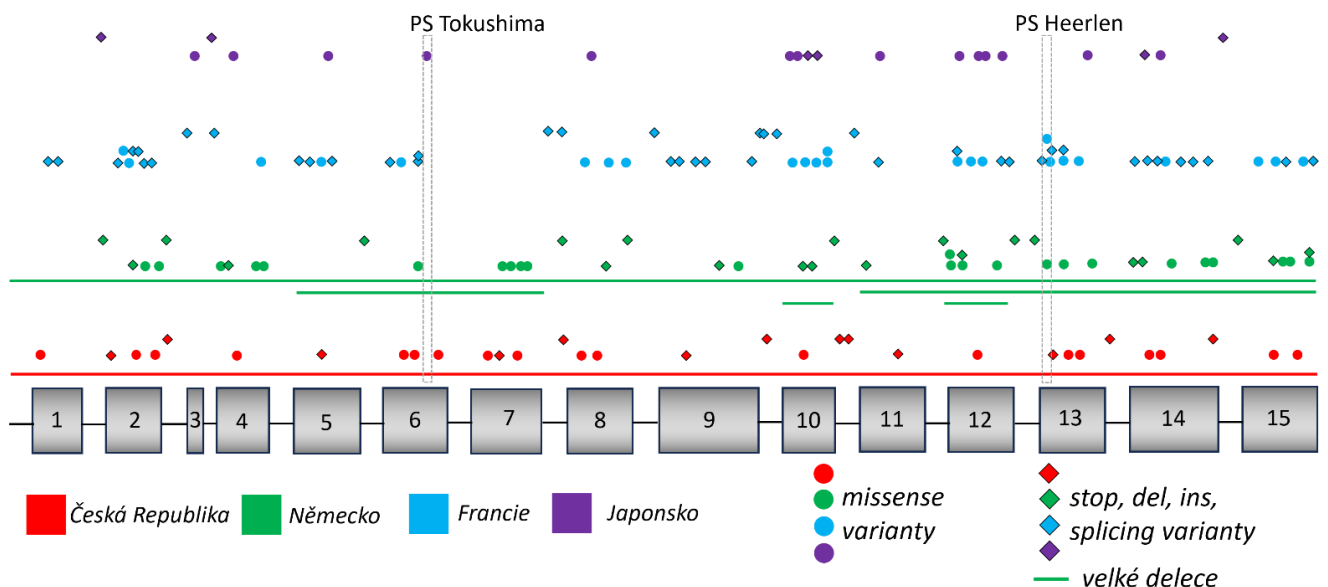
### Statistická analýza

Pro stanovení, zda poloha mutace ovlivňuje riziko trombózy jsme použili multivariantní logistickou regresi. Tento model zahrnoval kromě hlavní proměnné (poloha mutace v SHBG doméně) také věk, pohlaví a přítomnost mutace FV Leiden. Pro analýzu, zda poloha mutace ovlivňuje věk, kdy se u pacienta trombóza projeví jsme použili Kaplan-Meierovu křivku přežití a log-rank test. Pro analýzu rozdílů aktivity PS mezi skupinami pacientů se získaným deficitem PS jsme použili Kruskal-Wallis test; pro zhodnocení proporce pacientů s patologickými hodnotami jsme použili  $\chi^2$  (chí kvadrátový) test.

## 4. Výsledky a diskuze

### Genetika vrozeného deficitu PS

V naší kohortě pacientů s vrozeným deficitem PS byla nalezena kauzální mutace u 73/79 (92 %) pacientů a celkem 34 různých mutací, z toho 15 nebylo dosud v literatuře popsáno (viz tabulka 1). Velká delece zahrnující exony 1-15 genu *PROS1* metodou MLPA byla nalezena u 3 ze 43 rodin (7 %). Všechny nalezené mutace byly v heterozygotní formě. Pacienty s vrozeným PSD a nalezenou mutací jsme rozdělili do skupin podle polohy mutace na SHBG a non-SHBG, vzhledem k důležitosti této oblasti PS v jeho různých funkcích a vazbách na další proteiny. Zahrnuti byli pouze pacienti se záměnami (missense mutace), protože u ostatních typů mutací (frame-shift, záměny za stop kodon, splicingové mutace a delece) je převažujícím fenotypem ztráta exprese, a tedy snížení syntézy, zatímco u záměnných mutací fenotyp není jasný.



**Obrázek 1:** Porovnání mutačního profilu různých populací s českou na schématu genu *PROS1*.

**Tabulka 1:** Přehled nově nalezených mutací, které nebyly dosud popsány v literatuře, ISTH databázi mutací, nebo ve volně dostupných databázích jako jsou NCBI dbSNP databáze a HGMD – The Human Gene Mutation Database. Uvedené hladiny PS představují probanda nebo u rodin se smíšeným fenotypem příbuzného s daným fenotypem.

Číslo rodiny	Mutace: p.	cDNA: het.c.	Místo	PSD typ	PS aktivita [M:65-140%; F:50-140%]	PS Free Ag [M:70-148%; F:50-134%]	PS Total Ag [M:75-140%; F:60-140%]	Predikce
29	Met1Ile	3G>C	Ex1	I	26	4	32	patogenní
5	Ser28Phefs*11	82dupT	Ex2	I	34	24	49	patogenní
28	Cys113Ser	338G>C	Ex4	III	35	36	61	patogenní
12, 13	Cys171Trp	513C>G	Ex6	I	40	52	43	patogenní
21	Gln173Lys	517C>A	Ex6	III	23	31	62	patogenní
19	Cys228*	684C>A	Ex7	I	22	22	39	patogenní
38	Glu304*	910G>T	Ex9	I	20	34	32	patogenní
41	IVS9+5G>A	965+5G>A	In9	I	52	57	45	patogenní
37	Pro416Alafs*22	1244dupA	Ex11	I	27	29	49	patogenní
17	Leu446Arg	1336_1337del insAG	Ex12	I	27	16	24	patogenní
35	Ala525Thr	1573G>A	Ex13	I	27	17	30	patogenní
4	IVS13+1 G>T	1644+1G>T	In13	I III	11 18	6 8	24 110	patogenní
3, 36	Gly621Asp	1862G>A	Ex14	-	29	-	-	patogenní
23	Asp624Metfs*9 (skipping Ex14)	1645_1870del	Ex14, In14	I	34	28	62	-
42	Asp652Gly	1955A>G	Ex15	III	-	20	60	patogenní

Mutace byla označena jako patogenní, když alespoň 5 ze 7 použitých predikčních softwarů vyhodnotilo mutaci jako „disease-causing“, tedy kauzální pro deficit PS.

Mutační profil byl podobný jako byl reportován v předchozích studiích (viz obrázek 1), s mutacemi všech typů rozptýlenými po celém genu (García de Frutos et al. 2007). V literatuře je několik příkladů různé míry detekce mutací v závislosti na selekci pacientů, zejména podle hladin FPS. Vyšší míra detekce mutací je výrazně posílena přísnějším výběrem pacientů a strategií testování. Proto aby bylo genetické vyšetření dostatečně efektivní, je důležité provádět důkladnou laboratorní diagnostiku a korelaci s rodinnou anamnézou před jeho zahájením. Míra detekce mutací v našem souboru pacientů byla 92 %, pravděpodobně díky přísnější selekci pacientů na základě anamnézy a léčby.

Doporučení k vyšetřování deficitu PS se různí. Například je uváděno, že volný antigen PS je lepší screeningová metoda oproti aktivitě PS, nicméně pokud je používán výhradně volný antigen, dochází k poddiagnostikování funkčních deficitů PS (typ II). Nicméně, sice je k dispozici velké množství reagensů ke stanovení aktivity PS, ne všechny jsou ale spolehlivé vzhledem k interferencím, například přítomnosti FV Leiden. Dále je taky nutné vyvinout metody pro stanovení aktivity PS jako kofaktoru TFPI, tyto jsou zatím odkázány na složité a často nedostupné výzkumné metodiky. Dokud nebude na trhu spolehlivá screeningová metoda

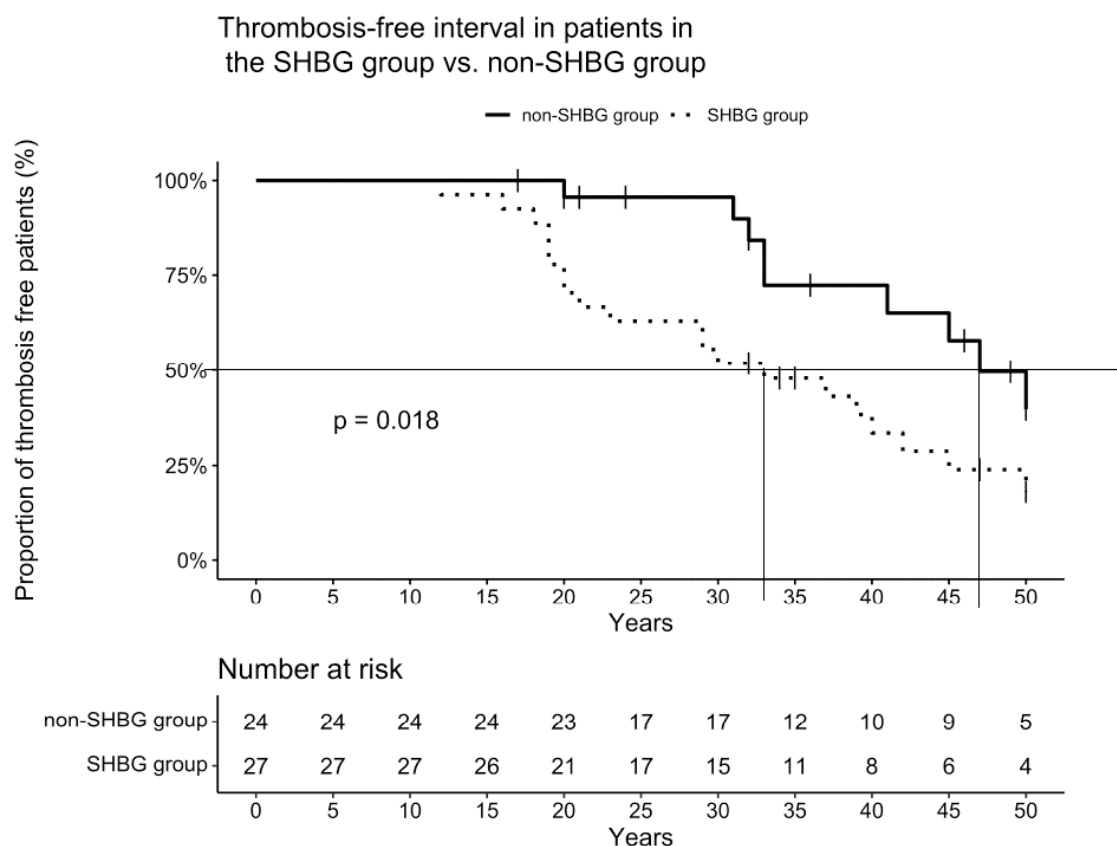


citlivá na všechny typy PSD, je nutné diagnostiku provádět pečlivě a vždy zahrnovat anamnézu a historii pacienta a prozkoumat možné interference. Na druhou stranu genetické vyšetření v době sekvenování nové generace (NGS) již není tak obtížně dostupné jak tomu bylo v minulosti a proto je v případě nejasného fenotypu a rizikových pacientů stále možnost použít molekulárně genetické metody pro definitivní diagnózu (Berezky et al. 2016).

### Vliv polohy mutace na riziko trombózy

Mezi SHBG a non-SHBG skupinami nebyl významný rozdíl ve věku ani pohlaví pacientů. Pacienti, kteří prodělali trombózu měli častěji mutaci v SHBG oblasti než mimo tuto oblast (69 % vs. 31,8 %;  $p = 0,008$ ). Naopak se významněji nelišila míra pacientů, kteří prodělali trombózu v závislosti na přítomnosti mutace FV Leiden (31 % vs. 18,2 %;  $p = 0,30$ ) a to i přes výrazně vyšší zastoupení v SHBG skupině (44,4 % vs. 4,2 %,  $p = 0,001$ ), což naznačuje, že samotný FVL nebyl nezávislým rizikovým faktorem.

Multivariantní regresní analýzou těchto dvou skupin jsme prokázali, že poloha mutací v SHBG oblasti PS byla nezávislým rizikovým faktorem pro trombózu (OR 5,17, CI 1,29 – 20,65). Pacienti v SHBG skupině měli také nižší aktivitu PS (medián 27 %, IQR 20-29,5 vs. medián 37,5 %, IQR 25,8-44,3) a hladinu volného antigenu (medián 19 %, IQR 10-23 vs. medián 49,5 %, IQR 31-52,8) a zároveň se u nich trombóza objevovala v mladším věku (obrázek 2,  $p = 0,018$ ).



**Obrázek 2:** Kaplan-Meierova křivka intervalu do výskytu první trombózy u pacienta. Skupina pacientů s mutací v SHBG oblasti (tečkovaná čára) má kratší interval do výskytu trombózy, tedy se u nich vyskytuje v mladším věku, než u pacientů s mutacemi v non-SHBG oblasti (plná čára).

Hypotéza, že umístění mutace způsobuje různé poruchy, a tedy i rozdílné riziko trombózy nebyla v kontextu přirozených inhibitorů koagulace formulována poprvé. Zajímavým příkladem je zde antitrombin, kde poloha mutace v genu *SERPINC1* určuje typ a funkční prezentaci deficitu.

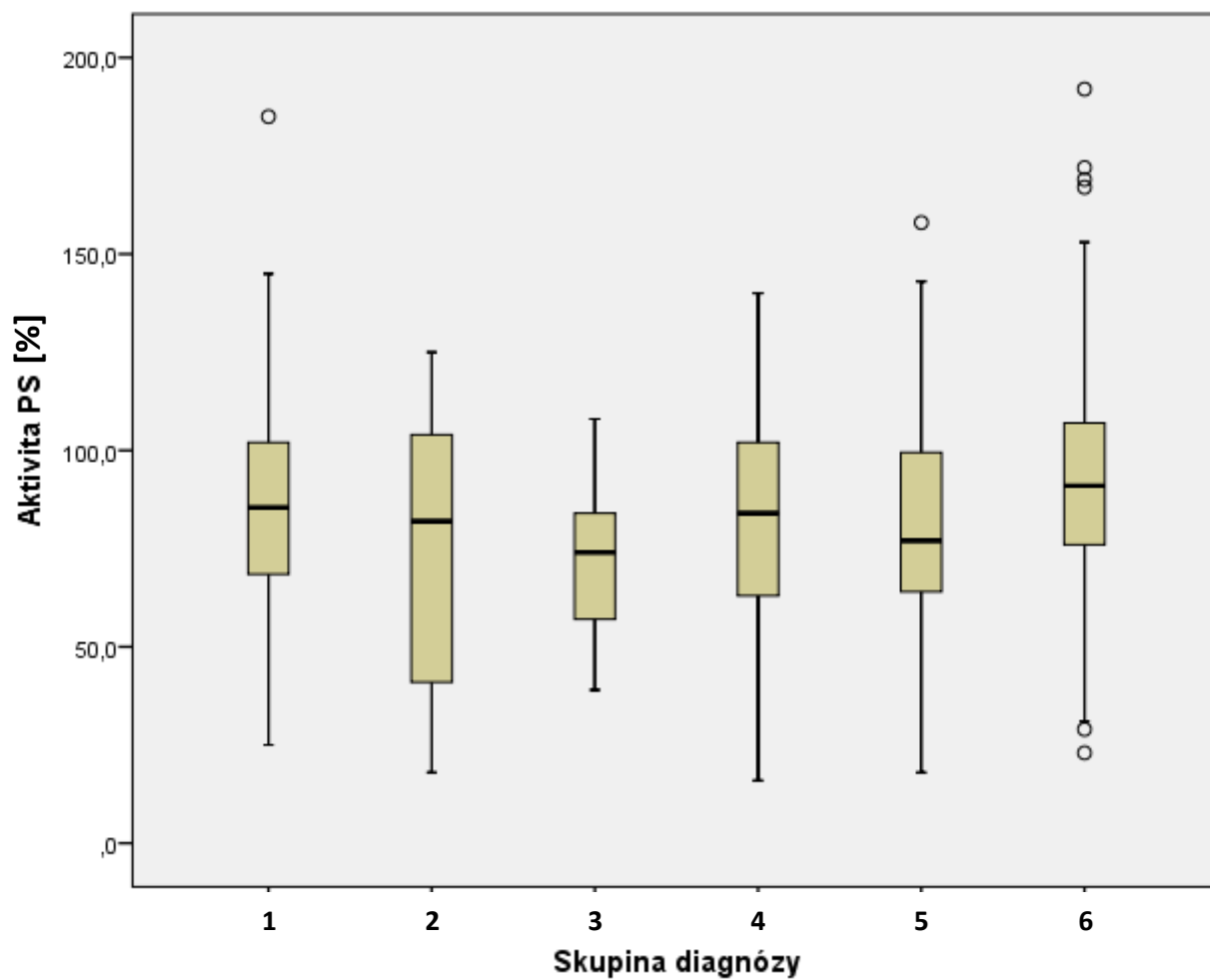
U PS jsme prokázali, že hladiny aktivity a volného antigenu PS jsou významně nižší u pacientů s mutací v SHBG-like oblasti PS v porovnání s mutacemi v Gla-EGF4 oblasti (Fenclova et al. 2023). Pacienti s mutacemi v SHBG-like oblasti mají také vyšší riziko trombózy a v průměru prodělají trombózu v mladším věku. To může být vysvětleno několika způsoby. Za prvé, SHBG-like oblast PS je důležitá pro funkci PS jako kofaktoru APC a kritická pro TFPI- $\alpha$  aktivitu. Tím, že zatím nejsou dostupné metody specifické pouze pro TFPI- $\alpha$  kofaktorovou aktivitu PS nelze vyloučit, že u pacientů s těmito mutacemi bude tato aktivita ještě nižší, než APC-kofaktorová aktivita, která je měřena standardně. Za druhé, snížená hladina volného PS může vést také ke snížené hladině TFPI- $\alpha$  v plazmě, jelikož tyto dva proteiny (spolu s FV-short) spolu v plazmě tvoří komplex a PS zvyšuje poločas TFPI- $\alpha$  v plazmě, a tedy i jeho bioavaiabilitu. Toto může vést k dalšímu zvýšení rizika trombózy. Dalším důvodem může být snížená vazba volného PS na C4BP, pokud mutace zasahuje do oblasti v SHBG doméně, kde dochází k vazbě na  $\beta$ -podjednotku C4BP. Tím může být u mutovaných forem PS které se dostanou do plazmy snížený poločas a tím celkově nižší hladina než u mutací, které toto nezpůsobují (He et al. 1997).

### **Získaný deficit PS u hematoonkologických pacientů**

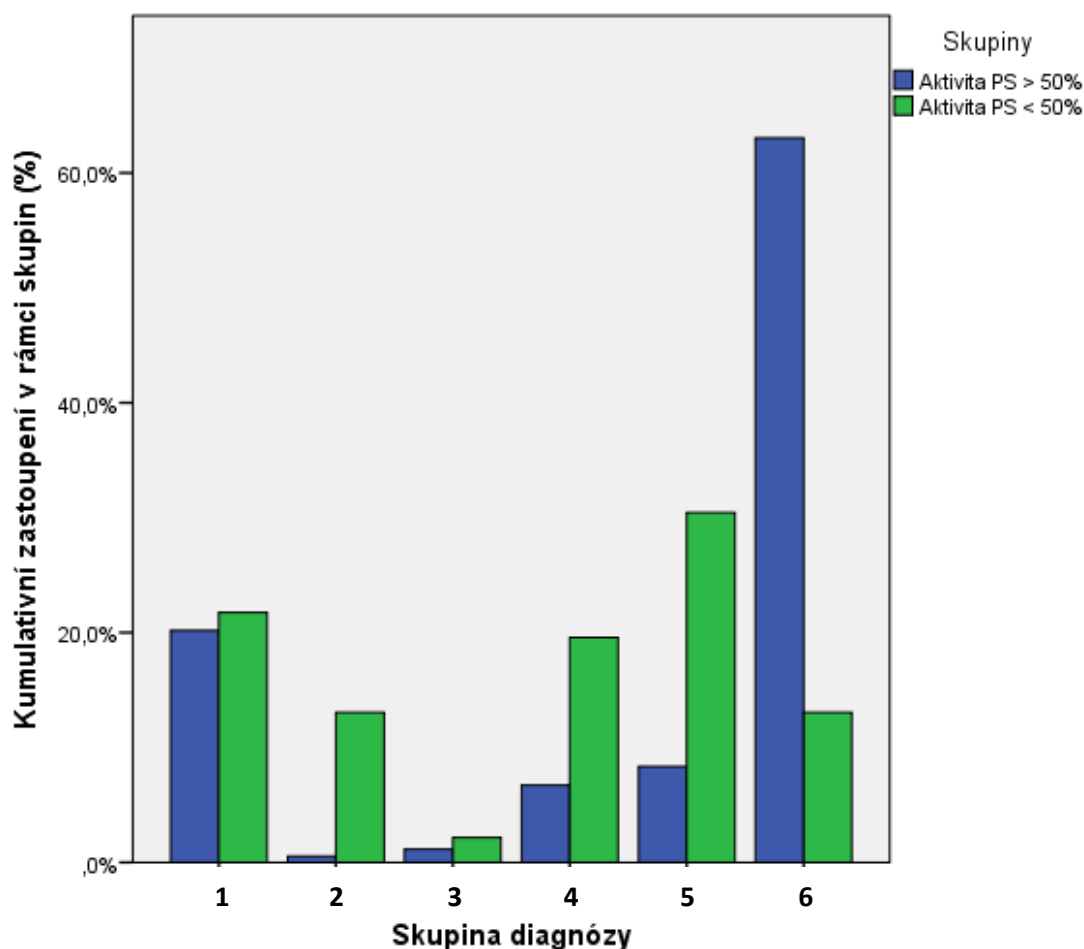
Provedli jsme centrovou retrospektivní analýzu, do které jsme zařadili všechny pacienty poprvé hospitalizované s hematoonkologickou diagnózou v období mezi 3.1.2013 a 31.12.2023. Následně jsme vyřadili všechny pacienty s nízkými hladinami proteinu C nebo jiných koagulačních faktorů, tedy pacienty s konzumpční koagulopatií, syntetickou jaterní dysfunkcí nebo dalšími stavy charakterizovanými globální poruchou koagulace. Finálně bylo do analýzy zahrnuto 1878 pacientů z čehož 46 pacientů mělo ve vstupním trombofilním screeningu izolovanou patologickou aktivitu PS (<50 %).

Diagnózy pozorované u pacientů s patologickou aktivitou PS byly rozděleny do těchto skupin: **1)** C920 – Akutní myeloblastická leukemie, **2)** C925 – Akutní myelomonocytická leukemie, **3)** C930 – Akutní monoblastická/monocytická leukemie, **4)** C910 – Akutní lymfoblastická leukemie, **5)** C921 – Chronická myeloidní leukemie (CML), BCR/ABL-pozitivní, **6)** ostatní myelo/lymfoproliferativní onemocnění (např. polycytemia vera, primární myelofibróza, akutní promyelocytární leukémie, myelodysplastický syndrom, chronická lymfatická leukémie, jiné neurčené leukémie, atd.).

V analýze bylo zjištěno, že se mezi danými skupinách onemocnění významně lišily jak absolutní hodnota PS aktivity ( $p < 0.001$ ; Kruskal-Wallis test, obrázek 3), tak proporce pacientů s patologickými hodnotami ( $p < 0.001$ ;  $\chi^2$  test, obrázek 4). Vůbec nejvyšší zastoupení pacientů s izolovanou patologickou PS aktivitou bylo ve skupině pacientů s akutní myelomonocytickou leukémií (37,5 %). Nepoměrné zastoupení pacientů s izolovaným získaným PS deficitem je demonstrováno na obrázku 4, kdy pacienti s myelomonocytickou leukémií tvořili nejmenší skupinu pacientů, ale současně zaujímali významnou proporcii ze všech patologických měření.



**Obrázek 3:** Zobrazení hodnot aktivity PS v hodnocených skupinách diagnóz. Křabicový graf rozděluje data do kvartilů, střední dělení představuje medián a zvýrazněné body odlehle hodnoty.



**Obrázek 4:** Zastoupení patologické aktivity PS napříč skupinami pacientů. Modře jsou znázorněny procentuální proporce pacientů s normální PS aktivitou v jednotlivých skupinách počítané ze všech pacientů s normální PS aktivitou. Zeleně jsou znázorněny proporce pacientů s patologickou PS aktivitou (<50 %) v jednotlivých skupinách počítané ze všech pacientů s patologickou PS aktivitou.

U těchto pacientů jde o izolovaný deficit PS s normálním PC a ostatními parametry koagulace (kromě FVIII a fibrinogenu, které se v akutní fázi naopak zvyšují), nejde tedy o konzumpční koagulopatii. U mnohočetného myelomu a leukémie (Miljić et al. 2000) byla popsána tvorba anti-PS autoprotilátek, které vyhytávají PS do imunokomplexů a dochází k jeho degradaci. Autoprotilátky jsme u této kohorty pacientů nesledovali, nicméně mohl by to být jeden z mechanismů snížení PS v akutní fázi choroby. Vzhledem k vysokému procentu pacientů s deficitem ve skupině s diagnózou akutní myelomonocytické leukémie je také možné, že se zde projevuje zvýšené vyhytávání PS TAM receptory, které se vyskytují na buňkách monocytární řady a na makrofázích. Nicméně není známo, zda i tyto blastické elementy exprimují TAMR a v jaké míře. Over-exprese této rodiny receptorů a také Gas6 byla potvrzena u několika maligních onemocnění i u akutní myeloidní leukémie (Whitman et al. 2014), což tuto hypotézu podporuje. V budoucnosti však bude potřeba tento vztah prokázat experimentálně na buněčných liniích.

## **Stabilita PS a dalších koagulačních parametrů ve zmražené plazmě**

Ve vzorcích směsné normální plazmy jsme prokázali dlouhodobou stabilitu po dobu maximálně 6 měsíců pro FVIII a PS, respektive 12 měsíců pro APTT, PT, fibrinogen a antitrombin, pokud byly uchovávány alespoň při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a zmražení probíhalo šokově. Ideálním způsobem skladování bylo ponoření v tekutém dusíku (až 12 měsíců pro FVIII), nicméně tato metoda skladování není pro laboratoře běžně dostupná.

APTT vykazovalo anomálii, kdy v období 14 dnů po zmražení byly hodnoty testu zvýšené nad interval nejistoty metody ( $>1\text{ CV}$ ) a po uplynutí tohoto období se vrátily do hodnot, které odpovídaly měření z čerstvé nemražené plazmy. Toto zvýšení má potenciál ovlivnit analýzy, které jsou závislé na APTT, například lupus antikoagulant. Dále také byly zvýšené obě stanovení PS (aktivita a volný antigen) nad nejistotu metody během prvních dvou měsíců skladování ve všech teplotách (včetně kapalného dusíku), ale aktivita PS začala klesat po uplynutí 2 měsíců, zatímco PS antigen zůstal zvýšený.

Anomálie přítomná na začátku skladovacího období u APTT byla už v minulosti pozorována v krátkodobých studiích, nicméně je možné, že se v těchto studiích projevila aktivace destiček po rozmražení plazmy, vzhledem k tomu, že vzorky nebyly před zmražením centrifugovány dvakrát (Rao et al. 2000; Awad et al. 2006). Dvojitá centrifugace je doporučena pro vzorky plazmy určené ke zmražení pro všechny koagulační analýzy, největší vliv zbytkových destiček je ale právě na APTT, což se nejčastěji pozoruje arteficiálním prodloužením časů APTT při stanovení lupus antikoagulant, které je na to obzvláště citlivé. V naší studii obsahovala plazma před zmražením  $<10 \times 10^3/\mu\text{l}$  destiček, což odpovídá doporučení. Nicméně je možné, že i toto stopové množství destiček stačí k tomu, aby při krátkodobém zmražení přežily a po rozmražení a jejich rozpadu způsobily prodloužení APTT. Stejný mechanismus mohl mít za následek i zvýšení PS aktivity a volného antigenu. PS je syntetizován také v megakaryocytech a ve zralých destičkách je v alfa-granulích obsaženo až 2,5 % plazmatické hladiny PS. Proti tomu jde zdánlivě skutečnost, že hladiny PS aktivity začaly po 2 měsících skladování klesat. Nicméně v literatuře bylo ukázáno, že PS aktivita po tomto iniciálním nárůstu později klesá při dlouhodobém skladování (Woodhams et al. 2001) a je tedy možné, že i přes toto zvýšení naměřených hodnot způsobené vyjitím PS z destiček dochází k degradaci PS aktivity jak volně v plazmě, tak v destičkovém poolu a výsledná změřená aktivita je součtem těchto protichůdných vlivů.

## **5. Závěry**

V této práci jsme charakterizovali genotyp a fenotyp kohorty pacientů s vrozeným deficitem proteinu S v České republice. Tato populace se významně nelišila od ostatních popsanych kohort v evropských a světových studiích. U pacientů s vrozeným deficitem PS jsme prokázali, že poloha mutace v SHBG-like oblasti PS představuje rizikový faktor hluboké žilní trombózy a jejího vzniku v mladším věku.

Dále jsme analýzou kohorty pacientů se získaným deficitem PS a aktivním hematoonkologickým onemocněním zjistili, že aktivita PS se signifikantně lišila mezi skupinami podle diagnózy s největším podílem patologických hodnot u pacientů s akutní myelomonocytární leukémií.

Prokázali jsme dostatečnou stabilitu všech sledovaných parametrů včetně proteinu S, pokud byly uchovávány alespoň při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a zmražení probíhalo šokově. Výsledky APTT, PS aktivity

a PS volného antigenu vykazovali krátkodobou anomálii, kdy se zvýšily nad nejistotu metody ve všech skupinách hned od začátku sledovaného období a po určité době se vrátily na úroveň výsledků z čerstvé plazmy (u vzorků uchovávaných při -80 °C a méně). Tato studie potvrzuje důležitost dodržování správných preanalytických postupů zejména u speciálních vyšetření koagulace jako je PS, jelikož tyto metody jsou velmi citlivé a jakékoliv prodlení v měření nebo nesprávná manipulace se vzorky či reagensii v kombinaci s možným arteficiálním zvýšením hodnot z důvodu zmrazení vzorku mohou vyústit v chybný výsledek.

Tato práce potvrzuje význam PS a jeho molekulární diagnostiky pro lepší odhad rizika trombózy u pacientů s vrozeným deficitem a zároveň ukazuje, jakým směrem by mohly být v budoucnu zaměřeny studie tohoto multifunkčního přirozeného inhibitoru koagulace.

## 6. Seznam publikací doktoranda

### Publikace I:

**Fenclova Tereza**, Matyskova Miloslava, Provaznikova Dana, Marecek Frantisek, Geierova Vera, Kovarova-Kudrnova Zuzana, Hrachovinova Ingrid. **The impact of PROS1 mutation position on thrombotic risk in protein S-deficient patients.** Research and practice in thrombosis and haemostasis. 2023 May 24;7(4):100194.

doi: 10.1016/j.rpth.2023.100194.

IF<sub>2023</sub> = 4,6

Podíl doktoranda na práci:

Měření hladiny a aktivity PS, genetická analýza, statistická analýza a příprava publikace.

### Publikace II:

**Fenclova Tereza**, Marecek Frantisek, Hrachovinova Ingrid. **Effects of frozen storage conditions and freezing rate on the stability of coagulation proteins in human plasma.** Blood coagulation and fibrinolysis. 2023 Sep 1;34(6):377-384.

doi: 10.1097/MBC.0000000000001239.

IF<sub>2022</sub> = 1,1

Podíl doktoranda na práci:

Příprava testované dárcovské plazmy, analýza koagulačních vyšetření, statistická analýza a příprava publikace.

## 7. Použitá literatura

- Adachi, Tomoko. 2005. „Protein S and Congenital Protein S Deficiency: The Most Frequent Congenital Thrombophilia in Japanese". *Current Drug Targets* 6 (5): 585–92. <https://doi.org/10.2174/1389450054545980>.
- Anderson, Howard A., Caroline A. Maylock, Joy A. Williams, Cloud P. Paweletz, Hongjun Shu, a Emily Shacter. 2003. „Serum-Derived Protein S Binds to Phosphatidylserine and Stimulates the Phagocytosis of Apoptotic Cells". *Nature Immunology* 4 (1): 87–91. <https://doi.org/10.1038/ni871>.
- Awad, Mohammed A., Omar A. Sharaf Eldeen, a Hoda A. Ibrahim. 2006. „Stability of Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test under Different Storage Conditions". *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 11 (5): 311–15. <https://doi.org/10.1080/10245330500397752>.
- Berczky, Zsuzsanna, Réka Gindele, Marianna Speker, a Judit Kállai. 2016. „Deficiencies of the Natural Anticoagulants - Novel Clinical Laboratory Aspects of Thrombophilia Testing". *EJIFCC* 27 (2): 130–46.
- Crowther, Mark A., a John G. Kelton. 2003. „Congenital Thrombophilic States Associated with Venous Thrombosis: A Qualitative Overview and Proposed Classification System". *Annals of Internal Medicine* 138 (2): 128–34. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-138-2-200301210-00014>.
- Dahlbäck, B. 2008. „Advances in Understanding Pathogenic Mechanisms of Thrombophilic Disorders". *Blood* 112 (1): 19–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-077909>.
- Deitcher, S. R., J. K. Erban, a S. A. Limentani. 1996. „Acquired Free Protein S Deficiency Associated with Multiple Myeloma: A Case Report". *American Journal of Hematology* 51 (4): 319–23. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8652\(199604\)51:4<319::AID-AJH12>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8652(199604)51:4<319::AID-AJH12>3.0.CO;2-9).
- Fenclova, Tereza, Miloslava Matyskova, Dana Provaznikova, Frantisek Marecek, Vera Geierova, Zuzana Kovarova-Kudrnova, a Ingrid Hrachovinova. 2023. „The Impact of PROS1 Mutation Position on Thrombotic Risk in Protein S-Deficient Patients". *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 7 (4): 100194. <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100194>.
- García de Frutos, Pablo, Pablo Fuentes-Prior, Begoña Hurtado, a Núria Sala. 2007. „Molecular Basis of Protein S Deficiency". *Thrombosis and Haemostasis* 98 (3): 543–56.
- Hackeng, Tilman M., Kristin M. Seré, Guido Tans, a Jan Rosing. 2006. „Protein S Stimulates Inhibition of the Tissue Factor Pathway by Tissue Factor Pathway Inhibitor". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (9): 3106–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504240103>.
- He, X., L. Shen, A. C. Malmberg, K. J. Smith, B. Dahlback, a S. Linse. 1997. „Binding Site for C4b-Binding Protein in Vitamin K-Dependent Protein S Fully Contained in Carboxy-Terminal Laminin-G-Type Repeats. A Study Using Recombinant Factor IX-Protein S Chimeras and Surface Plasmon Resonance". *Biochemistry* 36 (12): 3745–54. <https://doi.org/10.1021/bi962315q>.
- Chattopadhyay, Rima, Tanusree Sengupta, a Rinku Majumder. 2012. „Inhibition of Intrinsic Xase by Protein S: A Novel Regulatory Role of Protein S Independent of Activated Protein C". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (10): 2387–93. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.250928>.
- Kate, M. K. ten, a J. van der Meer. 2008. „Protein S Deficiency: A Clinical Perspective". *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 14 (6): 1222–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01775.x>.

- Lemke, Greg, a Carla V. Rothlin. 2008. „Immunobiology of the TAM Receptors". *Nature Reviews. Immunology* 8 (5): 327–36. <https://doi.org/10.1038/nri2303>.
- Margaglione, M., V. Brancaccio, N. Giuliani, G. D'Andrea, G. Cappucci, L. Iannaccone, G. Vecchione, E. Grandone, a G. Di Minno. 1998. „Increased Risk for Venous Thrombosis in Carriers of the Prothrombin G-->A20210 Gene Variant". *Annals of Internal Medicine* 129 (2): 89–93. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-129-2-199807150-00003>.
- Mateo, J., A. Oliver, M. Borrell, N. Sala, a J. Fontcuberta. 1997. „Laboratory Evaluation and Clinical Characteristics of 2,132 Consecutive Unselected Patients with Venous Thromboembolism--Results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study)". *Thrombosis and Haemostasis* 77 (3): 444–51.
- Miljić, P., N. Milosević-Jovicić, P. Antunović, D. Bosković, N. Basara, a Z. Rolović. 2000. „Recurrent Venous Thrombosis in a Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia and Acquired Protein S Deficiency". *Haematologia* 30 (1): 51–54. <https://doi.org/10.1163/15685590051129896>.
- Rao, L. V., A. O. Okorodudu, J. R. Petersen, a M. T. Elghetany. 2000. „Stability of Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time Tests under Different Storage Conditions". *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 300 (1–2): 13–21. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(00\)00288-6](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(00)00288-6).
- Sasaki, Takako, Pjotr G. Knyazev, Yuri Cheburkin, Walter Göhring, Dominic Tisi, Axel Ullrich, Rupert Timpl, a Erhard Hohenester. 2002. „Crystal Structure of a C-Terminal Fragment of Growth Arrest-Specific Protein Gas6. Receptor Tyrosine Kinase Activation by Laminin G-like Domains". *The Journal of Biological Chemistry* 277 (46): 44164–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207340200>.
- Schmidel, D. K., A. V. Tatro, L. G. Phelps, J. A. Tomczak, a G. L. Long. 1990. „Organization of the Human Protein S Genes". *Biochemistry* 29 (34): 7845–52. <https://doi.org/10.1021/bi00486a010>.
- Sim, Martha M. S., Meenakshi Banerjee, Thein Myint, Beth A. Garvy, Sidney W. Whiteheart, a Jeremy P. Wood. 2022. „Total Plasma Protein S Is a Prothrombotic Marker in People Living With HIV". *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 90 (4): 463–71. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000002994>.
- Stitt, T. N., G. Conn, M. Gore, C. Lai, J. Bruno, C. Radziejewski, K. Mattsson, J. Fisher, D. R. Gies, a P. F. Jones. 1995. „The Anticoagulation Factor Protein S and Its Relative, Gas6, Are Ligands for the Tyro 3/Axl Family of Receptor Tyrosine Kinases". *Cell* 80 (4): 661–70. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90520-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90520-0).
- Stoichitoiu, Laura Elena, Larisa Pinte, Marius Ioan Balea, Valentin Nedelcu, Camelia Badea, a Cristian Baicus. 2020. „Anticoagulant Protein S in COVID-19: Low Activity, and Associated with Outcome". *Romanian Journal of Internal Medicine = Revue Roumaine De Medecine Interne* 58 (4): 251–58. <https://doi.org/10.2478/rjim-2020-0024>.
- Whitman, Susan P., Jessica Kohlschmidt, Kati Maharry, Stefano Volinia, Krzysztof Mrózek, Deedra Nicolet, Sebastian Schwind, et al. 2014. „GAS6 Expression Identifies High-Risk Adult AML Patients: Potential Implications for Therapy". *Leukemia* 28 (6): 1252–58. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.371>.
- Woodhams, B., O. Girardot, M. J. Blanco, G. Colesse, a Y. Gourmelin. 2001. „Stability of Coagulation Proteins in Frozen Plasma". *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 12 (4): 229–36. <https://doi.org/10.1097/00001721-200106000-00002>.