

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Porovnání výsledků agregace trombocytů u  
pacientů s heterozygotní mutací faktoru V Leiden  
nebo protrombinu G20210A s trombózou a bez ní**

**Bc. Kristýna Vacíková**

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Filip Vrbacký, Ph.D.**

**Konzultant: MUDr. Petr Kessler**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2024**

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala MUDr. Petru Kesslerovi za jeho cenný čas, pozornost, neocenitelnou pomoc, rady, připomínky, ochotu a zájem, které mi věnoval během tvorby této práce. Mé poděkování patří také odbornému garantovi RNDr. Filipu Vrbackému, Ph.D. za pomoc při vypracování diplomové práce. Nemohu opomenout ani všechny pracovníky Oddělení hematologie a transfuziologie Nemocnice Pelhřimov, bez jejichž spolupráce by tato práce nemohla vzniknout.

„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, 31.8. 2024

# 1. OBSAH

1.	OBSAH .....	4
2.	ABSTRAKT .....	6
3.	ABSTRACT .....	9
4.	ÚVOD .....	12
5.	ZADÁNÍ – CÍLE PRÁCE .....	13
6.	TEORETICKÁ ČÁST .....	14
6.1	Hemostáza .....	14
6.2	Složky hemostázy .....	15
6.2.1	Reflexní vazokonstrikce .....	15
6.2.2	Úloha trombocytů v hemostáze .....	16
6.2.3	Trombocyty a proces hemostázy .....	20
6.2.4	Hemokoagulace .....	23
6.2.5	Fibrinolytický systém .....	29
6.3	Faktor II .....	30
6.4	Faktor V .....	30
6.4.1	Leidenská mutace faktoru V .....	31
6.4.2	Historie Leidenské mutace .....	31
6.4.3	Dědičnost Leidenské mutace .....	32
6.4.4	Formy Leidenské mutace .....	32
6.4.5	Diagnostika mutace .....	33
6.4.6	Léčba .....	33
6.5	Mutace protrombinu G20210A .....	34
6.6	Syndrom lepivých destiček .....	35
6.6.1	Historie SPS .....	35
6.6.2	Klasifikace SPS .....	36
6.6.3	Laboratorní diagnostika SPS .....	37
6.7	Optická agregometrie .....	38
6.8	Impedanční agregometrie .....	40
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	41
7.1	Charakteristika zkoumaného souboru .....	41

7.2	Preanalytická fáze .....	41
7.3	Vyšetřovaný materiál .....	42
7.3.1	Odběr vzorku pro vyšetření agregace trombocytů.....	42
7.3.2	Příprava vzorku pro vyšetření agregace trombocytů .....	42
7.4	Analytická fáze .....	43
7.5	Přístrojové vybavení.....	44
7.5.1	Centrifuga Universal 320.....	44
7.5.2	Coulter DxH 900 .....	44
7.5.3	Sysmex CS 2500.....	45
7.6	Laboratorní pomůcky .....	46
7.6.1	Reagencie.....	46
7.6.2	Induktory.....	46
7.7	Postup měření agregace trombocytů.....	48
7.8	Postanalytická fáze .....	51
7.8.1	Interpretace a zpracování naměřených výsledků.....	51
8.	VÝSLEDKY.....	52
8.1	Základní demografické údaje a hodnoty krevního obrazu .....	52
8.2	Primární cíle .....	54
8.2.1	Porovnání výsledků agregace u obou skupin .....	54
8.2.2	Porovnání výskytu zvýšené agregability definované jako dosažení maximální amplitudy $\geq 60\%$ u obou skupin .....	59
8.2.3	Porovnání výskytu zvýšené agregability definované jako dosažení maximální amplitudy odpovídající nejvyššímu kvartilu hodnot získaných vyšetřením zdravých osob .....	63
8.3	Sekundární cíle.....	68
9.	DISKUSE .....	75
10.	ZÁVĚR .....	77
11.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	78
12.	SEZNAM TABULEK .....	80
13.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	82
14.	POUŽITÁ LETERATURA.....	83
15.	PŘÍLOHA .....	92

## 2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**Autor:** Bc. Kristýna Vacíková

**Vedoucí práce:** RNDr. Filip Vrbacký, Ph.D.

**Konzultant:** MUDr. Petr Kessler

**Název diplomové práce:** Porovnání výsledků agregace trombocytů u pacientů s heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A s trombózou a bez ní

Heterozygotní mutace koagulačního faktoru V Leiden a heterozygotní mutace protrombinu G20210A jsou trombofilní stavy, které zvyšují riziko žilního tromboembolismu. Zdaleka ne všichni nosiči těchto mutací však trombózu prodělají. O významu zvýšené agregability trombocytů jako rizikového faktoru žilního tromboembolismu se diskutuje.

### **Cíle studie:**

**Primární cíle:** 1. Zjistit, zda u osob s prokázanou heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A, které prodělaly trombózu, je agregabilita trombocytů s nízkými koncentracemi ADP a epinefrinu zvýšená proti agregaci u osob s heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A, které trombózu neprodělaly. 2. Zjistit, zda zvýšená agregabilita, definovaná: a) jako maximální amplituda  $\geq 60$  % b) jako maximální amplituda odpovídající nejvyššímu kvartilu hodnot zjištěných v souboru zdravých dobrovolníků se vyskytuje častěji u osob s heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A, které prodělaly trombózu než u osob s těmito mutacemi, které trombózu neprodělaly.

**Sekundární cíle:** 1. Zjistit korelaci výsledků vyšetření vzorků získaných odběrem do uzavřeného vakuového systému s výsledky vyšetření vzorků získaných odběrem volně vytékající krve do otevřeného systému. 2. Zjistit, zda existují rozdíly mezi výsledky získanými vyšetřením vzorků získaných odběrem do uzavřeného vakuového systému

s výsledky vyšetření vzorků získaných odběrem volně vytékající krve do otevřeného systému.

**Soubor:** 55 pacientů, kteří prodělali trombózu a 99 pacientů, kteří trombózu neprodělali. Mezi osobami, které prodělaly trombózu, bylo 46 nosičů heterozygotní mutace faktoru V Leiden a 9 nosičů heterozygotní mutace protrombinu G20210A, mezi osobami, které neprodělaly trombózu bylo 83 nosičů heterozygotní mutace faktoru V Leiden a 16 nosičů heterozygotní mutace protrombinu G20210A.

**Metodika:** Z osob evidovaných v registru trombofilních stavů byly vybrány osoby s prokázanou heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A, které neprodělaly trombózu (skupina A). Z osob s těmito mutacemi, které trombózu neprodělaly, byly vybrány osoby kontrolního souboru (skupina B), tak aby mezi oběma soubory nebyly statisticky významné rozdíly v základních demografických datech (věk a pohlaví). Tyto osoby byly vyzvány k účasti do studie a poučeny o přípravě k vyšetření agregace trombocytů. Po podepsání informovaného souhlasu a kontrole zaměřené na dodržení pokynů a vynechání léků ovlivňující funkci trombocytů byly provedeny plánované odběry krve: 1 zkumavka s EDTA na krevní obraz, 5 zkumavek s 0,109 mol/l citrátem sodným, z toho nejdříve do 3 zkumavek vakuovaných (systém Vacutainer) a pak do 2 zkumavek nevakuovaných (otevřený systém).

Příprava destičkami bohaté plazmy (PRP) a destičkami chudé plazmy (PPP) centrifugací byla provedena po 30 minutách od odběru, vyšetření agregace trombocytů bylo provedeno do 1 hodiny od ukončení centrifugace optickou agregometrií s koncentracemi epinefrinu 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 0,5  $\mu\text{M}$  a s koncentracemi ADP 2,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 0,5  $\mu\text{M}$ . Hodnoceny byly hodnoty maximální amplitudy.

**Výsledky:** Na rozdíl od našeho původního předpokladu byly naměřené hodnoty vyšší u pacientů, kteří neprodělali trombózu v porovnání s hodnotami naměřenými u pacientů s anamnézou prodělané trombózy. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny při vyšetření vzorků odebraných do vakuovaného systému (Vacutainer) při koncentracích ADP 1  $\mu\text{M}$  ( $p=0,00708$ ) a ADP 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p=0,00077$ ) a při vyšetření vzorků odebraných do nevakuovaného systému při koncentraci ADP 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p=0,00708$ ). Rozdíly při vyšetření s epinefrinem a ostatními koncentracemi ADP nebyly statisticky významné.

Byla zjištěna závislost výskytu zvýšené agregability (definované jako maximální amplituda v rozmezí nejvyššího kvartilu hodnot získaných vyšetřením zdravých dobrovolníků) a nepřítomnosti trombózy v anamnéze jen při vyšetření vzorků odebraných do nevakovaného systému použitím ADP v koncentraci 2,5  $\mu$ M ( $p=0,026$ ), ve všech ostatních případech nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v zastoupení zvýšené agregability trombocytů mezi pacienty s anamnézou trombózy a osobami bez anamnézy trombózy.

Byla zjištěna silná a statisticky významná korelace mezi výsledky získanými vyšetřením vzorků odebraných do vakuovaného systému s výsledky získanými vyšetřením vzorků odebraných do nevakovaného systému. (Spearmanovy koeficienty v rozmezí 0,767 až 0,840,  $p < 0,00001$ ). Mezi výsledky získanými vyšetřením vzorků odebraných do vakuovaného systému a výsledky získanými vyšetřením vzorků odebraných do nevakovaného systému však existují statisticky významné rozdíly, při odběru do vakuovaného systému je naměřená maximální amplituda vyšší při použití všech koncentrací obou induktorů.

**Závěr:** Nebyl prokázán náš původní předpoklad, že u pacientů s heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A, kteří prodělali trombózu (skupina A), v porovnání s jedinci s těmito mutacemi, kteří trombózu neprodělali (skupina B) je častěji přítomna zvýšená agregabilita trombocytů s nízkými koncentracemi ADP a epinefrinu. Výsledky získané vyšetřením vzorků odebraných do vakuovaného systému silně korelují s výsledky získanými vyšetřením vzorků odebraných do nevakovaného systému, ale nejsou srovnatelné, existují mezi nimi statisticky významné rozdíly. V klinické praxi je tedy nutno používat jen jednu z uvedených metod odběru.

**Klíčová slova:** žilní tromboembolismus (VTE); faktor V Leiden; mutace protrombinu G20210G; agregace trombocytů; optická agregometrie (LTA)



### 3. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

**Author:** Bc. Kristýna Vacíková

**Supervisor:** RNDr. Filip Vrbacký, Ph.D.

**Consultant:** MUDr. Petr Kessler

**Title of diploma thesis:** Comparison of platelet aggregation results in patients with heterozygous factor V Leiden or prothrombin G20210A who have undergone thrombosis versus those who have not undergone thrombosis.

**Background:** Heterozygous mutations of coagulation factor V Leiden and prothrombin G20210A are thrombophilic states that increase the risk of venous thromboembolism. However, not all carriers of these mutations will develop thrombosis. The significance of increased platelet aggregability as a risk factor for venous thromboembolism is being discussed.

**Study objectives:**

**Primary objectives:** 1. To determine whether individuals with proven heterozygous mutations of factor V Leiden or prothrombin G20210A who have experienced thrombosis have increased platelet aggregability with low concentrations of ADP and epinephrine compared to individuals with these mutations who have not experienced thrombosis. 2. To determine whether increased aggregability, defined as: a) maximum amplitude  $\geq 60\%$  b) maximum amplitude corresponding to the highest quartile of values obtained from healthy volunteers, occurs more frequently in individuals with heterozygous mutations of factor V Leiden or prothrombin G20210A who have experienced thrombosis compared to those who have not.

**Secondary objectives:** 1. To determine the correlations between the results of samples obtained using a closed vacuum system and those obtained using an open system. 2. To determine whether there are differences between the results obtained using a closed vacuum system and those obtained using an open system.

**Participants:** 55 persons who have experienced thrombosis and 99 persons who have not. Among those who have experienced thrombosis, 46 were carriers of heterozygous mutation of factor V Leiden and 9 were carriers of heterozygous mutation of prothrombin G20210A. Among those who have not experienced thrombosis, 83 were carriers of heterozygous mutation of factor V Leiden and 16 were carriers of heterozygous mutation of prothrombin G20210A.

**Methods:** Individuals with proven heterozygous mutations of factor V Leiden or prothrombin G20210A who have not experienced thrombosis (group A) were selected from the registry of thrombophilic states. A group of matched controls (group B) was selected from individuals with these mutations who have not experienced thrombosis, ensuring that there were no statistically significant differences in basic demographic data (age and sex) between the two groups. These individuals were invited to participate in the study and were instructed on how to be prepared for platelet aggregation testing. After signing informed consent and checking for adherence to instructions and after exclusion of medications affecting platelet function, blood samples were collected using: 1 tube with EDTA for blood count, 5 tubes with 0,109 mol/l sodium citrate; the first 3 tubes were vacuum-sealed (Vacutainer system) and the last 2 tubes were not vacuum-sealed (open system).

Preparation of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP) was performed by centrifugation starting 30 minutes after blood collection, and platelet aggregation testing was performed within 1 hour of centrifugation completion using optical aggregometry with concentrations of epinephrine 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , and 0,5  $\mu\text{M}$ , and concentrations of ADP 2,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , and 0,5  $\mu\text{M}$ . Maximum amplitude values were evaluated.

**Results:** Contrary to our original hypothesis, higher values were measured in patients who have not experienced thrombosis compared to patients with a history of thrombosis. Statistically significant differences were found when the samples obtained using a vacuum-sealed system (Vacutainer) were examined at concentrations of ADP 1  $\mu\text{M}$  ( $p=0.00708$ ) and ADP 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p=0.00077$ ), and when the samples obtained using an open system were examined at a concentration of ADP 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p=0.00708$ ).

No statistically significant differences were found with epinephrine and other concentrations of ADP.

A statistically significant relation was found between the occurrence of increased aggregability (defined as maximum amplitude within the range of the highest quartile of values obtained by investigation of healthy volunteers) and the absence of thrombosis in the history when the samples obtained using an open system were examined with ADP at a concentration of 2,5  $\mu\text{M}$  ( $p=0.026$ ). In all other cases, no statistically significant differences of the proportions of persons with increased platelet aggregability were found between persons with a history of thrombosis and persons without a history of thrombosis.

A strong and statistically significant correlations were found between the results obtained using a vacuum-sealed system and those obtained using an open system (Spearman's coefficients in the range of 0,767 to 0,840,  $p<0.00001$ ). However, statistically significant differences were found between the results obtained using a vacuum-sealed and open system.

**Conclusion:** Our initial hypothesis was not confirmed: that patients with a heterozygous mutation in factor V Leiden or prothrombin G20210A who have experienced thrombosis (Group A) would exhibit a higher frequency of increased platelet aggregability in response to low concentrations of ADP and epinephrine, compared to individuals with these mutations who have not experienced thrombosis (Group B). The results obtained from samples collected using a vacuum system strongly correlate with those obtained from samples collected using a non-vacuum system, but they are not comparable; there are statistically significant differences between them. Therefore, in clinical practice, only one of the collection methods should be used.

**Keywords:** Venous Thromboembolism (VTE), Factor V Leiden, Prothrombin G20210A Mutation, Platelet Aggregation; Light Transmission Aggregometry (LTA)

## 4. ÚVOD

Žilní tromboembolismus (VTE) představuje závažný zdravotní problém s vysokou morbiditou a mortalitou. Mezi nejčastější genetické predispozice k VTE se řadí heterozygotní mutace faktoru V Leiden a protrombinu G20210A. Tyto trombofilní stavy jsou spojeny se zvýšeným rizikem tvorby krevních sraženin v žilním systému. Přesto však zdaleka ne všichni jedinci nesoucí tyto mutace skutečně prodělají trombózu, což naznačuje, že další faktory mohou hrát klíčovou roli v patogenezi tohoto onemocnění.

Jedním z diskutovaných rizikových faktorů je zvýšená agregabilita trombocytů. Trombocyty (krevní destičky) hrají zásadní roli v hemostáze a jejich zvýšená agregabilita může přispívat k tvorbě trombů. Přesto je stále předmětem výzkumu, do jaké míry tento mechanismus přispívá k riziku VTE u jedinců s trombofilními mutacemi.

Cílem této diplomové práce je prozkoumat agregabilitu trombocytů u osob s prokázanou heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A, které prodělaly trombózu, a porovnat ji s agregabilitou trombocytů u osob s těmito mutacemi, které trombózu neprodělaly. K tomuto účelu bude sledována agregace trombocytů při nízkých koncentracích adenosindifosfátu (ADP) a epinefrinu, což jsou dva významné aktivátory trombocytů. Výsledky této studie mohou přinést nové poznatky o mechanismech vzniku trombózy a přispět k lepšímu porozumění individuálním rizikům spojeným s trombofilními stavy.

Tato práce tedy nejen prohloubí znalosti o vztahu mezi genetickými predispozicemi a funkční aktivitou trombocytů, ale také může přispět k vývoji nových preventivních a terapeutických strategií pro jedince s vysokým rizikem VTE.

## 5. ZADÁNÍ – CÍLE PRÁCE

### Primární cíl:

Zjistit, zda u osob s prokázanou heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A, které prodělaly trombózu (skupina A) je agregabilita trombocytů s nízkými koncentracemi ADP a epinefrinu zvýšená oproti agregaci u osob s heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A, které trombózu neprodělaly (skupina B) s využitím těchto statistických přístupů:

- a) porovnání výsledků agregace u obou skupin
- b) porovnání výskytu zvýšené agregability definované jako dosažení maximální amplitudy  $\geq 60\%$  u obou skupin
- c) porovnání výskytu zvýšené agregability definované jako dosažení maximální amplitudy odpovídající nejvyššímu kvartilu hodnot získaných vyšetřením zdravých osob

### Sekundární cíl:

Zjistit u zkoumaných osob korelaci výsledků agregace trombocytů s nízkými koncentracemi induktorů při odběru do vakuované zkumavky s výsledky získanými vyšetřením vzorků odebraných do nevakuované zkumavky.

## 6. TEORETICKÁ ČÁST

### 6.1 Hemostáza

Hemostáza, označující zastavení krvácení, představuje komplexní fyziologický proces, který zajišťuje udržení krve v tekutém stavu uvnitř cév a zabraňuje její ztrátě po poranění prostřednictvím tvorby krevní sraženiny. Tento proces zahrnuje několik zásadních systémů: cévní systém, koagulační systém, fibrinolytický systém, trombocyty, kininový systém, inhibitory serinových proteáz a komplementový systém. Při poškození cévní stěny dochází k vazokonstrikci, což je prvotní odpověď na poranění, a následně jsou aktivovány krevní destičky, které adherují na subendoteliální struktury, kde agregují a vytvářejí primární zátku v místě poranění. Proces je podporován faktory jako von Willebrandův faktor (vWF) a destičkovými receptory (IIb/IIIa a Ib/IX). Sekundární hemostáza zahrnuje komplexní koagulační kaskádu, která vede k přeměně fibrinogenu na fibrin a tvorbě stabilní fibrinové sítě, jež přemění primární destičkovou zátku na pevnou krevní sraženinu. (Ogedegbe, 2002; Lapelusa a Dave, 2023; Indrák et. al., 2006)

Hemostatický proces vyžaduje jemnou rovnováhu mezi tvorbou a rozpuštěním sraženiny, kterou zajišťují fibrinolytické enzymy, jako je plazmin. Narušení této rovnováhy může vést k patologickým stavům, jako je trombóza v důsledku hyperkoagulace nebo hemoragie způsobená hypokoagulací. Důležitou součástí tohoto procesu je také kininový systém a inhibitory serinových proteáz, které modulují zánětlivé reakce a zajišťují rovnováhu mezi koagulací a fibrinolýzou. Porozumění těmto komplexním interakcím je klíčové pro diagnostiku a léčbu poruch spojených s krvácením a trombózou. (Ogedegbe, 2002; Gale, 2011; Favaloro et al., 2019)

## **6.2 Složky hemostázy**

V této diplomové práci budu používat dva podobné pojmy – hemostáza a hemokoagulace, které však nejsou synonyma. Rozdíl mezi hemostázou a hemokoagulací spočívá v jejich významu a rozsahu. Hemostáza je komplexní fyziologický proces, který zahrnuje všechny fáze procesu zastavení krvácení, zatímco hemokoagulace představuje specifickou fázi tohoto procesu. Celkově můžeme identifikovat čtyři fáze procesu zastavení krvácení:

- Reflexní vazokonstrikce
- Adheze, aktivace a agregace trombocytů
- Hemokoagulace
- Trombolýza a reparace poškození

Hemokoagulace neboli srážení krve, je komplexní fyziologický proces, při kterém se tekutá krev přeměňuje na pevnou sraženinu. Tento proces je řízen kaskádou koagulačních faktorů, které společně tvoří složitý systém vzájemných interakcí. Klíčovým momentem tohoto procesu je přeměna rozpustné plazmatické bílkoviny fibrinogenu na nerozpustný fibrin, kterou katalyzuje enzym trombin. Fibrin následně formuje odolnou fibrinovou síť, která stabilizuje vzniklou sraženinu. (Fontana a Lavříková, 2024)

### **6.2.1 Reflexní vazokonstrikce**

Zjednodušeně lze říct, že poranění cévní stěny způsobuje podráždění její hladké svaloviny, což vede k reflexní vazokonstrikci. Tento základní, ale velmi důležitý mechanismus je podporován několika látkami. Nejvýznamnější z nich jsou tromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) a serotonin, oba syntetizované trombocyty, jejichž prostřednictvím je zesílena reflexní vazokonstrikce. (Fontana a Lavříková, 2024)

#### **6.2.1.1 Cévní stěna**

Cévní stěna s endotelem hraje v hemostáze důležitou roli. Cévní systém poskytuje prostor pro krevní oběh, zajišťující mimo jiné transport kyslíku navázaného na hemoglobin v erytrocytech ke tkáním. Cévní stěna hraje významnou roli v hemostáze. Důležitým faktorem hemostázy je pevnost cévního systému.

Stěny krevních cév se skládají ze tří vrstev (z lat. *tunica* = vrstva, plášť) – *tunica intima*, *tunica media*, *tunica adventicia*.

Vnitřní vrstvou je *tunica intima*, která je tvořena jednovrstvou výstelkou endotelových buněk, spojených polysacharidovou intercelulární matrix obklopených z vnější strany bazální membránou, a v tepenném řečišti vrstvou elastických vláken. Z hlediska hemostázy je tato vrstva velmi důležitou součástí. Endoteliální buňky vykazují intenzivní metabolismus, jehož produkty jsou významné látky. Mezi tyto látky patří: EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor), vWF (von Willebrandův faktor), tkáňový aktivátor plasminogenu, endotelin, trombomodulin, receptor proteinu S, trombospondin, fibronectin a další.

Intaktní endotel hraje důležitou roli v ochraně před trombózou, zatímco za patologických okolností tuto ochrannou roli ztrácí, například při sepsi, kdy je snižena exprese trombomodulinu a naopak se objevuje exprese tkáňového faktoru. (Ito et al., 2021)

Druhá vrstva se nazývá *tunica media*, je složena ze šroubovitě orientovaných buněk hladkého svalstva, zodpovídající za elasticitu a cévní tonus. Nachází se zde kolagenní a elastická vlákna, proteoglykany. Je bohatá na retikulární vlákna (kolagen typu III).

Třetí vrstva stěny cévní se nazývá *tunica adventicia* (*adventicie*). Je tvořena především kolagenními a elastickými vlákny (kolagen typu I). (Pecka, 2004; Penka a Slavíčková, 2011; Iba a Levy, 2019)

### **6.2.2 Úloha trombocytů v hemostáze**

Trombocyty jsou oválné bezjaderné elementy, vznikající odštěpováním z cytoplazmy megakaryocytů. Odhaduje se, že jeden megakaryocyt může produkovat 1000–5000 trombocytů. Vedle kostní dřeně některé studie také naznačují, že trombocyty mohou být produkovány z megakaryocytů v plicích (Lefrançois et al., 2017). Trombocyty mohou vznikat z megakaryocytů dvěma způsoby: tvorbou pseudopodií, následnou fragmentací nebo přímým rozpadem megakaryocytů. Proces tvorby trombocytu ze zralého megakaryocytu přibližně trvá 5 hodin. V krevním řečišti přežívají 8–12 dní. Po uplynutí



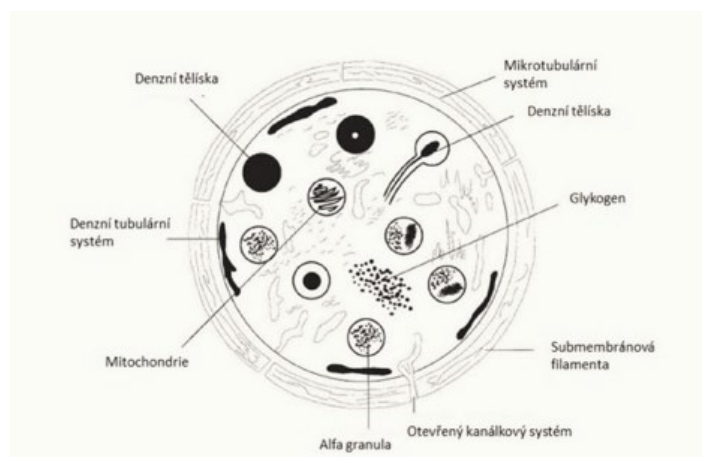
této doby jsou odstraňovány v retikuloendotelovém systému sleziny, jater a kostní dřeni. (Mourek, 2012; Repsold a Joubert, 2021; Holinstat, 2017)

Protože trombocyty postrádají jádro, ztrácejí postupně schopnost proteosyntézy. Některé jejich organely, jako mitochondrie a Golgiho aparát, však vykazují velmi intenzivní metabolickou aktivitu. Hlavním zdrojem energie pro trombocyty je glukóza, která je metabolizována prostřednictvím aerobní glykolýzy. Cytoplazma krevních destiček obsahuje řadu molekul, které podmiňují kontraktilitu trombocytu, například mikrotubuly, aktin a myosin. Kontrakcí dochází jednak k retrakci trombu, tak k exocytóze obsahu trombocytových granul. (Fontana a Lavříková, 2024)

Na procesech krevního srážení se podílejí také trombocytární fosfolipidy, například tzv. PF 3 (Platelet Factor 3). Během aktivace destiček jsou tyto fosfolipidy vystavovány pomocí flip–flop mechanismu. Fosfolipidy umožňují interakci a spolupráci koagulačních faktorů, přičemž vazba je podporována také ionty  $Ca^{2+}$  a  $\gamma$ -karboxyglutamátem přítomným v molekulách těchto faktorů. Výsledkem je tvorba enzymových komplexů na povrchu aktivovaných trombocytů, což zajišťuje přesné zacílení hemostázy. (Fontana a Lavříková, 2024)

### **6.2.2.1 Morfologická charakteristika**

Pro lepší pochopení lze strukturu krevní destičky konceptuálně rozdělit na periferní zónu, zónu solubilního gelu, zónu organel a oblast membránových systémů. (Gremmel et al., 2016)



**Obrázek 1 Trombocyt**

(Upraveno dle (Munker, 2006))

**Periferní zóna** trombocytů zahrnuje destičkovou membránu a submembránovou oblast. Plazmatická membrána je hladká a má silnější glykokalyx než jiné krevní elementy. Elektronová mikroskopie s vysokým rozlišením odhaluje vrásčitý povrch s mnoha malými záhyby a náhodně rozloženými otvory otevřeného kanalikulárního systému. Glykokalyx, vnější obal krevní destičky je dynamická struktura a představuje primární místo interakce s okolním prostředím. Obsahuje povrchové glykoproteiny (GP), které jsou klíčové pro interakci trombocytů se subendoteliálními strukturami poškozené cévní stěny, jejich aktivaci, adhezi a agregaci, a také pro retrakci sraženiny. Pod glykokalyx je situována nestlačitelná a neroztažitelná lipidová dvojvrstva. Tato dvojvrstva, morfologicky podobná membránám jiných buněk, je zásadní pro proces koagulace. Obsahuje tkáňový faktor, který je po aktivaci trombocytů vystaven na jejich povrch v neaktivní formě spolu s negativně nabitým fosfatidylserinem. Po aktivaci trombocyty uvolňují mikročástice obsahující tkáňový faktor, které mohou vázat koagulační faktory Va, VIIa, a Xa na povrchový fosfatidylserin. Díky interakci těchto koagulačních faktorů s tkáňovým faktorem se zvyšuje tvorba trombinu na povrchu aktivovaných trombocytů, rovněž tak na mikročásticích, které se z trombocytů uvolnily. Submembránová oblast se vyskytuje bezprostředně pod lipidovou dvojvrstvou a obsahuje kontraktilní cytoskelet, který je složen z tenkých aktivovaných vláken. Tento cytoskelet je nezbytný pro změnu tvaru trombocytu a translokaci receptorů a částic po jejich povrchu. (Malíková, 2012; Gremmel et al., 2016)

**Oblast solubilního gelu**, známá také jako sol–gel, je průhledná, viskózní matrice uvnitř trombocytů. Tato oblast připomíná tekutý gel a obsahuje organizované mikrotubuly a mikrofilamenta, náhodně rozmístěný glykogen, několik hladkých a klathrinem potažených vezikul a sekreční organely. Mikrotubuly jsou uspořádány do obvodových závitků blízko buněčné membrány, čímž vytvářejí systém, který podporuje kontraktilní cytoskelet membrány. Výzkumy naznačují, že mikrotubuly jsou nezbytné pro zachování diskoidního tvaru lidských krevních destiček. (White a Krivit, 1967; Gremmel et al., 2016)

Aktivovaná mikrofilamenta v sol–gel oblasti tvoří cytoplazmatický cytoskeleton z aktinových filament, což je matrice, ve které jsou všechny organely suspendovány. Po aktivaci trombocytů dochází k tomu, že cytoplazmatický aktinový systém stahuje

spirály mikrotubulů a přesouvá  $\alpha$ -granule a hustá tělíska do centra trombocytu. Tento proces může vést k sekreci jejich obsahu prostřednictvím otevřeného kanálkového systému. (Gremmel et al., 2016)

**Krevní destičky obsahují tři hlavní typy granulí.** Prvním typem jsou hustá (denzní) granula, přičemž každý trombocyt má přibližně 4–6 těchto granulí. Tato granula obsahují více než 200 různých malých molekul a iontů, včetně vápníku, ATP, ADP, serotoninu (5-HT) a epinefrinu.

Druhým typem jsou  $\alpha$ -granula, z nichž každá krevní destička obsahuje kolem 60–80 těchto granulí. Alfa-granula obsahují řadu větších proteinů, které jsou po sekreci uvolněny buď na povrch trombocytů, nebo do krevního oběhu. Jedním z ukazatelů aktivace trombocytů, který se uvolňuje z  $\alpha$ -granulí, je P-selektin, který se po sekreci ukotví na vnější stranu plazmatické membrány trombocytu a může sloužit jako spoj mezi trombocyty a dalšími buňkami v cévách.

Třetím typem granulí v krevních destičkách jsou lysozomální granula, která mají zásadní roli v degradaci proteinů. (Holinstat, 2017)

V oblasti organel můžeme také najít mitochondrie, které představují asi 3 % celkového objemu trombocytů. I přes jejich nízký počet a jednoduchou strukturu zabezpečují energetické požadavky trombocytů. energii získávají prostřednictvím oxidativní fosforylace. (Gremmel et al., 2016; Chaloupková, 2018)

**Oblast membránových systémů** zahrnuje otevřený kanalikulární systém (kanálkový systém), denzní tubulární systém a drsné endoplazmatické retikulum. Otevřený kanálkový systém je integrovanou součástí povrchové membrány krevních destiček, která se rozprostírá dovnitř destičky, čímž se zvětšuje celkový povrch. Tento systém slouží k transportu plazmatických složek, jako je například fibrinogen do alfa granulí. Dále funguje jako cesta pro uvolňování granulárního obsahu během aktivace krevních destiček. Kromě toho mohou být kanály otevřeného kanalikulárního systému evaginovány, čímž poskytují membránové struktury nezbytné pro šíření aktivovaných krevních destiček po jejich adhezi na poraněnou cévní stěnu. Tento mechanismus umožňuje aktivovaným trombocytům zvětšit svůj povrch více než čtyřnásobně ve srovnání s klidovými diskoidními destičkami. Denzní tubulární systém představuje

endomembránový komplex, který je reziduem hladkého endoplazmatického retikula mateřského megakaryocyty. Tento systém se skládá z kanálků, které jsou náhodně dispergované v cytoplazmě krevních destiček. Důležitou funkcí tohoto systému je akumulace iontů vápníku a enzymů klíčových pro regulaci a aktivaci trombocytů. (Gremmel et al., 2016; Applová, 2019)

### **6.2.3 Trombocyty a proces hemostázy**

Trombocyty se aktivně účastní všech fází hemostázy, přičemž jejich role je zásadní zejména v primární hemostáze. V následující části se detailně zaměřím na specifické mechanismy a fáze jejich účasti.

#### **1. Adheze trombocytů**

Adheze trombocytů představuje počáteční krok hemostatické odpovědi, což zdůrazňuje důležitost porozumění mechanismů trombocytární adheze při vývoji selektivních antitrombotik. Adhezní proteiny zajišťující optimální adhezi trombocytů se odlišují od těch, které regulují adhezi ostatních typů buněk. Proces adheze trombocytů má několik specifických funkcí. Trombocyty se při adhezi v proudící krvi musí přichytit a jejich interakce musí být dostatečně silné, aby odolaly třecí síle cirkulující krve. (Greselle et al., 2002)

Před prvním kontaktem trombocytů s poškozenou cévní stěnou se von Willebrandův faktor (vWF) z plazmy váže na exponovaný kolagen v cévní stěně. Trombocyty se poté vážou prostřednictvím receptorového komplexu GPIb/IX na imobilizovaný vWF na kolagenu cévní stěny. Kromě tohoto komplexu se na adhezi trombocytů k subendotelu podílí minimálně čtyři další receptory: kolagenové receptory  $\alpha 2\beta 1$  a GPVI,  $\alpha 5\beta 1$  fibronectinový receptor a receptor fibrinogenu  $\text{aIIb}\beta 3$  (GPIIb/IIIa). Následně dochází k silnému přitisknutí trombocytů, což je nezbytné proto, aby odolaly třecí síle vyvolané proudící krví. Trombocyty, které přilnou na poškozenou stěnu cévy, poskytují nový povrch pro adhezi dalších trombocytů a tvoří základ trombocytárního agregátu. Adheze trombocytů je zesilována malým množstvím ADP uvolňovaným z okolí perivaskulární tkáně.

Míra adheze je dále ovlivněna počtem trombocytů, množstvím a viskozitou krve, velikostí a tvarem cév. (Pecka, 2004; Bradáčová, 2013; Penka, 2011; Greselle et al., 2002; Munker et al., 2006); Rožman, 2002)

## **2. Aktivace trombocytů**

Trombocyty jsou aktivovány různými faktory, jako je obnažený kolagen, trombin, ADP, PAF (Platelet Activating Factor) a TXA<sub>2</sub> (Thromboxan A<sub>2</sub>). Tato aktivace trombocytů vede k významným důsledkům:

- a) Zvýšená exprese receptorů GP IIb/IIIa na povrchu trombocytů, což umožňuje jejich interakci a agregaci
- b) Sekrece biologicky aktivních látek, například TXA, který má významný vliv na agregaci a kontrakci cévní stěny
- c) Změna morfologie trombocytů z diskoidního na ameboidní tvar díky aktivaci kontraktilních proteinů a reorganizaci cytoskeletu

Procesy spuštěné aktivací trombocytů umožní agregaci trombocytu.

## **3. Agregace trombocytů**

Agregace trombocytů vzniká prostřednictvím vytvoření můstků vazbou přes fibrinogen mezi receptory GP IIb/IIIa na dvou sousedních trombocytech. Trombocyty jsou vzájemně spojeny pouze pomocí receptorů na svých výběžcích. V tuto chvíli jsou receptory GP IIb/IIIa na povrchu přítomny pouze v omezeném počtu, což vede k pouze částečnému spojení trombocytů. Mezi nejvýznamnější induktory agregace patří kolagen z cévní stěny, ADP z erytrocytů nebo uvolněný z trombocytů samotných, TXA<sub>2</sub> produkovaný stimulovanými trombocyty a trombinem. Epinefrin sám o sobě nezpůsobuje shlukování trombocytů, ale výrazně zvyšuje agregaci stimulovanou jinými agonisty. Proagregační stimuly působí synergicky, což vede k silnějšímu efektu induktorů. Během uvolňovací reakce se z alfa granul secernuje trombospondin, který přispívá ke stabilizaci fibrinogenových můstků. Dochází k výrazné expresi receptorů GP IIb/IIIa na povrchu trombocytů, což vede k jejich těsnějšímu vzájemnému spojení a ireverzibilní sekundární agregaci, vytvářející bílý trombus – primární hemostatickou zátku. Za fyziologických podmínek agregace může buď nastat po adhezi, avšak lze ji také snadno vyvolat přímým působením induktorů, jako jsou ADP, kyselina arachidonová,

epinefrin, kolagen, trombin nebo TXA2. (Pecka, 2004; Bradáčová, 2013; Penka, 2011; Greselle et al., 2002; Šlechtová, 2007)

#### **4. Propojení s procesem koagulace**

Aktivita trombocytů a koagulační kaskády je vzájemně propojena na několika místech a má vysoký funkční význam. Při své aktivaci a degranulaci trombocyty uvolňují nebo exprimují látky, které podporují proces koagulace. Zásadní roli hraje exprese destičkových fosfolipidů (PF 3) na jejich povrchu.

#### **5. Proces hojení poranění**

Trombocyty se také zapojují do procesu reparace poranění cévní stěny a to tím, že vylučují látky s proliferativními účinky, například PDGF (Platelet Derived Growth Factor).

## 6.2.4 Hemokoagulace

Jak bylo zmíněno dříve v kapitole 5.2, proces hemokoagulace (srážení krve) umožňuje, aby se tekutá krev v konkrétním místě změnila ve sraženinu, která zacelí poškozené místo. K tomuto účelu slouží v krvi (a některých buňkách) koagulační faktory, které společně tvoří tzv. koagulační kaskádu. Většina těchto faktorů jsou proteiny vytvářené játry. Není tedy překvapením, že onemocnění jater často vede k poruchám srážení krve. Poměrně velká část těchto faktorů náleží do skupiny serinových proteáz, které prostřednictvím své činnosti (tzv. parciální proteolýzy) štěpí a současně aktivují další koagulační faktory. Jedním z hlavních úkolů koagulační kaskády je přeměna rozpustného plazmatického proteinu fibrinogenu na nerozpustný fibrin (tento proces katalyzuje trombin), který následně formuje odolnou fibrinovou síť.

V současné době se v literatuře můžeme setkat se dvěma modely koagulace – tzv. starým a novým (revidovaným) modelem. Každý z těchto modelů má své výhody a nevýhody, které zde stručně představím. (Fontana a Lavříková, 2024)

Hlavní výhodou starého modelu je jeho schopnost usnadnit pochopení in vitro měření parametrů hemokoagulace. Nevýhodou tohoto modelu je, že průběh hemokoagulace, který popisuje, není zcela přesný ve srovnání s tím, jak probíhá v lidském těle, a navíc nedokáže vysvětlit některé patologické stavy. Starý model je založen na kaskádovité aktivaci koagulačních faktorů, rozdělené na vnitřní a vnější cestu a společnou část, přičemž klade důraz na význam vnitřního systému v koagulaci.

Nový (revidovaný) model hemokoagulace vychází ze starého modelu, ale jeho hlavní výhodou je schopnost přesněji popsat procesy probíhající in vivo, včetně mnoha patologických stavů. Tento model rozděluje koagulaci do tří fází: iniciace, amplifikace a propagace. Klade důraz na klíčovou roli vnějšího systému a trombinu. (Fontana a Lavříková, 2024)

### 6.2.4.1 Koagulační faktory

Hemokoagulace se účastní velké množství látek (plazmatické proteiny, fosfolipidy, ionty), souhrnně nazývané koagulační faktory – neboli srážecí faktory. Každý faktor má své jméno a je identifikován pomocí římských číslic. Několik koagulačních faktorů,

známých jako vitamin K dependentní faktory, vyžaduje vitamin K pro svou plnou syntézu. Mezi tyto faktory patří F II, VII, IX a antikoagulační faktory protein C a S. Role vitaminu K spočívá v umožnění posttranslační  $\gamma$ -karboxylace zbytků glutamátu na  $\gamma$ -uhlík, čímž vzniká karboxyglutamát. Tento zvyšuje afinitu faktorů k vápníku, což napomáhá jejich vazbě na membránové fosfolipidy. S výjimkou TF se všechny koagulační faktory vyskytují v plazmě ve formě proenzymů. Plazmatický koagulační systém zahrnuje několik dějů, které mají za následek vytvoření nerozpustného fibrinu. Fibrinogen se postupně přeměňuje na fibrinové monomery, které spontánně polymerují. Polymery se spojují kovalentními vazbami a působením aktivovaného faktoru XIII (XIIIa) – tak vzniká nerozpustný fibrin. Vytvoří vláknitou síť zachycující krevní buňky. Vznikne tzv. stabilní fibrinová zátka, na jejímž stažení se podílejí krevní destičky. (Sussman, 1992; Ar et al., 2019; Pokorný, 2001)

Vzhledem k jejich různým funkcím v procesu krevního srážení můžeme koagulační faktory rozdělit do pěti základních skupin:

- 1) Serinové proteázy – tyto enzymy katalyzují parciální proteolýzu koagulačních faktorů
- 2) Kofaktory enzymů – bílkoviny, které aktivně spolupracují s enzymy v koagulační kaskádě
- 3)  $\text{Ca}^{2+}$  – iont vápníku, který je klíčový pro vazbu některých koagulačních faktorů na membránové fosfolipidy
- 4) Fibrinogen – glykoprotein, který slouží jako prekurzor fibrinové sítě
- 5) Transglutamináza – faktor XIII, který je zodpovědný za stabilizaci fibrinové sítě prostřednictvím křížové vazby



## Starý model koagulace

Přestože starý model koagulace je překonán, poskytnu mu zde značný prostor. Důvodem je, že nový model z něj vychází a zároveň vysvětluje interpretaci běžně používaných laboratorních testů.

V procesu hemokoagulace lze schématicky rozlišit dvě fáze:

- 1) Aktivace faktoru II (protrombinu) na trombin, která může probíhat prostřednictvím vnitřní nebo vnější cesty, přičemž obě cesty se sjednocují u faktoru X
- 2) Společná fáze, během níž dochází k tvorbě nerozpustného fibrinu z fibrinogenu a následně stabilizaci fibrinové sítě

**Vnější cesta koagulace (extrinsic pathway)** začíná účastí koagulačních faktorů III (tkáňový tromboplastin), IV ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a VII (prokonvertin). Na počátku této cesty dochází k uvolnění faktoru III, který aktivuje faktor VII na faktor VIIa (aktivovaný faktor VII). Komplex faktoru VIIa s fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$  vytváří tzv. vnější tenázu, která, jak název napovídá, aktivuje faktor X na faktor Xa. Tímto způsobem se relativně rychle dostáváme ke společné fázi koagulace ve srovnání s vnitřní cestou. Faktor VIIa zároveň propojuje vnější a vnitřní cestu tím, že aktivuje faktor IX. (Fontana a Lavříková, 2024)

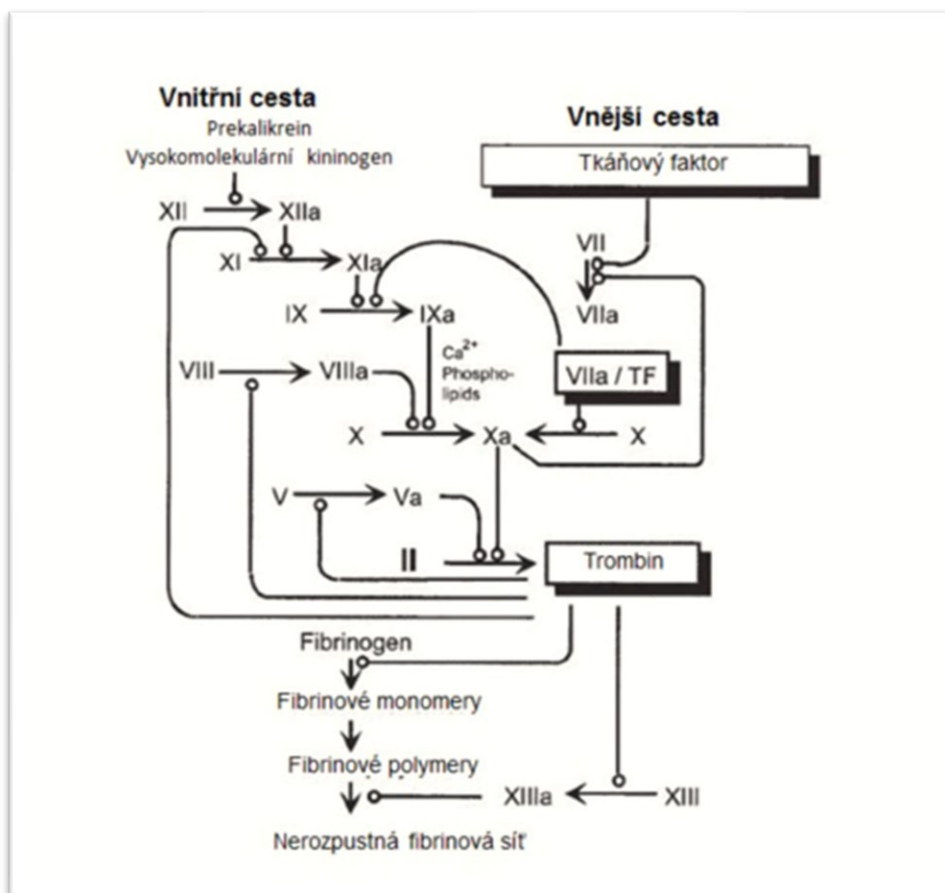
**Vnitřní cesta koagulace (intrinsic pathway)** započiná účastí koagulačních faktorů VIII (antihemofilický faktor), IX (Christmasův faktor), XI (PTA) a XII (Hagemanův faktor). Na začátku této cesty je tzv. kontaktní fáze, ta se vysvětluje vazbou faktoru XII na obnažený subendoteliální kolagen či destičkové membrány. Faktor XII se přeměňuje na aktivní formu XIIa, která následně aktivuje faktor XI na XIa. Aktivovaný faktor XIa poté aktivuje faktor IX na IXa. Faktor IXa, stejně jako faktor VIIa z vnější cesty, štěpí faktor X na aktivní formu Xa, čímž vzniká vnitřní tenázový komplex. Tento komplex, kromě faktoru IXa, zahrnuje také faktor VIIIa (aktivovaný trombinem), fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$ . Aktivace faktoru Xa zahajuje společnou cestu koagulace. (Fontana a Lavříková, 2024)

**Společná cesta koagulace** spojuje jak vnější, tak vnitřní cesty prostřednictvím jejich tenázových komplexů, které aktivují faktor X na Xa. Aktivovaný faktor Xa potom štěpí plazmatickou bílkovinu protrombin (faktor II) na trombin (faktor IIa) pomocí

protrombinázového komplexu, který kromě Xa obsahuje také faktor Va (aktivovaný trombinem), fosfolipidy a  $Ca^{2+}$ . (Fontana a Lavříková, 2024)

Trombin je v současnosti považován za klíčovou molekulu nejen v procesu hemokoagulace, ale i v celém systému hemostázy, neboť aktivuje:

- 1) Trombocyty a endotelové buňky
- 2) Neutrofilů a monocytů prostřednictvím exprese tkáňového faktoru (TF)
- 3) Faktor XIII, což přispívá k stabilizaci fibrinové sítě
- 4) Faktory V, VIII a XI, čímž se zvyšuje účinnost koagulace
- 5) Protein C, jehož aktivita vyžaduje předchozí interakci trombinu s trombomodulinem, což umožňuje antikoagulační účinek
- 6) TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor), jehož funkce je rovněž podmíněna vazbou trombinu s trombomodulinem a brání fibrinolýze (Fontana a Lavříková, 2024)



**Obrázek 2 Vizualizace koagulační kaskády**

(Upraveno dle (Munker, 2006))

## **Nový (revidovaný) model koagulace**

Jak již bylo zmíněno dříve, nový model koagulace vychází ze starého modelu, ale přináší detailnější popis jednotlivých fází procesu. Tento model je strukturován do tří fází – iniciace, amplifikace a propagace a klade zvláštní důraz na roli vnějšího koagulačního systému a trombinu. (Fontana a Lavříková, 2024)

**Iniciace** koagulace začíná aktivací tkáňového faktoru (TF) a faktoru VII. V krvi je přítomno malé množství faktoru VII, které čeká na uvolnění TF, jež nastává při poškození tkáně, zánětu nebo podobných situacích. Faktor VII se následně autoaktivuje a následně formuje komplex s TF, což vede k aktivaci faktorů IX a X. Faktor Xa pak nejen aktivuje další molekuly faktoru VII, ale také produkuje omezené množství trombinu. Tato inicializace není dostatečná pro vytvoření fibrinové sítě, ale zahajuje a řídí další průběh koagulace, přecházející do fáze amplifikace. (Fontana a Lavříková, 2024)

**Amplifikace** koagulace je fáze, kde pod vlivem trombinu dochází k aktivaci faktorů V, VIII a XI. Aktivovaný faktor XIa transformuje molekuly faktoru IX na faktor IXa, který se následně zapojuje do vnitřního tenázového komplexu. Aktivace trombocytů je současně stimulovaná trombinem vede k expresi negativně nabitých fosfolipidů na jejich povrchu, což usnadňuje vazbu koagulačních faktorů IXa, VIIIa a Va. Pozitivní zpětnou vazbou tak vzniká stále větší množství faktorů IXa, VIIIa, Va a následně i trombinu, což umožňuje přechod do fáze propagace. Výsledkem fáze amplifikace je zvýšená produkce trombinu a vytvoření reakčních povrchů s navázanými molekulami aktivovaných faktorů. Tyto povrchy následně slouží k doplnění a zesílení komplexů vnitřní tenázy a protrombinázy.

**Propagace** je klíčovou fází koagulace, kde se faktor X váže na komplex vnitřní tenázy (tvořený faktory IXa a VIIIa) a aktivuje se na faktor Xa. Tento faktor Xa pak vytváří s faktorem Va komplex protrombinázy, což katalyzuje významnou produkci trombinu – to je tzv. trombinový nápor (trombin burst). Toto množství trombinu je dostatečné pro efektivní přeměnu fibrinogenu na fibrin. Nestabilní fibrinový polymer je následně stabilizován faktorem XIIIa, čímž dochází k definitivnímu vytvoření fibrinové sítě nezbytné pro zastavení krvácení a zahájení procesu hojení tkáně. (Fontana a Lavříková, 2024)

**Tabulka 1 Seznam hemokoagulačních faktorů s uvedením jejich synonym a funkcí**

<b>Koagulační faktor</b>	<b>Synonymum</b>	<b>Funkce/aktivuje</b>
fibrinogen	faktor I	krevní koagulum, převod signálů, aktivace trombocytů
protrombin	faktor II	fibrinogen, FV, VIII, XI, XIII, trombocyty, protein C
tkáňový faktor	faktor III, tkáňový tromboplastin	zahajuje koagulační kaskádu
vápenaté ionty	faktor IV	aktivace a stabilizace FV
faktor V	proakcelerin, labilní faktor	kofaktor při aktivaci FII
faktor VII	prokonvertin, stabilní faktor	FX, IX
faktor VIII	antihemolický faktor A	kofaktor při aktivaci FX
faktor IX	antihemolický faktor B	FX
faktor X	Stuartův-Prowerův faktor	FII, V, VII
faktor XI	antihemolický faktor C	FIX, XII, A $\alpha$ řetězec fibrinogenu, HMWK plazminogen
faktor XII	Hagemanův faktor	FXI, HMWK, prekalikrein
faktor XIII	fibrin-stabilizující faktor	stabilizuje fibrin
rekalikrein	Fletcherův faktor	FXII a štěpí HMWK

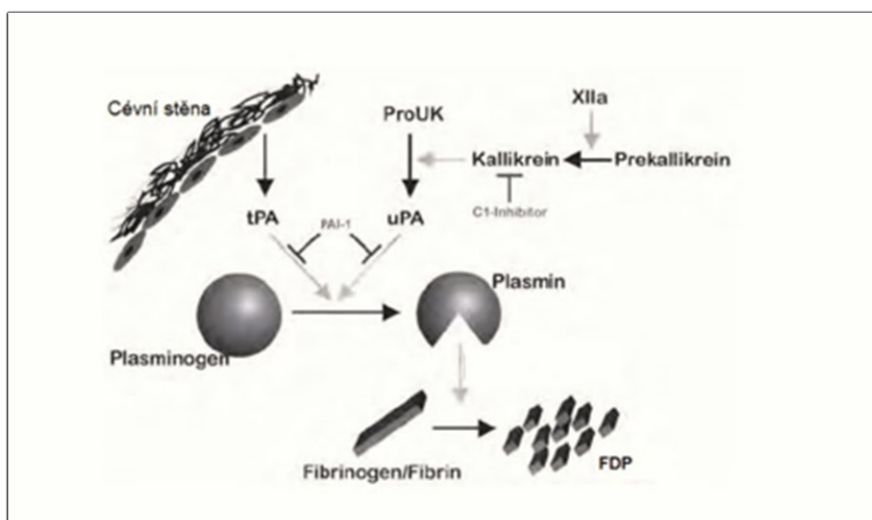
Zdroj:(Kittnar, 2011; Penka a Slavičková, 2011)

## 6.2.5 Fibrinolytický systém

Fibrinolytický systém hraje klíčovou roli v udržení hemostatické rovnováhy tím, že lyzuje fibrinové koagulum a tím udržuje cévy průchodné. Jeho cílem je rozpuštění nadbytečné sraženiny, která by mohla omezit nebo i zastavit krevní tok uvnitř cévy. Při nedostatečné aktivaci fibrinolytického systému může dojít k uzavření cévy. (Matýšková et al., 1999; Šlechtová, 2007)

Hlavní složkou je plazminogen, který je prekurzorem plazminu. Nejdůležitějšími aktivátory plazminogenu jsou tkáňový aktivátor plazminogenu (t-Pa) a urokináza (u-Pa). Na přítomnost fibrinových vláken a fibrinového koagula reaguje organismus aktivací fibrinolytického systému. (Davie et al., 1991) Na krevní koagulum se váže plazminogen, působením uvolněných aktivátorů z endotelu je aktivován na plazmin. Ten proteolyticky působí na koagulum a je inaktivován cirkulujícími antiplazminy. Na regulaci fibrinolýzy se významně podílí inhibitor tkáňového aktivátoru plazminogenu (Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1)).

Fibrinolýza je vázána na místo poranění, plazmin je aktivován na povrchu koagula. Schopnost plazminu specificky štěpit fibrin podstatně účinněji, než fibrinogen je dána zvýšenou afinitou k fibrinu. Stejnou vlastnost má i aktivátor plazminogenu t-Pa. (Matýšková et al., 1999; Šlechtová, 2007)



**Obrázek 3** Systém fibrinolýzy obsahující prvky aktivace a inhibice

Upraveno dle (Munker, 2006)

### **6.3 Faktor II**

Protrombin, označovaný též jako F II, je součástí skupiny koagulačních faktorů závislých na vitamínu K, jehož syntéza probíhá v játrech. Aktivuje se prostřednictvím štěpení pomocí komplexu známého jako protrombináza, který zahrnuje aktivované faktory Xa, Va, destičkové fosfolipidy a vápenaté ionty. Aktivovaný faktor II (trombin), nese nejen koagulační a fibrinolytické funkce, ale také se podílí na procesu hojení. V rámci koagulační kaskády plní klíčovou roli při transformaci fibrinogenu na fibrin. Další jeho funkce zahrnují aktivaci faktorů V, VIII, IX, XIII, aktivaci krevních destiček a trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI). V přítomnosti intaktního endotelu se trombin váže na trombomodulin a tím se mění jeho charakter z prokoagulačního na antikoagulační – aktivuje protein C. Tato zpětnovazebná regulace brání vzniku krevní sraženiny v místě neporušené cévní stěny a neuplatňuje se v místech, kde chybí intaktní endotel. Účast endotelu v procesu tvorby t–Pa přispívá také k fibrinolýze. (Penka a Slavíčková, 2011; Pecka, 2004; Pokorný, 2001)

### **6.4 Faktor V**

Faktor V je protein, který působí v koagulační kaskádě. Tento faktor má dvojí funkci – prokoagulační a antikoagulační. Jedná se o jednořetězový glykokoprotein, který vzniká v játrech a megakaryocytech.

Trombin aktivuje faktor V štěpením v Arg 709, Arg 1 018 a Arg 1 545. Tím vzniká prokoagulační molekula faktor Va, která je složena z lehkého a těžkého řetězce spojená prostřednictvím iontu vápníku a nekovalentních interakcí. Lehký řetězec je složen z domén A3 – C1 – C2; zatímco těžký řetězec se skládá z domén A1 – A2.

Faktor Va a faktor Xa jsou součástí komplexu protrombinázy, katalyzující přeměnu protrombinu na trombin. Ten přeměňuje fibrinogen na fibrin. APC inaktivuje faktor Va a vzniká inaktivovaný faktor Vai. Tato přeměna probíhá prostřednictvím proteolytického štěpení v polohách Arg 306, Arg 506 a Arg 679 na těžkém řetězci. První probíhá štěpení v poloze Arg 506, poté Arg 306 a tím je molekula zcela inaktivována. Štěpení na Arg 679 je nejpomalejší a nemá žádný fyziologický význam. (Segers et al., 2007; Rosendorff a Dorfman, 2007)

### **6.4.1 Leidenská mutace faktoru V**

Leidenská mutace (LM) je autozomálně dominantně dědičná porucha s neúplnou dominancí a je nejběžnějším genetickým rizikovým faktorem pro vznik hluboké žilní trombózy. Porucha tedy není vázána na pohlavní chromozomy a její heterozygotní forma má mírnější klinické důsledky než homozygotní forma.

Leidenská mutace bývá často označována jako faktor V Leiden. Jedná se o dědičnou poruchu krevní srážlivosti. Jde o bodovou mutaci v genu pro faktor V, která způsobuje sníženou antikoagulační odezvu na aktivovaný protein C, což vede k mimořádně zvýšené tvorbě trombinu a následně i krevních sraženin.

Uvedená mutace vytváří hyperkoagulační (trombofilní) stav, a tím tak zesiluje riziko vzniku trombózy. LM je řazena mezi vrozené trombofilie. Nejčastějším projevem trombofilie je VTE zahrnující hlubokou žilní trombózu (DVT) a plicní embolii (PE).

### **6.4.2 Historie Leidenské mutace**

V roce 1943 v norském Oslu byla na kliniku přijata pacientka, u které se objevily těžké stavy spojené s krvácivými projevy. P. A. Owren, tehdejší docent, který pracoval na tomto oddělení se zabýval krví pacientky. Zjistil, že pacientka trpí nedostatkem (v té době ještě neznámého) srážecího faktoru. K objevení nového koagulačního elementu přišel až v roce 1947 a pojmenoval ho faktor V. (Stormorken, 2003)

V roce 1993 profesor Björn Dahlbäck s jeho týmem realizoval mnoho laboratorních testů plazmy hlášeného případu rodiny. Proband z této rodiny v minulosti prodělal epizodu hluboké žilní trombózy. Podrobnější rodinná anamnéza prokázala přítomnost trombózy i mezi dalšími příbuznými. Bylo testováno 19 členů rodiny, kde u 14 členů se projevila slabá antikoagulační odpověď na aktivovaný protein C (APC). Při hlubším zkoumání se dospělo k závěru, že APC rezistence může být způsobena anomálií ve funkci koagulačního faktoru V. (Dahlbäck et al., 1993)

Následující rok, tedy v roce 1994 profesor Rogier M. Bertina objevil bodovou mutaci v genu pro faktor V, která je příčinou APC rezistence, a tedy zvýšeného rizika hluboké žilní trombózy. Tato mutace byla pojmenována podle města Leiden, nacházející se v Nizozemí, kde byla anomálie poprvé odhalena. (Bertina et al., 1994; Kočárek, 2008)

Od svého objevení se Leidenská mutace stala středem mnoha výzkumných studií, zaměřených na porozumění jejím důsledkům a možným terapeutickým intervencím.

### 6.4.3 Dědičnost Leidenské mutace

Gen, odpovídající za syntézu proteinu faktoru V, se objevuje na dlouhém raménku 1. chromozomu. Příčinou Leidenské mutace je bodová mutace v dotyčném genu pro faktor V. Jedná se o nahrazení neboli přeměnu páru bazí, kdy guanin je substituován za adenin v nukleotidové pozici 1 691, tím vznikne pozměněná molekula koagulačního faktoru. Centrálním mechanismem je rezistence faktoru Va vůči aktivovanému proteinu C (tzv. APC rezistence). Tím nedochází k jeho rozštěpení, což vede ztrátě jeho funkce. Následkem je pak nadprodukce trombinu, která podporuje zvýšenou srážlivost krve. (Rosendorff a Dorfman, 2007; Rosková a Bystřická, 2014)

### 6.4.4 Formy Leidenské mutace

Leidenská mutace patří mezi nejčastější vrozené trombofilní stavy. Mezi závažné zdravotní komplikace patří hluboká žilní trombóza a plicní embolie, které každoročně postihují přibližně jednoho člověka z tisíce. (Kujovich, 2011)

Leidenská mutace se vyskytuje v heterozygotní i homozygotní formě. Rozdíl mezi heterozygotem a homozygotem u Leidenské mutace se liší rizikem vzniku trombózy.

**Heterozygotní forma** – bodová mutace FVL je lokalizována pouze na jedné alele. U této formy je riziko výskytu tromboembolických příhod oproti populaci nepostižené 5–10krát vyšší. (Penka a Buliková, 2009)

**Homozygotní forma** – bodová mutace FVL je lokalizována na obou alelách. U této formy je 50–100krát vyšší riziko výskytu tromboembolické nemoci.

Pokud se sejdou dva heterozygoti, jejich potomek může být s 25% pravděpodobností ohroženým homozygotem nebo s 50% pravděpodobností heterozygotem, ale i s 25% pravděpodobností naprosto zdravým jedincem – homozygotem s oběma alelami nemutovanými – tzv. wild type. (Segers et al., 2007)

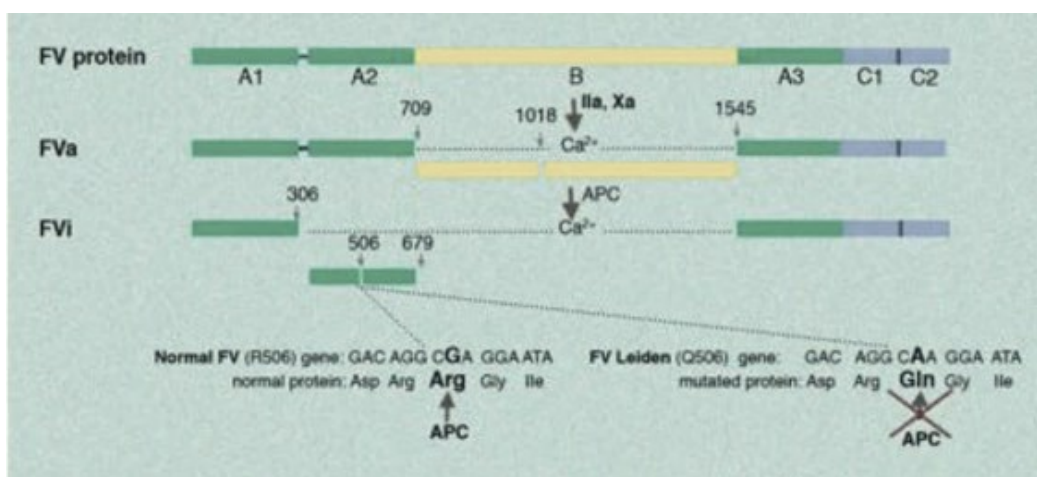


### 6.4.5 Diagnostika mutace

K potvrzení přítomnosti Leidenské mutace je možné provést specifické molekulárně biologické vyšetření. Přítomnost Leidenské mutace je možné s jistou mírou nejistoty zjistit i vyšetřením APC – rezistence.

### 6.4.6 Léčba

Leidenská mutace je vrozená geneticky podmíněná odchylka, která nevyžaduje žádnou léčbu. Riziko trombózy lze však snížit podáním antikoagulačních léků v případě rizikových situací, jako jsou imobilizace, operace, dlouhé cesty letadlem, těhotenství, porod, šestinedělí a podobně. Nosička Leidenské mutace by měla být poučena o zvýšeném riziku trombózy při užívání kombinované hormonální antikoncepce.



**Obrázek 4** Procesy aktivace a degradace faktoru V (FV) a jeho mutované formy

Zdroj: (Dahlbäck, 2008)

## **6.5 Mutace protrombinu G20210A**

Tato mutace je druhou nejčastější hereditární poruchou, která zvyšuje riziko trombózy. Poprvé byla protrombinová mutace v genu pro faktor II protrombin lokalizovaná na chromozomu 11 popsána Poortem v roce 1996. (Poort et al., 1996)

Protrombin je koagulační faktor označený jako FII, je součástí procesu hemokoagulace a podílí se tak na vytvoření definitivní zátky. Komplex protrombináza mění protrombin na trombin. Za účasti vitamínu K vzniká protrombin v játrech. (Pecka, 2004; Khan a Dickerman, 2006)

Mutace protrombinu G20210A způsobuje u pacientů zvýšenou hladinu protrombinu v plazmě – zvyšuje riziko trombózy. Příčinou je bodová mutace, vyvolávající transformaci jednoho nukleotidu. Podstatou této mutace je záměna nukleotidu guanin za adenin v pozici 20 210 v řetězci DNA (G20210A). Tato záměna vede k vyšší produkci protrombinu, což má za následek vyšší srážlivost krve a zvýšenou možnost vzniku žilních trombóz.

Jde o autozomálně dominantní mutaci. Heterozygoti s alelou pro tuto mutaci mají v porovnání se zdravými jedinci zvýšené riziko trombózy 2–5 krát, hladina protrombinu je o 30% vyšší. (Murin et al., 1998; Khider et al., 2022) U pacientů s touto mutací je klinický obraz velmi proměnlivý. Trombóza se u většiny heterozygotů i homozygotů za celý život neobjeví. Pokud se trombóza vyskytne, u převážné části heterozygotů se do dospělosti neprojeví žádné příznaky, i když u některých osob do 30 let se projevuje opakovaně.

Mutace v genu pro protrombin je součástí základního panelu vyšetření na trombofilie.

## **6.6 Syndrom lepivých destiček**

Syndrom lepivých destiček (Sticky Platelet Syndrome – SPS) je vrozená porucha trombocytů s familiárním výskytem a autozomálně dominantním znakem. Tato porucha se projevuje zvýšenou in vitro agregací trombocytů po aktivaci nízkými koncentracemi ADP a/nebo epinefrinu (EPI), přičemž agregace s jinými induktory je fyziologická. (Kubisz et al., 2014; Mammen et al., 1988)

Jedná se o dědičnou protrombotickou trombocytopatii s četným výskytem arteriálních a žilních trombóz. Pro SPS je charakteristický opakovaný výskyt nestabilní anginy pectoris, infarktu myokardu, cévní mozkové příhody, opakované ztráty plodu, těhotenské komplikace (zpomalení růstu plodu), trombóza retinálních arterií, familiární výskyt migrén, mentální anorexie a nefrotický syndrom. (Kubisz et al., 2014; Šimonová et al., 2012)

Diagnostika SPS se provádí pouze na základě klinických (tromboembolická příhoda) a laboratorních kritérií (schopnost hyperagregace krevních destiček). (Kubisz et al., 2014)

SPS podle studií může predisponovat k trombotické příhodě sám o sobě, někdy ve spolupráci s dalším rizikovým faktorem (stres, perorální antikoncepce, infekce nebo jiný trombofilní stav – faktor V Leiden mutace a antifosfolipidový syndrom). (Šimonová et al., 2012; Azamar-Solis et al., 2019)

### **6.6.1 Historie SPS**

Syndrom lepivých destiček poprvé popsal Holiday a spol. jako samostatný klinický syndrom v roce 1983 na konferenci o cévních mozkových příhodách a mozkové cirkulaci v Arizoně (The Ninth Conference on Stroke and Cerebral Circulation, Phoenix, Arizona). (Sokol et al., 2018)

SPS je definován jako hyperagregabilita trombocytů po stimulaci trombocytů velmi nízkými koncentracemi induktorů – ADP a/nebo EPI, zatímco odpověď trombocytů na jiné induktory je fyziologická.

Vztah mezi hyperagregabilitou trombocytů a ischemickou cévní mozkovou příhodou původně rozpoznali Al-Mefty a spol. v roce 1979. (Kubicz et al., 2014)

V roce 1984 léčil Mammen 24letitou těhotnou pacientku, která překonala akutní infarkt myokardu. Koronografie ani angiografie neodhalila žádné známky cévní léze včetně aterosklerózy, ani žádné faktory zvyšující protrombotické riziko. Matka pacientky během jednoho z jejích těhotenství prodělala také infarkt myokardu. Její bratr (18 let) prodělal opakované záchvaty anginy pectoris i přes normální angiografii koronárních tepen. U zmíněných osob agregační testy s řaděnými koncentracemi ADP a EPI vykazovaly opakovaně hyperagregabilitu. (Bradáčová, 2013)

V dalších letech Mammen a spol. publikovali své studie na větší sérii pacientů, definovali obecně uznávaná laboratorní diagnostická kritéria a navrhli dva typy (I a II) syndromu.

V polovině 90. let na základě analýzy skupiny pacientů přidal Bick další typ (III.) syndromu. Několik autorů publikovalo další případy a skupiny pacientů se syndromem a jeho různými klinickými projevy: koronární syndrom, migréna, ideopatická neuropatie zrkového nervu, venózní tromboembolie a syndrom ztráty plodu. Na konci 20. století Muhlfeldt a kol a El–Amm a kol. považovali syndrom za možnou příčinu trombotických komplikací a poruchy funkce štěpu při transplantaci ledviny. (Kubisz et al., 2014)

### 6.6.2 Klasifikace SPS

SPS lze rozdělit na 3 typy, a to podle toho, který z trombocytárních induktorů vyvolá zvýšenou agregaci krevních destiček.

- **SPS I. typu** – hyperagregabilita po indukci ADP i EPI. Vyskytuje se ve 26,7 % z celkového počtu SPS
- **SPS II. typu** – hyperagregabilita po indukci pouze EPI. Jedná se o nejčastější typ SPS, Výskyt v 71,3 % z celkového počtu SPS.
- **SPS III. typu** – hyperagregabilita po indukci pouze ADP. Vzácný výskyt pouze ve 2 % z celkového počtu SPS. (Bradáčová, 2013)

Nejčastěji se vyskytuje SPS II. typu (hyperagregabilita po samotném EPI), následuje SPS I. typu (hyperagregabilita po ADP i EPI). SPS III. typu (hyperagregabilita po indukci ADP) je vzácný. Je dobré zdůraznit, že tato klasifikace je založena na laboratorních testech a nespojuje s klinickými projevy, prognózou či terapií. (Santimone et al., 2013; Kubisz et al., 2013; Mannem et al., 1995)

Diagnóza musí být potvrzena nejméně dvěma vyšetřeními s odstupem alespoň 4 týdnů. Vyšetření na SPS by mělo být provedeno u pacientů po infarktu myokardu, u DIC, při migrénách nebo problémech s těhotenstvím, před transplantací ledvin apod. Léčebný postup využívá pouze nízké dávky ASA, běžná antikoagulantia jsou neúčinná.

### **6.6.3 Laboratorní diagnostika SPS**

Před diagnostikou SPS je nezbytné vyloučit všechny známé faktory rizika trombózy. U většiny pacientů se provede komplexní sada testů na vrozené a získané trombofilní stavy, které jsou spojeny s opakovanými trombózami a rodinnou anamnézou tromboembolických příhod. Trombofilní screening zahrnuje testování různých faktorů, jako je aktivita faktoru VIII, proteinu C, proteinu S, antitrombinu, sérová koncentrace homocysteinu a stanovení protilátek typu lupus antikoagulans a mutací faktoru V Leiden a faktoru II. (Bradáčová, 2013; Bartošková, 2008)

V laboratorních podmínkách neexistuje standardizovaná metoda pro testování SPS, což vede k používání různých metod a odchylek v postupech měření. Často se využívá agregometrie se subprahovými koncentracemi induktorů, které nepůsobí na trombocyty za fyziologických podmínek. Existují různé typy agregometrií, jako je optická a impedanční. Rozdíly v postupech měření mohou spočívat v různých způsobech přípravy plazmy bohaté na trombocyty (PRP), počtu trombocytů v PRP, množství vzorku nebo koncentracích použitých induktorů. Alternativně lze aktivitu trombocytů stanovit pomocí průtokové cytometrie, ale toto testování je předmětem výzkumu. (Staško et al., 2011; Bick, 1998; Rand et al., 2003)

## **6.7 Optická agregometrie**

V roce 1960 byla představena metoda, která se stala dosud platným standardem pro testování funkce destiček, a to optická agregometrie (Light Transmission Aggregometry, LTA). Tato metoda umožňuje měřit schopnost trombocytů, tvořit agregáty, což poskytuje informaci o jejich schopnosti vytvářet primární zátku in vivo. Agregace představuje shlukování trombocytů, která může nastat po jejich adhezi nebo stimulaci různými stimulanty (induktory). Test lze provést sledováním agregace bez přidání stimulantu, což je spontánní agregace. Když jsou přidány látky, které mohou vyvolat agregaci, hovoříme o stimulované agregaci. Induktory se dělí do dvou skupin: silné induktory, jako je kolagen a trombin, které přímo vyvolávají agregaci, a navíc stimulují syntézu TXA<sub>2</sub> a uvolňování z destičkových granul, a slabé induktory, jako je ADP, kyselina arachidonová a adrenalin, které vyvolávají agregaci bez uvolňování látek z granul, ta se může objevit až po vzájemném kontaktu destiček, což se projeví druhou vlnou agregace na agregáční křivce. Při vyšetření SPS se běžně používají tři subprahové koncentrace ADP a epinefrinu.

Pro analýzu agregace pomocí optické agregometrie se běžně používá žilní krev odebíraná do zkumavek obsahujících citrát sodný v koncentraci mezi 0,105 a 0,109 mol/l. Pro venepunkci se doporučuje použití jehly s průměrem 0,7 až 1,0 mm, protože tenčí jehly mohou vyvolat hemolýzu a nežádoucí aktivaci destiček a koagulačních faktorů. Taktéž je důležité vyhnout se použití škrtidla během odběru. Doporučuje se provést odběr přímo na pracovišti, kde budou vzorky následně analyzovány, a to z důvodu časové citlivosti vyšetření. Trombocytová funkce by měla být testována nejpozději do dvou hodin od odběru.

Získané vzorky jsou následně centrifugovány za účelem oddělení plazmy bohaté na trombocyty (PRP) po dobu 10–15 minut při 150–200 G a plazmy chudé na trombocyty (PPP) po dobu 10–15 minut při 1 800 až 2 500 G. Optimální hodnota trombocytů v PRP se pohybuje v rozmezí 150–400 x 10<sup>9</sup> /l. Hodnoty nižší, než 100 x 10<sup>9</sup> /l trombocytů mohou vést k nižším odezvám, zatímco vyšší hodnoty lze upravit přidáním PPP. Dále by neměl být test proveden v případě, že je plazma silně lipemická.

Optický agregometr pracuje na principu turbidimetrie, což znamená, že sleduje změny v průchodu světla přes analyzovaný vzorek v závislosti na procentuálním zastoupení agregovaných trombocytů v čase. Před provedením analýzy se přístroj kalibruje, přičemž plazma bohatá na trombocyty (PRP) slouží jako referenční bod pro 0 % agregace, zatímco plazma chudá na trombocyty (PPP) reprezentuje 100 % agregaci. Vzorek PRP je poté umístěn do měřicí komory udržované na teplotě 37 °C, kde je sledována agregace. Vzorek musí být neustále míchán, aby nedocházelo k sedimentaci trombocytů a jejich vzájemnému kontaktu. Přístroj zaznamenává změny optických vlastností vzorku. Výsledkem je agregační křivka, ze které lze určit maximální amplitudu, což je procentuální hodnota agregace vyjádřená vzhledem k maximální možné agregaci (vztažená ke 100% agregaci, tedy PPP), maximální sklon (slope), který udává rychlost nárůstu agregace (závisí na počtu a velikosti trombocytárních agregátů), a dobu latence agregační křivky, to je čas od přidání induktoru do okamžiku, kdy dojde ke změně optických vlastností prostředí. V klinické praxi se nejčastěji využívá maximální amplituda. Referenční rozmezí pro hodnoty agregace může být variabilní v literatuře. (Fauknerová et al., 2011; Rand et al., 2003; Harrison, 2005; Yee et al., 2005)

Měření trombocytární agregace může být ovlivněno interferencemi, kterým, je třeba předejít. Snížení amplitudy agregace může nastat po užívání léků ovlivňujících funkci trombocytů, konzumaci alkoholu, kofeinu či bylinných výtažků. Naopak zvýšené hodnoty lze zaznamenat po fyzické zátěži, užívání hormonální antikoncepce, kouření nebo po konzumaci tuků bohaté stravy. (Fauknerová et al., 2011; Rand et al., 2003; Michelson, 2009; Harrison 2005)

Někteří autoři doporučují u pacientů s diagnostikovaným SPS provést vyšetření i u jejich příbuzných (rodiče, sourozenci, děti) a v případě pozitivního výsledku jim doporučit adekvátní profylaxi TEN. (Bartošová et al., 2008)

## **6.8 Impedanční agregometrie**

U impedančních agregometrů (Whole Blood Aggregometry, WBA) dochází k přilnutí trombocytů na senzor, což simuluje situaci in vivo, a agregace je detekována zvýšením elektrického odporu mezi dvěma elektrodami, který je kontinuálně zaznamenáván v čase. Výsledek je vyjádřen jako plocha pod křivkou (AUC), maximální amplituda a maximální sklon agregace. Některé analyzátory obsahují dvojici nezávislých senzorů, zvyšující spolehlivost výstupu. Hlavní výhodou impedančních agregometrů je schopnost měřit agregaci v plné krvi bez nutnosti centrifugace, která může zkreslit výsledky. Nicméně, pro impedanční agregometrii je nutný odběr krve do speciálního antikoagulačního činidla, obvykle hirudinu, a výsledky nelze jednoduše porovnávat s výsledky z optické agregometrie. (Fauknerová et al., 2011; Rand et al., 2003; Michelson, 2009)



## **7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **7.1 Charakteristika zkoumaného souboru**

Zkoumaný soubor zahrnoval 55 pacientů s prokázanou heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A, kteří prodělali trombózu a 99 pacientů s těmito mutacemi, kteří trombózu neprodělali.

Jednotlivci byli pečlivě vybíráni s cílem zajistit, aby mezi oběma soubory neexistovaly statisticky významné rozdíly v základních demografických údajích. Ti, kteří splňovali kritéria, byli pozváni k účasti na studii a byli informováni o přípravě a provedení vyšetření agregace trombocytů.

Sběr dat probíhal v období srpna 2023 po červen 2024 na hematologické ambulanci Nemocnice Pelhřimov.

#### **Vstupní parametry:**

- heterozygotní mutace faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A
- věková hranice nad 18 let
- striktní dodržení předem stanovených dietních a medikačních směrnic
- správně vyplněný a podepsaný informovaný souhlas
- dostupné periferní žilní řečiště vhodné pro odběr krve na vyšetření primární hemostázy

### **7.2 Preanalytická fáze**

V rámci diagnostických procesů lze identifikovat fázi preanalýzy jako nejrizikovější a zároveň časově nejnáročnější. Je běžné, že tato fáze probíhá mimo prostor laboratoře, což ztěžuje plné ovlivnění všech klíčových faktorů. Optimalizací těchto faktorů by v ideálním případě mohlo být dosaženo eliminace až 70 % chyb, které se objevují v preanalytické fázi. Mezi tyto faktory se řadí správná indikace laboratorního vyšetření, příprava pacienta a odběr vzorku, transport vzorku, příjem a uchování vzorku před analýzou a příprava vzorku ke zpracování. (Cornes, 2020; Racek, 2006)

### **7.3 Vyšetřovaný materiál**

Odběry krve u pacientů byly prováděny v hematologické ambulanci Nemocnice Pelhřimov po předchozím objednání a detailním vysvětlení přípravy na diagnostické vyšetření.

U každého pacienta bylo pokaždé odebráno:

- 5 zkumavek krve s protisrážlivým činidlem citrátem sodným 0,109 mol/l na vyšetření SPS
  - ⇒ z toho nejdříve do 3 zkumavek vakuovaných (systém Vacutainer)
  - ⇒ a poté do 2 zkumavek nevakuovaných (otevřený systém)
- 1 zkumavka krve s protisrážlivým činidlem K<sub>3</sub>EDTA k vyšetření krevního obrazu

#### **7.3.1 Odběr vzorku pro vyšetření agregace trombocytů**

Pro odběr vzorků k vyšetření agregace trombocytů platí specifické pokyny. Je doporučeno, aby odběr probíhal nalačno, nejlépe v dopoledních hodinách. Doporučuje se jen krátké zaškrcení žíly a mírný rychlý vpich. Optimální je realizovat odběr co nejbližší laboratoři, aby interval mezi venepunkcí a stanovením agregace nepřesáhl dvě hodiny. Překročení této doby by mohlo způsobit zkreslení agregační doby (aktivita trombocytů klesá v důsledku posunu pH do alkalické oblasti).

#### **7.3.2 Příprava vzorku pro vyšetření agregace trombocytů**

Krevní destičky vykazují vysokou citlivost na aktivaci, a proto je nezbytné zacházet se vzorkem s maximální opatrností a provádět míchání s velkou precizností. Aktivace trombocytů před samotným vyšetřením by mohla způsobit zkreslení výsledků, proto je důležité zabránit jakékoli předčasné aktivaci. Zpracování plazmy a všechna manipulace s ní se provádí za laboratorní teploty, ideálně v rozmezí 20–24 °C. Přítomnost erytrocytů může ovlivnit průběh procesu agregace.

### **7.3.2.1 Příprava PRP – plazmy bohaté na trombocyty**

Odebraný vzorek krve nejprve musí půl hodiny stát, aby došlo k přirozenému uvolnění a stabilizaci složek. Poté se vzorek centrifuguje 11 minut při 1 460 otáčkách za minutu (200 g) bez brzdy. Následně se plazma (vrchní vrstva) bohatá na trombocyty odebere do nové označené zkumavky a šetrně se promíchá. Na analyzátoru krevního obrazu se provede stanovení krevního obrazu s cílem určit počet trombocytů, přičemž počet naměřených trombocytů by se měl pohybovat v rozmezí 150–450 x 10<sup>9</sup>/l. Během manipulace s PRP se využívají pouze nádoby a pomůcky z umělé hmoty.

### **7.3.2.2 Příprava PPP – plazmy chudé na trombocyty**

Krev odebraná pomocí vakuového systému se centrifuguje při 4000 otáčkách za minutu (1 520 g) po dobu deseti minut. Poté se plazma přesune do nové označené zkumavky. Počet krevních destiček by měl být nižší než 20 x 10<sup>9</sup>/l. Stabilita plazmy po procesu separace je 2 hodiny.

## **7.4 Analytická fáze**

V rámci analytické fáze provádíme důkladnou analýzu zkoumaného materiálu za přesně stanovených podmínek s využitím relevantní metodiky s hlavním cílem získat adekvátní výsledek. (Racek, 2006)

## 7.5 Přístrojové vybavení

### 7.5.1 Centrifuga Universal 320

Pro separaci plazmy od zbylých krevních složek byla využita centrifuga UNIVERSAL 320. Centrifugy jsou navrženy k separaci látek s odlišnou hustotou za pomoci síly odstředivé. Mikroprocesorový řídicí systém centrifugy umožňuje nastavení otáček za minutu, stupně akcelerace, brždění a dobu centrifugace.

Obrázek číslo 5 znázorňuje technické parametry centrifugy.

Rozměry	395 x 520 x 346 mm
Hmotnost	31 kg
Napájení	220 –230 V
Síťová frekvence	50–50 Hz
Kapacita	4 x 1000 ml
Počet otáček (RPM)	15 000
Teplota okolí	2–35°C
Vlhkost vzduchu	max. 80% při teplotě do 31°C

**Obrázek 5** Tabulka znázorňující specifikace technických parametrů centrifugy

(Knížová, 2018)

### 7.5.2 Coulter DxH 900

K analýze krevních obrazů byl využit hematologický analyzátor Beckman Coulter DxH 900. Jedná se o sofistikovaný, kvantitativní, a multiparametrický automatizovaný analyzátor, určený pro in vitro diagnostiku při provádění základních morfologických vyšetření pacientů v klinických laboratořích.

Analyzované parametry zahrnují počet leukocytů, erytrocytů, trombocytů, hematokrit, hemoglobin, střední objem erytrocytů, barvivo v erytrocytu, koncentrace hemoglobinu v erytrocytu, distribuční šíře erytrocytů, střední objem trombocytů, absolutní i relativní počty neutrofilů, lymfocytů, monocytů, bazofilů, eozinofilů, retikulocytů a normoblastů. Přístrojový komplex sestává ze samotného analyzátoru, manuálního snímače čárového kódu, kompresoru, počítače a tiskárny.

### **7.5.2.1 Reagencie**

- Coulter DxH Diluent – roztok pro ředění
- Coulter DxH Diff Pack – lyzační činidlo Erytrolyse a konzervační činidlo StabiLyse – určen k provedení diferenciální analýzy typů bílých krvinek
- Coulter DxH Cell Lyse – činidlo lyzující erytrocyty
- Coulter DxH Retic Pack – činidlo k barvení a čištění retikulocytů
- Coulter DxH Cleaner – činidlo odstraňující zbytkový materiál

### **7.5.2.2 Technika provedení analýzy krevního odběru**

Vacutainer zkumavky jsou umístěny do kazety, kterou magnetický modul Sample Transport Module (STM) přenesse do míchací stanice. Po naskenování čárového kódu na zkumavce je vzorek odebrán nasávací sondou. Výsledky jsou automaticky přenášeny do laboratorního informačního systému.

### **7.5.3 Sysmex CS 2500**

Sysmex CS 2500 je plně automatizovaný koagulační analyzátor určený pro diagnostické využití in vitro. Je navržen pro analýzu koagulačních, chromogenních, imunologických a agregačních metod. K provedení analýzy se primární vzorek odebírá z plazmatické složky lidské krve s přidáním antikoagulantu (citrát sodný). Měření agregace trombocytů probíhá při vlnové délce 660 nm.

## **7.6 Laboratorní pomůcky**

V rámci provedení vyšetření byly využity následující materiály a pomůcky:

- zkumavky s citrátem sodným (0,109 mol/l)
- plastové zkumavky, mikrozkušavky
- pipety
- špičky k pipetám
- kyvety do analyzátoru Sysmex CS 2500
- magnetická míchadla
- pasturovy pipety plastové
- lahvičky na reagenty

### **7.6.1 Reagenty**

- ADP Reagent – firmy Hyphen BioMed (lyofilizovaný preparát ADP)
  - ⇒ Obsah lahvičky se rozpustí v 0,625 ml destilované vody, pečlivě se promíchá a ponechá se 30 minut stát. Získaná koncentrace je 160  $\mu\text{mol/l}$ .
- Epinefrine – firmy Hyphen BioMed (lyofilizovaný preparát EPI)
  - ⇒ Obsah lahvičky se rozpustí v 0,625 ml destilované vody, pečlivě se promíchá a ponechá se 30 minut stát. Získaná koncentrace je 800  $\mu\text{mol/l}$ .
- Chlorid sodný 0,9% roztok Fresenius Kabi (fyziologický roztok)
- Destilovaná voda

### **7.6.2 Induktory**

#### **ADP**

ADP patří mezi slabé induktory agregace trombocytů. Pro tento proces je klíčové navázání na dva typy receptorů na povrchu trombocytu. V případě, že se ADP připojí k receptoru P2Y1, trombocyt mění svůj tvar a dochází k uvolnění intracelulárního vápníku a dalšího ADP z granulí. Uvolněné ADP umožňuje i připojení k receptoru P2Y12, což vede k sekundární agregaci. Z klinického hlediska sledování agregace trombocytů

po přidání ADP představuje vhodnou metodu pro měření účinnosti thienopyridinové protidestičkové terapie. Léčba kyselinou acetylsalicylovou (ASA) a nesteroidními protizánětlivými léky, například Ibalgin, potlačuje druhou vlnu agregace vyvolanou ADP. (Škorňová et al., 2020)

### **Epinefrin (adrenalin)**

Epinefrin je také řazen mezi mírnější induktory agregace. Při navázání na dva adrenergní receptory dojde k uvolnění intracelulárního kalcia, ADP a tím vzniká druhá vlna agregace. Při léčbě nesteroidními protizánětlivými léky a kyselinou acetylsalicylovou (ASA) lze pozorovat sníženou agregaci. (Škorňová et al., 2020)

#### **7.6.2.1 Ředění induktorů**

Induktory ADP a EPI musí být naředěny na příslušné koncentrace pomocí fyziologického roztoku.

ADP ředíme na koncentrace:

- 2,5  $\mu\text{mol/l}$
- 1,0  $\mu\text{mol/l}$
- 0,5  $\mu\text{mol/l}$

EPI ředíme na koncentrace:

- 10  $\mu\text{mol/l}$
- 2,5  $\mu\text{mol/l}$
- 0,5  $\mu\text{mol/l}$

Následující Tabulka číslo 2 a Tabulka číslo 3 znázorňují postupy ředění induktorů.

#### **Tabulka 2 Příprava a postup ředění induktoru ADP**

(Kubešová a Knížová, 2023)

ADP zásobní roztok 160 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{l}$ )	50	25	15
objem fyziologického roztoku ( $\mu\text{l}$ )	350	475	585
získaná koncentrace induktoru ADP ( $\mu\text{M}$ )	<b>20</b>	<b>8</b>	<b>4</b>

### **Tabulka 3 Příprava a postup ředění induktoru EPI**

(Kubešová a Knížová, 2023)

EPI zásobní roztok	50 $\mu$ l (800 $\mu$ mol/l)	50 $\mu$ l (80 $\mu$ mol/l)	30 $\mu$ l (80 $\mu$ mol/l)
objem fyziologického roztoku ( $\mu$ l)	450	450	570
získaná koncentrace induktoru EPI ( $\mu$ M)	<b>80</b>	<b>8</b>	<b>4</b>

## **7.7 Postup měření agregace trombocytů**

- 1) Připravit reagentie a naředit induktory na předem určené koncentrace do příslušných nádobek na reagentie s odpovídajícími čárovými kódy a následně umístit do určených stojánků. Tabulka číslo 2,3 znázorňuje postup ředění induktorů.
- 2) Umístit fyziologický roztok do daného stojánku.
- 3) Připravit plazmu bohatou na trombocyty (PRP) a také plazmu chudou na trombocyty (PPP). U PRP změřit počet trombocytů. Příprava PRP a PPP je popsána v kapitole 6.3.2.1, 6.3.2.2.
- 4) Do analyzátoru Sysmex CS 2500 vložit speciální kyvety s magnetickým míchadlem.
- 5) Přepnout do agregačního režimu.
- 6) Zadat do systému název vzorku a vybrat požadované koncentrace daného induktoru.
- 7) Pokaždé umístit do první pozice racku vzorek PPP a do druhé pozice vzorek PRP.
- 8) Vložit rack s PPP a PRP do analyzátoru a spustit měření.
- 9) Opakovat postup s dalším induktorem.
- 10) Pipetování reagentií v analyzátoru probíhá podle následujících dvou přehledných tabulek: Tabulka číslo 4, 5.



**Tabulka 4 Postup ředění induktoru ADP v analyzátoru**

(Kubešová a Knížová, 2023)

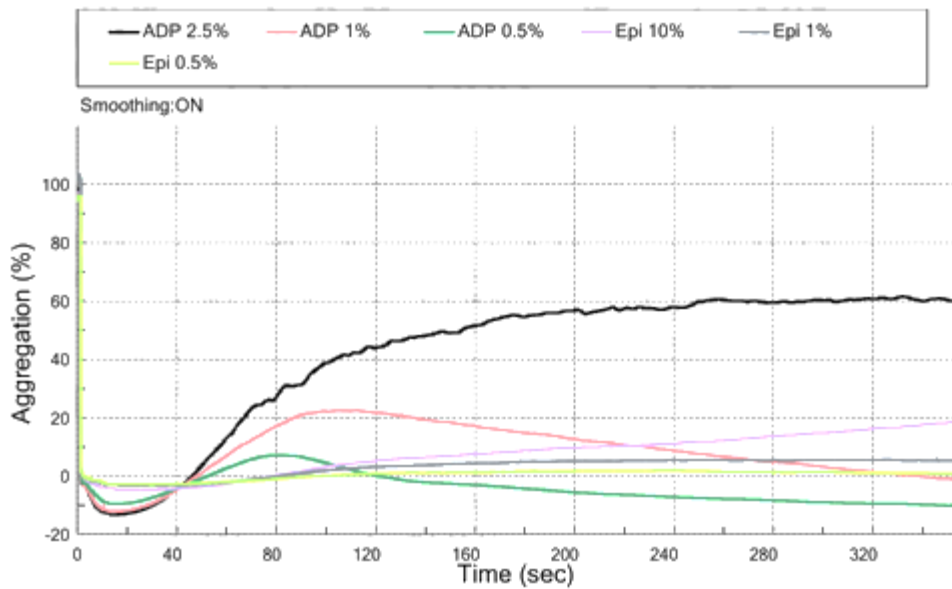
<b><u>1. analýza</u></b>	<b>PPP</b>	<b>PRP</b>	<b>ADP 20<math>\mu</math>M</b>	<b>výsledná koncentrace ADP</b>
<b>vzorek (<math>\mu</math>l)</b>	–	140	20	<b>2,5 <math>\mu</math>M</b>
<b>blank (<math>\mu</math>l)</b>	140	–	–	
<b><u>2. analýza</u></b>	<b>PPP</b>	<b>PRP</b>	<b>ADP 8<math>\mu</math>M</b>	<b>výsledná koncentrace ADP</b>
<b>vzorek (<math>\mu</math>l)</b>	–	140	20	<b>1,0 <math>\mu</math>M</b>
<b>blank (<math>\mu</math>l)</b>	140	–	–	
<b><u>3. analýza</u></b>	<b>PPP</b>	<b>PRP</b>	<b>ADP 4 <math>\mu</math>M</b>	<b>výsledná koncentrace ADP</b>
<b>vzorek (<math>\mu</math>l)</b>	–	140	20	<b>0,5 <math>\mu</math>M</b>
<b>blank (<math>\mu</math>l)</b>	140	–	–	

**Tabulka 5 Postup ředění induktoru EPI v analyzátoru**

(Kubešová a Knížová, 2023)

<b><u>1. analýza</u></b>	<b>PPP</b>	<b>PRP</b>	<b>EPI 80<math>\mu</math>M</b>	<b>výsledná koncentrace ADP</b>
<b>vzorek (<math>\mu</math>l)</b>	–	140	20	<b>10 <math>\mu</math>M</b>
<b>blank (<math>\mu</math>l)</b>	140	–	–	
<b><u>2. analýza</u></b>	<b>PPP</b>	<b>PRP</b>	<b>EPI 8<math>\mu</math>M</b>	<b>výsledná koncentrace ADP</b>
<b>vzorek (<math>\mu</math>l)</b>	–	140	20	<b>1,0 <math>\mu</math>M</b>
<b>blank (<math>\mu</math>l)</b>	140	–	–	
<b><u>3. analýza</u></b>	<b>PPP</b>	<b>PRP</b>	<b>EPI 4 <math>\mu</math>M</b>	<b>výsledná koncentrace ADP</b>
<b>vzorek (<math>\mu</math>l)</b>	–	140	20	<b>0,5 <math>\mu</math>M</b>
<b>blank (<math>\mu</math>l)</b>	140	–	–	

Po dokončení analýzy lze zobrazit primární křivky, které byly vyhodnoceny pomocí softwaru zařízení a následně uloženy do databáze vzorků v počítači. Obrázek číslo 6 prezentuje agregaci trombocytů u jednoho zvoleného pacienta se všemi koncentracemi induktorů ADP a EPI.



**Obrázek 6 Výsledný graf agregace trombocytů**

## **7.8 Postanalytická fáze**

Fáze po analýze neboli postanalytická fáze představuje spolupráci mezi laboratoří a lékařem a je ohraničena časovým rámcem získání a poskytnutí výsledků analýzy.

Postanalytická fáze zahrnuje:

- validaci výsledků v rámci interní kontroly kvality (Internal Quality Assessment) IQA
- kontrolu správnosti provedeného měření s ohledem na diagnózu
- klinický obraz pacienta
- archivní data a rozdíl stanoveného výsledku měření oproti minulému výsledku
- porovnání a srovnání s dalšími parametry, popř. konzultace výsledků s lékařem (Sciacovelli et al., 2016)

Výsledky vyšetření je vhodné porovnávat s referenčními hodnotami relevantního souboru testů. Hodnocení zahrnuje také detekci neočekávaných nálezů, opakování testů a ověřování alternativními metodami. Součástí procesu je též archivace dat. Chybovost v této fázi čítá přibližně 13–20 % z celkového počtu chyb. (Hawkins, 2012)

### **7.8.1 Interpretace a zpracování naměřených výsledků**

Pro analýzu a statistické vyhodnocení dat byl využit software Statistica CZ. Byly aplikovány následující statistické testy:

- Test normality rozdělení – Shapiro–Wilkův test
- Test shody rozdělení veličin – Mann–Whitneyův test
- Test vyšetření závislosti kvantitativních proměnných – Korelační matice (Spearmanův korelační koeficient)
- Test pro analýzu rozdílů ve výskytu vysoké maximální amplitudy: Chí kvadrát test, přičemž Fischerův test byl použit, pokud nebyly splněny podmínky pro použití chí–kvadrát testu
- Wilcoxonův test pro analýzu rozdílů závislých kvantitativních proměnných

## 8. VÝSLEDKY

### 8.1 Základní demografické údaje a hodnoty krevního obrazu

Studijní soubor zahrnoval 149 pacientů s prokázanou heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A. Z těchto pacientů prodělalo trombózu 55 jedinců, zatímco 99 jedinců trombózu neprodělalo. Podskupina pacientů s trombózou byla tvořena 23 muži a 32 ženami s průměrným věkem 44,17 let. Druhá podskupina, zahrnující pacienty bez trombózy, byla tvořena 41 muži a 58 ženami s průměrným věkem 45,38 let.

Mezi osobami, které prodělaly trombózu, bylo 46 nosičů heterozygotní mutace faktoru V Leiden a 9 nosičů heterozygotní mutace protrombinu G20210A, mezi osobami, které neprodělaly trombózu bylo 83 nosičů heterozygotní mutace faktoru V Leiden a 16 nosičů heterozygotní mutace protrombinu G20210A. Zastoupení nosičů uvedených mutací se nelišilo ( $p=0,9740$  – hodnoceno chí–kvadrát testem).

Tabulka číslo 6 představuje věkový profil pacientů s trombózou a bez ní. Uvádí průměrný věk, mediánový věk, směrodatnou odchylku (SD), minimální a maximální věk pro obě skupiny pacientů. Pacienti s trombózou mají průměrný věk 44,17 let a medián 45,57 let, zatímco pacienti bez trombózy mají průměrný věk 45,38 let a medián 46 let. Směrodatná odchylka je 8,87 pro pacienty s trombózou a 8,37 pro pacienty bez trombózy. Nejmladší pacient s trombózou je 24,22 let a nejmladší pacient bez trombózy je 25,19 let. Nejstarší pacient s trombózou dosahuje věku 60,35 let, zatímco nejstarší pacient bez trombózy má 60,79 let. Celkově tabulka ukazuje, že věkový profil obou skupin pacientů je velmi podobný, s jen mírnými rozdíly v jednotlivých věkových ukazatelích.

**Tabulka 6 Věkový profil pacientů s trombózou a bez ní**

	průměr	medián	SD	MIN	MAX
pacienti s trombózou	44,17	45,57	8,87	24,22	60,35
pacienti bez trombózy	45,38	46	8,37	25,19	60,79

Následující tabulka číslo 7 poskytuje srovnání základních údajů mezi pacienty s trombózou a bez trombózy. Tato tabulka zahrnuje přehled parametrů jako věk, pohlaví a další relevantní charakteristiky. Dále je v tabulce uveden typ statistických testů použitých k analýze těchto parametrů, čímž umožňuje srovnání mezi těmito dvěma skupinami a poskytuje přehled o jejich rozdílech a podobnostech.

**Tabulka 7 Porovnání základních údajů mezi pacienty s trombózou a bez trombózy**

	<b>P</b>	<b>Použitý test</b>
<b>pohlaví</b>	0,9611	Chí–kvadrát
<b>věk</b>	0,41321	Mann–Whitney
<b>leuko</b>	0,83859	Mann–Whitney
<b>Hb</b>	0,84749	T–test
<b>htk</b>	0,95074	T–test
<b>trombo</b>	0,10908	T–test

Pro pohlaví byl aplikován chí–kvadrát test s p–hodnotou 0,9611, což naznačuje, že rozdíly v pohlaví nejsou statisticky významné. Věk a leukocyty byly analyzovány pomocí Mann–Whitney testu, přičemž p–hodnoty byly 0,41321 a 0,83859, což ukazuje, že rozdíly mezi skupinami pro tyto parametry nejsou statisticky významné. Pro parametr Hb (hemoglobin), htk (hematokrit) a trombo (trombocyty) byl použit T–test, s p–hodnotami 0,84749, 0,95074 a 0,10908. P–hodnoty u těchto parametrů ukazují, že rozdíly mezi skupinami nejsou statisticky významné. Celkově výsledky ukazují, že u všech analyzovaných parametrů nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami, které by mohly zkreslit výsledky dalších analýz.

## 8.2 Primární cíle

### 8.2.1 Porovnání výsledků agregace u obou skupin

Tabulka číslo 8 a obrázky číslo 7 a 8 ukazují hodnoty maximální amplitudy agregace získané měřením vzorků získaných odběrem do vakuovaného systému (Vacutainer).

**Tabulka 8 Hodnoty maximální amplitudy agregace získané měřením vzorků získaných odběrem do vakuovaného systému**

	Medián Tr+	Medián Tr-	P	Test
<b>Epi 10</b>	75,3	79,8	0,21267	Mann–Whitney
<b>Epi 1</b>	13,4	23,5	0,17884	Mann–Whitney
<b>Epi 0,5</b>	5,3	8,7	0,21724	Mann–Whitney
<b>ADP 2,5</b>	57,8	70,1	0,34681	Mann–Whitney
<b>ADP 1</b>	12,5	22	<b>0,01834</b>	Mann–Whitney
<b>ADP 0,5</b>	-0,4	6,5	<b>0,00077</b>	Mann–Whitney

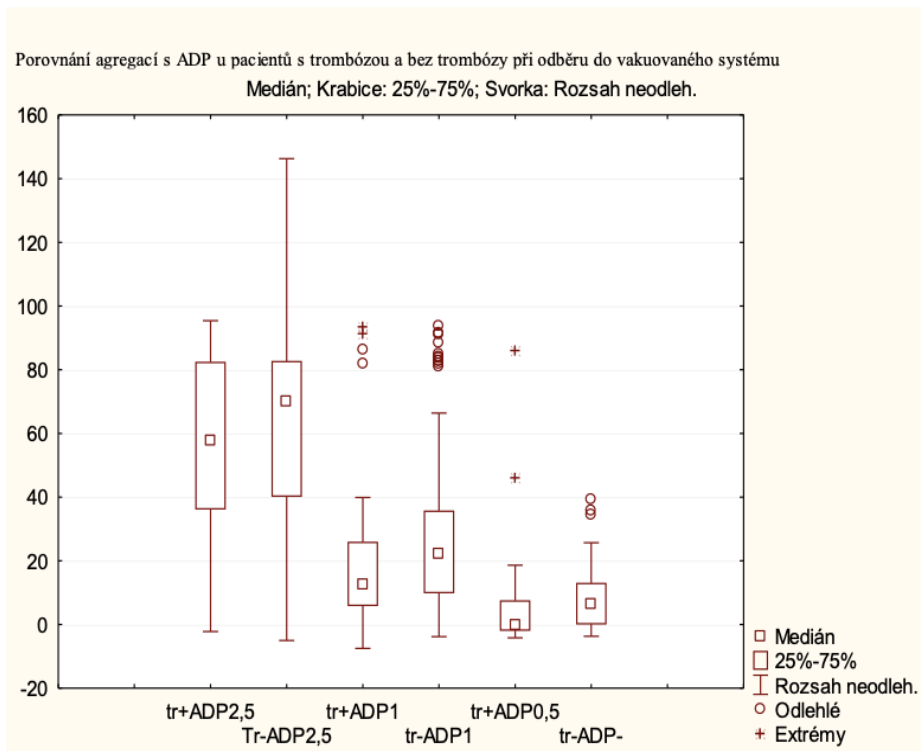
Tr+ pacienti, kteří prodělali trombózu

Tr- pacienti, kteří neprodělali trombózu

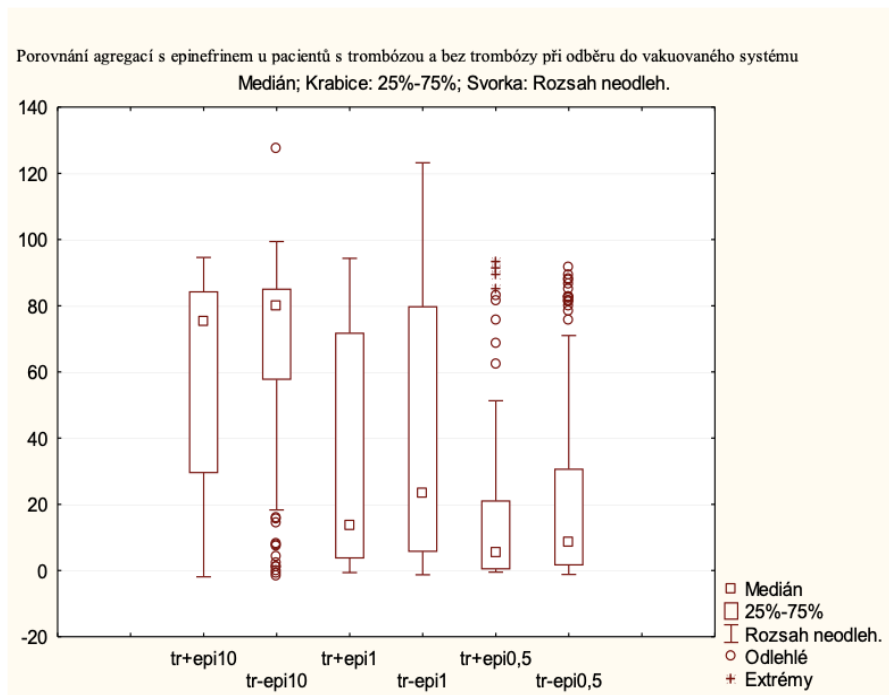
ADP 2,5 agregace při koncentraci ADP 2,5  $\mu\text{M}$

ADP 1 agregace při koncentraci ADP 1  $\mu\text{M}$

ADP 0,5 agregace při koncentraci ADP 0,5  $\mu\text{M}$



**Obrázek 7 Graf porovnání agregací s použitím induktoru ADP u pacientů s trombózou a bez trombózy při odběru do vakuovaného systému**



**Obrázek 8 Graf porovnání agregací s použitím induktoru EPI u pacientů s trombózou a bez trombózy při odběru do vakuovaného systému**

Oproti našemu původnímu předpokladu byl zjištěn trend k vyšším hodnotám maximální amplitudy u osob, které trombózu neprodělaly. Rozdíly byly statisticky významné při použití ADP 1  $\mu\text{M}$  ( $p=0,01834$ ) a 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p=0,00077$ ). Při použití epinefrinu a ADP 2,5  $\mu\text{M}$  nebyly rozdíly statisticky významné (ve všech případech  $p>0,05$ ).

Výsledky těchto statistických výpočtů je třeba však brát s rezervou, protože, jak vyplývá z grafů, zejména při použití dvou nejnižších koncentrací ADP jsou naměřené hodnoty nízké a rozptyl hodnot vysoký.

Tabulka číslo 9 a obrázky číslo 9 a 10 ukazují hodnoty maximální amplitudy agregace získané měřením vzorků získaných odběrem do nevakovaného systému.

**Tabulka 9 Hodnoty maximální amplitudy agregace získané měřením vzorků získaných odběrem do nevakovaného systému**

	Medián Tr+	Medián Tr-	P	Test
<b>Epi 10</b>	75,3	79,8	0,461	Mann–Whitney
<b>Epi 1</b>	13,4	23,5	0,40446	Mann–Whitney
<b>Epi 0,5</b>	5,3	8,7	0,06737	Mann–Whitney
<b>ADP 2,5</b>	57,8	70,1	0,0952	Mann–Whitney
<b>ADP 1</b>	12,5	22	0,08282	Mann–Whitney
<b>ADP 0,5</b>	-0,4	6,5	<b>0,00708</b>	<b>Mann–Whitney</b>

Tr+ pacienti, kteří prodělali trombózu

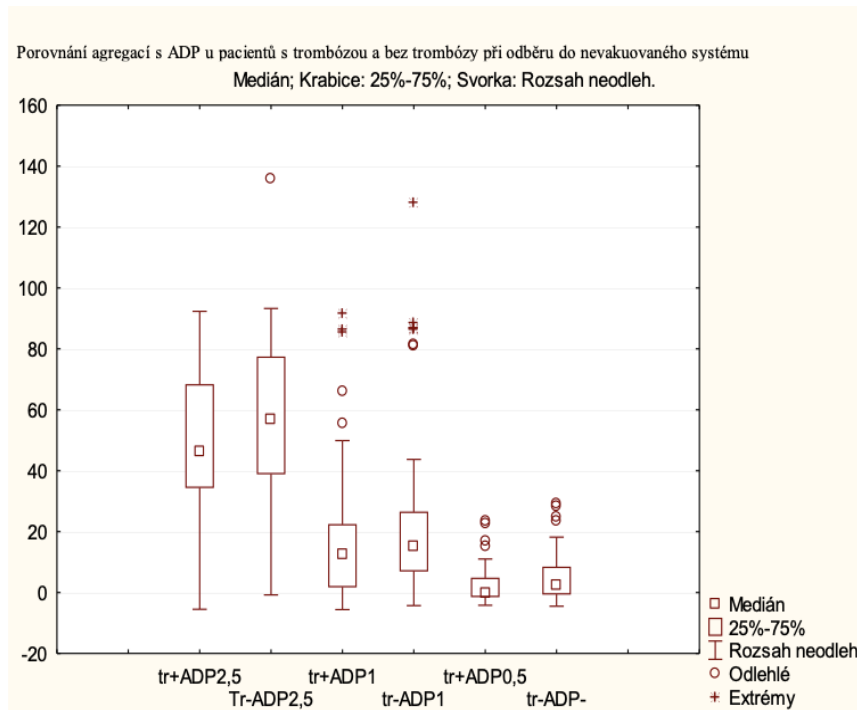
Tr- pacienti, kteří neprodělali trombózu

ADP 2,5 agregace při koncentraci ADP 2,5  $\mu\text{M}$

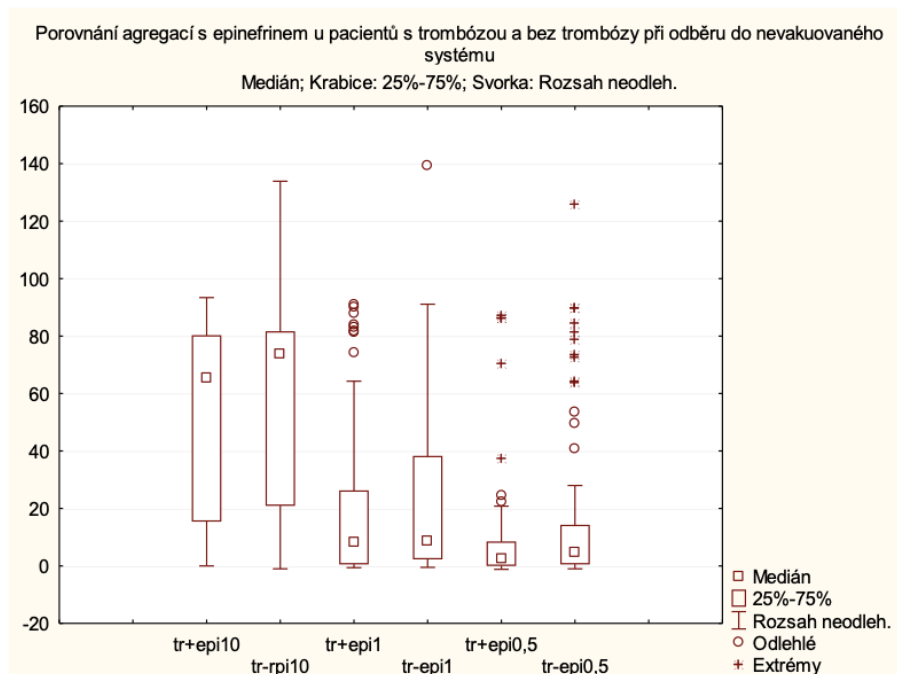
ADP 1 agregace při koncentraci ADP 1  $\mu\text{M}$

ADP 0,5 agregace při koncentraci ADP 0,5  $\mu\text{M}$





**Obrázek 9 Graf porovnání agregací s použitím induktoru ADP u pacientů s trombózou a bez trombózy při odběru do nevakuovaného systému**



**Obrázek 10 Graf porovnání agregací s použitím induktoru EPI u pacientů s trombózou a bez trombózy při odběru do nevakuovaného systému**

Tabulka číslo 9 prezentuje p–hodnoty získané pomocí Mann–Whitney testu pro analýzu rozdílů mezi skupinou A (pacienti s prodělanou trombózou) a skupinou B (pacienti, kteří trombózu neprodělali). Oproti našemu původnímu předpokladu byly hodnoty maximální amplitudy vyšší u osob, které trombózu neprodělaly. Rozdíly nebyly statisticky významné při použití epinefrinu a při použití nejvyšší koncentrace ADP, při použití koncentrací ADP 1  $\mu\text{M}$  a 0,5  $\mu\text{M}$  byly rozdíly statisticky významné.

Všechny p–hodnoty pro parametry EPI 10 ( $p=0,461$ ), EPI 1 ( $p=0,40446$ ), EPI 0,5 ( $p=0,06737$ ) a ADP 2,5 ( $p=0,0952$ ) jsou vyšší než běžně používaný práh statistické významnosti 0,05. Tyto výsledky indikují, že rozdíly mezi skupinami v těchto parametrech nejsou statisticky významné. Parametr ADP 1, s p–hodnotou 0,08282, naznačuje trend směrem k významnému rozdílu, avšak p–hodnota nedosahuje standardní úrovně významnosti 0,05, čímž zůstává statisticky nevýznamná. Naproti tomu p–hodnota pro ADP 0,5 ( $p=0,00708$ ) je výrazně pod prahovou hodnotu 0,05, což naznačuje statisticky významný rozdíl mezi skupinami. Tento výsledek je statisticky významný a ukazuje, že ADP 0,5 představuje parametr s významně odlišnými hodnotami mezi oběma skupinami. Závěrem, výsledky analýzy ukazují, že pouze parametr ADP 0,5 vykazuje statisticky významné rozdíly mezi skupinami, zatímco ostatní parametry neprokázaly statisticky významné rozdíly. Z dále uvedeného grafu (obrázek číslo 9) vyplývá, že vzhledem k nízkým hodnotám mediánu a velkému rozptylu hodnot nelze i přes statistickou významnost vyvozovat spolehlivé závěry, a to zejména při vědomí velké intraindividuální variability (nízké reprodukovatelnosti) výsledků při vyšetření optickou agregometrií.

### 8.2.2 Porovnání výskytu zvýšené agregability definované jako dosažení maximální amplitudy $\geq 60\%$ u obou skupin

Tabulka číslo 10, 11 uvádějí souhrnné výsledky porovnání procentuálního zastoupení pacientů, u kterých byla zjištěna zvýšená agregabilita definovaná jako dosažení maximální amplitudy po stimulaci epinefrinem nebo ADP vyšší než 60 % a kteří buď prodělali trombózu (Tr+), nebo neprodělali trombózy (Tr-).

**Tabulka 10 Rozdíly v zastoupení naměřených hodnot maximální amplitudy  $\geq 60\%$  při odběru do vakuovaného systému**

	Tr+ (%)	Tr- (%)	P	Test
<b>Epi 10</b>	65,45	74,75	0,2213	Chí–kvadrát
<b>Epi 1</b>	32,72	41,41	0,2880	Chí–kvadrát
<b>Epi 0,5</b>	16,36	20,20	0,5594	Chí–kvadrát
<b>ADP 2,5</b>	49,09	58,59	0,2563	Chí–kvadrát
<b>ADP 1</b>	7,27	12,12	0,3447	Chí–kvadrát
<b>ADP 0,5</b>	1,81	0	0,3571	Fisherův test

**Tabulka 11 Rozdíly v zastoupení naměřených hodnot maximální amplitudy  $\geq 60\%$  při odběru do nevakuovaného systému**

	Tr+ (%)	Tr- (%)	P	Test
<b>Epi 10</b>	61,82	62,63	0,9210	Chí–kvadrát
<b>Epi 1</b>	16,36	23,23	0,3141	Chí–kvadrát
<b>Epi 0,5</b>	7,27	10,10	0,7713	Fisherův test
<b>ADP 2,5</b>	29,09	47,47	0,0262	Chí–kvadrát
<b>ADP 1</b>	7,27	7,07	1,0000	Fisherův test
<b>ADP 0,5</b>	0	0	nelze spočítat	–

V tabulkách číslo 12 – 17 jsou uvedeny počty pacientů, u nichž byly zjištěny hodnoty maximální amplitudy  $\geq 60\%$  při vyšetření vzorků získaných při odběru do vakuovaného systému a buď prodělali nebo neprodělali trombózu.

**Tabulka 12 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 2,5  $\mu\text{M}$**

	Max. amplituda $\geq 60\%$	Max. amplituda $<60\%$
Prodělali trombózu	27	28
Neprodělali trombózu	58	41

**Tabulka 13 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 1,0  $\mu\text{M}$**

	Max. amplituda $\geq 60\%$	Max. amplituda $<60\%$
Prodělali trombózu	4	51
Neprodělali trombózu	12	87

**Tabulka 14 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$**

	Max. amplituda $\geq 60\%$	Max. amplituda $<60\%$
Prodělali trombózu	1	54
Neprodělali trombózu	0	99

**Tabulka 15 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 10  $\mu\text{M}$**

	Max. amplituda $\geq 60\%$	Max. amplituda $<60\%$
Prodělali trombózu	36	19
Neprodělali trombózu	74	25

**Tabulka 16 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 1,0  $\mu\text{M}$**

	Max. amplituda $\geq 60\%$	Max. amplituda $<60\%$
Prodělali trombózu	18	37
Neprodělali trombózu	41	58

**Tabulka 17 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 0,5 µM**

	Max. amplituda ≥ 60 %	Max. amplituda <60 %
Prodělali trombózu	9	46
Neprodělali trombózu	20	79

V tabulkách číslo 18 – 23 jsou uvedeny počty pacientů, u nichž byly zjištěny hodnoty maximální amplitudy ≥ 60 % při vyšetření vzorků získaných při odběru do nevakovaného systému a buď prodělali nebo neprodělali trombózu.

**Tabulka 18 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 2,5 µM**

	Max. amplituda ≥ 60 %	Max. amplituda <60 %
Prodělali trombózu	16	39
Neprodělali trombózu	47	52

**Tabulka 19 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 1,0 µM**

	Max. amplituda ≥ 60 %	Max. amplituda <60 %
Prodělali trombózu	4	51
Neprodělali trombózu	7	92

**Tabulka 20 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 0,5 µM**

	Max. amplituda ≥ 60 %	Max. amplituda <60 %
Prodělali trombózu	0	55
Neprodělali trombózu	0	99

**Tabulka 21 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 10 µM**

	Max. amplituda ≥ 60 %	Max. amplituda <60 %
Prodělali trombózu	34	21
Neprodělali trombózu	62	37

**Tabulka 22 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 1,0  $\mu$ M**

	Max. amplituda $\geq 60$ %	Max. amplituda $<60$ %
Prodělali trombózu	9	46
Neprodělali trombózu	23	76

**Tabulka 23 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 0,5  $\mu$ M**

	Max. amplituda $\geq 60$ %	Max. amplituda $<60$ %
Prodělali trombózu	4	51
Neprodělali trombózu	10	89

Při odběru do vakuovaného systému jsou všechny p–hodnoty vyšší než běžně používaná hladina významnosti 0,05, nebyla tedy prokázána závislost mezi anamnézou prodělané trombózy a zvýšenou agregabilitou definovanou jako dosažení maximální amplitudy  $\geq 60$  %.

Při odběru do nevakuovaného systému byly s výjimkou použití ADP v koncentraci 2,5  $\mu$ M všechny p–hodnoty vyšší než 0,05 a nebyla tedy prokázána závislost mezi anamnézou prodělané trombózy a zvýšenou agregabilitou definovanou jako dosažení maximální amplitudy  $\geq 60$  %. Při použití ADP v koncentraci 2,5  $\mu$ M byla prokázána závislost, kdy výskyt maximální amplitudy  $\geq 60$  % byl vyšší u pacientů, kteří neprodělali trombózu, nebyl tedy potvrzen náš původní předpoklad, že pacienti s anamnézou trombózy mají vyšší výskyt zvýšené agregability.

### 8.2.3 Porovnání výskytu zvýšené agregability definované jako dosažení maximální amplitudy odpovídající nejvyššímu kvartilu hodnot získaných vyšetřením zdravých osob

Tabulka číslo 24 uvádí výsledky statistických testů zaměřených na vyhodnocení rozdílů v procentuálním podílu osob, které prodělaly trombozu (Tr+) a osob, které trombozu neprodělaly (Tr-), ve vztahu k agregaci nad hranicí horního kvartilu. Tato hranice byla stanovena na základě vyšetření souboru 100 zdravých dobrovolníků. Analýza se zaměřila na výskyt hodnot agregace překračujících tuto hranici při odběru do vakuovaného systému. Pro posouzení rozdílů mezi oběma skupinami (Tr+ a Tr-) byl použit Chí–kvadrát test.

Tabulka podává procentuální podíly v obou skupinách (Tr+ a Tr-) a p–hodnoty, které umožnily vyhodnotit statistickou významnost rozdílů v zastoupení agregace nad hranicí horního kvartilu.

**Tabulka 24** Rozdíly v zastoupení naměřených hodnot agregace nad hraniční hodnotou nejvyššího kvartilu získaných vyšetřením zdravých osob při odběru do vakuovaného systému

	Tr+ (%)	Tr- (%)	P	Test
<b>Epi 10</b>	9,09	16,16	0,2205	Chí–kvadrát
<b>Epi 1</b>	14,54	16,16	0,7910	Chí–kvadrát
<b>Epi 0,5</b>	18,18	23,23	0,4642	Chí–kvadrát
<b>ADP 2,5</b>	7,27	13,13	0,2663	Chí–kvadrát
<b>ADP 1</b>	12,72	25,25	0,0664	Chí–kvadrát
<b>ADP 0,5</b>	16,36	27,27	0,1254	Chí–kvadrát

U induktorů EPI v koncentracích EPI 10, EPI 1 a EPI 0,5 a ADP v koncentracích ADP 2,5, ADP 1 a ADP 0,5 jsou uvedeny procentuální podíly v obou skupinách a p–hodnoty získané pomocí Chí–kvadrát testu. Hodnoty p pro jednotlivé koncentrace činily: 0,2205, 0,7910, 0,4642, 0,2663, 0,0664, 0,1254. Výsledky ukazují, že testované parametry nevykazují statisticky významný rozdíl mezi skupinami, jelikož žádná z p–hodnot neindikuje statisticky významný rozdíl na úrovni významnosti 0,05.

Tabulka číslo 25 uvádí výsledky statistických testů zaměřených na vyhodnocení rozdílů v procentuálním podílu osob, které prodělaly trombózu (Tr+) a osob, které trombózu neprodělaly (Tr-), ve vztahu k agregaci nad hranicí horního kvartilu. Tato hranice byla stanovena na základě vyšetření souboru 100 zdravých dobrovolníků. Analýza se zaměřila na výskyt hodnot agregace překračujících tuto hranici při odběru do nevakovaného systému. Byly aplikovány různé statistické testy, včetně Chí–kvadrát testu a Fisherova testu, k posouzení rozdílů mezi skupinami.

**Tabulka 25 Rozdíly v zastoupení naměřených hodnot agregace nad hraniční hodnotou nejvyššího kvartilu získaných vyšetřením zdravých osob při odběru do nevakovaného systému**

	Tr+ (%)	Tr- (%)	P	Test
<b>Epi 10</b>	7,27	3,03	0,2489	Fisherův test
<b>Epi 1</b>	14,54	22,22	0,2491	Chí–kvadrát
<b>Epi 0,5</b>	16,36	21,21	0,4667	Chí–kvadrát
<b>ADP 2,5</b>	14,54	13,13	0,8064	Chí–kvadrát
<b>ADP 1</b>	12,72	13,13	0,9430	Chí–kvadrát
<b>ADP 0,5</b>	7,27	16,16	0,1159	Chí–kvadrát

U induktorů EPI v koncentracích EPI 10, EPI 1 a EPI 0,5 a ADP v koncentracích ADP 2,5, ADP 1 a ADP 0,5 jsou uvedeny procentuální podíly v obou skupinách a odpovídající p–hodnoty získané pomocí statistických testů. P–hodnoty pro jednotlivé koncentrace činily: 0,2489, 0,2491, 0,4667, 0,8064, 0,9430, 0,1159. Tyto výsledky naznačují, že žádný z testovaných parametrů nevykazuje statisticky významný rozdíl mezi skupinami, protože všechny p–hodnoty jsou vyšší než úroveň významnosti 0,05. To znamená, že rozdíly v agregaci nad hranicí horního kvartilu mezi oběma skupinami nejsou statisticky významné.



V tabulkách číslo 26 – 31 jsou uvedeny počty pacientů, u nichž byly zjištěny hodnoty agregace překračující hraniční hodnotou nejvyššího kvartilu stanovenou na základě vyšetření zdravých jedinců při odběru do vakuovaného systému, kteří buď prodělali nebo neprodělali trombózu.

**Tabulka 26 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 2,5  $\mu$ M**

	Nad horním kvartilem	Pod horním kvartilem
Prodělali trombózu	4	51
Neprodělali trombózu	13	86

**Tabulka 27 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 1,0  $\mu$ M**

	Max. amplituda $\geq$ 60 %	Max. amplituda <60 %
Prodělali trombózu	7	48
Neprodělali trombózu	25	74

**Tabulka 28 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 0,5  $\mu$ M**

	Max. amplituda $\geq$ 60 %	Max. amplituda <60 %
Prodělali trombózu	9	46
Neprodělali trombózu	27	72

**Tabulka 29 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 10  $\mu$ M**

	Max. amplituda $\geq$ 60 %	Max. amplituda <60 %
Prodělali trombózu	5	50
Neprodělali trombózu	16	83

**Tabulka 30 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 1,0  $\mu$ M**

	Max. amplituda $\geq$ 60 %	Max. amplituda <60 %
Prodělali trombózu	8	47
Neprodělali trombózu	16	83

**Tabulka 31 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 0,5 µM**

	Max. amplituda ≥ 60 %	Max. amplituda <60 %
Prodělali trombózu	10	45
Neprodělali trombózu	23	76

V tabulkách číslo 32 – 37 jsou uvedeny počty pacientů, u nichž byly zjištěny hodnoty agregace překračující hraniční hodnotou nejvyššího kvartilu stanovenou na základě vyšetření zdravých jedinců při odběru do nevakuovaného systému, kteří buď prodělali nebo neprodělali trombózu.

**Tabulka 32 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 2,5 µM**

	Nad horním kvartilem	Pod horním kvartilem
Prodělali trombózu	8	47
Neprodělali trombózu	13	86

**Tabulka 33 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 1,0 µM**

	Nad horním kvartilem	Pod horním kvartilem
Prodělali trombózu	7	48
Neprodělali trombózu	13	86

**Tabulka 34 Kontingenční tabulka – výsledky při použití ADP v koncentraci 0,5 µM**

	Nad horním kvartilem	Pod horním kvartilem
Prodělali trombózu	4	51
Neprodělali trombózu	16	83

**Tabulka 35 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 10 µM**

	Nad horním kvartilem	Pod horním kvartilem
Prodělali trombózu	4	51
Neprodělali trombózu	3	96

**Tabulka 36 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 1,0  $\mu\text{M}$**

	Nad horním kvartilem	Pod horním kvartilem
Prodělali trombózu	8	47
Neprodělali trombózu	22	77

**Tabulka 37 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$**

	Nad horním kvartilem	Pod horním kvartilem
Prodělali trombózu	9	46
Neprodělali trombózu	21	78

### 8.3 Sekundární cíle

Cílem této kapitoly je zjistit, zda existují rozdíly a jaká je korelace mezi výsledky agregace trombocytů při použití nízkých koncentrací induktorů, získaných ze vzorků odebraných do vakuovaných zkumavek a výsledky získanými ze vzorků odebraných do nevakuovaných zkumavek.

Tabulka číslo 38 zobrazuje rozdíly v naměřených hodnotách získaných při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému. Ke statistickému hodnocení byl použit Wilcoxonův test.

**Tabulka 38 Rozdíly v naměřených hodnotách při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému**

	Medián vakuovaný systém	Medián nevakuovaný systém	P	Test
<b>Epi 10</b>	78,15	69,40	0,000000	Wilcoxon
<b>Epi 1</b>	19,35	8,35	0,000000	Wilcoxon
<b>Epi 0,5</b>	6,95	3,85	0,000000	Wilcoxon
<b>ADP 2,5</b>	66,65	51,00	0,000001	Wilcoxon
<b>ADP 1</b>	19,40	14,30	0,000000	Wilcoxon
<b>ADP 0,5</b>	4,25	1,55	0,000000	Wilcoxon

Ve všech případech byly výsledky rozdílné, při odběru do vakuovaného systému byly naměřené hodnoty maximální amplitudy statisticky významně vyšší.

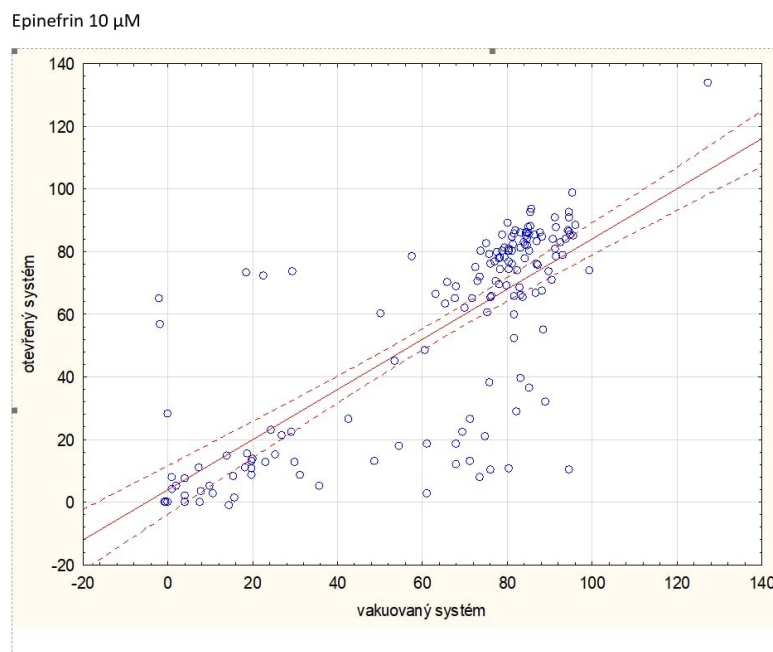
Tabulka číslo 39 zobrazuje hodnoty Spearmanova koeficientu  $r$ –korelace mezi hodnotami naměřenými při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému a statistickou významnost této korelace.

**Tabulka 39 Korelace výsledků získaných při odběru do vakuovaného systému a při odběru do nevakuovaného systému**

	Spearmanův koeficient $r$	P
<b>Epi 10</b>	0,767173	0,000000
<b>Epi 1</b>	0,818206	0,000000
<b>Epi 0,5</b>	0,839938	0,000000
<b>ADP 2,5</b>	0,769874	0,000000
<b>ADP 1</b>	0,780090	0,000000
<b>ADP 0,5</b>	0,796043	0,000000

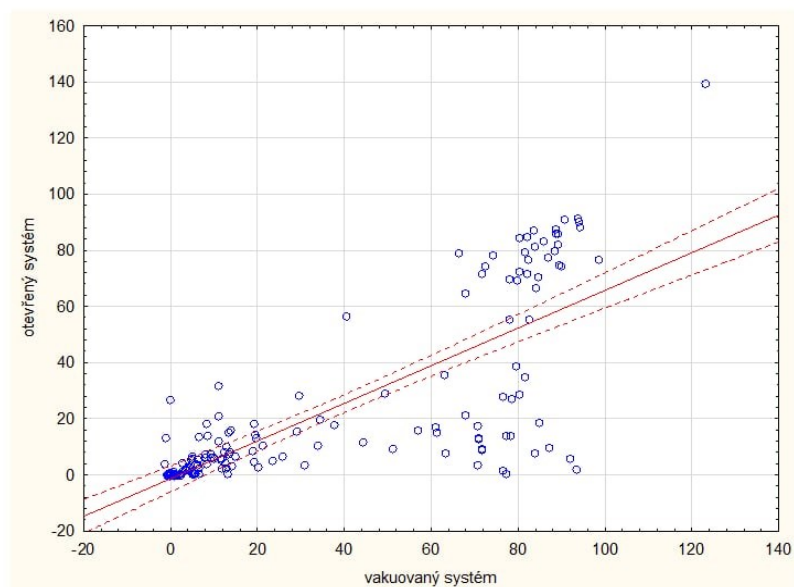
Výsledky ukazují silné korelace pro všechny analyzované induktry: EPI 10, EPI 1, EPI 0,5, ADP 2,5, ADP 1, a ADP 0,5 s koeficienty korelace v rozmezí od 0,767173 do 0,839938. Všechny  $p$ –hodnoty jsou 0,00000, což indikuje statistickou významnost všech nalezených korelací.

Následující grafy (Obrázek číslo 11, 12, 13) zobrazují vztah mezi hodnotami "vakuovaného systému" (osa X) a "otevřeného systému" (osa Y) při aplikaci epinefrinu v koncentracích 10, 1 a 0,5  $\mu\text{M}$ . Modré kruhy reprezentují měření, která vykazují pozitivní korelaci, což znamená, že s rostoucími hodnotami v jednom systému se zvyšují i hodnoty v druhém systému. Červená plná čára znázorňuje lineární trend, zatímco červené přerušované čáry ukazují intervaly spolehlivosti. Graf naznačuje, že lineární model dobře popisuje vztah mezi proměnnými, přičemž existuje určitá variabilita datových bodů kolem trendové linie.



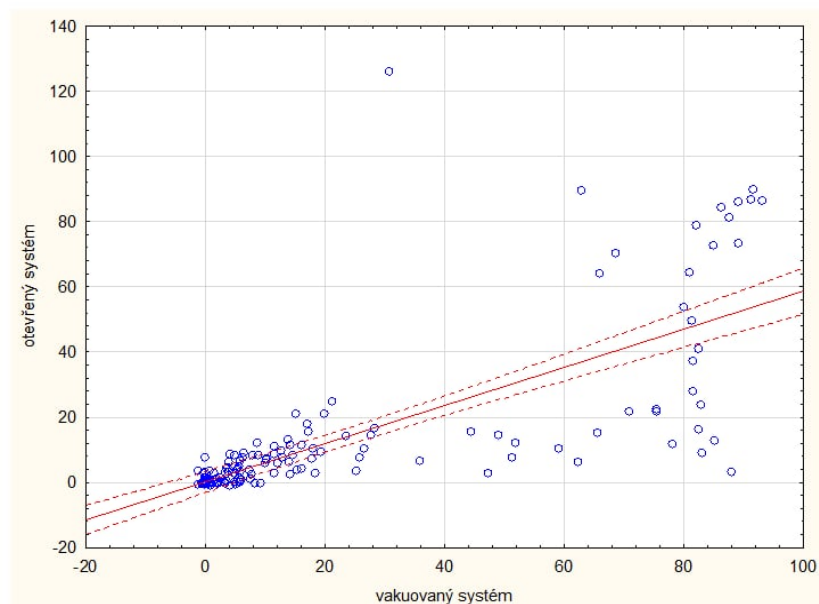
**Obrázek 11 Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci epinefrinu 10  $\mu\text{M}$  při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému**

Epinefrin 1  $\mu\text{M}$



**Obrázek 12** Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci epinefrinu 1  $\mu\text{M}$  při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému

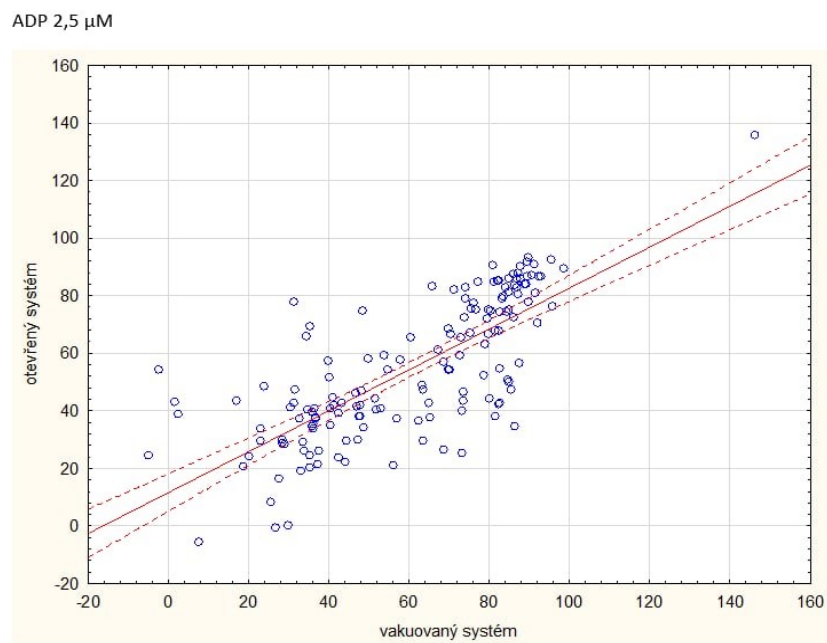
Epinefrin 0,5  $\mu\text{M}$



**Obrázek 13** Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci epinefrinu 0,5  $\mu\text{M}$  při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému

Grafy (Obrázek číslo 14, 15, 16) ukazují pozitivní korelaci mezi výsledky agregace trombocytů při koncentracích induktoru epinefrin 10, 1 a 0,5 $\mu$ M ze vzorků odebraných do vakuovaných a nevakuovaných zkumavek.

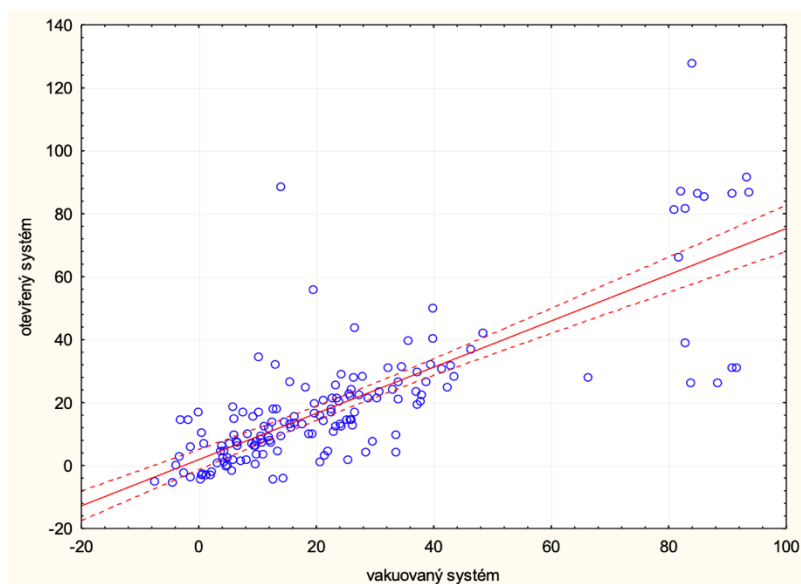
Následující grafy (Obrázek číslo 14, 15, 16) zobrazují vztah mezi hodnotami "vakuovaného systému" (osa X) a "otevřeného systému" (osa Y) při aplikaci adenosindifosfátu v koncentracích 2,5, 1 a 0,5 $\mu$ M. Modré kruhy reprezentují měření, která vykazují pozitivní korelaci, což znamená, že s rostoucími hodnotami v jednom systému se zvyšují i hodnoty v druhém systému. Červená plná čára znázorňuje lineární trend, zatímco červené přerušované čáry ukazují intervaly spolehlivosti. Graf naznačuje, že lineární model dobře popisuje vztah mezi proměnnými, přičemž existuje určitá variabilita datových bodů kolem trendové linie.



**Obrázek 14 Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci ADP 2,5  $\mu$ M při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému**

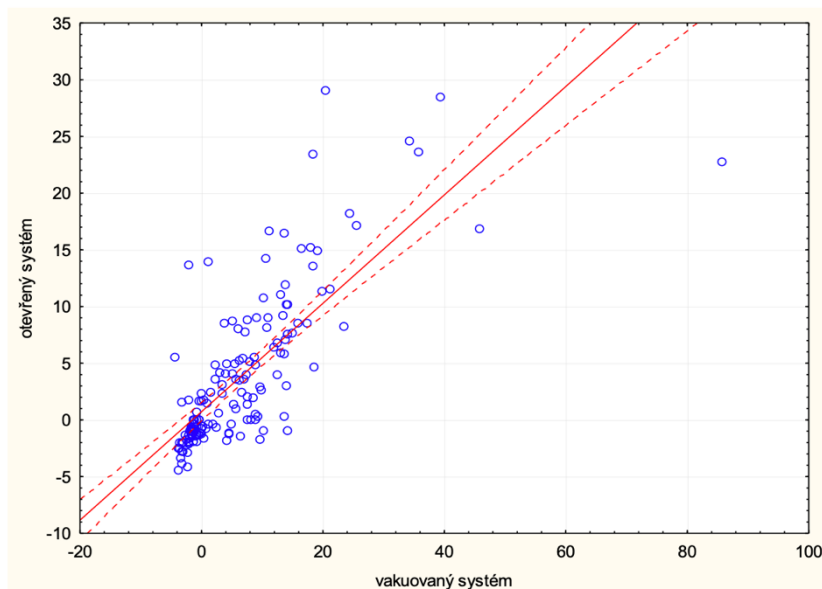


ADP 1  $\mu$ M



**Obrázek 15** Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci ADP 1  $\mu$ M při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému

ADP 0,5  $\mu$ M



**Obrázek 16** Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci ADP 0,5  $\mu$ M při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému

Výše uvedené výsledky naznačují silnou korelaci naměřených hodnot při vyšetření vzorků získaných odběrem do vakuovaného systému s naměřenými hodnotami při vyšetření vzorků získaných odběrem do nevakuovaného systému. Vzhledem ke zjištěným rozdílům však silná korelace neznámá zaměnitelnost obou metod. Také z grafů jasně vyplývá, že tyto hodnoty sice korelují, ale nejsou porovnatelné. Pro praxi vyplývá, že si laboratoř musí zvolit jen jednu z těchto metod odběru a nepoužívat druhou metodu. Je to příklad situace, kdy preanalytická fáze má zásadní význam. Jde o jednu z metod, kdy by laboratoř měla mít jistotu, že odběr byl proveden odpovídajícím způsobem.

## 9. DISKUSE

Žilní tromboembolismus (VTE), souhrnný termín pro hlubokou žilní trombózu a plicní embolii, má roční incidenci 1–2 případy na 1000 osob. (Heit, 2015) Jedná se o komplexní onemocnění, které vzniká v důsledku interakcí mezi dědičnými a získanými faktory. (Rosendaal, 1999)

Heterozygotní mutace koagulačního faktoru V Leiden a protrombinu G20210A jsou známy jako nejčastější genetické predispozice k VTE. Tyto mutace zvyšují riziko vzniku trombózy, avšak ne všichni nosiči těchto mutací se potýkají s trombózou, což naznačuje, že kromě těchto genetických faktorů mohou hrát roli i další mechanismy (Pastori et al., 1999; Updated 2024). Důležitým rizikovým faktorem pro vznik VTE je obezita. (Purdy, 2021)

O možné roli trombocytů v patogenezi VTE svědčí účinnost protidestičkové terapie v profylaxi recidivy TEN po ukončení antikoagulační léčby (Becattini et al., 2012) nebo při léčbě mnohočetného myelomu zahrnující lenalidomid (Larocca et al., 2012), i když nízkomolekulární hepariny nebo přímá orální antikoagulancia jsou považována v profylaxi TEN v různých situacích za účinnější a jsou tedy preferována.

Je otázkou, zda role trombocytů v patogenezi TEN je významnější u osob se zvýšenou agregabilitou trombocytů, zjištěnou při vyšetření agregace s nízkými koncentracemi ADP nebo epinefrinu. Zvýšená agregabilita trombocytů splňující kritéria SPS byla nalezena u 21 % pacientů s idiopatickým VTE, nicméně, v této publikaci nebyl uveden kontrolní soubor (Tekgündüz et al., 2013). Vysoký výskyt SPS byl popsán také v populaci mexických mesticů s anamnézou TEN, ale i v této publikaci nebyl uveden kontrolní soubor. (Azamar–Solis et al., 2019) Uvedené metodické nedostatky těchto studií vedly ke kritice závěrů o SPS jako příčině VTE. Absence publikací porovnávajících agregabilitu s nízkými koncentracemi ADP a epinefrinu u osob s trombózou s agregabilitou u osob bez trombózy byla impulsem k vypracování mé diplomové práce.

Samotná trombocytóza je rizikovým faktorem trombózy, a to sekundární trombocytóza i trombocytóza při myeloproliferativních chorobách. (Ho et al., 2012; De Stefano et al., 2008)

Byly publikovány souhrnné práce popisující význam trombofilních stavů včetně role trombocytů v patogenezi VTE. (Dicks et al., 2024)

V této diplomové práci jsme neprokázali náš původní předpoklad, že nosiči heterozygotní mutace faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A, kteří prodělali VTE mají vyšší agregabilitu trombocytů s nízkými koncentracemi ADP a/nebo epinefrinu oproti osobám, které neprodělaly trombózu. Naše výsledky tedy nejsou v souladu s výše uvedenou literaturou (Tekgündüz et al., 2013; Azamar–Solis et al., 2019). Na rozdíl od uvedených publikací jsme v diplomové práci porovnávali hodnoty zjištěné u pacientů s prodělanou trombózou s hodnotami zjištěnými u nosičů stejných mutací, které trombózu neprodělali, což lze považovat za silnou stránku této práce. Dalším rozdílem bylo použití diagnostických kritérií SPS ve výše uvedených studiích, zatímco v naší studii jsme použili pro porovnání obou souborů několik různých statistických přístupů. Původní diagnostická kritéria SPS nejsou některými autory považována za vhodná, zejména pro vysoký výskyt hyperagregability s koncentracemi epinefrinu 10  $\mu\text{M}$  a ADP 2,5  $\mu\text{M}$  (Yee et al., 2005; Kessler et al., 2024). Hodnoty maximální amplitudy v mé práci byly dokonce vyšší u osob, které trombózu neprodělaly. Statisticky významné rozdíly v agregaci při koncentracích ADP 1  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,01834$ ) a 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,00077$ ), pro tento rozdíl nemáme žádné vysvětlení. Slabou stránkou této práce je skutečnost, že výsledky vyšetření optickou agregometrií, zejména s nízkými koncentracemi induktorů, vykazují významnou intraindividuální variabilitu a výsledky vyšetření v čase, kdy jsme tato vyšetření prováděli, nemusí odpovídat situaci v době vzniku trombózy. Ve světle našich výsledků se ale jeví podíl geneticky podmíněné zvýšené agregability s nízkými koncentracemi ADP a epinefrinu popsané u SPS na patogenezi VTE jako velmi nepravděpodobné.

Korelační analýza mezi odběry do vakuovaného a nevakuovaného systému ukázala silné a statisticky významné korelace (Spearmanovy koeficienty v rozmezí 0,767 až 0,840,  $p < 0,00001$ ). Je tedy možno používat každou z těchto metod, ale každá laboratoř si musí zvolit pro rutinní praxi a používat důsledně jen jednu z nich. I když hodnoty korelují, nemají stejné výsledky.

## 10. ZÁVĚR

Primárním cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda je agregabilita trombocytů u osob s prokázanou heterozygotní mutací faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A, kteří prodělali trombózu (skupina A), zvýšená při nízkých koncentracích induktorů ADP a epinefrinu ve srovnání s osobami s touto mutací, kteří trombózu neprodělali (skupina B). Tento náš původní předpoklad nebyl potvrzen.

Výsledky studie naznačují, že vyšetření agregability trombocytů zjištěné optickou agregometrií s použitím nízkých koncentrací ADP a epinefrinu není přínosné pro odhad rizika VTE u heterozygotních nosičů mutace faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A. Je otázkou, zda jiné metody vyšetření trombocytů (agregace s jinými induktory, flowcytometrické vyšetření exprese P–selektinu) by mohly být přínosnější. Existují další faktory, které ovlivňují riziko, a které je třeba zkoumat.

Sekundárním cílem bylo zjištění rozdílů a korelací mezi výsledky získanými vyšetřením vzorků odebraných do vakuovaného systému a výsledky získanými vyšetřením vzorků odebraných do nevakuovaného systému. Bylo zjištěno, že při odběru do vakuovaného systému jsou maximální amplitudy statisticky významně vyšší.

## 11. POUŽITÉ ZKRATKY

ADP – Adenosine diphosphate (Adenosindifosfát)

APC – Activated Protein C (Aktivovaný protein C)

ASA – Acetylsalicylic Acid (Acetylsalicylová kyselina)

ATP – Adenosine triphosphate (Adenosintrifosfát)

Ca<sup>2+</sup> – Calcium Ion (Vápenatý iont)

DIC – Disseminated Intravascular Coagulation (Diseminovaná intravaskulární koagulace)

DVT – Deep Vein Thrombosis (Hluboká žilní trombóza)

EDRF – Endotelium Derived Relaxing Factor (Endoteliem odvozený relaxační faktor)

EPI – Epinephrine (Epinefrin – adrenalin)

FVL – Factor V Leiden (Faktor V Leiden)

GP – Glycoprotein (Glykoprotein)

IQA – Internal Quality Assessment (Systém interní kontroly kvality)

LM – Leiden Mutation (Leidenská mutace)

LTA – Light Transmission Aggregometry (Optická agregometrie)

NO – Nitric oxide (Oxid dusnatý)

PAF – Platelet Activating Factor (Faktor aktivující destičky)

PAI-1 – Plasminogen Activator Inhibitor-1 (Inhibitor aktivátoru plazminogenu-1)

PDGF – Platelet Derived Growth Factor (Trombocytární růstový faktor)

PE – Pulmonary Embolism (Plicní embolie)

PF3 – Platelet factor 3 (Destičkový faktor 3)

PLT – Platelet (Trombocyt)

PPP – Platelet poor plazma (Plazma chudá na trombocyty)

Profylaxe TEN – Thrombosis and Embolism Prevention (Profylaxe trombózy a embolie)

PRP – Platelet rich plazma (Plazma bohatá na trombocyty)

SD – Standard Deviation (Směrodatná odchylka)

SPS – Sticky Platelet Syndrome (Syndrom lepivých destiček)

STM – Sample Transport Module (Systém transportního modulu)

t-Pa – Tissue Plasminogen Activator (Tkáňový aktivátor plazminogenu)

TAFI – Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (Trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy)

TF – Tissue Factor (Tkáňový faktor)

TXA2 – Tromboxan 2

u-Pa – Urokinase Plasminogen Activator (Urokináza aktivátor plazminogenu)

VTE – Venous Thromboembolism (Žilní tromboembolismus)

vWF – von Willebrand Factor (von Willebrandův faktor)

WBA – Whole Blood Agregometry (Impedanční agregometrie)

## 12. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Seznam hemokoagulačních faktorů s uvedením jejich synonym a funkcí.....	28
Tabulka 2 Příprava a postup ředění induktoru ADP .....	47
Tabulka 3 Příprava a postup ředění induktoru EPI .....	48
Tabulka 4 Postup ředění induktoru ADP v analyzátoru .....	49
Tabulka 5 Postup ředění induktoru EPI v analyzátoru .....	49
Tabulka 6 Věkový profil pacientů s trombózou a bez ní .....	52
Tabulka 7 Porovnání základních údajů mezi pacienty s trombózou a bez trombózy.....	53
Tabulka 8 Hodnoty maximální amplitudy agregace získané měřením vzorků získaných odběrem do vakuovaného systému .....	54
Tabulka 9 Hodnoty maximální amplitudy agregace získané měřením vzorků získaných odběrem do nevakuovaného systému .....	56
Tabulka 10 Rozdíly v zastoupení naměřených hodnot maximální amplitudy $\geq 60\%$ při odběru do vakuovaného systému .....	59
Tabulka 11 Rozdíly v zastoupení naměřených hodnot maximální amplitudy $\geq 60\%$ při odběru do nevakuovaného systému .....	59
Tabulka 12 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $2,5\ \mu\text{M}$ .....	60
Tabulka 13 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $1,0\ \mu\text{M}$ .....	60
Tabulka 14 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $0,5\ \mu\text{M}$ .....	60
Tabulka 15 Kontingenční tabulka– výsledky při použití EPI v koncentraci $10\ \mu\text{M}$ .....	60
Tabulka 16 Kontingenční tabulka– výsledky při použití EPI v koncentraci $1,0\ \mu\text{M}$ .....	60
Tabulka 17 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci $0,5\ \mu\text{M}$ .....	61
Tabulka 18 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $2,5\ \mu\text{M}$ .....	61
Tabulka 19 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $1,0\ \mu\text{M}$ .....	61
Tabulka 20 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $0,5\ \mu\text{M}$ .....	61
Tabulka 21 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci $10\ \mu\text{M}$ .....	61
Tabulka 22 Kontingenční tabulka– výsledky při použití EPI v koncentraci $1,0\ \mu\text{M}$ .....	62
Tabulka 23 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci $0,5\ \mu\text{M}$ .....	62
Tabulka 24 Rozdíly v zastoupení naměřených hodnot agregace nad hraniční hodnotou nejvyššího kvartilu získaných vyšetřením zdravých osob při odběru do vakuovaného systému	63
Tabulka 25 Rozdíly v zastoupení naměřených hodnot agregace nad hraniční hodnotou nejvyššího kvartilu získaných vyšetřením zdravých osob při odběru do nevakuovaného systému .....	64
Tabulka 26 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $2,5\ \mu\text{M}$ .....	65
Tabulka 27 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $1,0\ \mu\text{M}$ .....	65
Tabulka 28 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $0,5\ \mu\text{M}$ .....	65
Tabulka 29 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci $10\ \mu\text{M}$ .....	65
Tabulka 30 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci $1,0\ \mu\text{M}$ .....	65
Tabulka 31 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci $0,5\ \mu\text{M}$ .....	66
Tabulka 32 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $2,5\ \mu\text{M}$ .....	66
Tabulka 33 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $1,0\ \mu\text{M}$ .....	66
Tabulka 34 Kontingenční tabulka– výsledky při použití ADP v koncentraci $0,5\ \mu\text{M}$ .....	66
Tabulka 35 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci $10\ \mu\text{M}$ .....	66



Tabulka 36 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 1,0 $\mu\text{M}$ .....	67
Tabulka 37 Kontingenční tabulka – výsledky při použití EPI v koncentraci 0,5 $\mu\text{M}$ .....	67
Tabulka 38 Rozdíly v naměřených hodnotách při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému.....	68
Tabulka 39 Korelace výsledků získaných při odběru do vakuovaného systému a při odběru do nevakuovaného systému .....	69

## 13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Trombocyt.....	17
Obrázek 2 Vizualizace koagulační kaskády .....	26
Obrázek 3 Systém fibrinolýzy obsahující prvky aktivace a inhibice .....	29
Obrázek 4 Procesy aktivace a degradace faktoru V (FV) a jeho mutované formy .....	33
Obrázek 5 Tabulka znázorňující specifikace technických parametrů centrifugy.....	44
Obrázek 6 Výsledný graf agregace trombocytů.....	50
Obrázek 7 Graf porovnání agregací s použitím induktoru ADP u pacientů s trombózou a bez trombózy při odběru do vakuovaného systému.....	55
Obrázek 8 Graf porovnání agregací s použitím induktoru EPI u pacientů s trombózou a bez trombózy při odběru do vakuovaného systému.....	55
Obrázek 9 Graf porovnání agregací s použitím induktoru ADP u pacientů s trombózou a bez trombózy při odběru do nevakuovaného systému.....	57
Obrázek 10 Graf porovnání agregací s použitím induktoru EPI u pacientů s trombózou a bez trombózy při odběru do nevakuovaného systému.....	57
Obrázek 11 Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci epinefrinu 10 $\mu\text{M}$ při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému .....	70
Obrázek 12 Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci epinefrinu 1 $\mu\text{M}$ při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému .....	71
Obrázek 13 Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci epinefrinu 0,5 $\mu\text{M}$ při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému .....	71
Obrázek 14 Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci ADP 2,5 $\mu\text{M}$ při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému .....	72
Obrázek 15 Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci ADP 1 $\mu\text{M}$ při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému .....	73
Obrázek 16 Graf znázorňující korelaci agregace trombocytů při koncentraci ADP 0,5 $\mu\text{M}$ při odběru do vakuovaného a nevakuovaného systému .....	73

## 14. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) **Applová, L. (2019).** *Ovlivnění aktivace krevních destiček polyfenolickými látkami a jejich metabolity.* Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové.
- 2) **Ar, M.C., Balkan, C. and Kavaklı, K. (2019).** *Extended half-life coagulation factors: a new era in the management of hemophilia patients.* Turkish Journal of Haematology: Official Journal of Turkish Society of Haematology, 36(3), pp.141–154.  
<https://doi.org/10.4274/tjh.galenos.2019.2018.0393>.
- 3) **Azamar-Solis, B., Cantero-Fortiz, Y., Olivares-Gazca, J.C., Olivares-Gazca, J.M., Gómez-Cruz, G.B., Murrieta-Álvarez, I., Ruiz-Delgado, G.J. and Ruiz-Argüelles, G.J. (2019).** *Primary thrombophilia in Mexico XIII: localization of the thrombotic events in Mexican mestizos with the sticky platelet syndrome.* Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis: Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, 25, p.1076029619841700.  
<https://doi.org/10.1177/1076029619841700>.
- 4) **Bartošová, L., Dobrotová, M., Hollý, P., Ivanková, J., Staško, J. and Kubisz, P. (2008).** *Syndróm lepivých doštičiek – jeho diagnostika a liečba.* Lék Obz, 56(7-8), pp.512-513.
- 5) **Becattini, C., Agnelli, G., Schenone, A., Eichinger, S., Bucherini, E., Silingardi, M., Bianchi, M., Moia, M., Ageno, W., Vandelli, M.R., Grandone, E., Prandoni, P. and WARFASA Investigators (2012).** *Aspirin for preventing the recurrence of venous thromboembolism.* The New England Journal of Medicine, 366(21), pp.1959–1967.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1114238>.
- 6) **Bertina, R.M., Koeleman, B.P., Koster, T., Rosendaal, F.R., Dirven, R.J., de Ronde, H. and Reitsma, P.H. (1994).** *Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.* Nature, 369(6475), pp.64–67.
- 7) **Bick, R.L. (1998).** *Sticky platelet syndrome: a common cause of unexplained arterial and venous thrombosis.* Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, 4(2), pp.77–81.

- 8) **Bradáčová, P. (2013).** *Laboratorní diagnostika SPS*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové.
- 9) **Buliková, A.A. (2009).** In Penka, M. and Buliková, A. (Eds.) *Neonkologická hematologie*.
- 10) **Cornes, M. (2020).** *The preanalytical phase—Past, present and future*. *Annals of Clinical Biochemistry*, 57(1), pp.4–6.
- 11) **Dahlbäck, B. (2008).** *Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders*. *Blood*, 112(1), pp.19–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-077909>.
- 12) **Dahlbäck, B., Carlsson, M. and Svensson, P.J. (1993).** *Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 90(4), pp.1004–1008.
- 13) **Davie, E.W., Fujikawa, K. and Kiesel, W. (1991).** *The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation*. *Biochemistry*, 30(43), pp.10363–10370.
- 14) **De Stefano, V., Za, T., Rossi, E., Vannucchi, A.M., Ruggeri, M., Elli, E., Micò, C., Tieghi, A., Cacciola, R.R., Santoro, C., Gerli, G., Vianelli, N., Guglielmelli, P., Pieri, L., Scognamiglio, F., Rodeghiero, F., Pogliani, E.M., Finazzi, G., Gugliotta, L. and Barbui, T. (2008).** *Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments*. *Haematologica*, 93, pp.372–380. <https://doi.org/10.3324/haematol.12053>.
- 15) **Dicks, A.B., Moussallem, E., Stanbro, M., Walls, J., Gandhi, S. and Gray, B.H. (2024).** *A comprehensive review of risk factors and thrombophilia evaluation in venous thromboembolism*. *Journal of Clinical Medicine*, 13(2), p.362. <https://doi.org/10.3390/jcm13020362>.
- 16) **Fauknerová, M., Osmančík, P., Špaček, M., Kejst, L. and Kalvach, P. (2011).** *Agregometrie v sekundární prevenci cévních mozkových příhod. Aspirinová rezistence*. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 74(5), pp.527–532.

- 17) **Favaloro, E.J. and Lippi, G. (2019).** *Commentary: Controversies in Thrombosis and Hemostasis Part 2 – Does Sticky Platelet Syndrome Exist?* *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 45(1), pp.69–72.
- 18) **Ferreiro, J.L., Sibbing, D. and Angiolillo, D.J. (2010).** *Platelet function testing and risk of bleeding complications.* *Thrombosis and Haemostasis*, 103(06), pp.1128–1135.
- 19) **Fontana, J. and Lavříková, P. (n.d.).** *Funkce buněk a lidského těla – Multimediální skripta, Část V. Krev a orgány imunitního systému, Kapitola 4: Hemostáza.* Online. Available at: <https://fbt.cz/skripta/v-krev-a-organy-imunitniho-systemu/4-hemostaza/> [Accessed 16 Jul. 2024].
- 20) **Gale, A.J. (2011).** *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis.* *Toxicologic Pathology*, 39(1), pp.273–280.
- 21) **Gremmel, T., Frelinger III, A.L. and Michelson, A.D. (2016).** *Platelet physiology.* *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 42(3), pp.191–204. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1564835>.
- 22) **Greselle, P., Page, C.P., Fuster, V. and Vermynen, J. (2002).** *Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders.* Cambridge: Cambridge University Press.
- 23) **Harrison, P. (2005).** *Platelet function analysis.* *Blood Reviews*, 19(2), pp.111–123.
- 24) **Hawkins, R. (2012).** *Managing the pre-and post-analytical phases of the total testing process.* *Annals of Laboratory Medicine*, 32(1), pp.5–16.
- 25) **Heit, J.A. (2015).** *Epidemiology of venous thromboembolism.* *Nature Reviews Cardiology*, 12(8), pp.464–474.
- 26) **Iba, T. and Levy, J.H. (2019).** *Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis.* *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 17(2), pp.283–294.
- 27) **Ho, K.M., Yip, C.B. and Duff, O. (2012).** *Reactive thrombocytosis and risk of subsequent venous thromboembolism: a cohort study.* *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 10(9), pp.1768–1774. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04846.x>.
- 28) **Holinstat, M. (2017).** *Normal platelet function.* *Cancer and Metastasis Reviews*, 36, pp.195–198.

- 29) **Chaloupková, P. (2018).** *Vliv kardiochirurgických výkonů na funkci krevních destiček* [The impact of cardiothoracic surgeries on platelet function]. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc.
- 30) **Indrák, K., Alušík, Š. and Lejsková, M. (2006).** *Hematologie* (1st ed.). Praha: Triton. ISBN 978-80-7254-868-2.
- 31) **Indrák, K. et al. (2006).** *Hematologie* (1st ed.). Praha: Triton. ISBN 80-7254-868-9.
- 32) **Ito, T., Kakuuchi, M. and Maruyama, I. (2021).** *Endotheliopathy in septic conditions: mechanistic insight into intravascular coagulation.* *Critical Care*, 25(1), p.95. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03524-6>.
- 33) **Kessler, P., Peliskova, L. and Prokopova, J. (2024).** *Sticky platelet syndrome— diagnostic issues and controversies.* *Annals of Blood*, 9.
- 34) **Khan, S. and Dickerman, J.D. (2006).** *Hereditary thrombophilia.* *Thrombosis Journal*, 4, pp.1–17.
- 35) **Khider, L., Gendron, N. and Mauge, L. (2022).** *Inherited thrombophilia in the era of direct oral anticoagulants.* *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), p.1821. <https://doi.org/10.3390/ijms23031821>. ISSN 1422-0067.
- 36) **Kittnar, O. et al. (2011).** *Lékařská fyziologie* (1st ed.). Praha: Grada Publishing, a.s., 800 pp.
- 37) **Knížová, A. (2018).** *Centrifugy – SOPT č. 417.* Nemocnice Pelhřimov, Oddělení hematologie a transfuziologie. Verze 05. Platnost od 26. 1. 2018.
- 38) **Kočárek, E. (2008).** *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika.* Scientia.
- 39) **Kubešová, P. and Knížová, A. (2022).** *Agregace SPS – SOPV č. 515.* Nemocnice Pelhřimov, Oddělení hematologie a transfuziologie. Verze 03. Platnost od 6. 6. 2023.
- 40) **Kubisz, P., Ruiz-Argüelles, G.J., Staško, J. and Holly, P. (2014).** *Sticky Platelet Syndrome: history and future perspectives.* *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 40(5). <https://doi.org/10.1055/s-0034-1381235>.

- 41) **Kubisz, P., Staško, J. and Holly, P. (2013).** *Sticky Platelet Syndrome*. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 39, pp.674–683.
- 42) **Kujovich, J.L. (2011).** *Factor V Leiden thrombophilia*. *Genetics in Medicine*, 13(1).
- 43) **LaPelusa, A. and Dave, H.D. (2023).** *Physiology, Hemostasis*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- 44) **Larocca, A., Cavallo, F., Bringhen, S., Di Raimondo, F., Falanga, A., Evangelista, A. and Palumbo, A. (2012).** *Aspirin or enoxaparin thromboprophylaxis for patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with lenalidomide*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(4), pp.933–939.
- 45) **Lefrançois, E., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D.M., Thornton, E.E., Headley, M.B., David, T., Coughlin, S.R., Krummel, M.F., Leavitt, A.D., Passegué, E. and Looney, M.R. (2017).** *The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors*. *Nature*, 544(7648), pp.105–109. <https://doi.org/10.1038/nature21706>.
- 46) **Malíková, L. (2012).** *Možnosti stanovení funkce trombocytů pomocí optické a impedanční agregometrie* [Options for assessing platelet function using optical and impedance aggregometry]. *Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha*.
- 47) **Mammen, E. (1995).** *Ten years' experience with the "sticky platelet syndrome"*. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 1(1), pp.66–72.
- 48) **Mammen, E.F., Barnhart, M.I., Selik, N.R., Gilroy, J. and Klepach, G.L. (1988).** *"Sticky platelet syndrome": a congenital platelet abnormality predisposing to thrombosis?*. *Folia Haematologica (Leipzig, Germany: 1928)*, 115(3), pp.361–365.
- 49) **Matýšková, M., Zavřelová, J. and Hrachovinová, I. (1999).** *Hematologie pro zdravotní laboranty: krevní srážení*. *Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví*.
- 50) **Michelson, A.D. (2009).** *Methods for the measurement of platelet function*. *American Journal of Cardiology*, 103(Suppl. 20A–26A).

- 51) **Mohammed, B.M., Monroe, D.M. and Gailani, D. (2020).** *Mouse models of hemostasis*. *Platelets*, 31(4), pp.417–422.
- 52) **Mourek, J. (2012).** *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů* (2nd ed.). Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3918-2.
- 53) **Munker, R. (2006).** *Modern Hematology: Biology and Clinical Management* (2nd ed.). Totowa, N.J: Humana Press. Contemporary Hematology. ISBN 978-1-59745-149-9.
- 54) **Murin, S., Marelich, G.P., Arroliga, A.C. et al. (1998).** *Hereditary thrombophilia and venous thromboembolism*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 158(5 Pt 1), pp.1369–1373. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.5.9712022>.
- 55) **Ogedegbe, H.O. (2002).** *An overview of hemostasis*. *Laboratory Medicine*, 33(12), pp.948–953.
- 56) **Pastori, D., Menichelli, D., Valeriani, E. et al. (1999).** *Factor V Leiden Thrombophilia*. 14 May 1999 [Updated 16 May 2024]. In: Adam, M.P., Feldman, J., Mirzaa, G.M. et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1368/>.
- 57) **Pastori, D., Cormaci, V.M., Marucci, S., Franchino, G., Del Sole, F., Capozza, A. and Pignatelli, P. (2023).** *A comprehensive review of risk factors for venous thromboembolism: from epidemiology to pathophysiology*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), p.3169.
- 58) **Pecka, M. (2004).** *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie hemostázy*. FINIDR.
- 59) **Penka, M. and Slavičková, E. (2011).** *Hematologie a transfuzní lékařství. I, Hematologie* (1st ed.). Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.
- 60) **Pokorný, J. (ed.) (2001).** *Přehled fyziologie člověka*. Karolinum.



- 61) **Poort, S.R., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H. and Bertina, R.M. (1996).** *A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.* Blood, 88, pp.3698–3703.
- 62) **Purdy, J.C. and Shatzel, J.J. (2021).** *The hematologic consequences of obesity.* European Journal of Haematology, 106(3), pp.306–319.
- 63) **Puurunen, M.K., Hwang, S.J., Larson, M.G., Vasani, R.S., O'Donnell, C.J., Tofler, G. and Johnson, A.D. (2018).** *ADP platelet hyperreactivity predicts cardiovascular disease in the FHS (Framingham Heart Study).* Journal of the American Heart Association, 7(5), e008522. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.008522>.
- 64) **Racek, J. (2006).** *Klinická biochemie (2. přeprac. vyd.).* Praha: Galén. ISBN 80-726-2324-9.
- 65) **Rand, M.L., Leung, R. and Packham, M.A. (2003).** *Platelet function assays.* Transfusion and Apheresis Science, 28(3), pp.307–317.
- 66) **Repsold, L. and Joubert, A.M. (2021).** *Platelet function, role in thrombosis, inflammation, and consequences in chronic myeloproliferative disorders.* Cells, 10(11), p.3034. <https://doi.org/10.3390/cells10113034>.
- 67) **Rosendaal, F.R. (1999).** *Venous thrombosis: a multicausal disease.* Lancet (London, England), 353(9159), pp.1167–1173. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)10266-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)10266-0).
- 68) **Rosendorff, A. and Dorfman, D.M. (2007).** *Activated protein C resistance and factor V Leiden: a review.* Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 131(6), pp.866–871.
- 69) **Rosková, L. and Bystřická, D. (2014).** *Trombofilní mutace v souvislostech s hormonální antikoncepcí a hormonální substitucí.*
- 70) **Rožman, P. (2002).** *Platelet antigens: The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation.* Transplant Immunology, 10, pp.165–181.

- 71) **Santimone, I. and Gemmati, D. (2013).** *Sticky Platelet Syndrome and the Role of Glycoprotein Receptors: A Review of Literature.* Journal of Blood Disorders & Transfusion, 4, p.173.
- 72) **Sciacovelli, L., Aita, A., Padoan, A., Pelloso, M., Antonelli, G., Piva, E. and Plebani, M. (2016).** *Performance criteria and quality indicators for the post-analytical phase.* Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 54(7), pp.1169–1176.
- 73) **Segers, K., Dahlbäck, B. and Nicolaes, G.A. (2007).** *Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms.* Thrombosis and Haemostasis, 98(09), pp.530–542.
- 74) **Sokol, J., Skerenova, M., Ivankova, J., Simurda, T. and Stasko, J. (2018).** *Association of Genetic Variability in Selected Genes in Patients With Deep Vein Thrombosis and Platelet Hyperaggregability.* Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, 24(7), pp.1027–1032. <https://doi.org/10.1177/1076029618779136>.
- 75) **Staško, J., Bartošová, L., Mýtník, M. and Kubisz, P. (2011).** *Are the platelets activated in sticky platelet syndrome?* Thrombosis Research, 128(1), pp.96–97.
- 76) **Stormorken, H. (2003).** *The discovery of factor V: a tricky clotting factor.* Journal of Thrombosis and Haemostasis, 1(2), pp.206–213.
- 77) **Sussman, F.F. (1992).** *Normal pathways of coagulation.* Seminars in Hematology, 29(3), pp.157–158.
- 78) **Šimonová, R., Bartošová, L., Chudý, P., Staško, J., Rumanová, S., Sokol, J. and Kubisz, P. (2013).** *Nine kindreds of familial sticky platelet syndrome phenotype.* Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, 19(4), pp.395–401.
- 79) **Škorňová, I. and Slavík, L. (2020).** *Hemostáza: laboratórne metódy, ich využitie a interpretácia vo vybraných klinických situáciach.* Turany: P+M, s. r. o. ISBN 978-80-89694-78-5.
- 80) **Šlechtová, J. (2007).** *Hemostáza – jak ji možná neznáme.* Klinická biochemie a metabolismus, 15(2), pp.97–101.

- 81) **Tekgündüz, E., Demir, M., Akyol Erikçi, A., Akpınar, S., Oztürk, E. and Kırkızzlar, O. (2013).** *Sticky platelet syndrome in patients with uninduced venous thrombosis.* Turkish Journal of Haematology: Official Journal of Turkish Society of Haematology, 30(1), pp.48–52. <https://doi.org/10.5152/tjh.2011.79>
- 82) **White, J.G. and Krivit, W. (1967).** *An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling.* Blood, 30(5), pp.625–635.
- 83) **Yee, D.L., Sun, C.W., Bergeron, A.L., Dong, J.F. and Bray, P.F. (2005).** *Aggregometry detects platelet hyperreactivity in healthy individuals.* Blood, 106(8), pp.2723–2729. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1290>

## 15. PŘÍLOHA

### *Příloha č. 1 Informovaný souhlas pacientů zapojených do studie*

#### **Informovaný souhlas.**

Vážený pane, vážená paní,

Na hematologické ambulanci Nemocnice Pelhřimov jste sledován/sledována pro trombofilní stav, který vede ke zvýšenému riziku trombózy. Dosud však není známo, zda u osob s Vaším trombofilním stavem je riziko trombózy dále zvyšováno zvýšenou citlivostí krevních destiček.

Proto Vás Váš lékař požádal o účast ve studii „Porovnání výsledků agregace trombocytů u pacientů s heterozygotní mutací f. V Leiden nebo protrombinu 20210 A kteří prodělali trombózu oproti těm, kteří neprodělali trombózu.“ Cílem této studie je právě zkoumat roli aktivovatelnosti krevních destiček při stanovení rizika trombózy u osob s heterozygotní mutací f. V Leiden nebo protrombinu 20210 A.

Budeme od Vás potřebovat, abyste podstoupil/podstoupila při Vaší kontrole kromě běžného odběru krve ještě odběr krve k vyšetření aktivovatelnosti krevních destiček, tedy cca 25 ml krve navíc. Protože funkce krevních destiček je ovlivněna užíváním některých léků, některých potravin, je nutno před odběrem dodržovat tato pravidla:

K vyšetření se dostavte nalačno, v den vyšetření nekouřit.

10 dní před vyšetřením:

Nepoužívat léky obsahující kyselinu acetylsalicylovou (Anopyrin, Aspirin, Godasal, Stacyl...)

Nepoužívat ani další léky ovlivňující funkci krevních destiček (clopidogrel, prasugrel, ...)

Nepoužívat léky proti bolestem kloubů (Ibuprofen, Ibalgin, Diclofenac, Voltaren, ...)

Nejíst ryby, nepít odvary z bylin nebo výtažky z gingo biloba.

Den před vyšetřením a v den vyšetření nepít čaj a kávu.

Údaje o výsledcích Vašich testů budou statisticky zpracovány v anonymní podobě, takže Vaše osobní data v žádné formě nebudou uchovávána jinak, než ve standardní zdravotnické dokumentaci.

Vaše účast ve studii je zcela dobrovolná.

Prohlášení:

Já, níže podepsaný .....

jsem byl podrobně seznámen se smyslem a provedením studie „Porovnání výsledků agregace trombocytů u pacientů s heterozygotní mutací f. V Leiden nebo protrombinu 20210 A, kteří prodělali trombózu oproti těm, kteří neprodělali trombózu.“ Můj lékař mi zodpověděl všechny mé otázky.

Dobře rozumím smyslu studie, a jejímu provedení.

Jsem si vědom, že moje účast v studii je zcela dobrovolná a že odmítnutí mé účasti mě nijak neznevýhodní v přístupu lékařů a dalšího zdravotnického personálu k mé osobě.

Jsem si také vědom, že mohu svou účast ve studii kdykoli přerušit bez udání důvodu.

Všechny další otázky mi odpoví vedoucí lékař studie, MUDr. Petr Kessler

Se svou účastí ve studii souhlasím.

V Pelhřimově dne .....

Pacient.....

Lékař.....