

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vyšetření trombofilních stavů v oblasti Ústeckého kraje a monitorování léčby

Hradec Králové, 2011

Jana Šklíbová

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Vyšetření trombofilních stavů v oblasti Ústeckého kraje a monitorování léčby

An examination of trombofile statuses the territory of the Ústí region and monitoring of treatment

Hradec Králové, 2011

Jana Šklíbová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat odbornému garantovi mé bakalářské práce PharmDr. Petru Jílkovi CSc., školiteli Mgr. Petru Sadílkovi z FN Hradec Králové za pomoc a cenné rady. Mé poděkování patří hlavně mým rodičům za velikou pomoc a podporu.

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum: 30.4.2011

Podpis

Obsah

1	Úvod	11
2	Zadání - cíl práce	12
3	Teoretická část	13
3.1	Hemostáza.....	13
3.2	Poruchy hemostázy – trombofilie x krvácení	14
3.3	Trombofilní stavy.....	14
3.3.1	Rezistence na aktivovaný protein C (APC – R).....	15
3.3.2	Vrozená APC-R.....	16
3.3.3	Získaná APC-R.....	16
3.3.4	Mutace protrombinu G20210A.....	16
3.3.5	Deficit antitrombinu	16
3.3.6	Deficit systému proteinu C.....	17
3.3.7	Prevalence trombofilií	18
3.4	Trombóza a tromboembolická nemoc (TEN)	19
3.4.1	Arteriální trombóza (AT)	20
3.4.2	Žilní (venózní) trombóza (VTE)	21
3.5	Indikace vyšetření trombofilních stavů	22
3.6	Význam znalosti trombofilních stavů v prevenci venózní tromboembolismu	23
3.7	Léčba trombofilních stavů	24
3.7.1	Antikoagulační léčba	24
3.7.2	Antiagregační léčba	27
3.7.3	Trombolytická léčba	28
4	Metody, materiál a přístroje	29
4.1	Principy použitých metod.....	29
4.1.1	Stanovení počtu krevních destiček (Plt) na analyzátoru krevních buněk	29
4.1.2	Stanovení protrombinového testu (PT).....	29

4.1.3	Stanovení aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (APTT)	29
4.1.4	Stanovení funkční aktivity antitrombinu (AT)	29
4.1.5	Stanovení funkční aktivity proteinu C (PC)	30
4.1.6	Stanovení funkční aktivity proteinu S (PS)	30
4.1.7	Stanovení rezistence na aktivovaný protein C (APC – R)	30
4.2	Fyziologické rozmezí použitých metod	30
4.3	Použitý materiál	31
4.3.1	Vyšetřovaný materiál	31
4.4	Použité reagentie a kontrolní materiály	31
4.5	Stabilita použitých reagentií a kontrolních materiálů.....	32
4.6	Použité přístroje a pomocná zařízení.....	33
4.6.1	Automatický analyzátor krevních buněk LH 750, Beckman Coulter	33
4.6.2	Automatický koagulometr STA – R, Diagnostica STAGO	33
4.6.3	Pomocná zařízení	33
5	Praktická část.....	34
5.1	Pracovní postup.....	34
5.2	Výsledkové listy	35
5.3	Statistické vyhodnocení	37
6	Závěr.....	38
7	Diskuze	39
8	Seznam literatury	40

Abstrakt

Jana Šklíbová: Vyšetření trombofilních stavů v oblasti Ústeckého kraje a monitorování léčby

Trombofilie je stav zvýšené predispozice k nadměrné srážlivosti krve v arteriálním či v žilním systému. Je definována jako vrozená nebo získaná porucha hemostatického mechanismu, která je příčinou zvýšené tendence vzniku trombóz. Přítomnost tzv. trombofilního defektu však nemusí znamenat, že nositel prodělá trombózu.

Tromboembolismus je závažný a často podceňovaný medicínský problém, který je zdrojem nejen vážných zdravotních problémů, ale i narůstajících nákladů na zdravotní péči. V České republice zemře 10 000 lidí ročně v souvislosti s fatální plicní embolií. Tromboembolické komplikace mají mnoho příčin a na jejich vzniku se mohou podílet jak vnitřní, tak i zevní faktory (např. operace, úraz, imobilizace a další).

V dnešní době je známo mnoho vrozených trombofilních stavů, které mají genetický základ a jsou dědičné (např. trombofilní mutace FV Leiden, mutace protrombinu). Existuje také mnoho získaných trombofilních stavů (např. antifosfolipidový syndrom), které významně tendenci ke vzniku trombózy zvyšují. Trombóza jako symptom může komplikovat velkou řadu onemocnění.

Vyšetření trombofilních stavů nejsou prováděna u všech osob, ale pouze selektivně. Přitom včasnou diagnostikou a včasným zahájením preventivní léčby můžeme vzniku trombózy zabránit. Mezi vyšetření trombofilních stavů patří koagulační testy jako vyšetření funkční aktivity antitrombinu, proteinu C, proteinu S, rezistence na aktivovaný protein C, vyšetření protilátek typu lupus antikoagulans, počet krevních destiček a hlavně Leidenská mutace a mutace protrombinu G20210A. Často se vyšetřuje i protrombinový test a aktivovaný parciální tromboplastinový test, funkční aktivita faktoru VIII, stanovení koncentrace fibrinogenu, D-dimerů, homocysteinu a další.

Tato práce se zabývá právě vyšetřováním trombofilních markerů: počtu krevních destiček, protrombinového testu, aktivovaného parciálního tromboplastinového testu, antitrombinu, proteinu C, proteinu S a rezistence na aktivovaný protein C u dvou skupin pacientů. První skupinu tvoří pacienti, kteří trombózu dosud neprodělali, ale mají rizikové faktory jejího vzniku (např. pozitivní rodinnou anamnézu, opakované ztráty plodu, komplikace v těhotenství a další). Ve druhé skupině jsou pacienti, kteří již trombózu prodělali. Získané výsledky těchto 2 skupin osob byly statisticky porovnány s cílem zjistit, zda existují alespoň pro některá vyšetření mezi těmito 2 soubory nějaké statisticky významné rozdíly, což se nepotvrdilo.

Summary

Jana Šklíbová: An examination of thrombophilic statuses the territory of the Ústí region and monitoring of treatment

Thrombophilia is a state of the circulatory system that is characterised by increased probability of thrombus formation. Thrombophilia is defined as either inherent or acquired defect in haemostasis which, with the highest probability, causes heightened inclination to thrombosis. However, the presence of the thrombophilic defect does not necessarily mean that the bearer will suffer from thrombosis.

Thromboembolism is a serious but rather underestimated medical phenomenon that causes a lot of health trouble to patients as well as rising health-care costs. In the Czech Republic, up to 10,000 people a year die of or in relation to fatal pulmonary embolism.

Thromboembolitic complications can have many causes and even external factors, such as injuries, operations, immobility, etc., are known to affect their occurrence. There exist several prothrombotic states that are hereditary and of genetic nature, e.g. Factor V Leiden and the mutation on the gene responsible for the production of Factor II Prothrombin.

We have also identified many acquired conditions (e.g. antiphospholipid syndrome – APLS) mainly of clinical nature that raise the probability of thrombus occurrence significantly. Thrombosis constitutes a serious complication in many other diseases.

The detection of thrombophilia includes blood coagulation and coagulation factor tests, coagulation inhibitor tests, homocysteine level tests as well as search for gene mutations (e.g. Factor V Leiden) and phospholipid antibodies (aPL). In the Czech Republic, the performance of these tests is not comprehensive, but only selective.

Early recognition of prothrombotic states as well as general risk markers in patients can reduce the occurrence of thromboembolism, thus saving many a life.

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfátem
AIM	akutní infarkt myokardu
ASA	acetylsalicylová kyselina
AKS	akutních koronárních syndromů
APA	antifosfolipidové protilátky
APS	antifosfolipidový syndrom
APC	aktivovaný protein C
APC-R	rezistence na aktivovaný protein C
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
Arg	arginin
AT	antitrombin
DIK	diseminovaná intravaskulární koagulace
ELISA	enzymimunoanalýza
Fbg	fibrinogen
F V	faktor V
F Va	aktivovaný faktor V
F VIIIa	aktivovaný faktor VIII
FDP	fibrin/fibrinogen degradační produkty
FPA	fibrinopeptid A
FPB	fibrinopeptid B
Gln	glutamin
Gly	glycin
HIT	Heparinem indikovaná trombocytopenie
HUS	Hemolyticko-uremický syndrom (Gasserův)
ITP	Idiopatická trombocytopenická purpura
IM	infarkt myokardu
KO	krevní obraz
LA	lupus antikoagulans
LIS	laboratorní informační systém

MTHFR	methylen – tetrahydrofolát reduktáza
NIS	nemocniční informační systém
PAI	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PGM	mutace protrombinu 20210 A
PC	protein C
PS	protein S
PT	protrombinový čas
PUK	prourokináza
NIS	nemocniční informační systém
PT	protrombinový test
PLT	platelet (trombocyty)
pNA	para- nitroanilin
STA	staphylokináza
STK	streptokináza
TAFI	trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TAT	trombin-antitrombin komplex
TEN	tromboembolická nemoc
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
Thr	threonin
TM	trombomodulin
TT	trombinový čas
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
UHF	nefrakcionovaný heparin
vWF	von Willebrandův faktor
VTE	venósní tromboembolismus

1 Úvod

Tématem bakalářské práce jsou trombofilní stavy, jejichž komplikace, zejména tromboembolické příhody, v současné době zauímají přední místo v příčinách úmrtí. V Evropské unii následkem tromboembolické nemoci umírá asi 500 000 obyvatel (v ČR 10 000) ročně a to zejména na plicní embolii. Vzniku trombózy se dá však úspěšně zabránit včasnou diagnostikou trombofilních stavů pomocí laboratorních vyšetření a včasným zahájením preventivní léčby.

Toto téma je mi blízké vzhledem k tomu, že pracuji na Hematologickém oddělení Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem, v koagulační laboratoři, kde trombofilní markery vyšetřujeme.

Proto jsem se ve své práci rozhodla vyšetřit trombofilní markery jako: počet krevních destiček, protrombinový test, aktivovaný parciální tromboplastinový test, funkční aktivitu antitrombinu, proteinu C, proteinu S a rezistence na aktivovaný protein C u pacientů s vysokým rizikem vzniku trombózy a u pacientů s již prodělanou trombózou s cílem zjistit, zda existují alespoň u některých vyšetření mezi těmito dvěma skupinami statisticky významné rozdíly.

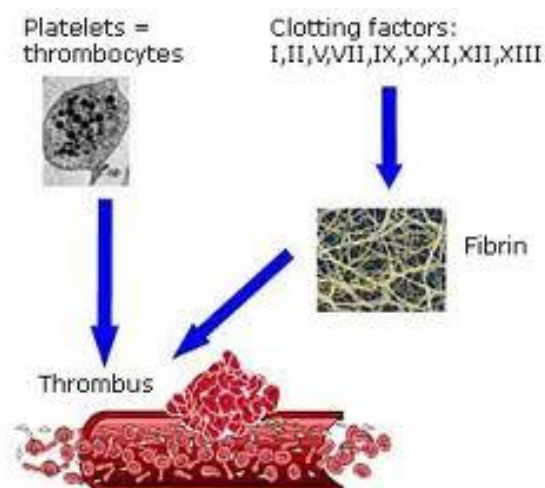
2 Zadání - cíl práce

Cílem této práce bylo vyšetřit trombofilní markery jako počet krevních destiček, protrombinový test, aktivovaný parciální tromboplastinový test, funkční aktivitu antitrombinu, proteinu C, proteinu S a rezistence na aktivovaný protein C u 2 skupin pacientů. V první skupině byli pacienti z Hematologické poradny, kteří dosud trombózu neprodělali, ale měli rizikové faktory jejího vzniku (např. pozitivní rodinnou anamnézu, opakované ztráty plodu, komplikace v těhotenství a další). Ve druhé skupině byli pacienti z Hematologické poradny a z Masarykovy nemocnice, kteří již trombózu prodělali. Kromě samotného vyšetření trombofilních markerů bylo cílem práce naměřené výsledky statisticky vyhodnotit a zjistit, zda existují alespoň u některých vyšetření mezi těmito dvěma skupinami statisticky významné rozdíly.

3 Teoretická část

3.1 Hemostáza

Hemostáza (zástava krvácení) je proces nezbytný pro život, zábrana vykrvácení při sebemenším poranění. Je to dynamický proces, který probíhá uvnitř cév v místě poranění a jeho okolí. Skládá se z dějů prokoagulačních, které tvoří krevní sraženinu (trombus, koagulum), dějů kontrolních antikoagulačních (systém inhibitorů koagulace), které zastavují další tvorbu sraženiny po vytvoření hemostatické zátky. Dalším dějem je fibrinolýza, která vede k rozpouštění sraženiny po obnově celistvosti narušené cévy a podílí se na obnovení průtoku krve. Proces rozložení fibrinu se nazývá fibrinolýza a klíčovou roli v něm hraje serinová proteasa plazmin. Plazmin štěpí fibrinogen na fibrin za vzniku fibrindegradačních produktů (FDP), které zpětně tlumí polymeraci fibrinových monomerů a adhezivitu a agregaci destiček. Další systém, který se účastní hemostázy, jsou plazmatické koagulační faktory, které se kaskádovitě aktivují a výsledkem je přeměna protrombinu na trombin, aktivující přeměnu fibrinogenu na fibrin, jehož monomery se spojují v polymery. Krevní sraženina se vytváří v okamžiku, kdy trombin začne štěpit fibrinogen na fibrinopeptidy A, B a fibrinmonomery. Fibrinové monomery následně polymerizují a tvoří základ fibrinové sítě. Shluky zesíťovaných fibrinových molekul jsou základem koagula. (Matouš, 2010) Obr. 1 srážení krve (www.google.cz)



Na procesu hemostázy se podílí cévní stěna se svými endotelovými a subendotelovými strukturami, složka tkáňová se svými působky z porušené tkáně, krevní destičky (trombocyty), činitelé plazmatického koagulačního systému s aktivátory a inhibitory a systém fibrinolýzy. Po poranění cévy dochází nejprve k tzv. vazokonstrikci, reflexnímu smrštění cévy, která je způsobená reakcí svaloviny obsažené v cévní stěně. Mění se průsvit cévy a tím se sníží průtok poraněnou cévou. (www.novonordisk.cz/documents/article_page/document/haemophilia.asp)

Složka tkáňová je důležitá při poranění tkáně, protože se z ní uvolňuje ADP, které vyvolává primární agregaci trombocytů, dále tkáňový faktor, který ve svém důsledku způsobí přeměnu protrombinu na trombin. (Pecka, 2004)

Krevní destičky se účastní hemostázy jednak tvorbou primární hemostatické zátky a dále poskytují fosfolipidový povrch pro navázání koagulačních faktorů závislých na vitamínu K přes Ca^{2+} můstky. Specificky vážou faktory VIII a V a jsou schopny přímo aktivovat faktory XII a XI. (Pecka, 2004)

3.2 Poruchy hemostázy – trombofilie x krvácení

Proces srážení v neporušených cévách u zdravého jedince za normálních okolností neprobíhá. Poruchy hemostázy jak vrozené, tak získané se klinicky mohou manifestovat jako krvácivé stavy anebo jako zvýšený sklon ke vzniku trombózy. U získaných poruch se můžeme u jednoho pacienta setkat jak s krvácivými, tak i trombotickými projevy. Trombotizace v žilním nebo arteriálním řečišti je patologickým stavem, spojeným vysokou morbiditou a mortalitou (tromboembolická nemoc, infarkt myokardu (IM) po vytvoření trombu v koronárních tepnách nebo ischemický iktus při trombóze mozkových tepen). (Matouš, 2010)

Krvácivé stavy jsou charakteristické spontánními krvácivými projevy nebo krvácením, které je neúměrné stavům nebo podnětům, které je vyvolaly. Krvácivé stavy vznikají narušením hemostatické rovnováhy z důvodu poruchy některého z hemostatických mechanismů např. funkce cévní stěny, funkce trombocytů, plazmatického koagulačního systému či fibrinolytického systému. (Pecka, 2004)

Trombofilie (z řeckého „thrombophilia“ je predispozice ke vzniku trombóz). Je definována jako vrozená nebo získaná porucha hemostatického mechanismu, která je pravděpodobnou příčinou zvýšené tendence trombóz. Výskyt vrozené trombofilie je asi 5 krát vyšší než výskyt hemofilie. U trombofilie získané je častá kombinace více rizik najedou. U pacienta s trombofilním defektem nemusí nutně vzniknout trombóza. Je to ovlivněno individuálním rizikem trombofilní embolická nemoc (TEN) a výsledkem vrozených a získaných, trvalých a dočasných trombogenních faktorů. (Matýšková, 2010)

3.3 Trombofilní stavy

Trombofilní stavy jsou patofyziologicky a statisticky spojené se zvýšeným rizikem trombózy a podle etiologie je rozdělujeme na vrozené, získané či kombinované.

Vrozené (kongenitální) trombofilní stavy jsou geneticky podmíněné faktory spojované se zvýšeným rizikem venózní trombózy. Jsou to: rezistence na aktivovaný protein C (APC-R), způsobená mutací F V, především tzv. Leidenskou mutací a vzácně mutací Cambridge. Mutace protrombinu G20210A (PGM), deficit antikoagulačních inhibitorů PC, PS, AT. Vzácně se vyskytující dysfibrinogémie, homozygotní homocystinurie, syndrom lepivých destiček a deficit trombomodulinu, inhibitor tkáňového faktoru (TFPI), plasminogenu. Většina z nich je autozomálně dominantně dědičná. V naší populaci se nejčastěji setkáváme s Leidenskou mutací faktoru V (F VL), jejíž prevalence je kolem 7% a která se fenotypicky projevuje jako rezistence na aktivovaný protein C. (www.thrombosis.cz)

Incidence trombózy u nositelů vrozených defektů je velmi variabilní. Za nejzávažnější rizikové faktory jsou považovány defekty v homozygotní formě (např. Leidenská mutace - F VL), dále kombinace defektů. Závažné kombinace, jako je nedostatek antitrombinu a F VL, závisí riziko trombózy na typu defektu a projevy jsou v rodinách různé. (www.internímedicina.cz)

Mezi celou řadu dosud známých klinicky významných získaných trombofilních stavů řadíme např. antifosfolipidový syndrom, rezistence na aktivovaný protein C, která nevznikla mutací faktoru V, myeloproliferativní onemocnění a trombocytémií, stav po prodělané trombóze, malignitu, závažné respirační onemocnění, autoimunitní choroby, graviditu a šestinedělí, léčbu estrogyeny, paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH), nefrotický syndrom, věk >60 let, chronické střevní záněty, obezitu, kouření, varixy dolní končetiny (DK), parézu končetin, septické stavy, srdeční insuficience, diseminovaná intravaskulární koagulace (DIK). (Vojáček, 2004)

Trombofilie s kombinovanou etiologií jsou rizikové faktory smíšené (kombinace vrozené dispozice a získaných faktorů). Jsou mezi ně řazeny zvýšené hladiny koagulačních faktorů, především F VIII a fibrinogenu. Zvýšená hladina F VIII zvyšuje riziko recidivy TEN po první trombotické příhodě. Hladina fibrinogenu nad 5 g/l je považována za rizikový faktor u arteriální, ale i žilní trombózy. (Matýšková, 2010)

3.3.1 Rezistence na aktivovaný protein C (APC – R)

Aktivovaný protein C (APC) je klíčový enzym v systému proteinu C. Při aktivaci proteinu C dochází k odštěpení peptidu o 12 aminokyselinách z N-konce jeho molekuly. Má biologický poločas kolem 15 minut, vykazuje úzce specifickou účinnost serinové proteázy a působí v přítomnosti fosfolipidů a Ca^{2+} tak, že proteolyticky štěpí a tím inaktivuje na membráně navázané plazmatické koagulační faktory neenzymového původu F Va a F VIIIa, což vede ke snížení produkce koagulačně aktivních komplexů tenázy a protrombinázy a výsledkem je celkové potlačení aktivovaného koagulačního procesu. (Kvasnička, 2003)

Rezistenci na aktivovaný protein C popsal v roce 1993 Dahlback a kolektiv. Jedná se o nedostatečnou nebo žádnou odpověď na aktivovaný protein C a tedy o zvýšenou odolnost koagulačního systému proti inhibičnímu vlivu proteinu C na koagulačně aktivní faktory Va a VIIIa. APC-R se vyskytuje ve vrozené nebo získané formě. (Pecka, 2004)

3.3.2 Vrozená APC-R

Vrozená APC-R je nejčastěji vyvolána jednobodovou mutací genu pro koagulační faktor V (Leidenská mutace). V naší populaci se vyskytuje ze všech trombofilních stavů nejčastěji, její prevalence je kolem 7%. Klinicky se defekt projevuje většinou distální žilní trombózou (hlavně hlubokou, ale je popsána i povrchní). Riziko trombózy se u heterozygotní formy zvyšuje přibližně 7 krát, u homozygotní 50 – 100 krát oproti zdravé populaci. Incidence trombózy u nositelů vrozených defektů je velmi variabilní. (Matýšková, 2010)

Mutace F V byla poprvé popsána v roce 1994 Bertinou a spolupracovníky na univerzitním pracovišti v Leidenu. Jedná se o bodovou mutaci v exonu 10 genu kódujícím faktor V, kde v pořadí nukleotidů dochází k záměně guaninu za adenin (G1691A). Vzniklý triplet kóduje v proteinu faktoru V na pozici 506 místo aminokyseliny argininu (Arg) aminokyselinu glutamin (Gln). (Pecka, 2004)

Druhá nejčastější jednobodovou mutací faktoru V je mutace Cambridge, u které dochází k záměně aminokyseliny v pozici 306 (místo argininu (Arg) je aminokyselina threonin (Thr). Je méně významná než Leidenská mutace a vyskytuje se v naší populaci velmi vzácně. (Pecka, 2004)

3.3.3 Získaná APC-R

Získaná APC-R je způsobená disbalancí mezi prokoagulačními a antikoagulačními proteiny hemostázy. (Pecka, 2004) Získaná APC-R se nejčastěji objevuje v těhotenství, při užívání hormonální antikoncepce, u nádorových onemocnění, akutních zánětů, v přítomnosti protilátek typu lupus antikoagulans (LA). Je provázána stejným rizikem venósní tromboembolismu (VTE) jako vrozená APC-R. (Dulíček, 2010)

3.3.4 Mutace protrombinu G20210A

Tento vrozený defekt protrombinu byl poprvé popsán v roce 1996 Poortem a spol. Jedná se o polymorfismus genu pro tvorbu protrombinu v 5. exonu, spojený s vysokou hladinou protrombinu. Dochází k záměně nukleotidu guaninu za adenin v pozici 20210 protrombinového genu (G20210A). (Pecka, 2004) Zvýšená koncentrace protrombinu v plazmě predisponuje nosiče této mutace ke vzniku trombózy. (Slavík a spol., 2009)

3.3.5 Deficit antitrombinu

Antitrombin (AT), dříve označovaný jako antitrombin III, je nejsilnějším inhibítorem trombinu a je též inhibítorem ostatních serinových proteáz F IXa, F Xa, F XIa, F XIIa a též komplexu tkáňového faktoru a F VIIa (TF/F VIIa). Jeho syntéza probíhá především v játrech, ale byla zjištěna i v endotelových buňkách. Nepůsobí však okamžitě, ale má opožděný účinek (15 – 30 min). Vliv heparinu na reakci mezi antitrombinem a serinovými proteázami značně urychluje. (Dulíček, 2010)

Vrozený defekt antitrombinu má prevalenci v populaci 1:2000 – 1:5000 a patří mezi stavy s malou frekvencí výskytu. Relativní riziko VTE je u jedinců s kongenitálním deficitem AT 25 – 50 krát větší oproti zdravé populaci. (Dulíček, 2010)

Dědičně podmíněný deficit antitrombinu byl poprvé popsán Egebergem v roce 1965. Gen pro antitrombin je lokalizován na 1. chromozomu (q23-25), má 7 exonů a 6 intronů. Primární deficit antitrombinu se nevyskytuje v populaci často, asi jen u 0,02 % osob. U pacientů s TEN je výskyt tohoto deficitu asi 1% a je velmi významným nálezem u žen, které užívají hormonální antikoncepci. Estrogeny totiž hladinu antitrombinu snižují. (Kvasnička, 2003)

Rozeznáváme dva typy vrozeného nedostatku antitrombinu: deficit I. typu, kdy prokazujeme sníženou funkční aktivitu (spektrofotometrickou metodou pomocí chromogenního substrátu), ale i antigenu antitrombinu, (pomocí testů enzymimunoanalýzy, ELISA). Dále deficit antitrombinu II. typu, kdy prokazujeme pouze funkční defekt a hladina antigenu antitrombinu je v normě. (Drábková, 2009)

Získané nedostatky přirozených inhibitorů nebývají většinou izolované, navíc jsou často doprovázeny sníženou produkcí i poruchou koagulačních faktorů. V klinickém stavu potom závisí na tom, která porucha převládne, jestli deficit přirozených inhibitorů nebo deficit koagulačních faktorů.

Léčba defektu je většinou substituční a to podáním koncentrovaného preparátu antitrombinu. Dávkování závisí na výchozí hodnotě AT, za kritickou hladinu se považují hodnoty pod 50 % normy koncentrace AT. (Kvasnička, 2003)

3.3.6 Deficit systému proteinu C

System proteinu C je tvořen proteinem C (PC), proteinem S (PS) a trombomodulinem. Společně s AT a TFPI je neúčinnějším přirozeným inhibitorem hemostázy. Systém proteinu C je schopen inaktivovat štěpením faktory koagulační faktory VIIIa a Va a tím regulovat tvorbu trombinu.

Protein C je plazmatický glykoprotein, který vzniká v játrech za účasti vitamínu K, který má krátký biologický poločas (5 - 7 hod). Protein C je aktivován komplexem trombinu s trombomodulinem (TM) na povrchu endotelu. Aktivovaný protein C (APC) potom vysoce selektivně štěpí F Va a F VIIIa. (Dulíček, 2010)

Deficit PC byl poprvé popsán Griffinem a spol. v roce 1981 a jedná se o kongenitální deficit či dysfunkci PC, které jsou především způsobeny mutacemi genu. Mutace vyvolávají různé změny v molekule PC. Do dnešní doby bylo popsáno 160 mutací. Z hlediska klinického můžeme defekty rozdělit na typ I, kdy se jedná o nízkou aktivitu PC a nízkou koncentraci antigenu PC. Typ II je dysfunkce PC. Oba typy je možno detekovat funkčními testy a vyšetřením koncentrace antigenu PC. (Kvasnička, 2003)

U homozygotních jedinců se defekt PC v raném dětství může projevit stavem nazývaným „purpura fulminans“, který často končí smrtí. Za příčinu se považují mikrotrombózy kapilár a výsledkem je poškození cévní stěny s následnou nekrózou. (Penka, 2001)

U osob s nedostatkem PC se zvyšuje riziko žilní trombózy asi 8-10 krát oproti osobám s normální hladinou. Je to vrozené autozomálně dominantní onemocnění s prevalencí v populaci 1/500 obyvatel a může se klinicky projevit již v dětství, ale nejčastěji mezi 20 až 50 rokem. (Vojáček, 2004)

Snížení PC může být vrozeným defektem nebo může jít o získaný deficit, který se objevuje při onemocněním DIC, při nedostatku vitamínu K, při léčbě kumariny, při těžké sepsi a při onemocnění jater.

Protein S je gama karboxylový glykoprotein, který má v přítomnosti Ca^{2+} afinitu k fosfolipidovým povrchům. Působí jako kofaktor APC, kde zvyšuje jeho schopnost degradovat FVa a FVIIIa. PS ještě inhibuje protrombinázu sám, mimo působení APC. (Pecka, 2004)

Vrozený deficit PS, spojený se žilním tromboembolismem, byl poprvé popsán Schwartzem a spol. v roce 1984. Výskyt je 1 až 5 % u nemocných se žilní trombózou. Heterozygot s deficitem PS má 5-10 krát vyšší tendenci k žilní trombotizaci než jedinci s normální hladinou. Prevalence defektu PS v normální populaci je méně než 0,13 %. Antikoagulačně se projeví jen volný PS, PS vázaný na C4bBP má jiné funkce v kaskádě komplementu. (Kvasnička, 2003)

Získané deficity se občas objevují v těhotenství, při chorobách jater, při DIC, u nedostatku vitamínu K, při léčbě kumariny, či při těžké sepsi.

3.3.7 Prevalence trombofilii

Prevalence nejvýznamnějších geneticky podmíněných trombofilních poruch (FVL) se výrazně liší u jednotlivých etnik. Např. maximální výskyt mutace FVL je ve Skandinávii a nejméně až vzácně se vyskytuje u Asiatů a Afričanů. Prevalence některých trombofilii je shrnuta v Tab. 1. (Poul, 2009)

Tab. 1 Prevalence trombofilii v kavkazské populaci a u pacientů s tromboembolickou nemocí (TEN).

TROMBOFILII	PREVALENCE V KAVKAZSKÉ POP.	PREVALENCE U PACIENTŮ S TEN
zvýšená hladina f. VIII	11 %	25 %
mutace f. V Leiden	4,8 %	20 %
hyperhomocysteinemie	4,8 %	10 %
mutace protrombinu 20210A	2,7 %	7,1 %
deficit proteinu S	0,7 %	2,3 %
deficit proteinu C	0,3 %	3,7 %
deficit antitrombinu	0,2 %	3,0 %

3.4 Trombóza a tromboembolická nemoc (TEN)

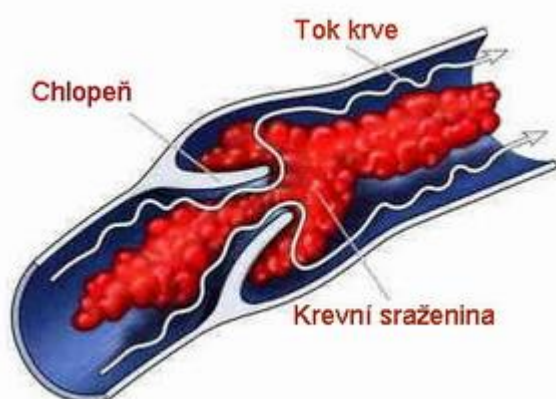
Patogeneze trombózy je multifaktoriální (vzájemné ovlivňování rizikových faktorů, interakce genové, prostředí, ovlivnění věkem) a v posledních letech byla popsána řada vrozených a získaných defektů, které riziko trombózy zvyšují. Trombóza je patologické srážení krve v cévách za vzniku trombu, aniž by došlo k jejich poškození. V tepnách má za následek ischemii dané oblasti, v žilách zhoršuje odtok krev, který způsobuje venostázu a může být zdrojem embolu. (Vokurka, 2000)

Trombus může být lokalizován v žilní (hluboká žilní trombóza, plicní embolie) i tepenné (infarkt myokardu, cévní mozková příhoda) části cévního řečiště i v srdečních dutinách).

Zpomalení toku krve žilním řečištěm může přispět k aktivaci nitrocévního srážení krve, hlubokému a rozsáhlému poškození krevních kapilár. Rozpad cévního endotelu vyvolaný bakteriemi, či jinými toxiny, vede k silnému podnětu ke spuštění hemostatické reakce, při které vznikají mikrotromby v cévním řečišti. (Penka, 2001)

Trombózy dělíme: Na arteriální, při nichž se uplatňuje především poškození endotelu a zvýšení agregability krevních destiček a na žilní trombózy, při nichž se uplatňuje zejména hyperkoagulační stav a krevní stáza.

TEN představuje sociálně ekonomický problém, protože jsou často postiženi jedinci v produktivním věku. Velký problém to je i zdravotní, protože onemocnění může skončit fatálně plicní embolií. Pozdní následky VTE např. plicní hypertenze či posttrombotický syndrom mají vliv na kvalitu života postiženého jedince.



Obr. 2 trombóza (www.google.cz)

3.4.1 Arteriální trombóza (AT)

Při vzniku arteriálního trombu se uplatňují především dva základní mechanismy: dysfunkce cévního endotelu (ateromatózní změny) a zvýšená aktivace krevních destiček.

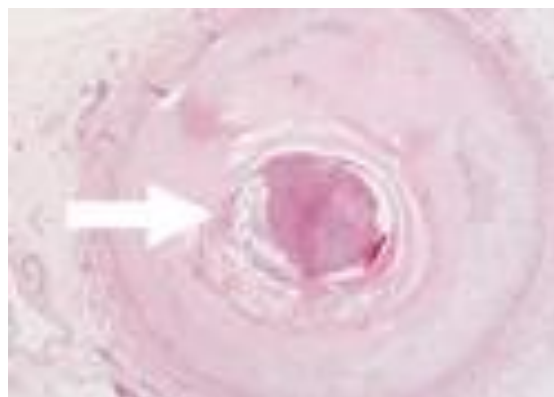
Na tvorbě aterosklerotického plátu se podílí proces přestavby cévní stěny, charakterizovaný hlavně ukládáním tukových látek, který může vznikat již v prvních letech života, ale klinicky se projeví až mnohem později. Patogeneze aterosklerózy je chápána jako imunopatologické onemocnění a její výskyt koreluje s infekcí některých patogenů např. *Chlamydia pneumoniae* nebo *Helicobacter pylori*. (Vojáček, 2004)

Tvorba trombu na porušeném aterosklerotickém plátu je hlavní mechanismus vzniku akutních koronárních syndromů (AKS) a to infarktu myokardu (IM) a nestabilní anginy pectoris. IM je důsledek úplného uzávěru koronární artérie a angina pectoris je důsledkem tvorby trombu na cévní stěně s neúplným uzávěrem. Krevní destičky se podílejí na vzniku tzv. bílého trombu, který tvoří vzájemným shlukováním mezi sebou a spolu s leukocyty. Propojení mezi destičkami zajišťuje fibrinogen nebo von Willebrandův faktor (vWF). (Pecka, 2004)

Mezi rizikové faktory arterosklerózy patří hyperlipoproteinemie, diabetes melitus, arteriální hypertenze, kouření, ateroskleróza, obezita, pozitivní rodinná anamnéza, arteriálních cévních příhod v mladém věku.

Léčba v arteriálním řečišti je farmakologická a to preparáty acetylsalicylové kyseliny (ASA) a dalšími inhibitory destičkových funkcí. Při nestabilní angíně pectoris je používána kombinovaná antitrombotická léčba protideštičkovými léky (aspirinem a klopidogelem) a antikoagulancii (např. heparinem). Další možností je léčba chirurgická (trombektomie), miniinvazivní zákroky (balónková dilatace + stentování cév). (Kvasnička, 2003)

Obr. 3 arteriální trombóza (www.stago-us.com)



3.4.2 Žilní (venózní) trombóza (VTE)

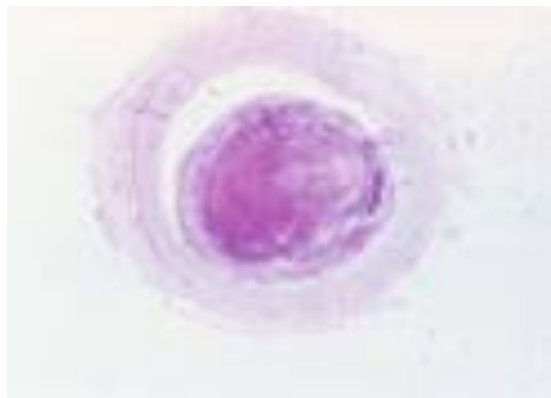
Příčinou vzniku VTE je stáza krve a aktivace koagulace s tvorbou červeného, fibrinového trombu. Stáza krevního proudu zvyšuje lokálně koncentraci koagulačních plazmatických faktorů a leukocytů. Leukocyty začnou uvolňovat zánětlivé cytokiny, které spolu s ischemií, ke které dochází při stagnaci neokysličené krve, přispívají k protrombotické aktivaci buněk žilní výstelky. Vznik žilní trombózy také podporuje zhoršení reologických poměrů např. při relativním zvýšení hematokritu po dehydrataci. (Kvasnička, 2003)

Tromboembolická nemoc (TEN) je nejčastější a jedna z nejzávažnějších komplikací v medicíně. Incidence žilní trombózy je udávána 1/1000 osob a rok. Při diferenciální diagnostice musíme vždy myslet na choroby, které jsou často TEN provázeny. Jedná se především o nádorová onemocnění, systémová onemocnění, cévní malformace, lupus antikoagulans a pooperační stavy. (Kecskevény, 2008)

Získané rizikové faktory venózní trombózy jsou: věk nad 45 let, atypické lokalizace trombózy, opakované trombózy, obezita, operace a to především velké ortopedické, poranění, včetně popálenin, imobilizace, nádorová onemocnění, tromboembolická nemoc (TEN) v anamnéze, varixy, hormonální léčba, těhotenství, šestinedělí, kouření, opakované ztráty plodu. (Penka, 2001)

Léčba žilního tromboembolismu je různorodá: např. farmakologická a to nefrakcionovaným či nízkomolekulárním heparinem, perorálně podáváním kumarinů, přímých inhibitorů trombinu, trombolitik, dále chirurgická zavedením ochranného filtru do vena cava a chirurgickým zásahem jako je trombo/embolektomie. (Kvasnička, 2003)

Obr. 4 hluboká žilní trombóza (www.stago-us.com)



3.5 Indikace vyšetření trombofilních stavů

Při zvažování indikace vyšetření trombofilie je vždy velmi důležitá řádně odebraná rodinná a osobní anamnéza, protože pokud bychom se měli řídit pouze laboratorními nálezy, můžeme přehlédnout i více než 50 % nemocných, u kterých se dosud žádný defekt neprokázal, ale mají významné klinické projevy. Nález trombofilního faktoru může ovlivnit tromboprophylaxi v zátěžové situaci, pokud bude nositelem osoba mladší 40-45 let. Pokud je pacient starší, profylaxe se běžně podává. Lékař musí vždy především komplexně zhodnotit rizikovost situace. (Matýšková, 2010)

Vyšetření trombofilních stavů nejsou prováděna u všech osob, ale pouze selektivně. Je indikováno, pokud jsou přítomny alespoň dva znaky definující klinickou trombofilii. Klinická definice trombofilie zahrnuje: výskyt trombózy v mladším věku, atypickou lokalizaci trombózy, opakované trombózy, pozitivní rodinnou anamnézu, opakované ztráty plodu a komplikace v těhotenství. (Matýšková, 2009)

Vždy jsou indikována u osob s prodělanou žilní trombózou, plicní embolií nebo prokazatelnou rodinou zátěží, u žen s rizikem trombofilie před nasazením hormonální substituční terapie v přechodu, měla by být indikována u dívek před nasazením hormonální antikoncepce, u těhotných a u žen s nevysvětlitelnými potraty v anamnéze, eventuelně u pacientů před operací s vysokým rizikem trombózy, např. ortopedické operace.

Detekce trombofilních stavů zahrnuje vyšetření koagulačních faktorů srážení krve, zejména FVIII, jejich inhibitorů (antitrombinu, proteinu C, proteinu S), známých mutací koagulačních faktorů (Leidenská mutace FV, mutace protrombinu, mutace v genu pro MTHFR (enzym methylenetetrahydrofolátreduktáza), antifosfolipidových protilátek, homocysteinu, někdy skupinových koagulačních testů (aktivovaný parciální tromboplastinový test - APTT, protrombinový test - PT, trombinový test - TT, D-dimerů, fibrinogenu).

Zavedením nových vyšetřovacích metod pro stanovení molekulových markerů pozitivně ovlivnilo diagnostiku a prevenci trombogeneze a trombofilie. Nové poznatky jsou využívány k prevenci, diagnostice i k léčbě. Např. při dysfunkci endotelu stanovujeme endotelové markery např. von Willebrandův faktor, trombomodulin, tkáňový faktor (TF), inhibitor tkáňového faktoru (TFPI), adhezivní proteiny. (Pecka, 2004)

3.6 Význam znalosti trombofilních stavů v prevenci venózní tromboembolismu

Tromboembolismus je závažný, často podceňovaný medicínský problém, který je zdrojem nejen vážných zdravotních problémů pacienta, ale i narůstajících nákladů na zdravotní péči. V České republice zemře 10 000 lidí za rok v souvislosti s fatální plicní embolií. Venózní tromboembolismus představuje závažné onemocnění, kterému lze však správnou strategií prevence předcházet.

Mechanické metody prevence TEN jsou mechanické postupy, které snižují riziko trombózy a embolizace ovlivněním především faktoru žilní stázy. Účinným a levným principem je především časná mobilizace a následné rehabilitace chůze. Výhodou těchto pomůcek je, že nezvyšují riziko krvácení, mohou působit pozitivně k antikoagulanciím, mohou redukovat otok končetin. (Karetová, 2009)

Prevenci vzniku trombóz rozdělujeme na primární (u osob, které ještě trombózu neprodělaly) a sekundární (po již prodělané trombóze).

Prevencí u primárních tromboembolických příhod je znalost spouštěcích mechanismů a rizikových faktorů (např. nehybnost pacienta, může být spojena se srdečním a respiračním selháním, nádorovým onemocněním apod.). Důležitá je brzká mobilizace pacienta, cvičení s dolními končetinami, používání kompresivních punčoch, hydratace organismu, ale nejdůležitější úlohu má podávání vhodné farmakologické profylaxe, zvláště v rizikových situacích, jako je např. rozsáhlá ortopedická operace, chirurgické operace apod. Nejvíce doporučovaná je profylaxe nízkomolekulárními hepariny např. Clexane, Fraxiparine, Fragmin atd. (Poul, 2009)

Sekundární prevence spočívá ve farmakologické léčbě po již prodělané trombóze. Délka užívání je velice individuální a je závislá na vzniku a rozsahu trombózy, na počtu příhod, jestli nadále trvá spouštěcí faktor (např. aktivní nádor). S farmakologickou léčbou souvisí i případná změna životosprávy např. abstinence kouření, u žen se nedoporučuje užívání hormonální antikoncepce. (Poul, 2009)

3.7 Léčba trombofilních stavů

Trombofilie se klinicky projevuje nejčastěji jako žilní trombóza, embolizace do plicnice, infarkt myokardu, trombóza mozkových cév (iktus) nebo porucha mikrocirkulace s projevy orgánové dysfunkce. Léčba je proto zaměřena buď na snížení srážlivosti krve = antikoagulační léčba, nebo proti účinku krevních destiček = protideštičková (antiagregační) léčba, či na substituci přirozených inhibitorů krevního srážení = substituční, snížení hladiny fibrinogenu = defibrinační léčba, či rozpouštění fibrinových sraženin a obnovu krevního toku = trombolytická (fibrinolytická) léčba. (Kvasnička, 2003)

Při monitorování léčby je velice důležité, aby se laboratorní hodnoty používaných testů během antitrombotické léčby pohybovaly v léčebném rozmezí. Jsou-li nižší (nedostatečný čas) je nemocný ohrožen tromboembolickými příhodami, jsou-li naopak vyšší (nadměrný čas) je nemocný ohrožen krvácivými komplikacemi. (Pecka, 2004)

3.7.1 Antikoagulační léčba

Antikoagulační léčba zabraňuje vzniku trombu tím, že brání genezi trombinu a následné přeměně fibrinogenu na fibrin. Antikoagulační léčbou se potlačuje aktivace koagulačních faktorů tak, že se jedná brání vzniku plnohodnotných faktorů (preparáty kumarinového typu) nebo se potencuje účinek antitrombinu k nepřímému vyvázání trombinu (nefrakcionovaný heparin), či k vyvázání aktivního F Xa (nízkomolekulární heparin). Hlavním záměrem antikoagulační léčby je co nejrychlejší dosažení stabilní účinné léčebné dávky, udržení této dávky v terapeutických mezích a vyloučení významnějšího předávkování antikoagulačním působkem, (Pecka, 2004)

Antikoagulancia jsou látky, které zabraňují srážení krve a nejsou účinné proti již vytvořeným trombům. Rozdělujeme podle způsobu podání a podle toho, zda působí in vivo nebo in vitro. Heparin a jeho nízkomolekulární analogy tvoří skupinu antikoagulancií, která se podávají parenterálně a jsou účinná jak in vivo nebo in vitro. Perorální antikoagulancia jsou účinná pouze in vivo. Jsou to antagonisté vitamínu K a nejvíce se používá warfarin.

3.7.1.1 Nepřímé inhibitory trombinu a FXa.

Nepřímé inhibitory trombinu vyžadují další substituci, která jim umožní připojit se k molekule trombinu. Látky usnadňující připojení inhibitoru k molekule trombinu je heparin. Jde o endogenní mucopolysacharid, neabsorbuje se po perorálním podání, musí se aplikovat parenterálně. Byl objeven Mc Leanem v roce 1916. Je mezi prvními léky, které se podařilo izolovat pro antikoagulační léčbu. Antikoagulační aktivita heparinu je závislá na přítomnosti specifických inaktivátorů trombinu, jmenovitě na antitrombinu, který ireverzibilně inhibuje aktivitu trombinu a některých dalších koagulačních faktorů (např. F Xa). Heparin je katalyzátor reakcí antitrombinu,

kteřou zrychluje a podporuje interakce antitrombinu. Dále přispívá k urychlení přeměny plasminogenu na plasmin. (Lincová, 2000)

Rozlišujeme 2 typy heparinů: nefrakcionovaný heparin (UFH) a nízkomolekulární heparin (LMWH). Nefrakcionovaný heparin (UFH) se podává formou intravenózní infuze, zejména při léčbě akutních žilních tromboembolismů, nestabilních ateromatózních plátů či jako terapie arteriálních okluzí. (Penka, 2001) Monitorování léčby UFH se provádí testem APTT. Antidotem heparinu je protamin sulfát, jehož 1 mg může neutralizovat asi 100 jednotek heparinu. Ve studiích bylo prokázáno, že heparin snižuje produkci tkáňového faktoru in vitro. (Pecka, 2004)

Nízkomolekulární hepariny (LMWH) jsou dnes využívány hlavně pro prevenci, ale samozřejmě i k léčbě žilních trombóz. Proč se používají, jaké jsou jejich výhody? Jejich podávání se monitoruje laboratorním testem, který sleduje anti-Xa aktivitu v jednotkách (IU/ml). (Drábková, 2009)

Předností nízkomolekulárních heparinů ve srovnání s UFH je poměrně dobrá předvídatelnost účinku. Mají menší vliv na agregaci destiček a jejich podávání je spojeno s menším nebezpečím trombocytopenie. Dále mají větší biologickou dostupnost a jejich účinek trvá déle (cca 24 hodin) než účinek samotného heparinu. Je ale kratší než účinek perorálních antikoagulancií. (Lincová, 2007)

Pentasacharidy jsou syntetické látky, analoga pentasacharidové sekvence heparinu, které zprostředkovaně přes antitrombin selektivně blokují F Xa. Jedná se o krátký řetězec obsahující sekvenci 5 monosacharidů. (Pecka, 2010)

3.7.1.2 Přímé inhibitory trombinu a FXa.

Přímé inhibitory trombinu inhibují trombin tak, že se váží přímo na jeho molekulu bez působení další zprostředkující látky. Jsou látky, které inhibují všechny hlavní účinky trombinu. Rychle pronikají do trombu a inhibují trombin navázaný na fibrinu, trombocytech a subendotelové matrix. Výhodou těchto přímých antitrombinů je předvídatelný účinek, který nevyžaduje laboratorní monitorování. (Vojáček, 2004) Nejsilnější inhibitor trombinu je hirudin, který tvoří s trombinem dimerní komplex a takto vyvázaný trombin ztrácí své proteolytické schopnosti. (Pecka, 2004)

Prvým představitelem nové lékové skupiny přímých reverzibilních inhibitorů aktivovaného X. faktoru – xabanů – je rivaroxaban. Blokáda faktoru Xa je důležitá, jedná se o poslední krok aktivace trombinu. Nespornou výhodou je, že není zcela eliminován biologický efekt trombinu potřebný k aktivaci trombomodulinu a k zajištění aktivity antikoagulačně působících proteinů C a S. Výhodou rivaroxabanu je možnost perorálního podávání. Dostatečná doba účinku ($t_{1/2}$ je 5–11 hod.) umožňuje podávání jedenkrát denně. Další předností je rychlý nástup účinku (c_{max} je 2–4 hod.) a duální, tj. renální i hepatální vylučování. Díky více cestám bioeliminace (oxidázami CYP i hydrolázami) zůstává minimální prostor pro uplatnění lékových interakcí. V zatím jediné schválené indikaci, tj. v profylaxi tromboembolických komplikací u elektivních ortopedických výkonů (náhrad kloubů), byla dokumentována

asi o polovinu vyšší účinnost proti „zlatému standardu“ enoxaparinu, při stejné úrovni výskytu významných krvácivých příhod. Terapeutický potenciál rivaroxabanu bude pravděpodobně širší, probíhají registrační studie u nemocných s akutními koronárními příhodami, s fibrilací síní, s léčbou flebotrombózy a plicní embolie. (www.internimedicina.cz/pdfs/int/2010/09/08.pdf)

Antikoagulancia jsme dosud mohli dělit do tří skupin: hepariny a jejich deriváty, hirudiny a jejich deriváty a antivitaminy K. Zatím nejvýraznější vývoj jsme zaznamenali ve skupině heparinů, postupné užití menších a menších podjednotek polysacharidové sekvence heparinu vedlo k zavedení nejméně dvou důležitých lékových skupin – nízkomolekulárních heparinů a pentasacharidů. Třetí skupina heparinových derivátů – dermatansulfáty – se sice v klinické praxi užívá, nicméně jejich postavení jako antikoagulantů není ještě definitivně určeno. Všechny užívané skupiny mají řadu výhod, ale také nevýhod. U derivátů heparinu je velkou nevýhodou nutnost parenterální aplikace. Také skutečnost, že jak heparin, tak nízkomolekulární hepariny i pentasacharidy působí inhibicí trombinu či aktivovaného faktoru X (faktor Xa) zprostředkovaně, tj. aktivací antitrombinu, není výhodná. Vedle rizika nízké dostupnosti antitrombinu je handicapem i to, že prostorové vlastnosti antitrombinu neumožní vazbu na trombin již vázaný na fibrinovou síť. Po uvolnění trombinu ze sítě tak vzniká přechodně hyperkoagulační stav, kterému musíme čelit prodlouženým podáváním těchto nepřímých inhibitorů trombinu či faktoru Xa. Třetím problémem, se kterým se můžeme setkat při užití heparinů, je výskyt trombocytopenie indukované heparinem (HIT), která může nemocného ohrozit na životě. (www.remedia.cz)

Při užití hirudinů, přímých inhibitorů trombinu, sice odpadá potřeba antitrombinu, nesetkáme se s indukcí HIT, nicméně zůstává potřeba parenterálního podání, a navíc přistupuje vysoká cena léčby a úzké indikační spektrum. Poslední skupina, antivitaminy K, je v praxi nejrozšířenější. Výhodou jsou nízké náklady na vlastní lék (v našich podmínkách warfarin), dostatek klinických zkušeností a zejména možnost perorální aplikace. Nicméně nevýhod je více: zmiňme jen nutnost důsledné monitorace efektu při velké inter- i intraindividuální variabilitě účinku (při polymorfismu cílového enzymu a polymorfismu biodegradace), vysoké riziko lékových a potravinových interakcí a pomalý nástup účinku. (Lincová, 2007)

3.7.1.3 Kumarinové preparáty

Tyto preparáty patří mezi antagonisty vitamínu K a snižují jaterní syntézy faktorů závislých na vitamínu K. Způsobují deficit redukované formy vitamínu K a tím snížení hladin aktivovaných forem koagulačních faktorů II, VII, IX a X. (Vojáček, 2004) Nejvíce užívaným lékem z této skupiny pro perorální podání je Warfarin.

Jsou to látky, které ovlivňují karboxylaci prekurzorů proenzymů koagulačních faktorů závislých na vitamínu K a jsou vlastně kompetitivní antagonisty vitamínu K. Vitamin K v redukované formě je obvykle spolu s kalciovými ionty (Ca^{2+}) vyžadován ke katalyzování konverze prekurzorů koagulačních faktorů závislých na vitamínu

K na aktivní formy. Právě regenerace vitamínu K je blokována těmito antikoagulancii. Tím dochází k tvorbě strukturálně nekompletních koagulačních faktorů tzv. PIVKA (Protein induced by vitamin K absence or vitamin K antagonists). (Lincová, 2007). PIVKA faktory jsou koagulačně neaktivní faktory, které postrádají schopnost vázat se na fosfolipidovou matrix. (Pecka, 2010)

3.7.1.4 Nová antikoagulancia

V poslední době se dostávají do praxe nové preparáty. Dabigatran etexilát je přímým inhibitorem trombinu a rivaroxaban je přímým inhibitorem aktivovaného faktoru Xa. Jejich výhodou je dávkování ve formě tablet v jedné ověřené fixní dávce denně. Lze je podávat bez nutnosti laboratorní kontroly. (www.internimediceina.cz/pdfs/int/2010/09/08.pdf)

3.7.2 Antiagregační léčba

Antiagregační léčba je zaměřená na omezení shlukovací schopnosti krevních destiček. Aktivace krevních destiček má několik úrovní, ve kterých je možno farmakologicky zasáhnout a léčbu je možno kombinovat. Nabízí se několik úrovní, které je možné farmakologicky ovlivnit např. blokáda adheze krevních destiček, blokáda aktivačních cest a cyklů, stabilizace krevních destiček a blokáda agregace krevních destiček. (Pecka 2010)

Mezi antiagregační látky patří kyselina acetylsalicylová (ASA), dipyridamol, ticlopidin, sulfipyrazol. Látky inhibující aktivitu cyklooxygenázy jsou nejvíce prostudovány látky a to především kyselina acetylsalicylová (ASA). Její účinek je striktně závislý na dávce, která je vždy do 100 mg. Chronické užívání takto nízkých dávek může snížit až o 50% riziko infarktu a náhlé smrti u pacientů s nestabilní angínou pectoris. (www.vseprozdravi.cz)

Agregaci destiček navozenou adenosindifosfátem (ADP) blokují ticlopidin a clopidogrel. V kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou se používají k prevenci akutní a subakutní trombózy po uložení koronárního stentu. V sekundární prevenci po cévní mozkové příhodě jsou ticlopidin i clopidogrel bezpečnou alternativou kyseliny acetylsalicylové. Léčba clopidogrelem u akutních koronárních syndromu bez elevací ST úseku významně snížila počet úmrtí, výskytu fatálních i nefatálních infarktu myokardu a cévních mozkových příhod, tento vliv byl výraznější u osob podstupujících koronární intervenci. (www.remedia.cz) Monitorování agregační léčby je problematická a provádí se na agregometru.

3.7.3 Trombolytická léčba

Trombotická léčba je vedle chirurgické léčby jedinou aktivní metodou léčby trombózy a její úspěšnost závisí na časném začátku. (Marder a Sherry, 1988) Trombolytika jsou aktivátory plazminogenu (PA) a vyvolávají přeměnu plazminogenu na plazmin a tím aktivují fibrinolytický systém. Trombolytika (fibrinolytika) primárně slouží k rozpuštění již vytvořeného trombu a to jak v arteriích, tak ve vénách. Využívají se pro obnovení tkáňové perfúze a to hlavně v terapii infarktu myokardu.

Trombolytika dělíme na přímá a nepřímá. Mezi nepřímá trombolytika patří např. streptokináza či urokináza. Streptokináza nemá vlastní proteolytickou aktivitu a aktivuje fibrinolytický systém nepřímo. Vytváří komplex s plazminogenem, který je jeho účinným aktivátorem. Urokináza je účinnější než heparin a používá se u velkých plicních embolů. (www.vseprozdravi.cz)

Přímá trombolytika zastupuje tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA), který má vazebné místo pro fibrin a katalytické místo, které konvertuje plazminogen na plazmin. V praxi se dnes používají i další trombolytika, jako např. retepláza, prourokináza (PUK) a staphylokináza (STA).

Monitorování trombotické léčby se provádí pomocí trombinového testu (TT) a to pouze u kontinuálního podávání trombolytika. U jednorázového podání se monitorování neprovádí.

Při trombolytické terapii snadno dochází k hyperplazminémii, při níž jsou fibrinogen, plazminogen i další koagulační faktory vystaveny nespecifické proteolýze plazminem.

Antifibrinolytika zabraňují vazbě plazminu na fibrin a jsou používána jako přídatné látky při náhradě koagulačních faktorů při krvácení po chirurgických zákrocích. (Lincová, 2007)

4 Metody, materiál a přístroje

4.1 Principy použitých metod

4.1.1 Stanovení počtu krevních destiček (Plt) na analyzátoru krevních buněk

Naředěná suspenze krevních částic je pod tlakem nasávána do měřicí apertury. Vně i uvnitř apertury je polarizované stejnosměrné elektrické pole. Vnikne-li částice do apertury, změní se měrný odpor prostředí a vzniká napěťový impuls. Počet impulsů odpovídá počtu buněk prošlých aperturou a amplituda impulsu odpovídá objemu buňky. Jako výsledek se vydává počet krevních destiček v jednom litru.

4.1.2 Stanovení protrombinového testu (PT)

K citrátové plazmě se přidá tkáňový tromboplastin obsahující vápenaté ionty (Ca^{2+}). Sleduje se koagulační čas do vytvoření prvních fibrinových vláken. Výsledek se vydává jako poměr R času pacienta ku času normální kontrolní plazmy u neléčených, nebo jako INR u léčených.

$$R = (t_n/t_k)$$

$$\text{INR} = (t_n/t_k)^{\text{ISI}}$$

t_n - čas nemocného

t_k - čas kontrolní plazmy

ISI - index citlivosti tromboplastinu

4.1.3 Stanovení aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (APTT)

V přítomnosti purifikovaných fosfolipidů destičkového typu (kefalin), vápenatých iontů a povrchového aktivátoru na bázi křemičitanů dochází v plazmě chudé na destičky k aktivaci mediátorů vnitřní cesty přeměny protrombinu na trombin. Vzniklý trombin aktivuje následně přeměnu fibrinogenu na fibrin a posléze na nerozpustný fibrin. Výsledek se vydává jako poměr R času pacienta ku času normální kontrolní plazmy.

$$R_{\text{APTT}} = \frac{\text{Čas pacienta}}{\text{Čas normální kontroly}}$$

4.1.4 Stanovení funkční aktivity antitrombinu (AT)

Testovaná plazma je v přítomnosti heparinu inkubována při 37 °C s přebytem aktivovaného faktoru X. AT přítomný ve vyšetřované plazmě vytvoří s heparinem a faktorem Xa trimerní komplex. Zbytkový FXa v dalším kroku reaguje se substrátem a uvolňuje z něj žlutě zbarvený chromofor (p-nitroanilin). Intenzita zbarvení je

nepřímo úměrná koncentraci AT v plazmě a je detekována spektrofotometricky při 405 nm. Jako výsledek se vydává funkční aktivita AT v %, odečtená z kalibrační křivky.

4.1.5 Stanovení funkční aktivity proteinu C (PC)

K ředěné vyšetřované plazmě je přidán specifický aktivátor proteinu C (extrakt z jedu hada *Agkistrodon C. contortrix*). Po inkubaci je ke směsi přidán specifický chromogenní substrát. Aktivovaný protein C štěpí substrát za vzniku žlutě zbarveného chromoforu. Intenzita zbarvení je přímo úměrná aktivitě proteinu C ve vyšetřované plazmě. Jako výsledek se vydává funkční aktivita PC v %, odečtená z kalibrační křivky.

4.1.6 Stanovení funkční aktivity proteinu S (PS)

Ředěná vyšetřovaná plazma je inkubována s protein S deficitní plazmou, aktivovaným proteinem C a aktivovaným faktorem V. Aktivovaný protein C společně s proteinem S (kofaktor) inhibuje faktor Va. Po přidání vápenatých iontů se sleduje stupeň prodloužení koagulačního času způsobený inaktivací faktoru Va. Prodloužení koagulačního času je přímo úměrné aktivitě proteinu S ve vyšetřovaném vzorku plazmy. Jako výsledek se vydává funkční aktivita PS v %, odečtená z kalibrační křivky.

4.1.7 Stanovení rezistence na aktivovaný protein C (APC – R)

Sleduje se prodloužení APTT indukované aktivovaným proteinem C, který je přidáván s ionty kalcia jako startovací reagentie. U každého pacienta se získají dva časy: První čas = klasické APTT a druhý = APTT s přidavkem aktivovaného proteinu C (APC). Vyšetřují se vzorky, které jsou předředěné plazmou deficitní na faktor V, kde jsou ostatní koagulační faktory v nadbytku. Koagulační časy s APC jsou prodloužené díky inhibičnímu účinku APC, je-li přítomna Leidenská mutace F V, aktivovaný protein C nemůže dostatečně projevit svoji inhibiční aktivitu (hodnoty APC ratio jsou pod 2). Jako výsledek se vydává poměr času pacienta s přidavkem APC ku času pacienta bez přidavku APC.

4.2 Fyziologické rozmezí použitých metod

Tab. 2 fyziologické meze používaných metod

metoda	fyziologické meze	léčba	jednotky
PT	R = 0,80 – 1,20	INR = 2,0 – 4, 0	
APTT	28 – 39 s. R = 0,9 – 1,1	R = 2,0 – 4, 0	
AT	80 - 120		%
PC	70 - 140		%
PS	65 - 140		%
APC-R	>2		
PLT	120 - 350		10x ⁹ /l

4.3 Použitý materiál

4.3.1 Vyšetřovaný materiál

Jako vyšetřovaný materiál jsem použila krev odebranou do K_3EDTA pro stanovení počtu trombocytů a citrátovou plazmu pro stanovení koagulačních parametrů od vybraných pacientů Hematologického oddělení a Hematologické poradny Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem.

Pro koagulační vyšetření je nutné dodržet správný poměr mezi krví a antikoagulačním činidlem, zkumavka musí být naplněna přesně po vyznačenou rysku. Dále je nezbytné ihned po odběru odebranou krev promíchat s antikoagulačním činidlem opakovaným převrácením odběrové zkumavky. Odebraný materiál, co nejrychleji dopravit do laboratoře, nejdéle do dvou hodin od odběru. Při příjmu vzorku laboratoří je identifikovaný materiál polepen čárovými kódy a zadán do laboratorního informačního systému (LIS). Vzorky citrátové krve jsou ihned centrifugovány 15 minut při 3800 ot/min (platí při použití běžné laboratorní centrifugy s poloměrem otáčení 15cm).

4.4 Použité reagensie a kontrolní materiály

Použila jsem Coag Norm, Coag Path, System Control N+P, Unicalibrátor na kalibraci metod. Reagensie, které nejsou součástí setů Owren-Koller, Desorb U, STA- $CaCl_2$ 0,025 M. Neoplastine CI Plus 10 pro stanovení PT, PTT Automate 10 pro stanovení APTT, Stachrom ATIII pro stanovení AT a APC/ $CaCl_2$, APTT reagens, V-DEF. plazma pro stanovení APC-R.



Obr. 5 a 6 použité reagensie

4.5 Stabilita použitých reagensů a kontrolních materiálů

Tab. 3 Reagencie, kontrolní materiál a jejich stabilita

METODY	REAGENCIE	STAV	TEPLOTA	STABILITA
KONTROLA	Coag Norm	naředěné	15 - 19 °C	4 hodiny
KONTROLA	Coag Path	naředěné	15 - 19 °C	4 hodiny
KONTROLA	System Control N+P	naředěné	15 - 19 °C	8 hodin
KALIBRACE	Unicalibrátor	naředěné	15 - 19 °C	4 hodiny
	Owren-Koller	po otevření	15 - 19 °C	3 dny
	Desorb U	po otevření	15 - 19 °C	5 dny
	STA-CaCl ₂ 0,025 M	po otevření	15 - 19 °C	3 dny
PT	Neoplastine Cl Plus 10	naředěné	15 - 25 °C	48 hodin
APTT	PTT Automate 10	naředěné	15 - 25 °C	24 hodin
AT	Stachrom ATIII	naředěné	15 - 19 °C	7 dní
PC	Stachrom PC	naředěné	15 - 19 °C	21 dní
PS	Staclot PS	naředěné	15 - 19 °C	4 hodiny
APC- R	APC/CaCl ₂	naředěné	2 - 8°C	5 dní
APC- R	APTT reagens	naředěné	2 - 8°C	1 měsíc
APC- R	V-DEF. plazma	naředěné	2 - 8°C	24 hodin

4.6 Použité přístroje a pomocná zařízení

4.6.1 Automatický analyzátor krevních buněk LH 750, Beckman Coulter

Tento přístroj byl použit pro stanovení počtu krevních destiček

Impedanční princip pro měření počtu erytrocytů, leukocytů a trombocytů. Naředěná suspenze krevních částic je pod tlakem nasávána do měřicí apertury. Vně a uvnitř apertury je polarizované stejnosměrné elektrické pole. Vnikne-li částice do apertury, změní se měrný odpor prostředí a vzniká napěťový impuls. Počet impulsů odpovídá počtu buněk prošlých aperturou a amplituda impulsu odpovídá objemu buňky.



Obr. 7 a 8 LH 750 a STA-R v laboratoři ÚL – foto

4.6.2 Automatický koagulometr STA – R, Diagnostica STAGO

Koagulační princip: kulička kmitá pomocí magnetického pole v kyvetě a vlivem koagulačního procesu (tvorbou fibrinového vlákna) se zpomaluje její pohyb až dojde k úplnému zastavení, které se projeví změnou magnetického pole a vybuzený elektrický impuls zastaví ukazatel času. (Pecka, 2004)

Takto stanovujeme protrombinový test, aktivovaný parciální tromboplastinový test, protein S a rezistenci na aktivovaný protein C.

Optický princip: je založen na měření změny absorbance monochromatického světla při průchodu kyvetou při vlnové délce 405 nm.

Takto stanovujeme funkční aktivitu antitrombinu a proteinu C.

4.6.3 Pomocná zařízení

Valivá třepačka, výkyvná plošina k promíchání vzorků, hlubokomrazicí box, lednice, biohazard, centrifugy, chladicí centrifuga teplota je nastavená na 20°C, laboratorní centrifuga Express.

5 Praktická část

5.1 Pracovní postup

1. Začala jsem přípravou reagensí, kalibrátoru a kontrolních plazem. Postupovala jsme dle doporučení výrobce (viz příbalové letáky). Po vytemperování lyofilizovaných reagensí na laboratorní teplotu jsem všechny naředila vodou pro injekce. Po naředění jsem nechala reagenii stát 30 min. při laboratorní teplotě a poté jsem je jemně protřepala.

2. Poté jsem provedla identifikaci reagensí načtením čárových kódů (na lahvičkách) a vložila je do přístroje. Veškeré reagenie musí být před měřením vytemperované na teplotu reagenční zásuvky přístroje (15 – 19 °C).

3. Provedla jsem kalibraci antitrombinu, proteinu C a proteinu S na kalibrační plazmu. V našem případě jsem použila Unicalibrator firmy Diagnostica Stago. Koagulometr vytvoří kalibrační křivky automaticky, zadávají se pouze hodnoty výchozích koncentrací kalibrační plazmy deklarované výrobcem.

4. Po kalibraci jsem provedla kontrolu správnosti pomocí atestovaných kontrolních plazem s deklarovaným rozmezím hodnot (System Control N+P, Diagnostica Stago). Pro denní kontrolu přesnosti jsem používala normální a patologickou neatestovanou kontrolní plazmu (Coag Norm a Coag Path, Diagnostica Stago).

5. Následoval příjem vzorků do LIS, kde dochází k identifikaci materiálu, polepení žádanek i zkumavek čárovými kódy a zadání do laboratorního informačního systému, který vzorkům přiřadí identifikační čísla laboratoře.

6. Přijmutý materiál (citrátovou krev) jsme centrifugovali 15 minut při 3800 ot./min. Poté je plazma připravena ke koagulačním vyšetřením. Krev odebraná do K₃EDTA k vyšetření počtu krevních destiček se pouze promíchá na valivé třepačce a je připravena k vyšetření.

7. Zkumavku s vyšetřovanou plazmou jsem vložila do koagulometru, který si načte čárový kód na zkumavce a komunikací s LIS požadavky na vyšetření. Používá se neředěná plazma, ředění Owren-Kollerovým pufrům je automaticky provedeno v přístroji. Krev odebranou do K₃EDTA jsem vložila do analyzátoru krevních buněk.

8. Koagulometr provedl změření vzorků plazem. K naměřenému koagulačnímu času analyzátor z kalibrační křivky odečetl příslušnou koncentraci antitrombinu, proteinu C a proteinu S v plazmě. U ostatních testů vydá koagulometr naměřené koagulační časy, případně vypočítá poměry R či INR u protrombinového testu. Analyzátor krevních buněk vydá hodnotu krevních destiček vztaženou na litr krve.

9. Výsledné hodnoty byly vyneseny do tabulky (Výsledkový list) a statisticky vyhodnoceny.

5.2 Výsledkové listy

Naměřené výsledky viz příložené tabulky Tab. 5 a Tab. 6

Tab. 4 Skupina pacientů bez trombózy

Č.	P.	VĚK	A.	PLT	Q-R	APTTR	AT	PC	PS	APC-R
1.	Ž	1958	ne	235	1,00	0,97	130	299	132	2,6
2.	Ž	1987	ne	305	1,00	1,14	94	172	92	2,9
3.	M	1959	ne	210	1,00	0,94	102	148	96	1,8
4.	Ž	1973	ne	275	1,00	1,14	97	124	60	2,5
5.	Ž	1970	ne	267	1,00	0,91	111	146	126	1,7
6.	M	1962	ne	228	0,96	1,08	89	121	126	2,6
7.	Ž	1976	ne	184	1,00	1,02	92	113	79	2,3
8.	M	1964	ne	276	1,00	1,15	126	133	99	3,1
9.	Ž	1979	ne	301	1,00	0,89	92	116	69	1,8
10.	Ž	1992	ne	130	1,00	1,00	110	173	72	2,5
11.	M	1943	ne	304	1,00	0,82	82	159	91	1,6
12.	M	1975	ne	220	1,00	1,11	106	120	117	2,4
13.	Ž	1979	ne	236	1,00	0,97	87	126	53	3,2
14.	Ž	1944	ne	175	1,00	1,01	101	123	121	2,7
15.	Ž	1983	ne	198	0,94	1,09	90	115	86	2,8
16.	Ž	1985	ne	310	1,00	1,05	95	145	56	2,4
17.	Ž	1960	ne	247	1,00	0,93	111	123	102	2,5
18.	M	1978	ne	290	1,00	1,14	84	129	90	2,7
19.	M	1960	ne	189	1,00	1,01	91	183	101	3,0
20.	Ž	1989	ne	201	1,00	1,01	87	100	54	2,5
21.	Ž	1982	ne	350	1,00	0,87	110	142	60	2,9
22.	M	1977	ne	209	1,00	0,84	137	254	149	3,4
23.	Ž	1990	ne	130	1,10	1,16	107	150	72	2,6
24.	M	1953	ne	272	1,10	0,91	92	154	92	2,6
25.	M	1977	ne	308	1,00	0,93	94	114	59	2,5

Vysvětlivky: Č – číslo vzorku, Ž – žena, M – muž, P – pohlaví, A – anamnéza, ne – bez trombózy,

Tab. 5 Skupina pacientů s trombózou

Č.	P.	VĚK	A.	PLT	Q-R	APTR	AT	PC	PS	APC-R
26.	M	1942	trombóza	171	1,00	0,82	81	129	74	1,8
27.	Ž	1991	trombóza	158	0,96	1,09	92	100	75	2,9
28.	Ž	1942	trombóza	225	1,00	1,00	102	130	80	2,3
29.	Ž	1925	trombóza	207	1,00	1,06	116	142	97	2,6
30.	Ž	1990	trombóza	220	1,60	0,97	111	137	78	2,6
31.	M	1967	trombóza	192	1,00	0,90	101	145	116	1,6
32.	Ž	1966	trombóza	172	1,00	1,11	96	167	72	1,6
33.	Ž	1966	trombóza	211	1,00	1,00	77	109	68	3,1
34.	Ž	1981	trombóza	200	1,00	1,02	102	134	88	2,2
35.	Ž	1969	trombóza	222	1,00	1,10	106	150	107	3,1
36.	Ž	1966	trombóza	268	1,00	1,17	106	176	141	2,8
37.	Ž	1947	trombóza	158	1,50	1,26	74	54	72	2,3
38.	Ž	1974	trombóza	345	1,70	1,40	97	150	95	2,2
39.	Ž	1964	trombóza	188	1,90	1,26	103	175	86	2,0
40.	M	1975	trombóza	256	1,00	1,05	126	162	150	2,2
41.	Ž	1960	trombóza	280	1,00	0,92	90	104	87	1,6
42.	Ž	1963	trombóza	109	1,00	1,02	91	157	109	2,9
43.	M	1974	trombóza	222	1,00	3,02	107	127	145	2,2
44.	M	1955	trombóza	187	1,00	1,24	80	125	140	2,7
45.	M	1945	trombóza	212	1,00	1,00	104	143	114	2,0
46.	M	1952	trombóza	314	1,00	2,11	110	146	115	2,5
47.	M	1964	trombóza	259	2,10	1,14	76	125	94	1,6
48.	M	1953	trombóza	225	1,00	0,90	78	120	126	2,3
49.	Ž	1969	trombóza	268	1,70	1,17	90	125	105	1,7
50.	Ž	1976	trombóza	182	1,00	0,84	99	127	65	2,7

Vysvětlivky: Č – číslo vzorku, Ž – žena, M – muž, P – pohlaví, A – anamnéza

5.3 Statistické vyhodnocení

1. Testování normality: Test použijeme pro porovnávání dvou výběrových souborů, pocházejí z normálního rozdělení, či nikoliv. K ověření této skutečnosti můžeme využít např. test D'Agostino. Testujeme nulovou hypotézu o normalitě výběru proti hypotéze alternativní, že výběr pochází z nějakého nesymetrického rozdělení. Je-li vypočítaná p-hodnota větší než 0,05, předpokládáme, že se jedná pravděpodobně o normální rozdělení (s hladinou významnosti 0,05). V případě p-hodnoty menší než 0,05 můžeme nulovou hypotézu zamítnout a platí hypotéza alternativní, že se pravděpodobně nejedná o normální rozdělení (se spolehlivostí 95 %). (Anděl, 2003)

2. Testování rovnosti středních hodnot a rozptylů u nezávislých výběrů z normálního rozdělení: Použijeme parametrický dvouvýběrový (nepárový) t-test. Nejprve zjišťujeme, zda jsou rozptyly shodné či neshodné. Testujeme nulovou hypotézu (shodné rozptyly) proti hypotéze alternativní (neshodné rozptyly). Je-li vypočítaná p-hodnota větší než 0,05, předpokládáme, že se jedná pravděpodobně o shodné rozptyly. V případě p-hodnoty menší než 0,05 můžeme nulovou hypotézu zamítnout a platí hypotéza alternativní, kde se pravděpodobně jedná o neshodné rozptyly.

Když víme, zda se jedná o shodné či neshodné rozptyly, zjišťujeme, zda se od sebe oba soubory statisticky liší či nikoli. Opět testujeme nulovou hypotézu (soubory se statisticky neliší) proti hypotéze alternativní (soubory se statisticky liší). Je-li vypočítaná p-hodnota větší než 0,05, předpokládáme, že se jedná pravděpodobně o soubory, které se statisticky neliší. V případě p-hodnoty menší než 0,05 můžeme nulovou hypotézu zamítnout a platí hypotéza alternativní, kde se pravděpodobně jedná o soubory, které se od sebe statisticky liší. (Hendl, 2004)

3. Testování rovnosti středních hodnot u nezávislých výběrů v případě, že se nejedná o normální rozdělení: Použijeme neparametrický dvouvýběrový (nepárový) Mann Whitneyův test, kterým budeme zjišťovat, zda se od sebe oba soubory statisticky liší či nikoli. Opět testujeme nulovou hypotézu (soubory se statisticky neliší) proti hypotéze alternativní (soubory se statisticky liší). Je-li vypočítaná p-hodnota větší než 0,05, předpokládáme, že se jedná pravděpodobně o soubory, které se statisticky neliší. V případě p-hodnoty menší než 0,05 můžeme nulovou hypotézu zamítnout a platí hypotéza alternativní, kde se pravděpodobně jedná o soubory, které se od sebe statisticky liší. (Zvára, 2003)

6 Závěr

V rámci této práce jsem vyšetřila počet krevních destiček a koagulační parametry: protrombinový test, aktivovaný parciální tromboplastinový test, funkční aktivitu antitrombinu, proteinu C, proteinu S a rezistenci na aktivovaný protein C ve skupině 25 osob s vysokým rizikem vzniku trombózy a ve skupině 25 osob s již prodělanou trombózou.

Naměřené výsledky těchto 2 skupin osob jsem statisticky porovnávala s cílem zjistit, zda jsou mezi těmito 2 soubory nějaké statisticky významné rozdíly. Po vyhodnocení D'Agostiniho testem, zda mají dané soubory normální rozdělení či nikoli, byly testy s normálním rozdělením hodnot vyhodnoceny parametrickým dvouvýběrovým (nepárovým) t-testem. Ta vyšetření, u kterých se nepotvrdila normální rozdělení hodnot soubory, byly srovnávány neparametrickým dvouvýběrovým (nepárovým) Mann Whitneyovým testem.

U žádného z vyšetřovaných testů se nepotvrdil statisticky významný rozdíl mezi souborem osob bez trombózy a skupinou pacientů s již prodělanou trombózou. Statisticky významnému rozdílu se soubory pacientů nejvíce blížily u vyšetření aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (p -hodnota = 0,077) a u rezistence na aktivovaný protein C (p -hodnota = 0,071), na rozdíl např. od vyšetření proteinu C, kde je p -hodnota = 0,88.

7 Diskuze

Výsledky práce jsou poněkud překvapivé. Předpokládalo by se, že mezi souborem osob s vysokým rizikem vzniku trombózy a souborem pacientů s již prodělanou trombózou bude, alespoň u některých vyšetření, statisticky významný rozdíl. To se ale nepotvrdilo. Naskýtá se otázka, proč? Navíc je zvláštní, že převážná část těchto výsledků je v oblasti fyziologických hodnot.

Mohlo by to být např. načasováním odběru. Pokud by byly osoby s rizikem vzniku trombózy vyšetřeny v době záchytu trombofilního stavu, tedy ještě před léčbou, měly by jistě jiné výsledky, než kdyby byly vyšetřovány v průběhu preventivní terapie.

U souboru pacientů s již prodělanou trombózou mohou být výsledky (alespoň některé) ovlivněny správně nastavenou léčbou.

Otázkou také zůstává, jaké by byly výsledky dalších koagulačních vyšetření, např. funkční aktivity faktoru VIII, koncentrace fibrinogenu, monitorování anti-Xa aktivity při terapii nízkomolekulárními hepariny, aktivovaný parciální tromboplastinový test citlivý na Lupus antikoagulans, D-dimery a další, kdyby byly vyšetřeny.

8 Seznam literatury

1. ANDĚL, J.: Statistické metody. 3. vydání, Praha: Matfyzpress, 2003
2. DRÁBKOVÁ D., SUDROVÁ M.: Kombinovaná hereditární trombofilie, Florence, Roč 5, č. 7-8 (2009) s. 14 – 15
3. DULÍČEK P., II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Hradci Králové: Venózní tromboembolizmus – rizikové faktory a prevence
4. DULÍČEK P., Nová antitrombotika a možnosti jejich uplatnění. Dostupné z:<http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2010/09/08.pdf>
5. HENDL, J.: Přehled statistických metod zpracování dat. 1. vydání, Praha: Portál, 2004.
6. KATEROVÁ D.: Prevence TEN dle posledních doporučení, Medicína po promoci, ročník 10/č.5/září-říjen 2009
7. KECSKEMÉTHY, Z.: Trombotické stavy v záchranné službě, Urgentní medicína, Roč. 11, č. 3 (2008)
8. KVASNIČKA J.: Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi, 1. vydání, Grada Publishing, Praha 2003, s. 299
9. KVASNIČKA J, BOHATOVÁ V.: Před světem obstojíme se ctí (rozhovor, Trombotické centrum a Centrální hematologické laboratoře VFN, Praha, Zdravotnické noviny, Roč. 57, č. 46 (2008), s. 24-26
10. LINCOVÁ D., FARGHALI H. et al.: Základní aplikovaná farmakologie, 2. doplněné, přepracované vydání, Galén, 2007, s. 274 - 280
11. MATOUŠ B. et.al.: Základy lékařské chemie a biochemie, Galén 2010, s. 540
12. MATÝŠKOVÁ M., ŠLECHTOVÁ M.: Vrozená a získaná predispozice k tvorbě trombóz, Lékařské listy 04/2010, ročník 59
13. PECKA M.: Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie hemostázy, Finidr, s.r.o., Český Těšín, 2004, s. 237
14. PECKA M. a kolektiv: PRAKTICKÁ HEMATOLOGIE: Laboratorní metody, Finidr, s.r.o., Český Těšín, 2010 s. 343
15. PENKA M., BULÍKOVÁ A., MATÝŠKOVÁ M., ZAVŘELOVÁ J.: Hematologie I, 1. vydání, Grada Publishing, Praha 2001, s. 201

16. PENKA M., MATÝŠKOVÁ M., KRAHULCOVÁ E.: Hematologie pro zdravotní sestry na transfuzních odděleních, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví BRNO 1996, s. 121
17. POUL H., KESSLER P.: Trombofilní stavy: Význam pro prevenci a léčbu žilního tromboembolizmu, Vnitřní lékařství, Roč. 55, č. 3 (2009)
18. III. PLP/SOP/HEMAT/540/4-09 Oddělení klinické hematologie MNUL
19. SLAVÍK L., KRČOVÁ V., HLOUŠÍ A., PROCHÁZKOVÁ J., ÚLEHLOVÁ J., Molekulární metody v diagnostice trombofilních stavů, Vnitřní lékařství 2009; 55(3) s. 302-309
20. Trombofilní stavy v patogenezi žilní tromboembolické nemoci, Spolek pro trombozu a hemostázu Dostupné z: www.thrombosis.cz
21. VOJÁČEK J., MALÝ M. a kolektiv: Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi, 1. vydání, Grada Praha 2004, s. 276
22. VOKURKA M., CSc., MUDr. HUGO J. a kolektiv: Praktický slovník MEDICÍNY, MAXDORF PRAHA 2000, s. 490
23. ZVÁRA, K.: Biostatistika. 2. vydání, Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2003.
24. www.kzcr.eu
25. Trombofilní stavy v patogenezi žilní tromboembolické nemoci, Spolek pro trombozu a hemostázu Dostupné z: www.thrombosis.cz
26. <http://www.stago-us.com/products-services/news/detail/article/eca-ecarin-chromogenic-assay-3/>
27. http://www.novonordisk.cz/documents/article_page/document/haemophilia.asp
28. <http://www.vseprozdravi.cz/jak-funguji-leciva/leciva-ovlivnujici-krevni-srazlivost.html>
29. <http://www.google.cz/search?q=obr%C3%A1zek+sr%C3%A1%C5%99>
30. <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Angiologie/Antiagregacni-lecba-blokatory-adenosindifosfatoveho-receptoru/8-S-df.magarticle.aspx>
31. <http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.biobran.cz/IMAGES/trombus.jpg&imgrefurl=http://www.biobran.cz/trombosis.html&h=214&w=289&sz=2>