

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Porovnání výsledků koagulačních parametrů
měřených různými metodami – srovnávací studie**

Podnázev: Koagulační faktor VIII

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Ilona Fátorová

Konzultant: RNDr. Petr Sadílek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

Veronika Ježková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala všem, kteří mi nejen pomáhali při vypracování bakalářské práce, ale také mě psychicky podporovali. Především bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Sadílkovi, Ph.D. za čas, odborné rady a celkovou pomoc při tvorbě této práce.

„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, 30. 4. 2014

Podpis:

Obsah

1. Úvod	6
2. Zadání bakalářské práce – cíl práce.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1 Koagulační faktor VIII	8
3.1.1 Charakteristika faktoru VIII	8
3.1.2 Gen faktoru VIII	8
3.1.3 Struktura faktoru VIII.....	9
3.1.4 Biosyntéza faktoru VIII	9
3.1.5 Sekrece faktoru VIII	10
3.1.6 Funkce faktoru VIII	10
3.2 Koagulopatie	11
3.3 Hemofilie.....	12
3.3.1 Definice onemocnění	12
3.3.2 Historie hemofilie.....	12
3.3.3 Klinická klasifikace hemofilie.....	15
3.3.4 Etiopatogeneze onemocnění	16
3.3.5 Diagnostika přenašečství hemofilie A	18
3.3.6 Diagnostika onemocnění.....	19
3.3.7 Léčba hemofilie	20
3.4 Laboratorní stanovení koagulačního faktoru VIII a jeho inhibitoru	22
3.4.1 Laboratorní metody stanovení aktivity faktoru VIII	22
3.4.2 Laboratorní stanovení inhibitoru faktoru VIII	23
4. Praktická část.....	25
4.1 Vyšetřovaný materiál	25
4.2 Automatický koagulometr STA-R Evolution	26
4.3 Použité metody	27
4.3.1 Principy použitých metod	27
4.3.2 Reagencie, jejich příprava a stabilita.....	28
4.3.3 Nastavení přístroje	31
4.4 Kalibrace přístroje a kontrola kvality	33

4.4.1	Kalibrace přístroje	33
4.4.2	Kontrola kvality	36
4.5	Pracovní postup	37
4.6	Výsledky	38
4.7	Hodnocení výsledků	39
6.	Závěr	42
7.	Abstrakt	43
8.	Abstract	45
9.	Použité zkratky	47
10.	Seznam tabulek	49
11.	Seznam obrázků	50
12.	Seznam grafů	51
13.	Použitá literatura	52
14.	Přílohy	55

1. Úvod

Koagulační faktor VIII je z pohledu hemostázy důležitou složkou krve. Jedná se o plazmatický kofaktor, který se podílí na vnitřní cestě přeměny protrombinu na trombin a tím se účastní na zástavě krvácení. Spolu s koagulačním faktorem IX, vápenatými ionty a fosfolipidy vytváří komplex, tzv. vnitřní tenázu, jejíž funkcí je aktivace koagulačního faktoru X. Ten poté spolu s aktivovaným koagulačním faktorem V tvoří komplex, tzv. protrombinázu, jejímž působením dochází k přeměně protrombinu na trombin. Prostřednictvím trombinu následně dochází k přeměně fibrinogenu na fibrin. Ten se stabilizuje aktivovaným faktorem XIII, stává se nerozpustným a vytváří se tak stabilní fibrinová síť, která zpevňuje primární destičkovou zátku.

Nedostatečná syntéza koagulačního faktoru VIII v organismu nebo jeho porušená funkce může vést ke vzniku závažného krvácivého onemocnění nazývaného hemofilie A. Jedná se o poměrně vzácné, gonozomálně dědičné onemocnění, které se v populaci vyskytuje již stovky let. Hemofilii bývají postiženi především muži. U žen se obvykle onemocnění neprojevuje, jsou pouze přenašečkami defektního chromozomu X.

Diagnostika hemofilie A je velmi jednoduchá. Kromě klinických příznaků je důležité správně stanovit především funkční aktivitu koagulačního faktoru VIII, nebo také sílu specifického inhibitoru faktoru VIII, pokud je přítomen.

Faktor VIII lze laboratorně stanovit jako antigen, častěji se ale vyšetřuje jeho funkční aktivita. Rutinní metodou stanovení funkční aktivity faktoru VIII je koagulační metoda, alternativní metodou je v současné době chromogenní metoda. Přestože by obě metody měly poskytovat srovnatelné výsledky, měla by si každá laboratoř před zavedením nové metody do praxe provést srovnávací studii na statisticky významném souboru pacientů.

2. Zadání bakalářské práce – cíl práce

Cílem teoretické části bakalářské práce je poskytnout stručný souhrn informací o koagulačním faktoru VIII, jeho dědičnosti, struktuře, syntéze, sekreci a funkci v organismu. Dále také o onemocnění způsobeném nedostatkem či funkční poruchou koagulačního faktoru VIII - hemofilii A, její historii, klinické klasifikaci, etiopatogenezi, diagnostice a léčbě.

Praktická část si klade za cíl porovnat dvě laboratorní metody stanovení funkční aktivity koagulačního faktoru VIII – metodu koagulační a chromogenní, se zaměřením na jejich princip, stabilitu, přípravu a cenu reagensů, nastavení přístroje, ale především na porovnání výsledků získaných oběma metodami a jejich vzájemnou korelací.

3. TEORETICKÁ ČÁST

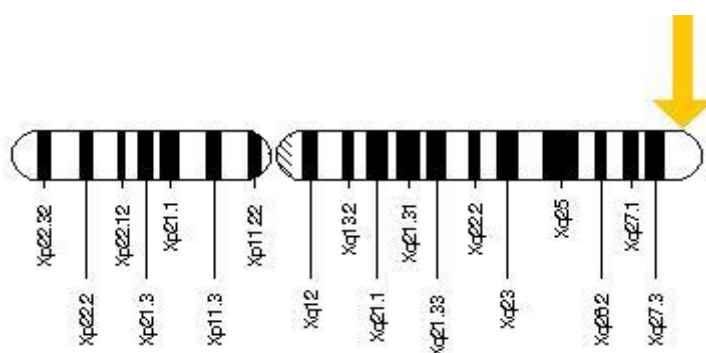
3.1 Koagulační faktor VIII

3.1.1 Charakteristika faktoru VIII

Koagulační faktor VIII (FVIII), též nazývaný jako antihemofilický, je plazmatický glykoprotein o molekulové hmotnosti 200 000 – 300 000 Da a plazmatické koncentraci mezi 100 – 200 ng/ml (1). FVIII se řadí mezi plazmatické koagulační faktory, které se podílejí na krevním srážení. Spolu s faktorem V patří mezi tzv. kofaktory, které nevykazují žádnou enzymatickou aktivitu, ale slouží k výraznému urychlení celého procesu krevního srážení (2). Aby se FVIII mohl tohoto procesu účastnit, musí být nejprve aktivován. Na jeho aktivaci se podílí trombin a aktivovaný faktor X (FXa). Inaktivaci FVIII způsobí především aktivovaný protein C (1).

3.1.2 Gen faktoru VIII

Gen FVIII se nachází na dlouhém raménku chromozomu X v pozici 28 mezi párovými bazemi 154, 835, 787 a 155, 022, 722 (3). Je tvořen více než 180 kilobazemi a je jedním z největších známých lidských genů. Transkripce genu může probíhat i několik hodin za předpokladu, že během jedné sekundy dochází k transkripci 10 nukleotidů. Transkripcí se získá 9-ti kilobazový produkt mRNA (messenger ribonukleová kyselina) (4).



Obrázek 1 Lokalizace genu FVIII na chromozomu X

Zdroj: (3)

Tento gen se skládá z 26 exonů, které kódují polypeptidový řetězec složený z 2351 aminokyselin. 19 aminokyselin z tohoto celkového počtu vytváří signální peptid, zbylých 2332 aminokyselin tvoří samotný protein (4).

3.1.3 Struktura faktoru VIII

Informace o podobě faktoru VIII byly získány jeho strukturální analýzou. Koagulační faktor VIII je tvořen doménami: A1-a1-A2-a2-B-A3-C1-C2 (4). Domény A1, A2 a B tvoří těžký řetězec faktoru VIII, který má molekulovou hmotnost 92 000 – 210 000 Da. Z domén A3, C1 a C2 se skládá lehký řetězec faktoru VIII s molekulovou hmotností 80 000 Da. Oba řetězce se v přítomnosti fosfolipidů spojují přes vápenaté můstky v koagulačně aktivní faktor VIIIa (5).

Domény A jsou svojí strukturou podobné ceruloplasminu a faktoru V. Jsou ohraničeny krátkými sekvencemi, které obsahují zbytky kyseliny asparagové (Asp) a glutamové (Glu). Tyto sekvence se označují jako tzv. kyselé proteiny. Domény C se strukturálně podobají C doménám faktoru V. Doména B má jedinečnou strukturu a nevykazuje žádnou významnou homologii s jiným proteinem (4).

3.1.4 Biosyntéza faktoru VIII

V lidském těle existuje několik typů tkání, které mají schopnost genové exprese faktoru VIII. Mezi hlavní orgány, produkující tento faktor, patří slezina, lymfatické uzliny, játra a ledviny. Byla v nich totiž prokázána přítomnost mRNA faktoru VIII. Transplantačními studiemi na zvířatech trpících hemofilií bylo prokázáno, že orgány jako plíce a slezina pozitivně přispívají k přítomnosti cirkulujícího faktoru VIII v krvi.

Nejvýznamnějším orgánem produkujícím faktor VIII jsou játra. FVIII se tvoří v jaterních buňkách, hepatocytech. Na rozdíl od sinusových jaterních buněk se v hepatocytech vyskytuje mRNA faktoru VIII. Bylo dokázáno, že promotorová část genu FVIII se skládá z elementů, charakteristických pro specifickou hepatocytární expresi. Při imunologicko-ultrastrukturální studii faktoru VIII byl tento protein detekován v hrubém endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu hepatocytů, čímž byla potvrzena jeho syntéza v játrech (4).

3.1.5 Sekrece faktoru VIII

Exprese faktoru VIII je značně omezená z důvodu nízké hladiny mRNA v cytoplasmě a neefektivního transportu primárního produktu translace z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu. V endoplazmatickém retikulu reaguje faktor VIII s řadou chaperonových proteinů. Dochází k interakci např. s kalnexinem, kalreticulinem a imunoglobulinem vázajícím protein (Ig-binding protein) (6).

Podstatná část molekuly faktoru VIII se interakcemi zadržuje v endoplazmatickém retikulu, což je důvod jeho omezeného transportu do Golgiho aparátu (4).

V Golgiho aparátu je faktor VIII dále upravován. Dochází k úpravě N – vázaných oligosacharidů, O – glykosylaci a sulfataci zbytků aminokyseliny tyrosinu (Tyr). Faktor VIII patří mezi proteiny, které podléhají intracelulární proteolýze. K té dochází na doméně B, v oblasti Arg-X-X-Arg. Tato oblast umožňuje proteolýzu na aminokyselině argininu v pozicích - Arg¹³¹³ a Arg¹⁶⁴⁸. Následnou reakcí se naruší kovalentní vazby mezi těžkým a lehkým řetězcem faktoru VIII, což vede ke zvýšení množství heterodimerních molekul cirkulujících v plazmě. Přesto zůstávají oba řetězce faktoru VIII spojeny nekovalentní vazbou pomocí domény A1 a A3. Na této vazbě se podílí kovový ion. V každé molekule faktoru VIII se vyskytuje jedna molekula mědi. Měď ale nedokáže v nepřítomnosti jiných kovových iontů spojit k sobě těžký a lehký řetězec faktoru VIII, proto dochází ke spojení těchto řetězců pomocí vápníku. Ionty mědi zvyšují kofaktorovou funkci faktoru VIII (4).

Po vyplavení faktoru VIII do krve dochází prostřednictvím jeho lehkého řetězce k navázání na von Willebrandův faktor, který ho stabilizuje a chrání před degradací (6).

3.1.6 Funkce faktoru VIII

Hlavní funkcí aktivovaného faktoru VIII (FVIIIa) je jeho účast v hemostáze na přeměně protrombinu na trombin tzv. vnitřní cestou.

Nejprve během iniciační fáze dochází k aktivaci koagulačních faktorů IX a X, poté se vytvoří malé množství trombinu, který aktivuje faktory V, VIII, XI a krevní destičky.

Vnější cestou aktivovaný faktor X nestačí k zabezpečení kompletní hemostázy, tedy k vytvoření dostatečného množství trombinu a následně fibrinu.

Koagulace dále probíhá pouze vnitřní cestou v amplifikační a propagační fázi na povrchu aktivovaných krevních destiček. Aktivovaný faktor IX spolu s aktivovaným faktorem VIII, vápenatými ionty a fosfolipidy tvoří komplex, tzv. vnitřní tenázu. Působením vnitřní tenázy se aktivuje faktor X. Ten dohromady s aktivovaným faktorem V vytváří komplex, tzv. protrombinázu, jejíž funkcí je transformace již dostatečného množství protrombinu na trombin, který následně vyvolá přeměnu fibrinogenu na fibrin. Nakonec dojde k polymeraci vzniklých fibrinových jednotek a jejich stabilizaci působením aktivovaného faktoru XIII. Tím se vytvoří nerozpustná fibrinová síť (5).

3.2 Koagulopatie

Koagulopatie tvoří skupinu onemocnění, která jsou způsobena nízkou koncentrací či aktivitou jednotlivých plazmatických koagulačních faktorů. Při těchto onemocněních se objevují náhlá spontánní krvácení do kůže, tkání a orgánů nebo krvácení neúměrná rozsahu poranění. Rozsah krvácení je závislý na poklesu funkční aktivity daného plazmatického koagulačního faktoru. Nízký pokles může způsobit krvácení např. při chirurgickém výkonu nebo při vážnějším zranění. U výrazného poklesu koagulační aktivity faktoru obvykle dochází k závažným krvácením i při mírném poranění nebo spontánně.

Příčinou koagulopatie může být snížené množství nebo úplná absence jednoho či více plazmatických koagulačních faktorů. Může ji způsobit i přítomnost strukturálně patologických hemokoagulačních faktorů nebo vysoká koncentrace jejich inhibitorů. Koagulopatie dělíme na vrozené a získané.

Vrozené koagulopatie jsou choroby většinou způsobené vrozeným nedostatkem jednoho plazmatického koagulačního faktoru. Řadíme mezi ně hemofilie A a B, které tvoří asi 95 % všech vrozených koagulopatií (5).

V populaci se častěji vyskytují koagulopatie získané. Ty nejsou primárním onemocněním - zpravidla se přidružují k jiné chorobě. Obvykle jsou vyvolány nedostatečným množstvím více koagulačních faktorů najednou (5). Onemocnění, která

tyto koagulopatie vyvolávají, jsou většinou způsobena funkční poruchou jater, střev a žlučníku. Také mohou provázet některé otravy (7). Mohou být způsobeny i poruchami imunity s tvorbou získaného inhibitoru (5).

3.3 Hemofilie

3.3.1 Definice onemocnění

Hemofilie je vzácné dědičné onemocnění a zároveň nejrozšířenější vrozená koagulopatie. Rozdělujeme ji na hemofilii A a B.

Hemofilie A patří mezi nejčtenější dědičné krvácivé choroby - tvoří přibližně 85% všech hemofilií. Způsobuje ji vrozený nedostatek nebo funkční nedostatečnost koagulačního faktoru VIII. Dělíme ji na vrozenou a získanou (5). Snížené množství faktoru VIII v plazmě může být způsobeno vrozenými mutacemi genu pro tento faktor. Ty mohou vést k nedostatečné produkci faktoru VIII, k jeho rychlému odbourávání nebo k jeho defektní funkci. Mezi vrozené mutace související s defektem faktoru VIII dále řadíme mutace genu pro von Willebrandův faktor. Získanou příčinou, vyvolávající nedostatečné množství faktoru VIII, může být přítomnost protilátek proti tomuto faktoru (8).

Hemofilie B vzniká nedostatkem či funkční nedostatečností koagulačního faktoru IX a představuje zhruba 10-12% hemofilií.

Oba typy hemofilie mají shodnou dědičnost i klinické projevy (9).

3.3.2 Historie hemofilie

Onemocnění krve, vyvolaná změnou její srážlivosti, se v populaci vyskytují už od dávných dob.

Již z období starověkého Řecka jsou dochovány spisy, ve kterých je popsána přeměna krve v krevní sraženinu a vylučování žlutého séra při retrakci krevních destiček. Také se v nich píše o bílé fibrinové hmotě, která se neodplaví po opláchnutí krevního koláče vodou. Hippokrates ve svých spisech vysvětluje svoji teorii principu

srážení krve, podle které je příčinou jejího srážení ochlazení ve chvíli, kdy opustila tělo (10).

V průběhu 19. století vědci dospěli k názoru, že na procesu srážení krve se podílí tkáňová tekutina spolu s plazmatickými proteiny a dochází k přeměně fibrinogenu na fibrin za pomoci trombinu. Zlomovým okamžikem bylo zjištění, že krevní srážení nemůže probíhat, chybí-li v krvi kalcium. Na počátku 20. století bylo objasněno přesnější působení kalcia na krevní srážení. Bylo zjištěno, že kalcium se účastní tvorby krevní sraženiny tím, že spolu s trombokinázou přeměňuje protrombin na trombin. Poté se působením vzniklého trombinu fibrinogen přemění na fibrin. V dalších letech se provádělo pozorování lidí, trpících poruchami krevního srážení a byly zavedeny koagulační testy, díky kterým se podařilo objevit jednotlivé krevní proteiny. Bylo zjištěno, že trombokináza je tvořena více proteiny, jejichž společnou funkcí je účast na zahájení tvorby fibrinové zátky. V roce 1943 v norském Oslu Dr. Owren léčil pacientku s poruchou srážlivosti krve a zjistil, že tato žena trpí onemocněním hemostázy, na kterém se nepodílí nedostatek dosud známých koagulačních faktorů - protrombinu, fibrinogenu, kalcia a tkáňové tekutiny, ale jiný, do té doby zcela neznámý faktor. Ten byl později nazván faktor V (10).

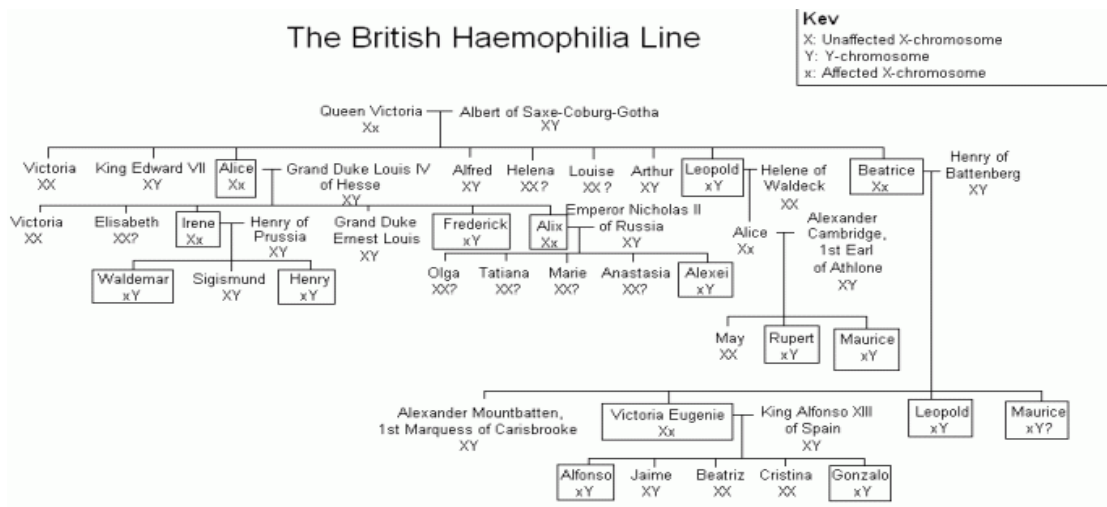
Teprve v první polovině 20. století byla vysvětlena příčina vzniku hemofilie A, a to ve vědecké práci týmu profesora MacFarlane z Oxfordu. Dospěli k závěru, že hemofilie typu A je způsobena nedostatečnou tvorbou koagulačního faktoru VIII. Jejich výzkum tak vytvořil základ substituční léčby tohoto onemocnění (10).

Za historicky nejznámější rodinu, ve které se vyskytovala hemofilie, je považována rodina anglické královny Viktorie (11). Královna Viktorie se narodila v roce 1819. Byla vnučkou Jiřího III. a jediným potomkem vévody Edwarda z Kentu a princezny Viktorie ze Saxe – Coburgu. Korunována byla roku 1837. Tato žena byla královnou Spojeného království Velké Británie a zároveň i matkou devíti dětí. S manželem Albertem zplodili čtyři syny a pět dcer (12). Hemofilikem byl jejich nejmladší syn Leopold. Dcery Alice a Beatrice byly přenašečkami tohoto onemocnění. Leopold se oženil s Helenou z Waldbecku. Ta mu porodila zdravého syna a dceru, přenašečku hemofilie. Té se narodil syn Rupert, trpící hemofilií.

Dcera královny Viktorie, Alice, porodila sedm dětí. Ze sedmi potomků byl hemofilii postižen syn Frederick. Ten ovšem zemřel již ve třech letech. Dcery Alix a Irene byly přenašečkami. Alix se po sňatku s carem Mikulášem II. stala ruskou carevnou. Z jejich dětí byl hemofilikem syn Alexej. Princezna Irene se stala manželkou svému bratranci Jindřichu Pruskému. Narodili se jim tři synové, dva z nich, Waldemar a Jindřich, byli hemofilici (10).

Beatrice, druhá dcera královny Viktorie, se provdala za španělského prince Jindřicha z Battenbergu. Narodily se jim čtyři děti. Dva synové, Leopold a Maurice, byli hemofilici. Dcera Victoria, přenašečka, se vdala za Alfonse XIII. Měli spolu sedm dětí, pět synů a dvě dcery. Synové Gonzalo a Alfonzo trpěli hemofilii.

Za konec šíření hemofilie v těchto královských rodinách se považuje smrt Waldemara, syna princezny Irene, v roce 1945. Jeho smrtí pravděpodobně vymizel hemofilický gen, který se přenášel skoro 100 let a svou existencí zasáhl do dějin Evropy (10).



Obrázek 2 Rodokmen rodiny královny Viktorie

Zdroj: (13)

V minulosti byla hemofilie smrtelným onemocněním. Ještě před čtyřiceti lety umíral vysoký počet nemocných postižených těžkou formou hemofilie v nízkém dětském věku (10). U nemocných dětí často docházelo ke spontánním krvácením do kloubů – zejména kolen, kotníků, loktů a také do svalů (14). To vyvolávalo závažná kloubní postižení a atrofii svalů. Pokroky v medicíně, především objasnění příčiny

vzniku hemofilie typu A, rozvoj transfúzního lékařství a zavedení substituční terapie, vedly ke zkvalitnění a prodloužení života nemocných. Ti se dnes mohou dožívat stejného věku jako zdraví lidé (10).

Substituční terapie spočívala nejprve v podávání čerstvé krve, popřípadě plazmy. Později následovalo podávání nejen čerstvé krve, ale i čerstvě zmražené plazmy a kryoprecipitátu.

Další pokrok v léčbě nemocných přinesla výroba purifikovaných koagulačních proteinů izolovaných z lidské plazmy. Byly vytvořeny velmi čisté produkty zbavené nežádoucích příměsí včetně virů. Léčba hemofilie se tím stala dostupnější a zejména bezpečnější (10).

V důsledku dalšího rozvoje začaly farmaceutické firmy používat k výrobě substitučních preparátů pro léčbu hemofilie metod genového inženýrství. Podařilo se připravit léčebné rekombinantní koagulační faktory, u kterých je téměř nulové riziko přenosu infekce na pacienta (15, 16).

Současné koncentráty pro substituční léčbu se vyrábí lyofilizované. Díky tomu došlo k výraznému rozvoji domácí léčby hemofilických pacientů (10).

3.3.3 Klinická klasifikace hemofilie

Podle stanovení zbytkové aktivity plazmatického koagulačního faktoru rozdělujeme hemofilii A na lehkou, středně těžkou a těžkou formu.

U lehkého stupně hemofilie A se zbytková aktivita FVIII nachází v rozmezí 5 – 25 %. U této formy dochází ke krvácivým stavům jen při vážném zranění, při chirurgickém zákroku nebo při trhání zubů.

Při středně těžkém stupni hemofilie A bývá zbytková aktivita FVIII v rozmezí 1 – 5 %. Tato forma se projevuje náhlým krvácením i při mírném poranění.

Těžký stupeň hemofilie A je charakterizován zbytkovou aktivitou FVIII v rozmezí 0 – 1 %. Vlivem takto výrazného nedostatku FVIII dochází ke spontánním nebo k náhlým krvácením už při drobném poranění. Často se objevuje krvácení do pohybového aparátu, svalů, kloubů, gastrointestinálního traktu a centrálního nervového systému (5).

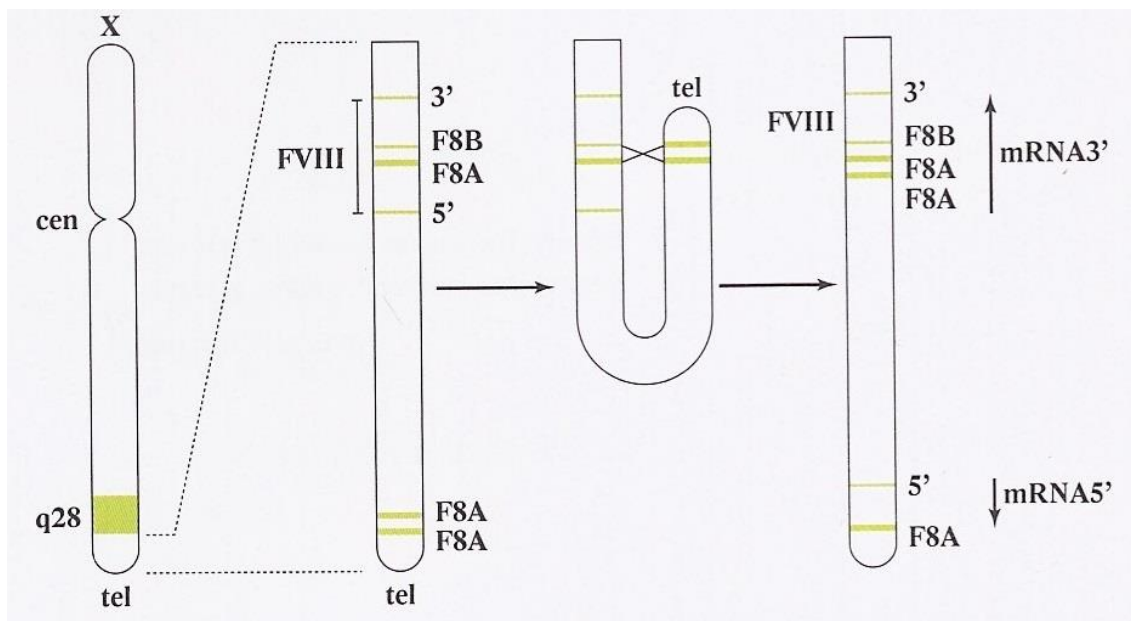
3.3.4 Etiopatogeneze onemocnění

Hemofilie se řadí mezi vrozená gonozomálně dědičná recesivní onemocnění. Dědičnost je vázána na pohlavní chromozom X. Ženy s defektním chromozomem X (X^H), jsou přenašečkami této choroby.

Ze základních pravidel dědičnosti vyplývá, že žena, nesoucí oba zdravé pohlavní chromozomy X (XX) a hemofilický muž, nesoucí defektní pohlavní chromozom X (X^HY), budou mít všechny potomky mužského pohlaví (XY) zdravé. Všichni potomci ženského pohlaví (X^HX) budou přenašečkami. V případě, že je žena přenašečkou mutovaného chromozomu X (X^HX) a muž je nositelem zdravého chromozomu X (XY), je 50 % pravděpodobnost, že jedna část jejich synů (XY) a dcer (XX) bude zdravá. Druhá část synů (X^HY) bude nemocná a druhá část dcer (X^HX) bude přenašečkami. Proto touto chorobou trpí převážně muži (9). U žen, přenašeček tohoto onemocnění, se nemoc projeví jen ve velmi vzácných případech. Nemocná dcera hemofilická by se mohla narodit hemofilickému muži a ženě, která je přenašečkou tohoto onemocnění (17).

Vzhledem k tomu, že hemofilie patří k dědičným chorobám, je vhodné v případě výskytu defektního hemofilického chromozomu X (X^H) zjistit rodinnou anamnézu nemocného. Ta může být u jedné čtvrtiny až jedné třetiny hemofilických pacientů negativní. V případě negativní rodinné anamnézy se předpokládá, že důvodem onemocnění je nově vzniklá mutace na chromozomu X u daného pacienta. Další příčinou negativní rodinné anamnézy může být přenos z generace na generaci v ženské linii, u které se nemoc klinicky neprojeví (9).

Hemofilii způsobují různé genové mutace. Nejvíce se setkáváme s inverzí v intronu 22 a v intronu 1. Dále mezi defekty způsobující toto onemocnění řadíme genové delece, strukturální změny genu a bodové mutace (18).

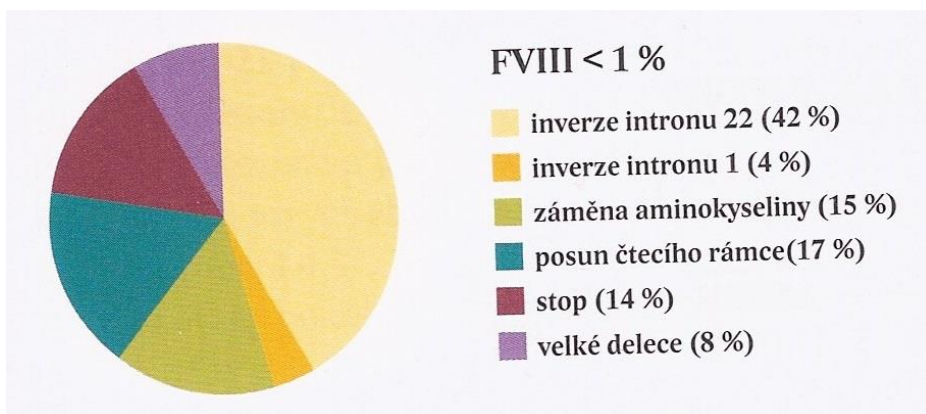


Obrázek 3 Lokalizace mutace v intronu 22

Zdroj: (19)

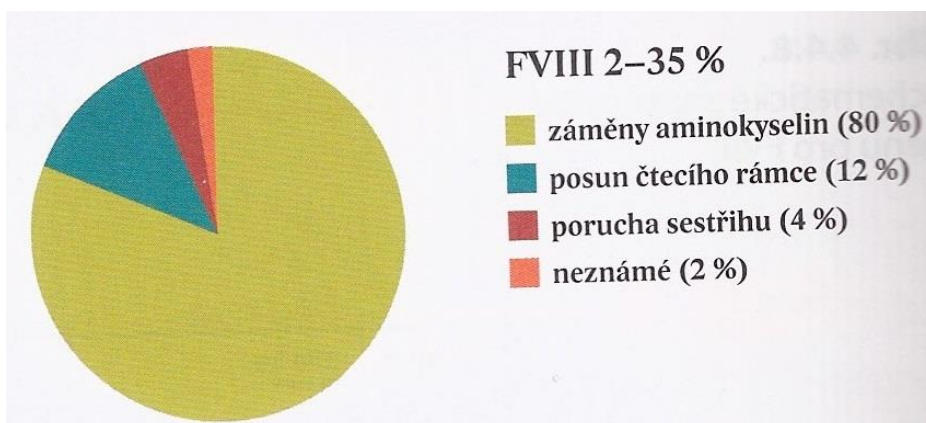
Dosud bylo nalezeno více než deset intronových a exonových polymorfismů a krátkých tandemových repetitivních sekvencí, díky nimž lze nepřímo diagnostikovat hemofilii A. V intronu 22 byly zjištěny dva pseudogeny F8A a F8B. V intronu 1 byla objevena repetitivní oblast, která má svoji kopii extragenově umístěnou 0.1 Mb od genu FVIII (19).

Příčinou mutace, která nejčastěji vyvolává těžkou formu hemofilie A, je genetická vada, vzniklá změnou uspořádání v homologní části intronu 22 nebo intronu 1. Další mutace, způsobující hemofilii A, mohou být bodové mutace, malé inserce, malé a velké delece. Velké delece jsou vzácné. Tyto mutace se mohou vyskytovat po celé délce genu FVIII a většinou bývají specifické pro danou hemofilickou rodinu (20).



Obrázek 4 Typy mutací genu FVIII a jejich zastoupení

Zdroj: (19)



Obrázek 5 Typy mutací genu FVIII a jejich zastoupení

Zdroj: (19)

Mutace ve struktuře genu pro FVIII obvykle nastává u zdravého muže, otce budoucí přenašečky hemofilie, v průběhu meiotické fáze spermatogeneze. Mutacemi dochází k poruše průběhu transkripce, translace nebo ke změně zbytku aminokyselinové skupiny. Důsledkem je pak nedostatečné množství funkčního koagulačního faktoru VIII (19).

3.3.5 Diagnostika přenašečství hemofilie A

Diagnostika přenašečství hemofilie je důležitá u žen, které pocházejí z rodin, kde se toto onemocnění již vyskytuje. Toto vyšetření je důležité zejména pro plánování početí dítěte, pro předporodní testy a také pro samotný porod hemofilického potomka. Přenašečství lze diagnostikovat několika způsoby. Jedním z nich je například

stanovení přenašečství z rodokmenu. To je vhodné provést v situaci, kdy se hemofilickému muži narodila dcera nebo kdy je členem rodiny žena, která je matkou dvou hemofilických synů, a také když se do hemofilické rodiny narodil hemofilický syn (21). Tento způsob stanovení přenašečství se dá aplikovat pouze u nízkého počtu předpokládaných přenašeček, proto se více využívá přímá nebo nepřímá diagnostika přenašečství (19).

Přímou diagnostikou se prokazuje kauzální mutace způsobující hemofilii v dané rodině. Slouží k potvrzení nebo naopak k vyloučení přenašečství u vzdálených rodinných příslušníků nemocného (21). Tato metoda se používá tehdy, jestliže známe příčinu vzniku mutace genu. V rodinách s výskytem hemofilie se doporučuje začít s testováním předpokládaných přenašeček již v dětství, přibližně okolo desátého roku jejich života. Její nevýhodou je časová a technická náročnost (19).

Nepřímá diagnostika je založena na stanovení polymorfních intragenových markerů ve spojení s koagulačním testem. Tento typ stanovení se dá aplikovat až u 85 % vyšetřovaných rodin. Nepřímá diagnostika je na rozdíl od přímé velmi rychlá, proto ji lze použít k diagnostice v počátku těhotenství, kdy je rychlost stanovení velmi důležitá. Nepřímá diagnostika vyžaduje získání genetického materiálu především od hemofilického člena rodiny, a zároveň od více rodinných příslušníků. Metoda má asi 0,1 % riziko vzniku chyby v důsledku přestavby genu (19).

3.3.6 Diagnostika onemocnění

Laboratorní diagnostika hemofilie A je velmi jednoduchá. Základem je rutinní koagulační vyšetření - aktivovaný parciální tromboplastinový test (aPTT). V případě, kdy je u vyšetřovaného pacienta snižená koncentrace FVIII pod 25 %, dochází k prodloužení koagulačního času tohoto testu (9). Pro potvrzení diagnózy se vyšetřuje funkční aktivita faktoru VIII. Také je možné změřit hladinu antigenu faktoru VIII, která informuje pouze o množství koagulačního faktoru v plazmě, ale ne o jeho funkčnosti (22).

K diagnostice lze využít i genetická vyšetření. Ta slouží k odhalení mutací způsobujících hemofilii. Používají se zejména u lidí, kteří trpí těžkou formou hemofilie. Obvykle se u této diagnostiky vyhledává genová inverze v intronu 22 a v intronu 1 (20).

Identifikace obou intronových inverzí je možná pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro spolehlivější nalezení inverze v intronu 22 je vhodné použít diagnostickou metodu Southern blotting. Je-li výsledek testu negativní, je nezbytné prozkoumání celého genu FVIII. Při diagnostice celého genu FVIII se zkoumají i jeho sousední nekódující oblasti. Používá se buď metoda přímé sekvenace nebo skenování s následnou sekvenací genových částí se strukturální odchylkou (18).

K celkovému skenování genu FVIII lze použít řadu metod. Výběr metody závisí především na technické vybavenosti laboratoře (18). Nejvíce se používá identifikační metoda single strand conformation polymorphism (SSCP) a denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) (23).

Metoda SSCP odhaluje polymorfismus v genových úsecích deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a ribonukleové kyseliny (RNA). Vyšetření spočívá v objevení mutací na jednovláknovém řetězci DNA a RNA. Jednovláknový řetězec molekuly DNA získáme denaturací její dvoušroubovice. Detekce mutací se provádí polyakrylamidovou elektroforézou. Využívá se rozdílné pohyblivosti mutovaných a nemutovaných genových sekvencí ve stejnosměrném elektrickém poli. Metoda DGGE je podobná metodě SSCP. Liší se v tom, že elektroforetický děj u DGGE probíhá v prostředí s koncentračním gradientem vytvořeným denaturačním roztokem (18).

Pro stanovení mutací genu FVIII se používá i metoda denaturační vysoce účinné kapalinové chromatografie (dHPLC). Výsledek dHPLC analýzy musí být v případě pozitivního nálezu mutace ověřen sekvenací (18).

Je-li zjištěna nízká aktivita koagulačního FVIII, je ještě zapotřebí potvrdit nepřítomnost inhibitoru FVIII. Též je nutné vyloučit autozomálně dědičné onemocnění – von Willebrandovu chorobu nebo nedostatek několika plazmatických koagulačních faktorů (10). U žen je také třeba vyloučit Turnerův syndrom - syndrom vyvolaný přítomností monozomie 23. chromozomu, tzv. X0 pohlavního chromozomu (18).

3.3.7 Léčba hemofilie

Hemofilie patří mezi onemocnění, která nelze zcela vyléčit. Z tohoto důvodu se používá léčba substituční, nikoliv kauzální. Substituční léčba hemofilie A spočívá v

podávání koncentráту FVIII, který nemocnému člověku v krvi chybí. Terapie by vždy měla být vedena odborným specialistou, nejlépe hematologem z hemofilického centra (17).

Podle typu hemofilie a závažnosti krvácení, které se u daného typu vyskytuje, se stanovuje velikost aplikované dávky koncentrátu FVIII. Předpokládá se, že aplikace jedné jednotky FVIII navýší jeho hladinu v krvi o 1,5 – 2 %. Celková potřebná dávka koncentrátu je závislá na hmotnosti pacienta a vypočítá se podle následujícího vzorce:

$$\text{potřebné množství jednotek FVIII} \\ = (\text{hmotnost pacienta v kg} \times \text{požadovaný vzestup v \%}) \times 0,6$$

(9).

Podávání substitučních preparátů se provádí přibližně 2 – 3x týdně podle pravidelného rozvrhu. Cílem terapie je zabránit krvácení a současně chránit pacienta před vznikem dalších doprovodných poškození, např. pohybového aparátu. Z důvodu vážných projevů onemocnění je pro hemofilického pacienta nutná komplexní péče. Při terapii dochází k propojení léčebných metod oborů ortopedie, rehabilitace, genetiky, stomatologie a psychologie (17).

Podávané koncentráty musí mít přesně definované vlastnosti, aby jejich aplikace byla pro pacienta co nejbezpečnější. Hlavní důraz se klade na jejich stabilitu, čistotu, nepřítomnost jiných proteinů a minimální imunogenost (9).

3.3.7.1 Komplikace léčby

V průběhu léčby může nastat komplikace v podobě výskytu specifického inhibitoru namířeného proti FVIII. To se stává přibližně u 3 – 23 % pacientů trpících těžkým stupněm hemofilie. Po aplikaci léčebného koncentrátu dochází nejčastěji k tvorbě aloprotilátek typu IgG. Ojedinele se objevuje i tvorba autoprotilátek proti FVIII (18).

Přítomností inhibitoru proti FVIII se terapie stává neúčinnou a to i v případě podávání vysokých léčebných dávek. Výskyt protilátek proti FVIII lze potvrdit pomocí testu na principu aPTT, tzv. cirkulujícího antikoagulans. Diagnosticky spolehlivější je vyšetření inhibitoru pomocí Bethesda metody (24), kterou se stanovují tzv. Bethesda jednotky (BU). BU je definována jako množství inhibitoru, které zneutralizuje během

inkubace 50 % plazmatického FVIII (14). Množství inhibitoru se často u pacientů mění a může nabývat i téměř nulové koncentrace. Při podání nové dávky koncentráту jeho hladina zpravidla prudce vzroste (2).

Pacienty s inhibitorem proti FVIII dělíme podle síly inhibitoru a reakce organismu po podání koncentráту FVIII do dvou skupin na tzv. - „low responder“ a „high responder“. „Low responder“ je hemofilik s koncentrací inhibitoru pod 5 BU/ml, „high responder“ má hladinu inhibitoru nad 10 BU/ml (2).

Hemofiliky s inhibitorem proti FVIII je možné léčit rekombinantním faktorem VIIa nebo koncentrovaným aktivovaným protrombinovým komplexem. Snížení koncentrace inhibitoru lze dosáhnout pravidelným podáváním koncentrovaného FVIII spolu s rekombinantním VIIa a léky na potlačení imunity. Novou metodou eliminace inhibitoru je imunoadsorpční metoda založená na principu adsorpce protilátek na protein A – sefarózu (18).

Léčba nemocných s inhibitorem nespočívá pouze v léčbě inhibitoru, ale také v léčbě bolesti, kterou tito pacienti často trpí. Až 70 % pacientů užívá na tlumení bolesti analgetika. Při výběru analgetik je důležité vyvarovat se farmak, které svým účinkem mohou podněcovat tvorbu krvácení, např. léčiva obsahující kyselinu acetylsalicylovou (9).

3.4 Laboratorní stanovení koagulačního faktoru VIII a jeho inhibitoru

Při laboratorním stanovení koagulačního faktoru VIII se obvykle stanovuje jeho funkční aktivita v plazmě. Dále je možné vyšetřit antigen faktoru VIII, což se nejčastěji provádí metodou imunoanalýzy (ELISA) (24). V praxi se ale toto vyšetření příliš nevyužívá (2). U pacientů se specifickým inhibitorem proti faktoru VIII je nutné stanovit jeho koncentraci v Bethesda jednotkách na mililitr plazmy (BU/ml) (24).

3.4.1 Laboratorní metody stanovení aktivity faktoru VIII

Laboratorní stanovení koagulačního faktoru VIII je možné provést několika způsoby. Základní diagnostické metody vyšetření aktivity faktoru VIII jsou založené na koagulačním nebo fotometrickém principu (2). K vyšetření se používá plazma získaná

centrifugací nesrážlivé žilní krve, která byla odebraná do zkumavky s citrátovým antikoagulačním činidlem (25).

Při koagulačním testu se měří čas potřebný k vytvoření fibrinových vláken po aplikaci startovací reagencie do kyvety s vyšetřovaným vzorkem (2). Zředěná plazma stanovovaného vzorku se smíchá s FVIII deficitní plazmou. Jedná se o plazmu, která neobsahuje faktor VIII, ale všechny ostatní koagulační faktory obsahuje v nadbytečném množství. Poté se do směsi přidá aPTT reagencie a nechá se inkubovat při 37 °C. Dále se jako startovací reagencie přidá roztok chloridu vápenatého (CaCl_2) a změří se čas, potřebný k vytvoření prvních fibrinových vláken. Nakonec se aktivita koagulačního faktoru VIII vyjádřená v procentech odečte z kalibrační křivky (8).

Podstatou fotometrických testů je měření změny absorbance v měřící kyvetě obsahující stanovovaný vzorek a přidané reagencie. V kyvetě dochází k rozkladu specifického chromogenního substrátu. Absorbance se měří spektrofotometrem při vhodné vlnové délce, obvykle při 405 nm (2). Při testu dochází k hydrolýze specifického chromogenního substrátu, ze kterého se uvolňuje žlutý paranitroanilin. Hydrolýzu substrátu vyvolá aktivovaný faktor X, jehož aktivace je závislá na aktivitě koagulačního faktoru VIII přítomného ve vyšetřovaném vzorku. Zaznamenává se barevná změna, která nastává štěpením substrátu aktivovaným faktorem X. Následně se odečte aktivita koagulačního faktoru VIII, vyjádřená v procentech, z kalibrační křivky (8).

Oba testy se provádí na automatických koagulometrech. Ty mohou být mechanické nebo fotooptické. Mezi mechanické patří kuličkový nebo háčkový koagulometr. Měření fotooptickými koagulometry jsou nejčastěji založena na turbidimetrickém či nefelometrickém principu (2).

3.4.2 Laboratorní stanovení inhibitoru faktoru VIII

Kromě stanovení funkční aktivity faktoru VIII se v některých případech také stanovuje jeho specifický inhibitor. Jedná se o jeden z nejvíce se vyskytujících získaných inhibitorů koagulačního systému (18). Prvním klíčovým ukazatelem jeho přítomnosti může být prodloužení koagulačního času aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (aPTT).

Při prodloužení aPTT se následně provádí tzv. směsný (korekční) test. Tímto testem se rozliší, zda se jedná o přítomnost inhibitoru nebo o nedostatečné množství či poruchu funkce některého z koagulačních faktorů, účastnících se vnitřní cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin. Při testu se smíchá pacientova plazma s normální plazmou v poměru 1:1. Směs se inkubuje 1 nebo 2 hodiny a poté se vyšetří aPTT (26). V případě, že se ve vyšetřovaném vzorku vyskytuje inhibitor, zůstane aPTT prodloužený. Jestliže je ve vzorku pacientovy plazmy nedostatečné množství některého z koagulačních faktorů, hodnota aPTT se normalizuje, protože se tento deficit zkoriguje faktorem dodaným do směsi z normální plazmy (18). Prodloužení aPTT způsobené přítomností inhibitoru je třeba následně potvrdit. Navíc je nutné rozlišit, zda se jedná o přítomnost specifického inhibitoru proti některému z koagulačních faktorů nebo o nespecifický inhibitor, např. protilátky typu lupus antikoagulans (26).

Po provedení korekčního testu se zpravidla stanovuje aktivita faktoru VIII koagulační nebo chromogenní metodou. Pokud je přítomen specifický inhibitor proti koagulačnímu faktoru FVIII, je funkční aktivita tohoto faktoru snížena z důvodu vyvázání faktoru svým specifickým inhibitorem. V takovém případě se určuje síla inhibitoru, která se obvykle udává v Bethesda jednotkách.

Kvantifikace inhibitoru se provádí nejčastěji Bethesda metodou. Tato metoda stanovuje tzv. zbytkovou aktivitu koagulačního faktoru VIII ve směsích, které obsahují geometrickou řadou nařaděnou plazmu pacienta a normální plazmu v poměru 1:1 po dvouhodinové inkubaci při 37°C. Po inkubaci se vyšetřuje aktivita faktoru VIII v jednotlivých směsích a přepočítává se jeho zbytková aktivita na množství inhibitoru v Bethesda jednotkách (BU) (27). Jedna BU je definována jako takové množství inhibitoru, které sníží aktivitu faktoru VIII během dvou hodinové inkubace na polovinu (28). K důkazu přítomnosti inhibitoru se také používá Nijmegenova modifikace Bethesda metody. Provádí se v případech, kdy je hladina inhibitoru nízká. Modifikace využívá imidazolového pufru, který stabilizuje pH prostředí a tím brání ovlivnění výsledku změnami pH (27).

4. Praktická část

Praktická část bakalářské práce se zabývá vyšetřením funkční aktivity faktoru VIII na souboru pacientů koagulační a chromogenní metodou na mechanickém automatickém koagulometru STA-R Evolution firmy Diagnostica Stago. Rutinní koagulační metoda pracuje na bázi aPTT s přidavkem FVIII deficitní plazmy. Chromogenní metoda využívá set DG-Chrom FVIII firmy Grifols.

Získané naměřené výsledky budeme porovnávat a statisticky vyhodnocovat.

4.1 Vyšetřovaný materiál

V této kapitole jsou stručně popsány podmínky správného odběru materiálu pro vyšetření funkční aktivity faktoru VIII, jeho transport do laboratoře, příprava a skladování materiálu před analýzou a charakteristika vyšetřovaného materiálu.

Pro vyšetření funkční aktivity koagulačního faktoru VIII je důležitý správný odběr krve. Zejména je třeba dodržet správný poměr krve a protisrážlivého činidla. Odebírá se devět dílů žilní krve do umělohmotné zkumavky, v níž je jeden díl 0,109 mol/l (3,2 %) citrátu sodného (31).

Po odběru musí být vzorek co nejrychleji dopraven do laboratoře. Nejdelší akceptovatelná doba transportu jsou dvě hodiny. Během přepravy musí být teplota vzorků udržována v rozmezí 15 – 25 °C. Do laboratoře je materiál dopravován také z externích pracovišť. Z těch může být poslána žilní krev ve zkumavkách nebo zamražená i nezamražená citrátová plazma v mikrozkušavkách. Během transportu zamražené plazmy nesmí dojít k jejímu rozmražení. Nezamražená stažená plazma musí být do laboratoře dopravena nejdéle do třech hodin po odběru. Během transportu je nutné udržovat její teplotu v rozmezí 15 – 25 °C (31).

Před vyšetřením se krevní vzorky deset minut centrifugují při 3500 ot./min. Po centrifugaci se plazma stáhne do plastové mikrozkušavky a buď se okamžitě použije k vyšetření, nebo se zamrazí v hlubokomrazicím boxu na – 70 °C. Jedná se totiž o speciální vyšetření, které se provádí v sériích. Zamraženou plazmu můžeme skladovat po dobu tří měsíců. Před samotným vyšetřením je nutné plazmu rozmrazit při 37 °C a

dalších 15 minut při této teplotě temperovat. Poté je vzorek připravený k vyšetření (31).

V této práci byl vyšetřen soubor 83 pacientů, 46 žen a 37 mužů. Průměrný věk byl 46 let a medián 48 let. Věkové rozmezí se pohybovalo od 5 do 78 let.

4.2 Automatický koagulometr STA-R Evolution

K měření aktivity koagulačního faktoru VIII koagulační i chromogenní metodou jsme použili mechanický automatický koagulometr STA-R Evolution od firmy Diagnostica Stago, umístěný v laboratoři IV. interní hematologické kliniky FN v Hradci Králové.



Obrázek 6 Koagulometr STA-R Evolution

Zdroj: (29)

Tento koagulometr pracuje na koagulačním, spektrofotometrickém a imunturbidimetrickém principu.

Podstatou koagulačního principu je sledování tvorby fibrinového vlákna během aktivace koagulačního děje. K měření se využívá kyveta, v níž se pohybuje kovová

kulička v magnetickém poli. Vlivem probíhajícího koagulačního děje dochází ke změně viskozity reakčního prostředí a tím i ke změně pohybu kuličky v kyvetě. Při definovaném zpomalení pohybu kuličky v kyvetě dojde k zastavení měření koagulačního času.

U spektrofotometrických a imunoturbidimetrických testů se měří změny absorbance monochromatického světla po průchodu kyvetou. Spektrofotometrickým testem se zjišťuje změna absorbance při vlnové délce 405 nm, u imunoturbidimetrického testu při 540 nm (30).

Koagulometr má celkem 220 vyšetřovacích pozic pro vyšetřované vzorky a 75 pozic pro umístění reagensů. Přístroj také obsahuje zásobník na 1000 kyvet, ve kterých se provádějí jednotlivá měření.

Vnitřní prostor přístroje je rozdělen do tří částí. První část slouží k uložení zásobníků na zkumavky, ve druhé jsou umístěny reagensie potřebné k měření. Třetí část je tvořena inkubačními a měřicími jamkami, temperovanými na 37°C (30).

4.3 Použité metody

4.3.1 Principy použitých metod

V této kapitole jsou zmíněny principy použitých metod, použité reagensie, jejich příprava a stabilita a nastavení pipetovacího protokolu v koagulometru.

Koagulační metoda:

Zředěná vyšetřovaná plazma se smísí s FVIII deficitní plazmou. Jedná se o plazmu, ze které byl odstraněn faktor VIII, ale ostatní koagulační faktory obsahuje v nadbytečném množství. Poté se přidá aPTT reagensie se zvýšenou citlivostí ke koagulačním faktorům a směs se 4 minuty inkubuje při 37°C. Reakce se odstartuje přidáním chloridu vápenatého. Měří se koagulační čas, který je přímo úměrný aktivitě faktoru VIII ve vyšetřovaném vzorku plazmy. Z kalibrační křivky se na základě naměřeného koagulačního času odečte hodnota funkční aktivity faktoru VIII v procentech (31).

Chromogenní metoda:

Principem tohoto testu je tvorba komplexu faktoru VIII, přítomném ve vyšetřované plazmě, s přidaným aktivovaným koagulačním faktorem IX. Kromě faktoru IX se do reakce také přidá faktor X, trombin, vápenaté ionty a směs fosfolipidů, v jejichž přítomnosti vzniká komplex, tzv. vnitřní tenáza, který aktivuje koagulační faktor X v reakční směsi. Ten následně štěpí přidaný specifický substrát, ze kterého se odštěpuje paranitroanilin. Množství odštěpeného paranitroanilinu je detekováno jako změna absorbance pomocí spektrofotometru při 405 nm. Podle hodnoty absorbance se z kalibrační křivky odečte funkční aktivita faktoru VIII v procentech (32).

4.3.2 Reagencie, jejich příprava a stabilita

Pro koagulační metodu byly použity tyto reagencie:

Tabulka 1 *Potřebné reagencie pro koagulační metodu*

Reagencie		Výrobce	Šarže	Exspirace
C. K. Prest 5	aPTT reagencie se zvýšenou citlivostí ke koagulačním faktorům	Diagnostica Stago	13003.01	04/2014
DG-FVIII	deficitní plazma	Grifols	12004.01	12/2014
roztok 0,025 M CaCl ₂	startovací reagencie	dodává lékárna FN HK		05/2014
Owren-Kollerův pufr	ředící roztok	Diagnostica Stago	111242	07/2015

Zdroj: vlastní zpracování

Příprava reagensí:

Reagencie DG-FVIII a C. K. Prest 5 se uchovávají v lyofilizované formě a musí se před použitím naředit. Před ředěním je nutné, aby reagencie byly vytemperované na laboratorní teplotu. Owren-Kollerův pufr a roztok CaCl_2 jsou připraveny k použití.

Reagencie DG-FVIII se ředí přidáním 1 ml vody pro injekce. Reagencie C. K. Prest 5 se vytvoří smícháním a následným promícháním reagensí C. K. Prest 5 č. 1 a C. K. Prest 5 č. 2.

Obě lahvičky s naředěnými roztoky se nechají 30 minut stát při laboratorní teplotě a poté se jemně promíchají (31).

Stabilita reagensí:

Tabulka 2 Teplota skladování reagensí pro koagulační metodu a jejich stabilita

Reagencie	Teplota skladování	Stabilita v přístroji
C. K. Prest 5 (naředěný)	15 – 19 °C	24 hodin
FVIII deficitní plazma (naředěná)	15 – 19 °C	8 hodin
Roztok CaCl_2	15 – 19 °C	3 dny
Owren-Kollerův pufr	15 – 19 °C	3 dny

Zdroj: vlastní zpracování

Pro chromogenní metodu byl použit set DG-Chrom FVIII od firmy Grifols, který obsahuje tyto reagensy:

Tabulka 3 Potřebné reagensy pro chromogenní metodu

Reagensy	
DG-FXa Sust	chromogenní substrát obsahující 10 μmol FXa-1 a 0,012 μmol αNAPAP
DG-Phos	reagensy obsahující fosfolipidy a albumin
DG-FIXa/FX	reagensy obsahující FIXa, FX, Ca^{2+} , albumin a trombin
DG-FVIII Dil	ředící imidazolový pufr obsahující chlorid sodný a 0,2% albumin
DG-FVIII Sust Add	reakční pufr obsahující Tris, EDTA a chlorid sodný

Zdroj: vlastní zpracování

Šarže použitého setu DG-Chrom FVIII od firmy Grifols byla 13003.01 s expirací 04/2015.

Příprava reagensů:

Reagensy DG-FXa Sust, DG-Phos a DG-FIXa/FX se musí před použitím naředit 2 ml destilované vody.

Naředěná reagensy DG-FXa Sust se po naředění vodou smíchá s reagensy DG-FVIII Sust Add.

Všechny naředěné reagensy se nechají 10 minut stát při laboratorní teplotě (32).

Stabilita reagensů:

Tabulka 4 Teplota skladování reagensů pro chromogenní metodu a jejich stabilita

Reagencie (rozpuštěné)	Teplota skladování	Stabilita
DG-FXa Sust	20 °C	1 měsíc
Roztok DG-FXa Sust + DG-FXa Sust Add	20 °C	8 hodin
DG-Phos	20 °C	17 hodin
DG-FIXa/FX	20 °C	8 hodin

Zdroj: vlastní zpracování

Jestliže jsou nerozpuštěné reagensy skladovány při teplotě 2 – 8 °C, je jejich stabilita zaručena do data expirace (32).

4.3.3 Nastavení přístroje

Koagulační vyšetření funkční aktivity faktoru VIII na koagulometru STA-R Evolution se provádí metodou VIII G/20. Jestliže je naměřená hodnota aktivity faktoru VIII nad horní hranicí rozsahu metody (200 %), je vhodné pro větší přesnost výsledků vzorek naředit Owren-Kollerovým puřrem např. v poměru 1:1, směs změřit a výslednou hodnotu vynásobit v tomto případě dvěma (31).

Koagulační metoda VIII G/20:

Tabulka 5 Nastavení STA-R Evolution pro metodu VIII G/20

Název metody:	VIII G/20
Testovaná plazma	50 µl
Ředění Owren-Kollerovým pufrem	1/20
DG-FVIII	50 µl
C. K. Prest	50 µl
Inkubace	240 s
0,025 mol/l CaCl ₂	50 µl
Měření koagulačního času	

Zdroj: vlastní zpracování

Fyziologické rozmezí funkční aktivity faktoru VIII je 50 – 150 %. Jestliže je hodnota funkční aktivity faktoru VIII menší než 50 %, musí se vzorek přeměřit metodou VIII G, která se od metody VIII G/20 liší pouze ředěním vyšetřované plazmy. V tomto případě se vzorek v přístroji ředí Owren-Kollerovým pufrem v poměru 1/10 (31).

Pokud je naměřená funkční aktivita faktoru VIII menší než 10 %, vzorek se přeměřuje metodou VIII G/L, což je metoda pro nízké hodnoty aktivity faktoru VIII. Ta se od předchozích dvou metod opět liší pouze ředěním vyšetřované plazmy. V tomto případě se vzorek v přístroji ředí Owren-Kollerovým pufrem v poměru 1/5 (31).

Analyzátor ke každému naměřenému koagulačnímu času odečte z kalibrační křivky příslušnou hodnotu aktivity faktoru VIII v procentech (31).

Vyšetření funkční aktivity faktoru VIII chromogenní metodou na koagulometru STA-R Evolution se provádí metodou CHROM 8.

Chromogenní metoda CHROM 8:

Tabulka 6 Nastavení STA-R Evolution pro chromogenní metodu

Název metody	CHROM 8
Testovaná plazma	25 µl
Ředění DG-FVIII Dil	1/40
DG-Phos	40 µl
Inkubace	0 s
DG-FIXa/FX	40 µl
Inkubace	300 s
DG-FXa Sust	200 µl
Měření absorbance	

Zdroj: vlastní zpracování

Je-li naměřená hodnota aktivity faktoru VIII v rozmezí 0 - 20 %, přístroj vzorek automaticky přeředí a znovu proměří. Místo ředění 1/40 se v tomto případě použije ředění 1/10. Naopak jsou-li naměřené hodnoty aktivity faktoru VIII vyšší než horní hranice rozsahu metody (144 %), je třeba vzorek přeměřit metodou CHROM 8/H, u které je nastavené ředění vzorku 1/80.

Analyzátor ke každé naměřené absorbanci odečte z kalibrační křivky příslušnou hodnotu aktivity faktoru VIII v procentech (32).

4.4 Kalibrace přístroje a kontrola kvality

Před začátkem měření každé série vzorků se přístroj kalibruje a poté se měří kontrola správnosti na dvou atestovaných kontrolních plazmách s rozmezím hodnot deklarovaných výrobcem.

4.4.1 Kalibrace přístroje

Koagulační i chromogenní metodu je nutné před každou sérií vzorků nakalibrovat na kalibrační plazmu s výchozí hodnotou funkční aktivity faktoru VIII uvedenou

výrobce. Zatímco koagulační metoda využívá jednu kalibrační plazmu a k jejímu ředění dochází v přístroji, u chromogenní metody jsou součástí setu čtyři kalibrační standardy. Výsledkem kalibrace je kalibrační křivka, která je u koagulační metody závislostí funkční aktivity FVIII na koagulačním čase a u metody chromogenní závislostí funkční aktivity FVIII na hodnotách absorbance.

U koagulační metody je jedna kalibrační křivka společná pro metody VIII G/20 a VIII G, tedy pro metody měřící aktivitu faktoru VIII v rozsahu od 50 do 200 %. Kalibrační křivka je sestavena ze 4 bodů. Ředění kalibrační plazmy si přístroj provádí sám a to v poměrech: 1/10, 1/30, 1/80 a 1/160. Druhá kalibrační křivka je pro metodu VIII G/L pro měření nízkých hodnot aktivity faktoru VIII. Ředění kalibrační plazmy je v poměrech: 1/20, 1/40, 1/100 a 1/400. Kalibrace obou křivek se provádí pomocí komerční kalibrační plazmy firmy Diagnostica Stago – STA Unicalibrator. Do přístroje se zadává pouze výchozí koncentrace kalibrační plazmy deklarovaná výrobcem. Obě kalibrační křivky jsou čtyřbodové, obě osy jsou logaritmické, závislost je lineární. Po kalibraci se vždy provádí měření kontroly správnosti pomocí atestovaných kontrolních plazem, normální a patologické, s rozmezím deklarovaným výrobcem (31).

Lyofilizovaná kalibrační plazma STA Unicalibrator se před použitím nechá vytemperovat na laboratorní teplotu, naředí se 1 ml vody pro injekce, nechá se 30 minut rozpouštět při laboratorní teplotě a následně se jemně promíchá. Poté se může použít ke kalibraci.

Pro naši kalibraci před měřením jsme použili reagentii STA Unicalibrator od firmy Diagnostica Stago šarže 110665 a expirací 12/2014.

Po kalibraci se provádí kontrolní měření správnosti pomocí kontrolních plazem, normální a patologické (31).

Stabilita kalibrační reagencie:

Tabulka 7 Stabilita kalibrační plazmy pro koagulační metodu

Kalibrační reagencie	Teplota skladování	Stabilita
STA Unicalibrator (naředěný)	15 – 19 °C	4 hodiny

Zdroj: vlastní zpracování

U chromogenní metody je pouze jedna kalibrační křivka pro vyšetřování nízkých, normálních i vysokých hodnot aktivity koagulačního faktoru VIII. Součástí setu jsou čtyři lyofilizované kalibrační standardy DG-FVIII Ref 1-4 s přesně definovanou aktivitou FVIII deklarovanou výrobcem. Kalibrační křivka je čtyřbodová, obě osy jsou lineární, závislost je také lineární. Po kalibraci se vždy provádí měření kontroly správnosti pomocí atestovaných kontrolních plazem, normální a patologické, s rozmezím deklarovaným výrobcem.

Lyofilizované kalibrační standardy DG-FVIII Ref 1 - 4 se před použitím nechají vytemperovat na laboratorní teplotu, naředí se 1 ml vody pro injekce, nechají se 10 minut rozpouštět při laboratorní teplotě a následně se jemně promíchají. Poté se mohou použít ke kalibraci. Každá reagencie je v přístroji naředěna pomocí ředícího pufry v poměru 1/40 (32).

Pro naši kalibraci před měřením jsme použili reagencie DG-FVIII Ref 1 - 4 od firmy Grifols šarže 13003.01 a expirací 04/2015.

Stabilita kalibračních reagencí:

Tabulka 8 Stabilita kalibračních plazem pro chromogenní metodu

Kalibrační reagencie	Teplota skladování	Stabilita
DG-FVIII Ref 1 – 4	20 °C	8 hodin

Zdroj: vlastní zpracování

4.4.2 Kontrola kvality

Vyšetření funkční aktivity koagulačního faktoru VIII se provádí v sériích. Před vyšetřením každé série vzorků se vždy provede měření kontroly správnosti s atestovanými kontrolními plazmami STA System Control N + P od firmy Diagnostica Stago (normální plazma a patologická kontrolní plazma), které mají výrobcem deklarované rozmezí pro funkční aktivitu faktoru VIII.

Před použitím se lyofilizované kontrolní plazmy nechají vytemperovat na laboratorní metodu, naředí se 1 ml vody pro injekce, nechají se 30 minut rozpouštět, jemně se promísí a poté mohou být použity k vyšetření kontroly správnosti. Naměřené hodnoty funkční aktivity faktoru VIII se vždy musí pohybovat ve výrobcem deklarovaném rozmezí. V opačném případě je nutné provést novou kalibraci a kontrolu správnosti zopakovat (31).

4.5 Pracovní postup

- 1) Nejprve jsme si připravili potřebné reagentie k oběma metodám, kalibrační a kontrolní plazmy.
- 2) Naředěné a promíchané reagentie jsme zadali do přístroje, včetně jejich objemu, šarže a doby stability.
- 3) Spustili jsme kalibrace obou metod. Kalibrační křivky si koagulometr vytvoří automaticky. Do přístroje jsme zadali pouze výchozí hodnoty kalibračních plazem, které výrobce uvádí ke každé šarži reagentie.
- 4) Po kalibraci jsme provedli kontrolu správnosti pomocí atestovaných kontrolních plazem STA System Control N + P.
- 5) Poté, co analyzátor změřil kontrolní plazmy a naměřené hodnoty se pohybovaly v předepsaných mezích, jsme vyndali zamražené vzorky z hlubokomrazícího boxu a vložili je do termostatu. V termostatu se vzorky nejen rozmrazily, ale také vytemperovaly na teplotu 37 °C.
- 6) Zkumavky s vyšetřovanou neředěnou plazmou jsme vložili do analyzátoru pod čísla, která jim přiřadil laboratorní informační systém.
- 7) Následně analyzátor provedl změření vzorků. Nejprve koagulační metodou, poté chromogenní metodou.
- 8) Analyzátor zobrazoval na obrazovce přímo hodnotu funkční aktivity koagulačního faktoru VIII v procentech, kterou odečetl z příslušné kalibrační křivky.
- 9) Naměřené hodnoty funkční aktivity faktoru VIII se přenesly do laboratorního informačního systému.
- 10) Naměřené hodnoty jsme zapsali do tabulky a vyhodnotili metodou lineární regrese.

4.6 Výsledky

Výsledky funkční aktivity koagulačního faktoru VIII naměřené na souboru 83 pacientů běžně používanou koagulační metodou a současně chromogenní metodou byly zpracovány do tabulky č. 11 a č. 12.

Soubor pacientů byl vyšetřen ve dvou sériích, ve dnech 11. 3. 2014 a 26. 3. 2014. Pokaždé byly u obou metod provedeny nové kalibrace a změřena kontrola kvality na atestovaných kontrolních plazmách s rozmezím hodnot daných výrobcem.

Pro měření kontroly správnosti jsme použili reagentie STA System Control N + P od firmy Diagnostica Stago šarže 110541 a expirací 02/2015.

Kontrola správnosti:

Tabulka 9 Kontrola správnosti měřená 11. 3. 2014

Datum	Reagencie	Rozmezí	Koagulační metoda	Chromogenní metoda
11. 3. 2014	STA System Control N	70 – 98 %	88 %	74,3 %
11. 3. 2014	STA System Control P	34 – 50 %	44 %	41,6 %

Zdroj: vlastní zpracování

Kontrola správnosti:

Tabulka 10 Kontrola správnosti měřená 26. 3. 2014

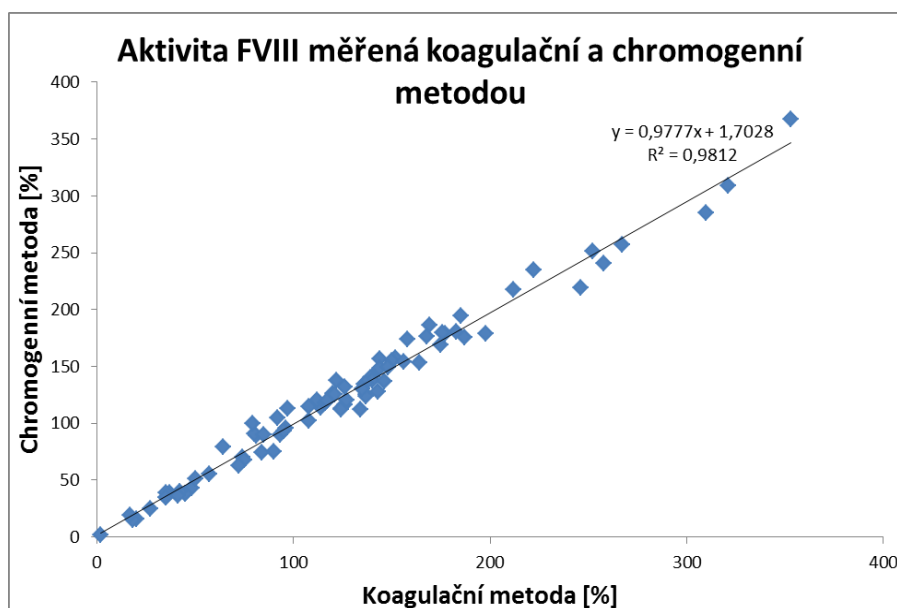
Datum	Reagencie	Rozmezí	Koagulační metoda	Chromogenní metoda
26. 3. 2014	STA System Control N	70 – 98 %	87 %	71,5 %
26. 3. 2014	STA System Control P	34 – 50 %	46 %	38,9 %

Zdroj: vlastní zpracování

4.7 Hodnocení výsledků

Naměřené hodnoty funkční aktivity koagulačního faktoru VIII získané koagulační a současně také chromogenní metodou jsme vzájemně porovnali a statisticky vyhodnotili metodou lineární regrese v programu Microsoft Excel. Korelace výsledků naměřených koagulační a chromogenní metodou je vyjádřena rovnicí přímky a hodnotou korelačního koeficientu r .

Graf 1 Aktivita FVIII měřená koagulační a chromogenní metodou



Zdroj: vlastní zpracování

5. Diskuze

Stanovení koagulačního faktoru VIII patří mezi speciální vyšetření s velkým klinickým významem. Je to dáno tím, že nízké hodnoty faktoru VIII signalizují značné riziko rozvoje krvácení, naopak jeho vysoké hodnoty jsou trombofilním rizikem.

Při vyšetření koagulačního faktoru VIII se v hematologických laboratořích zpravidla stanovuje jeho funkční aktivita. K vyšetření se běžně používá koagulační metoda, alternativou je v současné době chromogenní metoda. Přestože každá z těchto metod pracuje na jiném principu, měly by poskytovat srovnatelné výsledky.

Při zavádění nových metod do praxe by si měla každá laboratoř nejprve provést srovnávací studii s již používanou metodou a vyhodnotit míru korelace výsledků získaných oběma metodami.

V našem případě jsme srovnávali chromogenní metodu stanovení funkční aktivity faktoru VIII s rutinně používanou koagulační metodou na souboru 83 pacientů. Vyšetření oběma metodami byla provedena souběžně.

Hodnoty funkční aktivity faktoru VIII získané oběma metodami jsme vynesli do korelačního grafu. Statistickým vyhodnocením naměřených výsledků metodou lineární regrese se potvrdilo, že srovnávané metody spolu korelují. Korelaci vyjadřuje rovnice regresní přímky: $y = 0,9777x + 1,7028$ a hodnota korelačního koeficientu $r = 0,991$.

Pro dosažení co nejlepšího srovnání obou metod byly kromě plazem „normálního vzhledu“ vyšetřeny také hemolytické, ikterické a chylózní plazmy. Rovněž v tomto souboru vzorků bylo dosaženo dobré korelace naměřených výsledků.

Validovaný rozsah koagulační metody je 0 – 200 % funkční aktivity faktoru VIII, u metody chromogenní 0 – 144 %. V případě měření vzorků s výrazně vyšší aktivitou FVIII sice přístroj prodloužením kalibrační křivky hodnotu odečte, výsledek však může být nepřesný. Pokud je nutné získat co nejpřesnější výsledek, je nejvhodnější naředit vyšetřovaný materiál Owren-Kollerovým pufrům např. v poměru 1:1, směs vyšetřit a výsledek funkční aktivity FVIII poté vynásobit, v našem případě dvěma. Z klinického pohledu však tato nepřesnost u takto vysokých hodnot funkční aktivity FVIII nemá zásadní význam, neboť se v každém případě jedná o významné trombofilní riziko.

Spíše pro zajímavost byly vyšetřeny tři vzorky od pacientů pozitivních na protilátky typu lupus antikoagulans. Snahou bylo prokázat falešně nízké výsledky funkční aktivity faktoru VIII získané koagulační metodou. Toto tvrzení se u těchto tří pacientů prokázalo. Bohužel se ale nejedná o statisticky významný soubor, protože vzhledem k záchytu positivity protilátek typu lupus antikoagulans se nám nepodařilo získat více takových vzorků. Vzhledem k tomu, že se takové výsledky u těchto pacientů očekávaly, nebyly do srovnávací studie zahrnuty.

Vyšetření vzorků od pacientů silně pozitivních na protilátky typu lupus antikoagulans zde zmiňujeme z toho důvodu, že chromogenní metodou se podařilo naměřit pravděpodobně správné hodnoty funkční aktivity faktoru VIII. Koagulační metodou to principiálně nelze. Příčinou prodloužení koagulačního času v systému aPTT je přítomnost protilátky typu lupus antikoagulans, nikoliv snížená funkční aktivita faktoru VIII. Proto jsme koagulační metodou naměřili falešně nízké hodnoty funkční aktivity faktoru VIII.

6. Závěr

V teoretické části bakalářské práce byly stručně podány základní informace o struktuře, syntéze, sekreci, funkci a dědičnosti koagulačního faktoru VIII a také popsáno krvácivé onemocnění způsobené jeho nedostatkem nebo funkční poruchou – hemofilie A. Byly zde shrnuty i současné možnosti laboratorního stanovení tohoto koagulačního faktoru, včetně jeho specifického inhibitoru.

V praktické části jsme se zaměřili na porovnání dvou v současné době dostupných laboratorních metod, které se používají ke stanovení funkční aktivity koagulačního faktoru VIII. Porovnávali jsme výsledky naměřené na souboru pacientů běžně používanou koagulační metodou na bázi aPTT s přidavkem deficitní plazmy a chromogenní metodou s použitím setu DG-Chrom FVIII firmy Grifols.

Statistickým vyhodnocením naměřených výsledků metodou lineární regrese jsme dospěli k závěru, že srovnávané metody spolu korelují (rovnice přímky $y = 0,9777x + 1,7028$; hodnota korelačního koeficientu $r = 0,991$)

K vyšetření funkční aktivity koagulačního faktoru VIII je chromogenní metoda vhodnou alternativou koagulační metody. To se potvrdilo nejen na vzorcích plazmy „normálního vzhledu“, ale také na vzorcích hemolytických, ikterických a chylózních plazem.

Použití chromogenní metody pro stanovení funkční aktivity faktoru VIII je výhodné zejména u pacientů s protilátkami typu lupus antikoagulans. V ostatních případech bychom doporučili dále používat pro stanovení funkční aktivity faktoru VIII koagulační metodu, která je i finančně méně náročná.

7. Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce se zabývá problematikou laboratorního stanovení funkční aktivity koagulačního faktoru VIII, jednoho z koagulačních faktorů podílejících se na zástavě krvácení, jehož deficit či funkční nedostatečnost vede k závažnému krvácivému onemocnění – hemofilii A.

Teoretická část práce si klade za cíl vytvořit stručný přehled informací o koagulačním faktoru VIII – o jeho dědičnosti, struktuře, biosyntéze, sekreci a funkci v organismu. Dále pak popisuje hemofilii A, onemocnění způsobené nedostatečnou syntézou, funkčním defektem či přítomností inhibitoru proti koagulačnímu faktoru VIII. Popsána je zde historie tohoto onemocnění, klinická klasifikace, etiopatogeneze, diagnostika a léčba. V poslední části jsou popsány laboratorní metody stanovení koagulačního faktoru VIII a jeho specifického inhibitoru.

Praktická část se zabývá stanovením funkční aktivity koagulačního faktoru VIII běžně používanou koagulační metodou a současně také chromogenní metodou. Jejím cílem je naměřené výsledky vzájemně porovnat a statisticky vyhodnotit.

Studie byla provedena na mechanickém automatickém koagulometru STA-R Evolution firmy Diagnostica Stago. Do vyšetřovaného souboru byly zařazeny vzorky od 83 nemocných. Pro co nejlepší porovnání metod byly vybrány nejen vzorky plazmy „normálního vzhledu“, ale také vzorky hemolytických, ikterických a chylózních plazem. Ke statistickému hodnocení naměřených výsledků byla použita metoda lineární regrese. Naměřené hodnoty aktivity faktoru VIII koagulační a chromogenní metodou spolu velmi dobře korelují (rovnice přímky $y = 0,9777x + 1,7028$; $r = 0,991$). Na několika pacientech pozitivních na protilátky typu lupus antikoagulans byl pomocí chromogenní metody prokázán falešně nízký výsledek funkční aktivity faktoru VIII získaný koagulační metodou.

Chromogenní metoda k vyšetřování funkční aktivity koagulačního faktoru VIII je vhodnou alternativou koagulační metody. Lze s ní vyšetřovat i vzorky hemolytické, ikterické a chylózní, aniž by byl výsledek výrazně ovlivněn. Vyšetření chromogenní metodou je oproti koagulační metodě dražší. S výhodou se ale může použít u pacientů pozitivních na protilátky typu lupus antikoagulans.

Klíčová slova: koagulační faktor VIII, hemofilie A, stanovení funkční aktivity faktoru VIII

8. Abstract

The present thesis deals with the laboratory determination of the functional activity of coagulation factor VIII. It is one of the coagulation factors involved in hemostasis. Its deficit or functional deficiency leads to a severe bleeding disorder – haemophilia A.

The aim of the theoretical part of this thesis is to create a brief overview of the coagulation factor VIII – heredity, structure, biosynthesis, secretion and function in the organism. It also describes haemophilia A, which is a disorder caused by a lack of synthesis, functional defects or the presence of inhibitors against the coagulation factor VIII. The history of the disease, clinical classification, etiopathogenesis, diagnosis and treatment are described in this part. Laboratory methods for determination of coagulation factor VIII and its specific inhibitor are described in the last part.

The practical part deals with the determination of the functional activity of the coagulation factor VIII by the commonly used coagulant method and also by the chromogenic method. The aim is to compare the results and evaluate them statistically.

The study was performed on the mechanical automatic coagulometer STA-R Evolution from the company Diagnostica Stago. Samples from 83 patients were included in the examined group. Not only plasma samples of “normal appearance” but also hemolytic, icteric and chylous plasma samples were selected for the best comparison of methods. The method of linear regression was used for the statistical evaluation of measured results. The measured values of activity of the factor VIII by the coagulant and chromogenic methods correlate very well together (equation of line $y = 0,9777x + 1,7028$; $r = 0,991$). A falsely low result of the functional activity of the factor VIII was detected on a few patients who were positive for antibodies lupus anticoagulant. It was the coagulant method which showed this low result.

The chromogenic method is a suitable alternative for the coagulant method to investigate the functional activity of the coagulation factor VIII. It is possible to investigate hemolytic, icteric and chylous samples without a significantly affected result. The investigation by the chromogenic method is more expensive than by the

coagulant method but the advantage of the chromogenic method is that it can be used for patients who are positive for antibodies lupus anticoagulant.

Keywords: coagulation factor VIII, haemophilia A, determination of the functional activity of factor VIII

9. Použité zkratky

ΔA	změna absorpance
$^{\circ}C$	stupeň Celsia
μl	mikrolitr
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
BU	Bethesda jednotka
$CaCl_2$	chlorid vápenatý
Da	dalton – atomová hmotnostní konstanta
DGGE	denaturant gradient gel electrophoresis
dHPLC	denaturing high pressure liquid chromatography
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay
FN	fakultní nemocnice
FVIII	koagulační faktor VIII
FVIIIa	aktivovaný koagulační faktor VIII
FXa	aktivovaný koagulační faktor X
Glu	kyselina glutamová
HK	Hradec Králové
IgG	imunoglobulin typu G
Mb	megabaze
ml	mililitr
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
ng	nanogram

nm	nanometr
ot.	otáčky
PCR	polymerase chain reaction
pH	potenciál vodíku
RNA	ribonukleová kyselina
s	sekunda
SSCP	single strand conformation polymorfism
Tyr	tyrosin
X^H	defektní hemofilický chromozom X
X^HX	žena s defektním chromozomem X
X^HY	muž s defektním chromozomem X
XO	žena s monosomií ženského pohlavního chromozomu
XX	zdravá žena
XY	zdravý muž

10. Seznam tabulek

Tabulka 1 Potřebné reagensie pro koagulační metodu	28
Tabulka 2 Teplota skladování reagensí pro koagulační metodu a jejich stabilita.....	29
Tabulka 3 Potřebné reagensie pro chromogenní metodu.....	30
Tabulka 4 Teplota skladování reagensí pro chromogenní metodu a jejich stabilita	31
Tabulka 5 Nastavení STA-R Evolution pro metodu VIII G/20	32
Tabulka 6 Nastavení STA-R Evolution pro chromogenní metodu.....	33
Tabulka 7 Stabilita kalibrační plazmy pro koagulační metodu.....	35
Tabulka 8 Stabilita kalibračních plazem pro chromogenní metodu	35
Tabulka 9 Kontrola správnosti měřená 11. 3. 2014	38
Tabulka 10 Kontrola správnosti měřená 26. 3. 2014	39
Tabulka 11 Vzorky vyšetřované 11. 3. a 26. 3. 2014	56
Tabulka 12 Vzorky vyšetřované 26. 3. 2014 u pacientů s lupus antikoagulans	60

11. Seznam obrázků

Obrázek 1 Lokalizace genu FVIII na chromozomu X.....	8
Obrázek 2 Rodokmen rodiny královny Viktorie	14
Obrázek 3 Lokalizace mutace v intronu 22	17
Obrázek 4 Typy mutací genu FVIII a jejich zastoupení.....	18
Obrázek 5 Typy mutací genu FVIII a jejich zastoupení.....	18
Obrázek 6 Koagulometr STA-R Evolution.....	26
Obrázek 7 Kalibrační křivka koagulační metody stanovení aktivity FVIII	55
Obrázek 8 Kalibrační křivka chromogenní metody stanovení aktivity FVIII.....	55

12. Seznam grafů

Graf 1 Aktivita FVIII měřená koagulační a chromogenní metodou..... 39

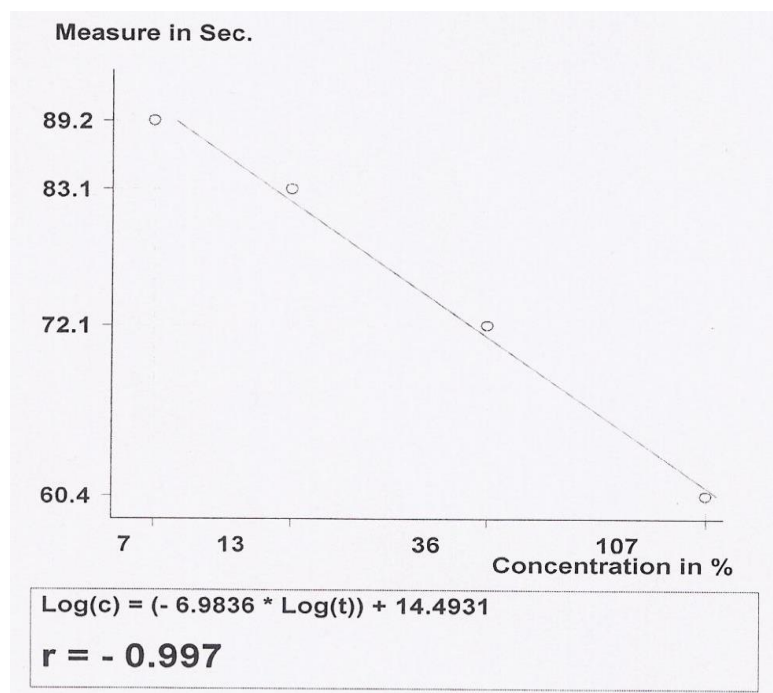
13. Použitá literatura

1. CHAVIN, Stephen I. Factor VIII: structure and function in blood clotting. *American journal of hematology* [online]. 1984, roč. 16, č. 3, s. 297-306 [cit. 2014-04-10]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6424437> Abstrakt databáze PubMed
2. MATÝŠKOVÁ, Miloslava, ZAVŘELOVÁ, Jiřina a HRACHOVINOVÁ, Ingrid. *Hematologie pro zdravotní laboranty: 2. díl Krevní srážení*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999, 203 s. ISBN 80-7013-278-7.
3. Genetics Home Reference: Your Guide to Understanding Genetic Conditions. *Genetics Home Reference: Your Guide to Understanding Genetic Conditions* [online]. 2010 [cit. 2014-03-15]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/F8>
4. LENTING, Peter J., VAN MOURIK, Jan A. a MERTENS, Koen. The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function. *Blood* [online]. 1998, č. 11, s. 3983-3996 [cit. 2014-03-07]. Dostupné z: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/92/11/3983.full.html>
5. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie hemostázy*. Český Těšín: FINIDR, s. r. o., 2004, 237 s. ISBN 80-86682-03-X.
6. KAUFMAN, Robert J., PIPE, Steven W. a TAGLIAVACCA, Luigina. Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* [online]. 1997, roč. 8, č. 2, s. 3-14 [cit. 2014-03-12]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607108> Abstrakt databáze PubMed
7. NAVRÁTIL, Leoš a KOLEKTIV. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha 7: Grada Publishing, a. s., 2008, 424 s. ISBN 978-80-247-2319-8.
8. PROKOPOVÁ, Jitka. Současné vyšetřovací metody používané k diagnóze hemofilie. In: *Český národní hemofilický program* [online]. 2011 [cit. 2014-02-21]. Dostupné z: <http://cnhp.registry.cz/res/file/seminare/2011-03-29-pelhrimov/soucasne-vysetrovaci-metody-pouzivane-k-diagnoze-hemofilie.pdf>
9. PENKA, Miroslav, BULIKOVÁ, Alena, MATÝŠKOVÁ, Miloslava a ZAVŘELOVÁ, Jiřina. *Hematologie I: Neonkologická hematologie*. Praha 7: Grada Publishing, spol. s. r. o., 2001, 201 s. ISBN 80-247-0023-9.
10. JONES, Peter. *Život s hemofilí*. Praha: Český svaz hemofiliků, 2007, 224 s. ISBN 978-80-239-9850-4.
11. Co zabíjelo panovníky Evropy?. *Magazín 2000 záhad* [online]. © 2014 [cit. 2014-02-25]. Dostupné z: http://www.magazin2000.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=393%3Adna&catid=38%3Aislo-152012&Itemid=17

12. Viktorie: britská královna a indická císařovna. *Panovnici* [online]. © 2014 [cit. 2014-02-15]. Dostupné z: <http://www.panovnici.cz/viktorie>
13. Haemophilia family tree. *Wikipedia: The Free Encyclopedia* [online]. 2005 [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Haemophilia_family_tree.GIF
14. SMEJKAL, Petr. Hemofilie. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2012, roč. 14, č. 11, s. 432-436 [cit. 2014-03-19]. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/11/08.pdf>
15. BLATNÝ, Jan, HRACHOVINOVÁ, Ingrid, HRDLIČKOVÁ, Radomíra, KOMRSKA, Vladimír, PENKA, Miroslav, SALAJ, Peter a SMEJKAL, Petr. Diagnostika a léčba hemofilie. *Český národní hemofilický program* [online]. 2012, č. 1, s. 1-25 [cit. 2014-03-26]. Dostupné z: <http://cnhp.registry.cz/res/file/konference/2012/diagnostika-lecba-hemofilie.pdf>
16. Hemofilie. *Baxter* [online]. © 2014 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: http://www.baxter.cz/pro_odborniky_ve_zdravotnictvi/hemofilie/index.html
17. Český svaz hemofiliků: Přenos. *Český svaz hemofiliků* [online]. © 2012 [cit. 2014-03-19]. Dostupné z: <http://www.hemofilici.cz/index.php/cs/accordion-b/prenos-hemo>
18. PENKA, Miroslav, BULIKOVÁ, Alena a KOLEKTIV. *Neonkologická hematologie*. 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Praha 7: Grada Publishing, a. s., 2009, 240 s. ISBN 978-80-247-2299-3.
19. POSPÍŠILOVÁ, Šárka, DVOŘÁKOVÁ, Dana, MAYER, Jiří, ET. AL. *Molekulární hematologie*. Praha 5: Galén, 2013, 316 s. ISBN 978-80-7262-942-8.
20. HABART, David. Molekulární diagnostika hemofilie A v klinické praxi. *Časopis lékařů českých* [online]. 2005, roč. 144, č. 12, s. 795-800 [cit. 2014-03-15]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/pdf?id=3460>
21. SEEMANOVÁ, Eva. Indikace a principy molekulárně-genetického vyšetření. *Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál 2. lékařské fakulty* [online]. 2009, roč. 61, 7-8, s. 434-439 [cit. 2014-03-14]. Dostupné z: <http://mefanet-motol.cuni.cz/clanky.php?aid=265>
22. APTT. *Lab Tests Online* [online]. © 2001 - 2010 [cit. 2014-03-28]. Dostupné z: <http://www.labtestsonline.cz/tests/aPTT.html?tab=3>
23. Stručný teoretický úvod do molekulární genetiky a jejích metod. *Gyn - test: laboratorní testy pro gynekologii, genetiku a IVF* [online]. © 2009 - 2014 [cit. 2014-03-18]. Dostupné z: <http://www.gyn-test.cz/testy-uvod-do-molekularni-genetiky/#htm-prima-diagnostika-nezname-mutace>

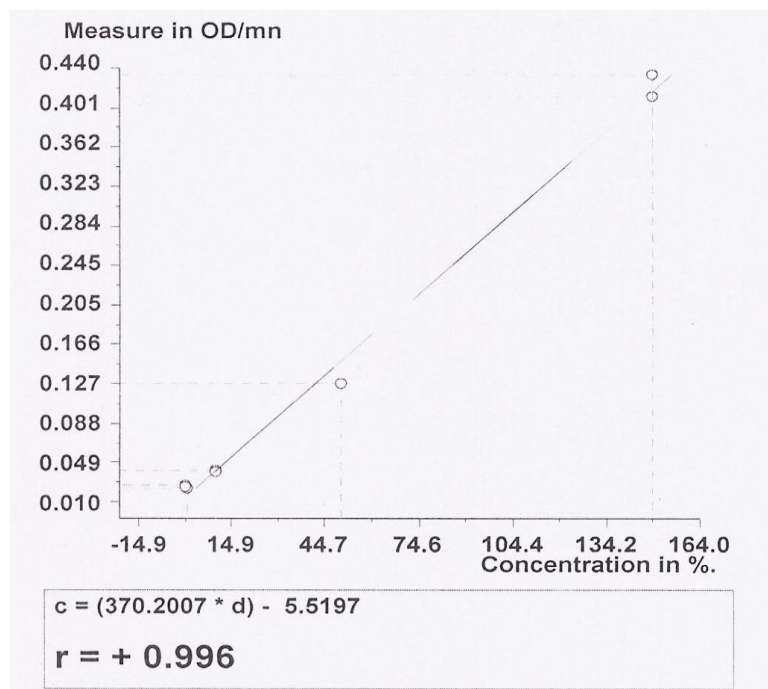
24. CHLUMSKÝ, Jaromír a KOLEKTIV. *Antikoagulační léčba* [online]. Praha: Grada Publishing s. r. o., 2005, 219 s. [cit. 2014-03-24]. ISBN 80-247-9061-0. Dostupné z: http://books.google.cz/books?id=whpgAgAAQBAJ&pg=PA59&lpg=PA59&dq=stanoven%C3%AD+antigenu+faktoru+viii&source=bl&ots=l4Bz_QX9P7&sig=fDahbJgd7xu-SHWfblIHUSegZd0&hl=cs&sa=X&ei=Ksk1U-2Al87A7AbctoCABw&ved=0CDoQ6AEwAw#v=onepage&q=stanoven%C3%AD%20antigenu%20faktoru%20viii&f=false
25. KRAHULCOVÁ, Eva, MATÝŠKOVÁ, Miloslava a PENKA, Miroslav. *Hematologie pro zdravotní sestry na transfúzních odděleních*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996, 131 s. ISBN 80-7013-214-0.
26. Podrobná charakteristika onemocnění: Laboratorní diagnóza. *Měníme možnosti péče o pacienty s hemofilii* [online]. 2013 [cit. 2014-03-19]. Dostupné z: <http://www.novoseven.cz/proHCP/labdiagnoza.html>
27. PENKA, Miroslav, TESAŘOVÁ, Eva a KOLEKTIV. *Hematologie a transfúzní lékařství I: Hematologie*. Praha: Grada Publishing, a. s., 2011, 488s. ISBN 978-80-247-3459-0.
28. LIBIGER, Jiří a VAŠKOVÁ, Alena. Diagnostika a vyšetření při hemofilii. In: *Český národní hemofilický program* [online]. 2011 [cit. 2014-03-17]. Dostupné z: <http://cnhp.registry.cz/res/file/seminare/2011-06-08-usti-nad-labem/diagnostika-vysetreni-pri-hemofilii.pdf>
29. *Manutál k přístroji STA-R Evolution*, Diagnostica Stago.
30. Standardní operační postup technický (SOPT) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 001 *Návod na obsluhu STA-R*. verze 05 – 2013, s. 1-15.
31. Standardní operační postup (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 011 *Faktor VIII*. verze 06 – 2013, s. 1-7.
32. *Příbalový leták setu DG-Chrom FVIII*, Grifols.

14. Přílohy



Obrázek 7 Kalibrační křivka koagulační metody stanovení aktivity FVIII

Zdroj: vlastní zpracování



Obrázek 8 Kalibrační křivka chromogenní metody stanovení aktivity FVIII

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 11 Vzorky vyšetřované 11. 3. a 26. 3. 2014

Vzorek č.	Koagulační metoda [%]	Chromogenní metoda [%]
1	140	141,0
2	139	140,0
3	114	113,8
4	140	137,8
5	177	179,2
6	96	96,0
7	20	16,0
8	1,6	1,6
9	18	14,8
10	45	37,9
11	42	39,9
12	35	34,5
13	48	42,6
14	112	120,5
15	108	102,1
16	116	117,9
17	74	70,5
18	169	186,2

Vzorek č.	Koagulační metoda [%]	Chromogenní metoda [%]
19	222	235,0
20	252	251,2
21	183	180,8
22	267	257,0
23	353	367,0
24	212	217,8
25	152	157,8
26	246	219,0
27	136	134,2
28	258	241,0
29	144	156,2
30	198	179,2
31	158	174,0
32	144	148,4
33	122	138,0
34	81	89,1
35	64	79,0
36	92	105,0
37	80	91,0

Vzorek č.	Koagulační metoda [%]	Chromogenní metoda [%]
38	90	75,2
39	126	116,0
40	150	155,1
41	126	132,2
42	168	176,4
43	156	154,1
44	137	135,0
45	148	149,2
46	164	153,2
47	79	99,4
48	310	285,4
49	75	67,3
50	72	62,5
51	124	112,8
52	137	125,6
53	120	126,4
54	134	111,8
55	175	169,3
56	146	136,7

Vzorek č.	Koagulační metoda [%]	Chromogenní metoda [%]
57	137	123,9
58	185	194,1
59	124	112,5
60	143	127,8
61	176	180,0
62	321	309,3
63	127	120,1
64	108	115,0
65	93	90,1
66	135	130,0
67	187	175,4
68	37	39,2
69	121	125,1
70	117	119,3
71	57	55,1
72	35	39,0
73	97	113,0
74	45	37,9
75	42	39,9

Vzorek č.	Koagulační metoda [%]	Chromogenní metoda [%]
76	35	34,5
77	41	36,6
78	50	51,0
79	17	19,3
80	27	25,0
81	85	90,1
82	95	93,3
83	84	74,6

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 12 Vzorky vyšetřované 26. 3. 2014 u pacientů s lupus antikoagulans

Vzorek č. u pacienta s lupus antikoagulans	Koagulační metoda [%]	Chromogenní metoda [%]
1	14	212,2
2	7	56,7
3	70	137,2

Zdroj: vlastní zpracování