Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicíně
Fyziologie a patofyziologie člověka

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Ivana Malíková

Generace trombinu u patofyziologických stavů

Thrombin generation in pathophysiological conditions

Dizertační práce

Školitel: doc. MUDr. Tomáš Kvasnička, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 9.2.2024

Ivana Malíková

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. MUDr. Tomáši Kvasničkovi, CSc. za jeho odborné vedení, pomoc a připomínky při psaní této práce.

Dále bych chtěla velmi poděkovat panu prof. MUDr. Janu Kvasničkovi, DrSc. za možnost věnovat se této tématice a za jeho cenné rady při řešení tématu.

Velký dík patří panu prim. MUDr. Martinu Špačkovi, PhD. za jeho podporu a spolupráci.

Také bych ráda poděkovala všem kolegům z Centrálních hematologických laboratoří a Trombotického centra ÚLBLD za dlouhodobou spolupráci, zejména pak Mgr. Martině Husákové, Ing. Janě Bílkové a RNDr. Martinu Řádkovi, PhD., bez jejichž pomoci a podpory by tato práce nemohla vzniknout.

V neposlední řadě bych velmi ráda poděkovala svým dcerám Lence a Michaele za pomoc a podporu nejen při psaní této práce a také neteři Kristýně Anně Korčákové za animace modelu hemostázy.

Identifikační záznam:

MALÍKOVÁ, Ivana. *Generace trombinu u patofyziologických stavů. [Thrombin generation in pathophysiological conditions]*. Praha, 2024. 110 s., 3 příl. Dizertační práce (PhD.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Školitel Kvasnička, Tomáš.

Abstrakt

Úvod: Trombofilní stavy mohou být provázeny zvýšenou generací trombinu, zvláště pak v těhotenství, kdy nárůst generace trombinu vyplývá z řady změn v hemostatickém systému. Při podávání antikoagulační léčby je žádoucí nárůst generace trombinu snížit.

Cíle studie: Jedním z cílů naší studie bylo porovnat generaci trombinu u jedinců s prokázanou mutací faktoru V Leiden a jedinců se zvýšenou hladinou faktoru VIII. Dalším úkolem bylo porovnat pacienty s VTE s prokázanou mutací faktoru V Leiden (nebo bez ní) a užívající rozdílnou antikoagulační léčbu. Posledním cílem bylo posoudit generaci trombinu u těhotných žen a jejich odpovědi na podávání LMWH při závažném trombofilním stavu.

Soubor pacientů a metody: Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 170 zdravých dárců krve, do skupiny vrozené a získané trombofilie bylo zahrnuto 44 jedinců s mutací faktoru V Leiden a 38 jedinců s hladinou faktoru VIII >150 % bez další prokázané trombofilie. Do skupiny s antikoagulační léčbou bylo zařazeno 347 jedinců s VTE užívajících přímé inhibitory koagulace. Do skupiny těhotných žen bylo zařazeno 60 žen s profylaktickou dávkou LMWH. Pro sledování generace trombinu jsme použili kit Technothrombin® TGA RC Low a RC High a analyzátor Ceveron® Alpha.

Výsledky: Zvýšená generace trombinu byla nalezena u skupiny s vysokým faktorem VIII v porovnání se skupinou s mutací FV Leiden. U skupiny užívající přímé inhibitory koagulace byla míra snížení generace trombinu podle typu léku a lišila se v minimu a maximu léčebného účinku. Nebyl nalezen významný rozdíl v odpovědi na léčbu mezi skupinami FV Leiden negativní a FV Leiden pozitivní. Rovněž nebyla nalezena vysoká korelace mezi hladinou užívaného léku a mírou snížení generace trombinu. U těhotných s trombofilním rizikem byla významně zvýšena generace trombinu a tyto ženy odpovídaly na profylaktické dávky nízkomolekulárního heparinu menším snížením generace trombinu, než byl předpoklad.

Závěr: Trombofilní stavy spojené s rizikem žilního tromboembolismu by bylo vhodné doplnit sledováním generace trombinu, zvláště pak v případech, kdy vzniká podezření na neúčinnost antikoagulační léčby. Důsledné sledování generace trombinu u těhotných s trombofilním rizikem může zlepšit celkový stav těhotných a kvalitu péče o ně.

Klíčová slova: trombofilie, trombin, generace trombinu, nízkomolekulární heparin, přímé inhibitory koagulace

Abstract

Introduction: Thrombophilic conditions may be accompanied by increased thrombin generation (TG), especially during pregnancy when the increase in thrombin generation results from a series of changes in the haemostatic system. During administration of anticoagulant treatment, it is desirable to reduce the increase in thrombin generation.

Aims of the study: The first aim of our study was to compare TG in individuals with a proven factor V Leiden mutation and individuals with elevated levels of factor VIII. Another aim was to compare patients with VTE and also with or without proven FV Leiden mutation that are taking different anticoagulation treatments. The final aim was to assess thrombin generation in pregnant women and their response to LMWH administration during severe thrombophilic conditions.

Group of patients and methods: There were included 170 healthy blood donors in the control group, the congenital and acquired thrombophilia group included 44 individuals with FV Leiden mutation and 38 individuals with factor VIII level >150 % without other proven thrombophilia. 347 subjects with VTE taking direct coagulation inhibitors were included in the anticoagulation group. Sixty women with a prophylactic dose of LMWH were included in the group of pregnant women. Kit Technothrombin® TGA RC Low and RC High and analyser Ceveron® Alpha were used to monitor the thrombin generation.

Results: Increased TG was found in the group with high factor VIII compared to the FV Leiden mutation group. In the group taking direct coagulation inhibitor, the rate of reduction in TG varied by drug type and differed in the minimum and maximum therapeutic effect. No significant difference in treatment response was found between FV Leiden negative and FV Leiden positive groups. No high correlation was also found between the level of used drug and the degree of reduction in thrombin generation. TG was significantly increased in pregnant women at thrombophilic risk and these women responded to prophylactic doses of LMWH with lesser reduction in thrombin generation than predicted.

Conclusion: Thrombophilic conditions associated with the risk of VTE should be accompanied with the monitoring of thrombin generation, especially in cases where the ineffectiveness of anticoagulant treatment is suspected. Consistent monitoring of TG in pregnant women at thrombophilic risk can improve the general condition of pregnant women and the quality of their care.

Key words: thrombophilia, thrombin, thrombin generation (TG), low molecular weight heparin (LMWH), direct coagulation inhibitors

Obsah

1 Úvod 10
1.1 Fyziologie hemostázy 10
1.1.1 Systém koagulačních inhibitorů 13
1.1.2 Fibrinolytický systém 14
1.1.3 Hemostáza v těhotenství 14
1.2 Patologie hemostázy 15
1.2.1 Koagulopatie a krvácivé stavy 15
1.2.2 Trombotické stavy 15
1.2.3 Trombofilie 16
2 Trombin a jeho generace 19
2.1 Stavba trombinu 19
2.2 Funkce trombinu 20
2.3 Trombin generační čas 21
2.4 Klinické a laboratorní využití generace trombinu 23
2.4.1 Hypokoagulační stavy 23
2.4.2 Generace trombinu u trombotických stavů 24
2.4.3 Monitorování antikoagulační léčby 25
3 Hypotéza a cíle práce 28
3.1 Hypotézy 28
3.2 Cíle práce 28
4 Metody 30
4.1 Soubor pacientů a kontrolních skupin 30
4.1.1 Kontrolní skupina zdravých jedinců 30
4.1.2 Skupina vrozené a získané trombofilie 30
4.1.3 Skupina užívající přímé inhibitory koagulace 30
4.1.4 Těhotné ženy s profylaxí LMWH 31

4.2 Laboratorní metody 31
4.2.1 Laboratorní metody skupiny vrozené a získané trombofilie 32
4.2.2 Laboratorní metody skupiny užívající přímé inhibitory koagulace 32
4.2.3 Laboratorní metody skupiny těhotných žen s profylaxí LMWH 33
4.3 Normální hodnoty laboratoře 34
4.4 Statistická analýza dat 34
5 Výsledky 35
5.1 Výsledky laboratorních vyšetření skupiny vrozené a získané trombofilie 35
5.2 Výsledky skupiny laboratorních vyšetření skupiny užívající přímé inhibitory koagulace 42
5.2.1 Dabigatran 42
5.2.2 Rivaroxaban 51
5.2.3 Apixaban 60
5.2.4 Edoxaban 69
5.3 Výsledky laboratorních vyšetření skupiny těhotných žen s profylaxí LMWH 79
6 Diskuze 84
6.1 Skupina vrozené a získané trombofilie 84
6.2 Skupina užívající přímé inhibitory koagulace 85
6.3 Skupina těhotných žen s profylaxí LMWH 87
7 Závěr 90
7.1 Závěr skupiny vrozené a získané trombofilie 90
7.2 Závěr skupiny užívající přímé inhibitory koagulace 90
7.3 Závěr skupiny těhotných žen s profylaxí LMWH 91
7.4 Souhrn závěrů 91
8 Dedikace 92
9 Seznam použité literatury 93
10 Seznam publikací 99

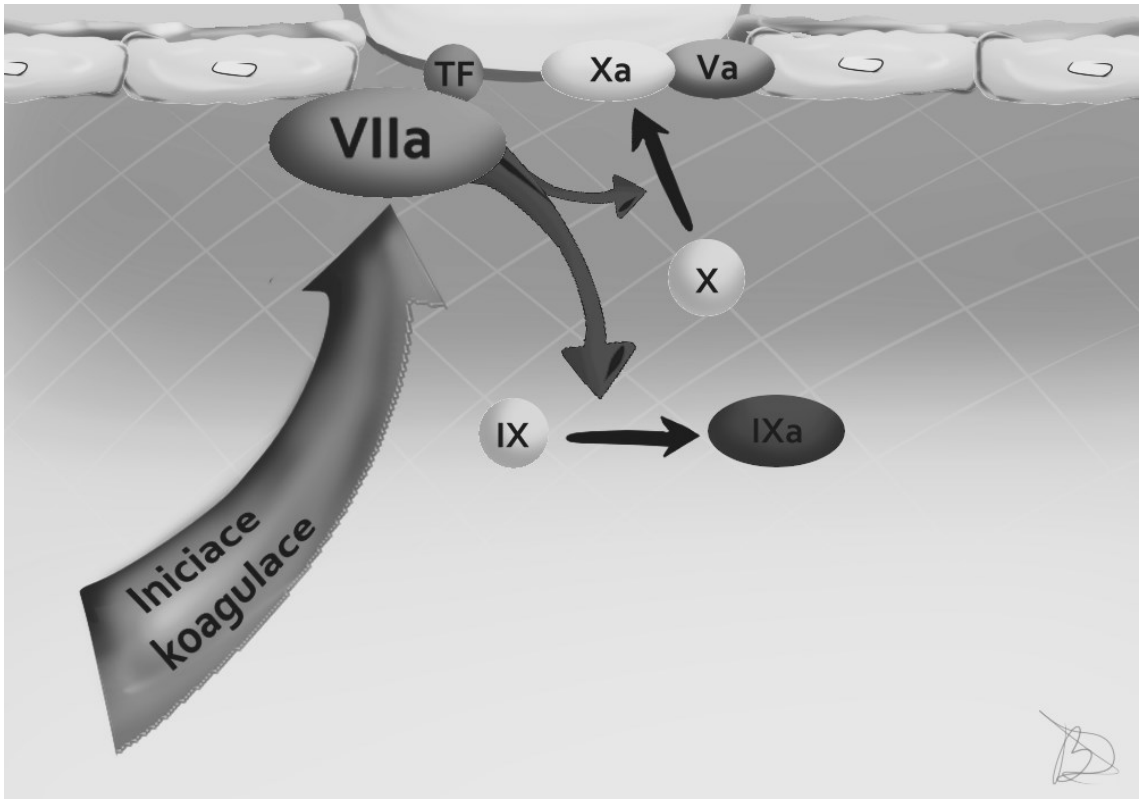
10.1 Publikace ve vztahu k dizertaci 99
10.2 Publikace bez vztahu k dizertaci 100
11 Seznam použitých zkratek 102
12 Seznam tabulek, grafů a obrázků 105
12.1 Seznam tabulek 105
12.2 Seznam grafů 107
12.3 Seznam obrázků 109
13 Seznam příloh 110

1 Úvod

Hemostáza je fyziologický proces, který udržuje tok krve, a chrání tak organismus před ztrátou krve po poranění cévní stěny. (Kvasnička 2003) Vyvážená a dobře fungující hemostáza je závislá na vzájemném fungování koagulačních faktorů a zároveň na činnosti inhibitorů koagulace a fibrinolytickém systému.

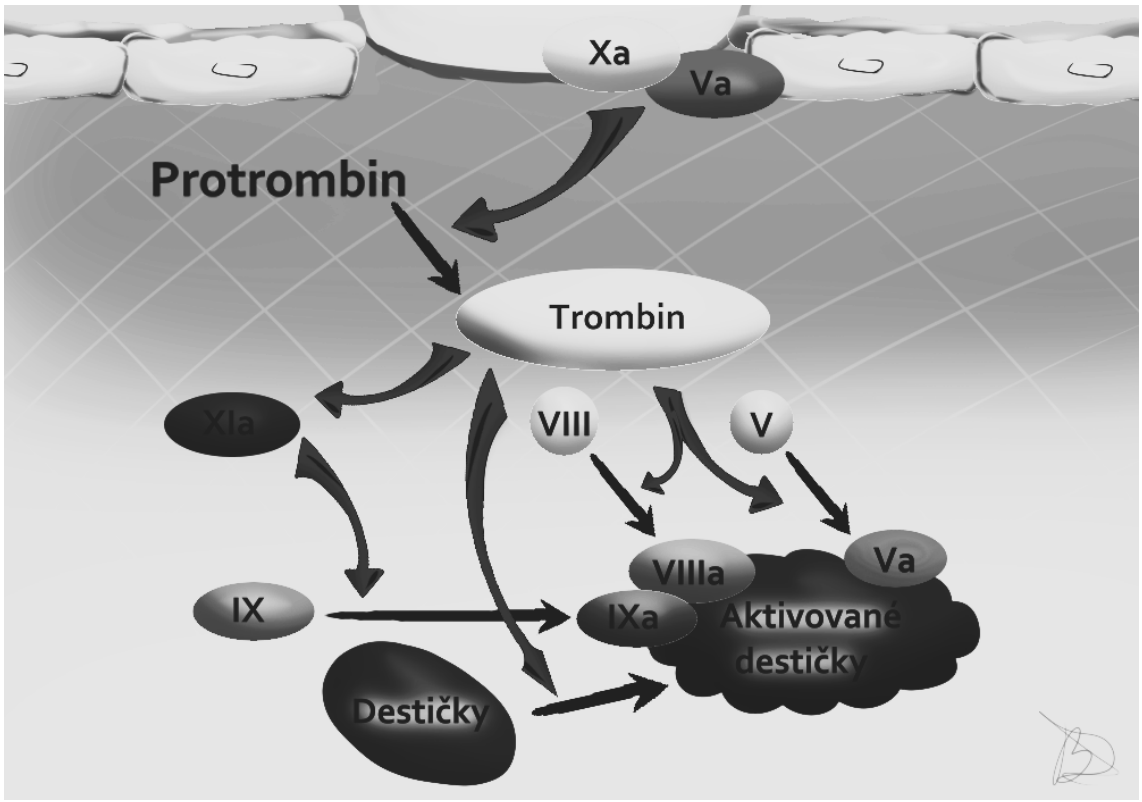
1.1 Fyziologie hemostázy

Na základě mnohaletých výzkumů bylo potvrzeno, že procesy hemostázy neexistují odděleně, ale vzájemně spolu interagují a probíhají zároveň. Průběh koagulační kaskády je v současné době popisován třemi fázemi: iniciací, amplifikací a propagací. Hlavním iniciátorem koagulačního děje je tkáňový faktor. Výsledkem iniciace je malé množství trombinu, které je ale dostatečné k pokračování amplifikace a propagační fáze.



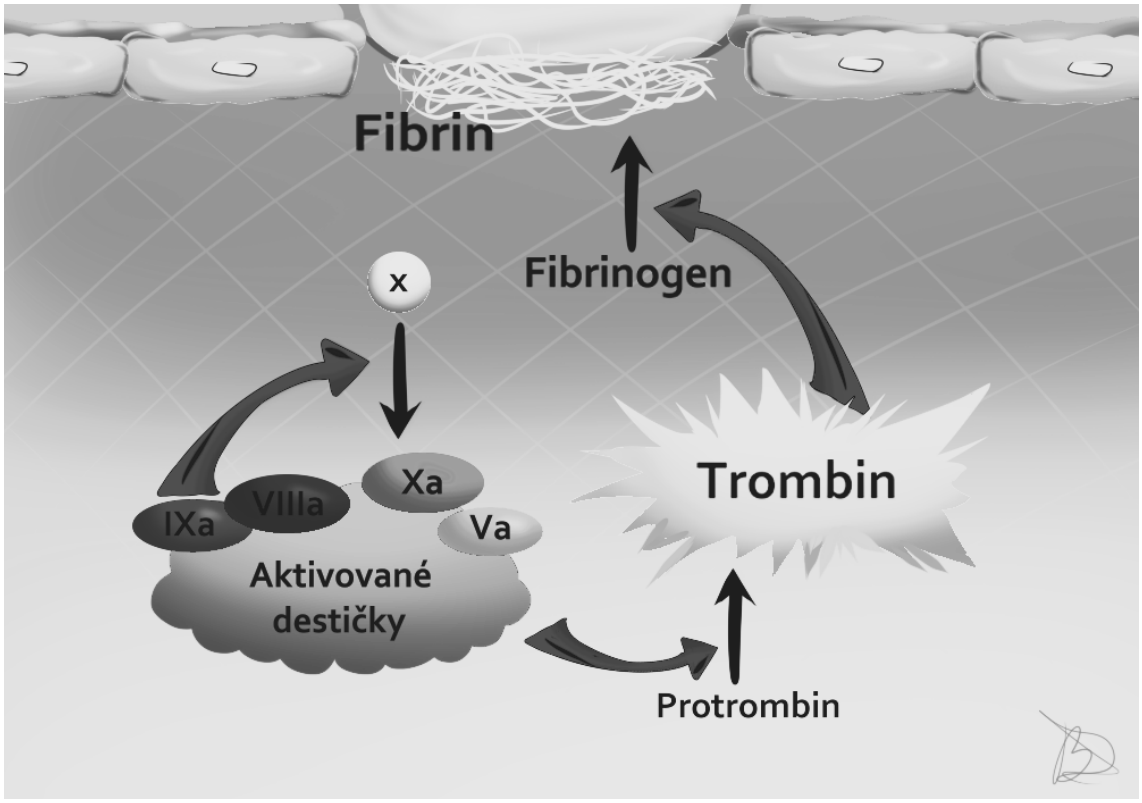
Obrázek 1 Schéma iniciace

Za fyziologických podmínek oddělují TF od cirkulace jak endotelová bariéra (subendotelová a perivaskulární složka), tak i mechanismy selektivní exprese (cévní složka TF). Buňky (endotelie, krevní elementy) exprimují TF až po stimulaci. Pokud nedojde k přímému poškození cévního systému, probíhá exprese TF hlavně na aktivovaných monocytech. (Osterrud et Bjorkif, 2001). Faktor VIIa se váže k membránovému TF na povrchu buněk za vzniku dimerního komplexu [TF. VIIa]. Při vazbě F VIIa na TF dochází současně k přenosu aktivačního signálu do buňky. Zvyšuje se koncentrace vápníku, aktivují se proteinové kinázy C a adhezivní kinázy, a to se projeví vznikem komplexu TF.FVIIa.Ca.Pl. (Preissner et Kanse, 1996). Takto aktivované monocyty jsou nejúčinnějším spouštěčem koagulace. TF se může přímo vázat na FVIIa i na FVII. Komplex TF a FVIIa společně s vápníkem a fosfolipidy aktivuje FIX. Tento faktor tvoří s FVIIIa, FX tzv. vnitřní tenázu. V systému vnější tenázy aktivuje komplex TF. FVIIa faktor X. FXa se na membráně aktivovaných monocytů váže do komplexu protrombinázy a v této formě generuje malé množství trombinu, který aktivuje faktory V, VIII, XI a krevní destičky.



Obrázek 2 Schéma amplifikace

V této fázi dochází k vyvázání aktivovaných faktorů na povrch aktivovaných destiček, které jsou soustředěné v místě poranění, a interakci destičkových receptorů s trombinem. Trombinem aktivované FVIIIa, Va a IXa se váží na fosfolipidy, které se dostaly na povrch membrány destiček pomocí tzv. flip-flop fenoménu. Uvedené aktivované faktory spolu s FXIa urychlují koagulační proces.



Obrázek 3 Schéma propagace

Dva komplexy vytvořené za přítomnosti Ca^{2+} na negativně nabitém povrchu destiček mají důležitou funkci. Tenázový komplex FVIIIa + FXa je důležitý pro rychlé generování faktoru Xa a protrombinázový komplex FVa + FXa pro rychlé vytvoření aktivního trombinu. Trombin je klíčový enzym celé hemostázy, protože ovlivňuje koagulační i inhibiční procesy a také fibrinolytické a antifibrinolytické systémy. Je jediným koagulačním enzymem, který je schopen štěpit fibrinogen na fibrinové monomery, které polymerizují do stabilního fibrinu.

1.1.1 Systém koagulačních inhibitorů

Trombin, který vzniká po celou dobu srážení krve, musí být po skončení tohoto procesu rychle vyvázán, aby srážení nepokračovalo. Inhibici nepodléhá jen trombin, ale i ostatní složky krevního srážení. Inhibitory tohoto systému jsou obsaženy v plazmě v malém množství.

Největší uplatnění v koagulačním systému mají inhibitory antitrombin (AT) a α2-makroglobulin (α2M). Oba se v plazmě vyskytují v poměrně vysoké koncentraci. AT společně s kofaktorem heparinu II odpovídají za 80 % koagulační aktivity.

Antitrombin je nejvýznamnějším inhibitorem serinových proteáz. Jeho hlavní funkcí je vyvázání trombinu a plazmatických proteáz za vzniku komplexu, který je odbouráván v monocytomakrofágovém systému (MFS). Vznik tohoto komplexu může být urychlen navázáním heparinu nebo proteoglykanů z endotelových buněk. Na antitrombin se ale vážou jen ty hepariny, které mají sekvenci pentasacharidu. Tato vazba je reverzibilní. (Kvasnička 2003)

Heparinový kofaktor II (HC II) je jednořetězcový glykoprotein inhibující serinové proteázy. Vyskytuje se hlavně na cévním endotelu a má pouze lokální význam. Vzniká v játrech a je také syntetizován endotelovými buňkami. Aktivita tohoto kofaktoru je výhradně namířena proti trombinu. Má uplatnění v inhibici trombinu až při poklesu hladiny AT pod 30 %. (Penka and Tesařová 2011)

Protein C (PC) spolu s antitrombinem a inhibitorem tkáňového faktoru (TFPI) představuje nejúčinnější inhibiční systém hemostázy. K jeho aktivaci dochází na povrchu cévních endotelií, kde je navázán trombomodulin. Vazba trombinu s trombomodulinem umožňuje aktivaci PC. Aktivní forma PC se za pomoci fosfolipidů a Ca^{2+} štěpí a tím inaktivuje FVa a FVIIIa.

Protein S má inhibiční aktivitu nezávislou na aktivovaném proteinu C (APC). Inhibuje protrombinázu přímou inhibicí FXa a dále také inhibuje v přítomnosti fosfolipidů aktivaci FX vazbou na FVIII.

Inhibitor zevního systému aktivace hemostázy (TFPI) přímo inhibuje FXa a reakce je urychlována heparinem. Působení TFPI je důležitá negativní zpětná vazba v hemostatickém systému, která zabraňuje její nadměrné aktivaci.

1.1.2 Fibrinolytický systém

Fibrinolytický systém je aktivován současně s aktivací hemostázy a tvorbou trombinu. Proces fibrinolýzy je pomalejší ve srovnání s koagulační kaskádou. Hlavní funkcí fibrinolytického systému je odstranění krevní sraženiny a obnovení průtoku krve. Jedná se o složitou síť aktivátorů a inhibitorů propojenou množstvím vazeb, které zajišťují regulaci rovnováhy v systému. Hlavním enzymem fibrinolytického systému je plazmin, který vzniká aktivací plazminogenu. Jeho úkolem je rozpuštění krevní sraženiny. Aktivovaná forma FXII, t-PA a u-PA se podílejí na přeměně plazminogenu na plazmin. Inhibitory PAI a α2-antiplazmin kontrolují a regulují fibrinolýzu. (Kvasnička 2003, Penka and Tesařová 2011) Zvýšení fibrinolytických schopností může vést ke krvácení a snížení může vyvolat trombotické stavy. (Dulíček 2022)

1.1.3 Hemostáza v těhotenství

Těhotenství, které probíhá fyziologicky, je vlivem trombogeneze doprovázeno řadou změn v hemostatickém systému. Dochází k vzestupu hladin koagulačních faktorů, zejména pak fibrinogenu, faktoru VIII, VII a V a von Willebrandova faktoru. Aktivita proteinu S je snížená a projevuje se i nižší účinek aktivovaného proteinu C způsobený vyšší aktivitou protrombinu. Zároveň dochází ke zvýšení koncentrace inhibitorů fibrinolýzy PAI-1 a PAI-2 (inhibitory aktivátoru plazminogenu) a TAFI (trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy). (Kvasnička 2003) Tyto prokoagulační změny se mohou projevit zvýšenou generací trombinu.

Pokud je těhotenství patologické např. z důvodu pozitivní trombofilní rodinné anamnézy, může být doprovázeno ještě vyššími hodnotami faktorů nebo neodpovídající reakcí na profylaktické dávky antikoagulační léčby. (Hathaway 1991, Brenner 2004, Bleker, Buchmüller et al. 2016)

1.2 Patologie hemostázy

Poruchy krevního srážení mohou být provázeny krvácivými stavy – hypokoagulace nebo naopak zvýšeným sklonem ke krevnímu srážení – hyperkoagulace. Stavy spojené s poruchami krevního srážení mohou být vrozené nebo získané.

1.2.1 Koagulopatie a krvácivé stavy

Jedná se o hypokoagulační poruchy primární nebo sekundární hemostázy nebo kombinované stavy. Ke krvácivému stavu tedy dochází při porušení některého z mechanismů hemostatické rovnováhy. Klinicky se projevují spontánními krvácivými příznaky, charakterem typickým pro danou poruchu, při závažnějším nebo protrahovaném průběhu se vyvine anemie.

U chorob s poruchou primární hemostázy se jedná o defekt v procesu tvorby primární hemostatické zátky buď na straně cévní nebo trombocytů, případně kombinovanou poruchu.

U koagulopatií je krvácivý stav způsobený sníženou koncentrací nebo sníženou aktivitou daného koagulačního faktoru (popřípadě celou řadou faktorů). Koagulační poruchy vznikají tedy důsledkem poruchy koagulační kaskády z důvodu vrozených nebo získaných poruch či působením vnějších vlivů (např. léků), které ovlivňují plazmatický koagulační systém. (Dempfle 2004, Tripodi and Mannucci 2011, Choi and Vogel 2014, Cohen and Christie 2017)

1.2.2 Trombotické stavy

Vznik trombu byl poprvé uceleně popsán v roce 1856, kdy profesor Virchow postuloval tři hlavní faktory, které přispívají ke vzniku trombu, poruchu krevního toku, postižení cévní stěny a hyperkoagulaci. Koncepce Virchowovy triády se v zásadě uplatňuje dodnes. Naproti tomu trombotické stavy jsou patofyziologické stavy, při kterých může docházet k uvolnění trombů neboli embolů, což může v konečném důsledku vést až k tromboembolické příhodě. Podle místa vzniku rozlišujeme trombózy žilní a arteriální. (Kvasnička 2003)

Žilní tromboembolizmus představuje jednu z nejčastějších příčin kardiovaskulárních úmrtí po infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhodě. Situaci zhoršuje i druhotný tromboembolizmus, který roste se zvyšujícím se počtem nádorových

onemocnění, či masové rozšíření některých protrombofilních medikací (např. hormonální antikoncepce) bez vyšetření tendence k hyperkoagulaci.

Na příčině vzniku žilní trombózy se z Virchowova trias podílejí především dva faktory, tj. zpomalení až zástava žilního průtoku (stáza) a hyperkoagulace, tedy neregulovaná aktivace koagulačního systému. Stagnací průtoku krve dochází k lokálnímu navýšení koncentrace koagulačních plazmatických faktorů a leukocytů, které začnou uvolňovat zánětlivé cytokiny, což přispívá k protrombotické aktivaci žilní výstelky. Tento proces vede až k hyperkoagulaci, která je způsobena jednak selháním inhibitorů koagulace a nedostatečnou funkcí fibrinolytického systému a zároveň také zvýšenou prokoagulační aktivitou v krvi. Změnou stavu žilního endotelu na prozánětlivý a protrombotický dojde k neregulované aktivaci koagulačního systému. (Kvasnička 2003)

Arteriální trombóza neboli aterotrombóza je v současné době jedna z nejčastějších chorob vedoucích k úmrtí, která navíc významně zhoršuje prognózu pacienta na přežití. Tento patologický proces postihuje velké a střední arterie, přičemž klinicky se projevuje především jako akutní koronární syndrom, cévní mozková nebo jiná cévní příhoda. (Kvasnička 2012)

Z hlediska klasického Virchowova trias se na vzniku arteriálního trombu zpočátku podílejí pouze dva faktory, tj. agregace krevních destiček a dysfunkce cévního endotelu, zejména při ateroskleróze. Nejprve totiž dochází pouze ke shlukování krevních destiček a leukocytů, tedy vzniku bílého trombu, červené krvinky a plazmatické koagulační faktory jsou pod tlakem krve vymývány. To nastává v důsledku poranění cévní stěny a následného odhalení vysoce trombogenních kolagenních vláken, což může být způsobeno například rupturou aterosklerotického plátu. Až druhotně během obturace artérie nebo krvácení dovnitř prasklého plátu dochází k hyperkoagulaci, podobně jako je tomu u žilní trombózy, a vzniku červeného trombu. (Kvasnička 2003)

1.2.3 Trombofilie

Za trombofílii lze obecně považovat stav zvýšené dispozice k tvorbě trombů v žilním nebo tepenném systému. Jedná se o komplexní onemocnění zapříčiněné poruchami koagulace a jejích inhibitorů a také protrombotickými stavy způsobenými přirozenými (geneticky závislými) nebo získanými poruchami krevních destiček, leukocytů, endotelu, zánětlivých cytokinů, metabolizmu atd. Z hlediska klinické praxe je zásadní patologické trombofílie včas diagnostikovat, tím získat čas pro vhodnou profylaxi, a zabránit tak

vzniku nebo rekurenci trombózy. Komplikace s již vzniklou trombotizací jsou totiž vždy částečně nevratné a léčebný postup je nákladnější a méně účinný. (Kvasnička 2003)

K včasné diagnostice trombofilií je samozřejmě nutné vědět, jaké příčiny vedou k jejich vzniku. V případě obou trombofilií, žilní i tepenné, působí mnoho faktorů, přičemž u žilní jsou spojené především se zástavou krve a hyperkoagulací, zatímco u tepenné s aktivací krevních destiček a dysfunkcí endotelu. Trombofilie můžeme rozdělit na primární, tj. vrozené a geneticky podmíněné, tedy takové, při kterých dochází ke zvýšení produkce koagulačních faktorů a inhibitorů fibrinolýzy, poruše regulace hemokoagulace, dysfunkci a nedostatku koagulačních faktorů, selhání aktivace fibrinolýzy nebo metabolickým poruchám na základě mutace či polymorfizmu na úrovni genu a na sekundární, tj. získané, kdy k výše zmíněným změnám dochází v rámci nějakého fyziologického či patofyziologického stavu, jako je například těhotenství, zánět nebo nádorové bujení. Příkladem získané autoimunitní trombofilie je antifosfolipidový syndrom. (Langer, Eifrig et al. 2002, Kvasnička 2003, Kitagawa 2005, Gehlen, Vandevelde et al. 2023)

Mutace faktoru V Leiden (1691 G>A) je významným rizikovým faktorem pro vznik žilního tromboembolizmu. Mutace vzniká záměnou guaninu za adenin (pozice 1691, exon 10) v genu pro faktor V, čímž dochází k substituci aminokyseliny argininu za glutamin v peptidickém řetězci. Důsledkem je rezistence faktoru V k aktivovanému proteinu C (tzv. APC rezistence), který je potřebný pro degradaci faktoru V a VIII. Tím dochází k ovlivnění hemokoagulace, protože protein C ztrácí funkci přirozeného inhibitoru koagulační kaskády. (Bertina, Koeleman et al. 1994, Adler, Clark et al. 2012, Simone, De Stefano et al. 2013, Kvasnicka, Hajkova et al. 2014)

Porucha tvorby antitrombinu je autozomálně dominantní onemocnění, které je méně časté než výše popsaná Leidenská mutace, ale o to více závažné. Deficit AT má několik odlišných typů. Typ I se projevuje nižším množstvím antigenu AT v plazmě a také sníženou aktivitou. Molekula AT je však funkční. Typ II se vyznačuje tím, že se AT vyskytuje v normálním množství, avšak jeho aktivita je výrazně snížená. Typ II se dále dělí na tři podtypy, z nichž je nejdůležitější typ IIB, u kterého dochází k poškození vazebného místa pro heparin, což snižuje účinnost léčby exogenními hepariny. Důležité je sledování deficience antitrombinu především v těhotenství, kde může docházet k až fatálním následkům. (Kottke-Marchant and Duncan 2002, Abbattista, Gianniello et al. 2020, Čápová, Salaj et al. 2021)

Dalším důležitým aspektem v diagnostice trombofilií je indikace laboratorního vyšetření z hlediska pravděpodobnosti záchytu a praktického významu pro vyšetřovanou osobu. Vyšetření je indikováno selektivně, zejména u pacientů s rodinnou či osobní anamnézou tromboembolické nemoci, u pacientů s trombózou v nižším věku než 45 let, u pacientů s trombózou recidivující či v neobvyklé lokalizaci, u pacientů s kombinovanou trombotickou žilní a tepennou diatézou a u pacientek s opakovanou ztrátou plodu či jinými těhotenskými komplikacemi. (Poul 2006, Kvasnička 2010, Hirmerová, Karetová et al. 2014)

2 Trombin a jeho generace

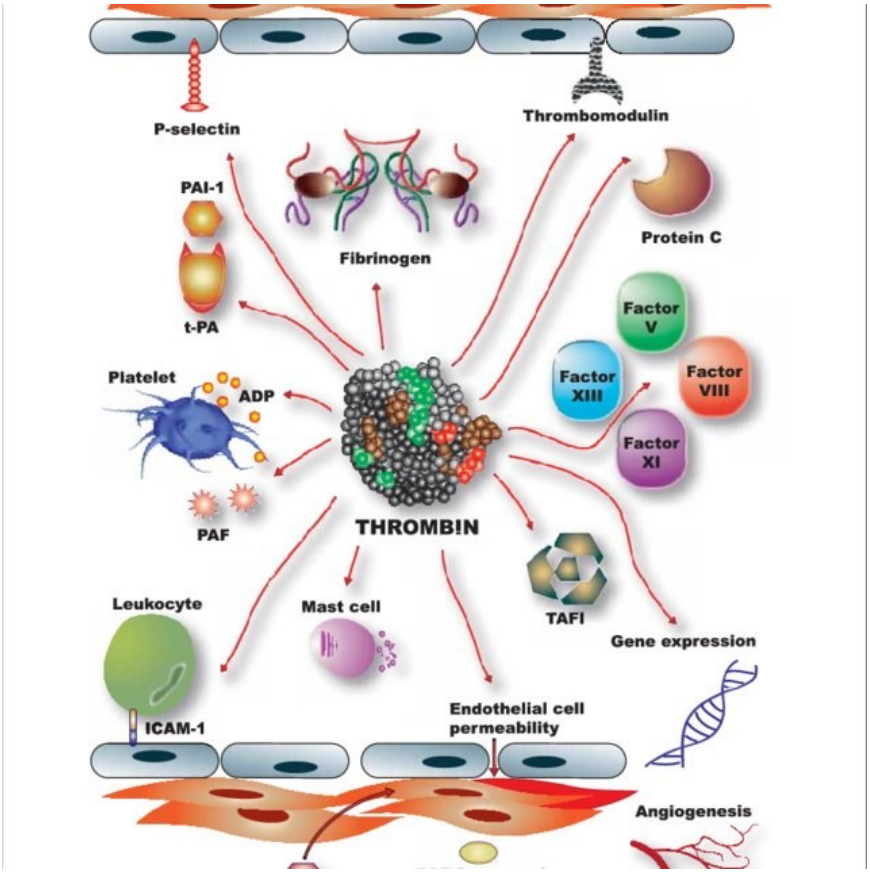
Trombin je serinová proteáza, která hraje hlavní roli v hemostáze regulací agregace krevních destiček a srážení krve. Trombin je aktivovaná forma protrombinu a přeměňuje fibrinogen na fibrin v posledním kroku koagulační kaskády. (Crawley, Zanardelli et al. 2007, Di Cera 2008) Podporuje také četné buněčné účinky včetně chemotaxe, proliferace a uvolňování cytokinů. Tyto účinky se podílejí na procesech reparace tkání a na patogenezi zánětlivých a fibroproliferativních poruch, jako je plicní fibróza a ateroskleróza. (Howell, Laurent et al. 2002, Licari and Kovacic 2009) Trombin zprostředkovává své buněčné účinky nejméně dvěma receptory buněčného povrchu PAR- 1 (receptor aktivovaný proteázou-1) a PAR-4. Objev mnohočetných trombinových receptorů umožňuje jejich selektivní blokádu, a tím i blokaci reakcí zprostředkovaných trombinem. (Nieman and Schmaier 2007, Hulshof, Hemker et al. 2021)

2.1 Stavba trombinu

Gen trombinu je lokalizován na chromozomu 11 (11p11-q12) (Goldsack, Chambers et al. 1998). Protrombin je složen z 532 aminokyselin. Vzniká v játrech a je závislý na vitamínu K. Molekulová hmotnost protrombinu je 72 kDa (trombin 37 kDa), biologický poločas je 48 hodin. Trombin je aktivován Na^+ ionty. (Di Cera 2008) V aktívní formě se skládá ze dvou polypetidových řetězců: lehkého A řetězce tvořeného ze 36 aminokyselinových zbytků a těžkého B řetězce, který je delší a obsahuje 259 aminokyselinových zbytků. Tyto řetězce jsou spojeny kovalentní vazbou disulfidickými můstky. (Goldsack, Chambers et al. 1998) Aktivovaný trombin štěpí každý polypeptidový řetězec s pořadím aminokyselin Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser mezi zbytky aminokyselin arginin a glycin. Tato vlastnost štěpení fibrinogenu a aktivace faktoru VIII mu umožňuje aktivovat koagulační faktory V, VII, XI, které hrají centrální roli v generaci trombinu a v koagulační kaskádě, faktor XIII, fibrinolytický inhibitor (TAFI) a proteázou aktivované receptory PAR1 a PAR4. Efektivnost těchto reakcí zvyšuje vazba sodíkového iontu (Na^+) na specifické Na-vazebné místo v trombinu. Spojení s Na^+ přeměňuje trombin na vysoce aktivní formu. Sodíkové ionty nejsou nezbytné pro aktivaci proteinu C, což ukazuje, že Na^+ podporuje pouze prokoagulační vlastnosti trombinu.

2.2 Funkce trombinu

Trombin působí jak koagulačně, tak i inhibičně. Nejdůležitějšími aktivitami trombinu jsou štěpení fibrinogenu na fibrin, limitovanou proteolýzou aktivuje faktory V a VIII, aktivuje faktory IX a XIII. Dále je významným aktivátorem krevních destiček. Na endotelu posiluje tvorbu a sekreci tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA). Po navázání na trombomodulin aktivuje protein C a TAFI (Thrombin Activable Fibrinolytic Inhibitor), který je nezbytný k normální rezistenci fibrinové zátky. Trombin se dále uplatňuje i v procesech zánětu a hojení. Je také důležitý při embryonálním vaskulárním vývoji, angiogenezi, revaskularizaci, neurodegeneraci a neuroprotekci. (Fenton 1995, Connolly, Ishihara et al. 1996, Di Cera 2003, Crawley, Zanardelli et al. 2007)



Obrázek 4 Centrální úloha trombinu v hemostáze (převzato z Thrombosis and Haemostasis 106(6):1020-33)

2.3 Trombin generační čas

Sledování procesu generace trombinu by mělo podat celkový obraz o hemostatickém stavu organizmu, odhalit trombofilní riziko, ukázat na riziko event. krvácení nebo na vliv antikoagulační léčby, zachytit zánětlivé procesy, sepsi a mnoho jiných rizik, jako např. vyšší produkci prokoagulačních faktorů při procesech zhoubného bujení. (Castoldi and Rosing 2011) Sledování změn v generaci trombinu je tak příležitostí, jak zkoumat mechanizmy koagulace, které byly doposud málo známy.

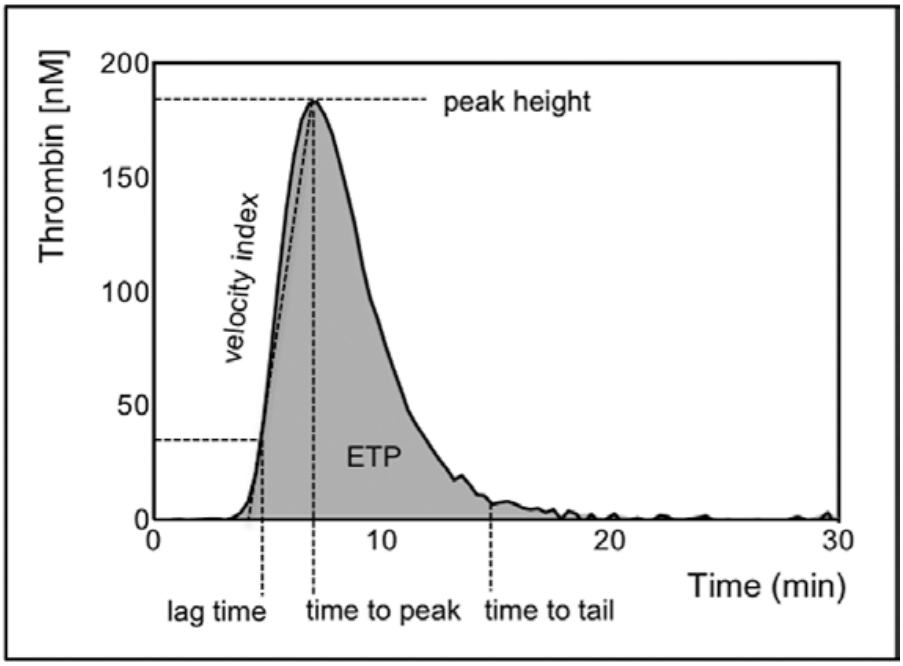
Filozofie měření generace trombinu vychází z klíčového postavení trombinu v hemostáze. Jeho laboratorní sledování bylo poprvé popsáno Macfarlanem a Pitneym již v roce 1953. (Macfarlane and Biggs 1953, Pitney and Dacie 1953) Tyto původní testy byly prováděny v plné krvi nebo plazmě se spouštěči, jako je TF nebo kefalin coby zdroji PL v kombinaci s chloridem vápenatým k zahájení koagulace. Tvorba trombinu byla hodnocena odběrem vzorků koagulační směsi do zkumavky obsahující fibrinogen v pravidelných časových intervalech. Následný čas srážení krve pak byl použit k sestavení kalibrační křivky, ze které byla odvozena aktivita trombinu. (Macfarlane and Biggs 1953) Test byl takto používán až do roku 1986, kdy Hemker provedl zásadní změny testu. Fibrinogen byl nahrazen syntetickým chromogenním substrátem specifickým pro trombin, plazma byla před testováním defibrinována hadím jedem a byl použit počítačový software pro výpočet parametrů vyplývajících z křivky tvorby trombinu (tzv. trombogram). (Hemker, Willems et al. 1986)

V roce 1993 byl trombin generační čas dále upraven zavedením syntetického substrátu s pomalou reakcí na trombin. (Hemker, Wielders et al. 1993) Tato modifikace umožnila kontinuální detekci nárůstu rozštěpeného substrátu a metoda mohla být použita v analyzátorech. Později byl chromogenní substrát zaměněn za fluorogenní substrát, což přineslo radikální pokrok ve vyšetřování generace trombinu. (Hemker 2011) Při štěpení trombinem chromogenní substráty uvolňují p-nitroanilin, jehož žluté zabarvení se měří při vlnové délce 405 nm. Tohoto principu se také využívá při stanovení antitrombinu, kde se přidává trombin v nadbytku a zbytkový trombin rozštěpí substrát. (Khor and Van Cott 2010)

Defibrinace (resp. inhibice tvorby fibrinu) je u chromogenních metod zásadní, aby se zabránilo interferenci způsobené zákalem při srážení plazmy. Na rozdíl od chromogenního stanovení fluorogenní substráty s trombinem generují fluorescenční produkt, jehož signál není rušen zákalem, a proto defibrinace není nutná. Z tohoto důvodu

je možné využít i plazmu bohatou na destičky, která se pro běžná koagulační vyšetření nepoužívá. Preference zpracování plazmy je však stále diskutabilní a stále se řeší i při otázkách standardizace TGT. (Hemker, Giesen et al. 2000)

Nejnovější metody stanovení generace trombinu už probíhají v automatickém analyzátoru, vyžadují speciální reagencie ke spuštění koagulace a fluorometr vybavený počítačovým softwarem, který umožňuje zaznamenat a vypočítat parametry z křivky generace trombinu (trombogramu). Podle typu použitého přístroje můžeme získat až pět parametrů: Lag fázi – dobu do nástupu generace trombinu (min), Time to Peak – dobu do dosažení maximálního peaku trombinu (min), Peak Thrombin – maximální koncentraci trombinu (nM/L), Velocity Index – strmost křivky (nM/min) a AUC – plochu pod křivkou odrážející celkové množství vzniklého trombinu (endogenní trombinový potenciál (ETP)) (nM/L.min). (Hemker 2015, Hemker 2016)



Obrázek 5 Základní parametry křivky generace trombinu (upraveno dle Loeffen et al.)

Generaci trombinu je možné sledovat fluorimetricky na ELISA readeru nebo na koagulačním analyzátoru. Automatický analyzátor s fluorimetrickým modulem se jeví jako vhodnější, protože lze jednotlivé kroky analýz automatizovat, a tím dosáhnout lepší reprodukovatelnosti. Principem dnes používaných automatizovaných měření je monitorování vzniku trombinu v plazmě po aktivaci koagulační kaskády tkáňovým faktorem (TF). Reakce probíhá za účasti negativně nabitých fosfolipidů a Ca^{2+}. TF

a koncentrace fosfolipidů jsou používány v různých koncentracích v závislosti na typu přepokládaného onemocnění. K vyšetření lze použít plazmu chudou na destičky (PPP), plazmu bohatou na destičky (PRP) nebo naopak bezdestičkovou plazmu (PFP). (Hemker 2015, Depasse, Binder et al. 2021)

Z důvodu různých klinických sledování a speciálních požadavků na provedení testu vznikla řada variant testu používajících různé koncentrace tkáňového faktoru a fosfolipidů, přidání inhibitoru kontaktní fáze nebo trombomodulinu, ev. aktivovaného proteinu C. (Andresen, Iversen et al. 2002, Hemker, Giesen et al. 2003, van Veen, Gatt et al. 2006, van Veen, Gatt et al. 2008)

2.4 Klinické a laboratorní využití generace trombinu

Některé aplikace TGT jsou již dobře známy a pomáhají objasňovat koagulační mechanizmy v různých klinických stavech. Jiné, i když jsou pravděpodobné, je třeba prozkoumat podrobněji a poskytnout důkazy, zda jsou metody TGT užitečné, zvláště pak pro diagnostiku a léčbu pacientů s hemoragií nebo trombotickým onemocněním. V návaznosti na vyšetřování trombofilních stavů pacientů Trombotického centra Všeobecné fakultní nemocnice se využívá sledování generace trombinu pomocí kitu TECHNOTROMBIN TGA Reagents for Ceveron, Technoclone, Rakousko, analyzátor CEVERON Alpha, Rakousko. Reagencie TGA RB (nízký obsah TF a PL) se využívají v menší míře, častěji se pro vyšetřování pacientů s předpokládaným trombofilním stavem, ev. antikoagulační léčbou, využívají reagencie TGA RC Low (nízký obsah PL a vyšší obsah TF) a TGA RC High (vyšší obsah PL a vysoký obsah TF). (Brummel-Ziedins 2013, Hemker 2015, Depasse, Binder et al. 2021)

2.4.1 Hypokoagulační stavy

U pacientů s hemofilií bylo prokázáno snížení generace trombinu hlavně v parametrech Peak Thrombin a AUC. Tyto parametry se významně liší u zdravých jedinců a u pacientů s různou tíží hemofilie. (Chantarangkul, Clerici et al. 2003, Haghpanah, Bazrafshan et al. 2016) V generaci trombinu se odráží i substituční léčba koagulačním faktorem. (Dielis, Balliël et al. 2008, Doshi, Gangadharan et al. 2012) Použití TGT se ukazuje jako výhodné u hemofilických pacientů s přítomností inhibitoru. Byly publikovány studie, které popisují monitorování substituce rekombinantními

přípravky a přípravkem FEIBA (Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity) pomocí Peaku Thrombinu a jeho následné normalizace při úspěšné léčbě. (Mancuso and Fasulo 2016)

U pacientů s von Willebrandovou chorobou a jinými krvácivými nemocemi mnoho zkušeností s generací trombinu popsáno není. (Rugeri, Beguin et al. 2007) Z jiných koagulopatií se větší měrou zabývali vědci hlavně jaterní cirhózou, kde byl prokázán větší vliv trombocytopatie na generaci trombinu ve srovnání s poklesem hladiny koagulačních faktorů. (Tripodi, Primignani et al. 2006)

2.4.2 Generace trombinu u trombotických stavů

V souvislosti se sledováním generace trombinu existují některé klinické stavy charakterizované zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění. Mezi nejdůležitější patří diabetes, nealkoholické ztučnění jater, myeloproliferativní novotvary, zánětlivé onemocnění střev a další, u kterých se předpokládá hyperkoagulabilita plazmy, která však laboratorně dostupnými testy prokázána nebyla. Výzkumy ukázaly, že v těchto klinických případech jsou patrné zřetelné biochemické známky hyperkoagulability, které lze detekovat pomocí TGT. (Saibeni, Saladino et al. 2010, Tripodi, Branchi et al. 2011, Tripodi, Chantarangkul et al. 2013, Tripodi, Fracanzani et al. 2014) Venózní tromboembolismus (VTE), který zahrnuje hlubokou žilní trombózu a plicní embolii, je velmi časté onemocnění v běžné populaci. Zvýšená generace trombinu již byla prokázána ve studiích zabývajících se trombofilními mutacemi FV Leiden (G1691A) a FII protrombin (G20210A). (Hézard, Bouaziz-Borgi et al. 2006, Couturaud, Duchemin et al. 2008, Kvasnicka, Hajkova et al. 2014, Segers, Simioni et al. 2014)

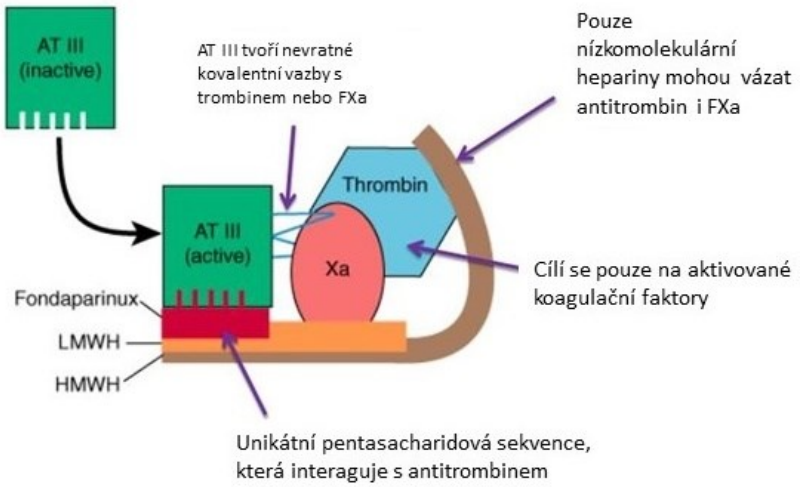
U závažných vrozených trombofilií, jako jsou deficit antitrombinu a deficit proteinu C a S, bylo rovněž prokázáno významné zvýšení generace trombinu, zvláště pak u homozygotních forem mutace. (Patnaik and Moll 2008, Brummel-Ziedins, Orfeo et al. 2012, Hepner and Karlaftis 2013, Durai, Tan et al. 2016, Malikova, Husakova et al. 2023) Zvýšená generace trombinu se může vyskytnout i u pacientů se zvýšenými hladinami faktorů VIII, IX a XI zejména tehdy, když je kombinovaná ještě s dalším trombofilním stavem. (Siegemund, Petros et al. 2004)

Specifickou skupinu pak tvoří těhotné ženy, kde nárůst generace trombinu vyplývá z řady změn v jejich hemostatickém systému. Dochází k vzestupu hladin koagulačních faktorů, zejména pak fibrinogenu, faktoru VIII, VII a V a von Willebrandova faktoru. (Bremme 2003, Brenner 2004, Bellesini, Robert-Ebadi et al. 2021) Pokud probíhá

těhotenství se zvýšeným trombofilním rizikem, např. z důvodu vrozeného trombofilního stavu, může být doprovázeno ještě vyššími hodnotami aktivity faktorů nebo neodpovídající reakcí na profylaktické dávky antikoagulační léčby. Jedním z takových případů může být vrozený nedostatek inhibitoru koagulace antitrombinu, který byl již popsán v kap. 1.2.3.

2.4.3 Monitorování antikoagulační léčby

Venózní tromboembolismus (VTE), který zahrnuje hlubokou žilní trombózu a plicní embolii, je velmi časté onemocnění v běžné populaci. Akutní příhody vyžadují okamžitou antikoagulaci s rychle působícími léky (nefrakcionovaný heparin, popř. nízkomolekulární hepariny) k zastavení akrece trombu. Nízkomolekulární hepariny (LMWH) a pentasacharid jsou nepřímé inhibitory faktoru Xa a jen v malé míře nepřímo inhibují trombin. Ke své funkci rovněž potřebují antitrombin jako kofaktor. Základní koagulační testy nejsou prodlouženy, k ověření účinnosti je potřeba použít měření aktivity anti-Xa. K následné léčbě se pak využívají vitamin K antagonisté (VKA) nebo přímá perorální antikoagulancia (DOAC) (např. dabigatran, rivaroxaban, apixaban, nebo edoxaban) k prevenci rekurentní VTE.



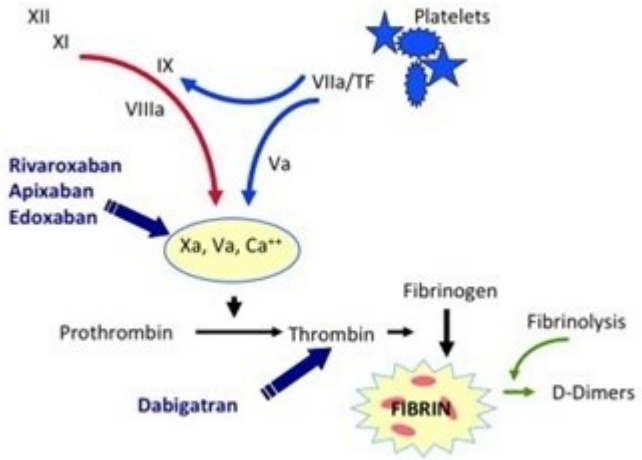
Obrázek 6 Mechanizmus účinku heparinu a pentasacharidu (upraveno dle Katzung et al.)

Dabigatran etexilát (Pradaxa) patří mezi přímé inhibitory trombinu, které jsou také nazývány gatrany. Ke stanovení plazmaticke hladiny dabigatranu lze použit dvě různé metody založené na inhibici konstantní definované koncentrace trombinu. Zbytkový

trombin je následně detekován koagulační (tzv. dilutovaný trombinový test) nebo chromogenní metodou při 405 nm.

Orientačními testy pro sledování účinku dabigatranu jsou aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) a trombinový test. Trombinový test je k účinku dabigatranu velmi citlivý a časy tohoto testu extrémně prodloužené, proto se užívá spíše jako laboratorní test pro posouzení zbytkové aktivity léku.

Rivaroxaban (Xarelto), apixaban (Eliquis) a edoxaban (Lixiana) jsou přímé selektivní inhibitory aktivovaného koagulačního faktoru Xa. Jeho blokádou se zpomalí koagulační děj v celé kaskádě, neboť vzniká méně trombinu. Ke stanovení plazmatické hladiny rivaroxabanu, apixabanu a edoxabanu lze použit metody založené na inhibici konstantního definovaného množství faktoru Xa. Zbytkový faktor Xa je následně detekován chromogenní metodou při 405 nm.



Obrázek 7 Schéma účinku přímých inhibitorů koagulace (upraveno dle Dimitrios et al.)

Měření generace trombinu umožňuje posuzování efektivity právě této léčby. Dochází k významnému prodloužení Lag fáze a snížení Peaku Thrombinu i AUC v závislosti na druhu použitého přípravku a jeho dávce. (Kvasnicka, Horak et al. 2011, Metze, Pfrepper et al. 2020, Meihandoest, Studt et al. 2021, Malikova, Husakova et al. 2023, Shaw, Castellucci et al. 2023) Neadekvátní snížení generace trombinu může upozornit na riziko krvácení nebo naopak neúčinnou léčbu. (Malikova, Husakova et al. 2023, Shaw,

Castellucci et al. 2023) Přímé inhibitory koagulace vyžadují měření jejich antikoagulačního účinku ve zvláštních situacích (urgentní stavy, kdy je nutnost akutní operace, závažné krvácení, předávkování, ischemická CMP vyžadující trombolýzu, identifikace pacientů se zvýšeným rizikem krvácení způsobeným nadměrnou expozicí vůči NOAC, známá interakce s jinými léky nebo podezření na ni, renální selhání). Dilutovaný trombinový test v případě podání dabigatranu a aktivita anti-FXa nakalibrovaná na rivaroxaban, apixaban a edoxaban nejsou ve skutečnosti vypovídající pro dosažený antikoagulační efekt, protože měří aktuální hladinu těchto léků, a ne inhibici hemostázy jako celku. Uvedená antikoagulancia jsou velmi účinná v prevenci trombózy, ale na úkor rizika hemoragie. Z toho vyplývají výhody měření generace trombinu oproti tradičním koagulačním testům a pro řadu nových léčebných přípravků je hodnocení generace trombinu zatím jedinou možností laboratorního posuzování jejich léčebného efektu. (Tripodi 2013, Metze, Pfrepper et al. 2020)

3 Hypotéza a cíle práce

3.1 Hypotézy

Hypotéza č.1

U pacientů s trombofilníhm stavem v důsledku přítomnosti vrozené významné trombofilní mutace (mutace faktoru V Leiden, 1691 G>A) předpokládáme i vyšší generaci trombinu (TGT) než u trombofilního stavu vyvolaného faktory získanými (vysoká hladina faktoru VIII nad 150 %).

Hypotéza č.2

U pacientů s léčeným žilním tromboembolizmem (VTE), při podávání antikoagulační léčby s přímými inhibitory koagulace, předpokládáme menší snížení generace trombinu u těch jedinců, u kterých byla prokázána mutace faktoru V Leiden (1691 G>A), než u jedinců bez průkazu této mutace.

Hypotéza č.3

Při podávání nízkomolekulárního heparinu v průběhu těhotenství u žen s deficitem antitrombinu předpokládáme vyšší generaci trombinu a tím i horší odpověď na podávanou léčbu ve srovnání s těhotnými ženami bez deficitu AT.

3.2 Cíle práce

Prostřednictvím optimalizované a standardizované metody sledování generace trombinu:

- stanovit referenční rozmezí pro jednotlivé parametry TGT u dvou dostupných koncentrací tkáňového faktoru a fosfolipidů na souboru zdravých kontrol a porovnat generaci trombinu u zdravých kontrol, jedinců s prokázanou mutací faktoru V Leiden a jedinců se zvýšenou hladinou faktoru VIII,

- kvantifikovat generaci trombinu u pacientů s VTE s prokázanou mutací faktoru V Leiden (nebo bez ní) a užívající rozdílnou antikoagulační léčbu DOAC (dabigatran, rivaroxaban, apixaban, edoxaban),
- kvantifikovat generaci trombinu u těhotných žen bez deficitu antitrombinu a jejich odpovědi na podávání LMWH ve srovnání s těhotnou ženou se závažným deficitem antitrombinu, kdy nejsou dostupná data ohledně změn v generaci trombinu při podávání antikoagulační léčby.

4 Metody

4.1 Soubor pacientů a kontrolních skupin

4.1.1 Kontrolní skupina zdravých jedinců

Do kontrolní skupiny (n = 170) byli zařazeni zdraví dobrovolníci a dárci krve bez prokázané trombofilie či jiné nemoci a s negativní rodinnou anamnézou tromboembolické nemoci (Kontroly) docházející na transfúzní oddělení Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Všichni dárci podepsali informovaný souhlas s odběrem krve.

4.1.2 Skupina vrozené a získané trombofilie

Do skupiny vrozené trombofilie byli zahrnuti jedinci s mutací faktoru V Leiden v heterozygotní konstituci (n = 44) bez další prokázané trombofilie či jiné nemoci (FVL het). Do skupiny získané trombofilie byli zařazeni jedinci s hladinou faktoru VIII> 150 % (n = 38), u kterých nebyla prokázána mutace faktoru V Leiden, faktoru II a nebyl zjištěn deficit AT, proteinu C, proteinu S a antifosfolipidový syndrom (FVIII).

4.1.3 Skupina užívající přímé inhibitory koagulace

Do této skupiny byli zařazeni jedinci s VTE užívající antikoagulační léčbu – přímé inhibitory koagulace (n = 347) a byli dále rozděleni podle typu léku. V každé skupině byli vyřazeni jedinci s prokázaným deficitem AT, proteinu C a proteinu S a jedinci s hladinou faktoru VIII> 150 %. V rámci každé skupiny různých druhů léku byli pacienti dále rozděleni na podskupinu s prokázanou mutací faktoru V Leiden (FVL het) a bez prokázané mutace (FVL neg). Byly provedeny dva odběry. První odběr venózní krve byl proveden v době minimálního účinku, tj. přibližně půl hodiny před užitím tablety, a druhý odběr v době maximálního účinku po užití tablety.

Tabulka 1 Základní charakteristika skupin s antikoagulační léčbou

Druh léku	Dávka	Čas 2. odběru	Průměrný věk	Celkový počet	Počet mužů	Počet žen
Dabigatran	150 mg 2 x denně	2 hodiny	56	95	49	46
Rivaroxaban	20 mg 1 x denně	2 hodiny	54	117	55	62
Apixaban	5 mg 2 x denně	3 hodiny	54	125	54	71
Edoxaban	60 mg 1 x denně	2 hodiny	56	10	5	5

4.1.4 Těhotné ženy s profylaxí LMWH

Soubor (n=60) tvořily jak těhotné ženy (3. trimestr, věk 32 ± 6) sledované v poradně pro graviditu na Gynekologicko – porodnické klinice a Trombotickém centru VFN Praha a indikované k profylaxi nízkomolekulárním heparinem před porodem, tak netěhotné ženy bez poruchy koagulace (věk 34 ± 7), které si dobrovolně nechaly aplikovat nízkomolekulární heparin ve stejné dávce jako ženy gravidní.

Všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas před zařazením do studie.

První odběr venózní krve probíhal před podáním LMWH v době standardních těhotenských odběrů. Druhý odběr byl proveden 4 hodiny po aplikaci LMWH s.c.

Pacientka, u které byl zjištěn homozygotní deficit AT způsobený mutací c.391C>T#, (p.Leu131Phe†) v genu SERPINC1 byla sledována v Trombotickém centru VFN od počátku gravidity.

Protokoly studie byly schváleny etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v rámci schválení RVO-VFN 64165.

4.2 Laboratorní metody

Odběr vzorků byl prováděn do vakuových zkumavek Vacutainer™ (Becton Dickinson, Rutherford, USA) obsahujících 0,129 M citrátu sodného pro koagulační testy a vyšetření generace trombinu. Zkumavky Vacutainer™ (Becton Dickinson) s obsahem K_2EDTA byly použity na vyšetření hemogramu a pro genetické vyšetření.

Po dodávce vzorků potrubní poštou do laboratoře byly centrifugovány 15 minut při 3000 *g* v pokojové teplotě. Po centrifugaci byly odděleny alikvoty plazmy pro vyšetření

TGT, faktoru VIII a proteinu S. Byly skladovány při – 80 °C maximálně 2 měsíce před provedením měření.

Dále byly ihned vyšetřeny koagulační parametry. Aktivovaný parciální tromboplastinový test (aPTT) a protrombinový čas (INR), koncentrace fibrinogenu (Fbg), D-dimerů, aktivita antitrombinu (AT) a proteinu C (PC) byly měřeny v citrátové plazmě analyzátorem BCS XP (Siemens, Marburg, SRN) pomocí komerčně vyráběných reagencií (Pathromtin SL®, Thromborel S®, Thrombin Reagent®, Berichrom Protein C®, Siemens). Koncentrace D-dimeru v plazmě byla určena pomocí kitu MediRox D-Dimer® (Alere AB, Lidingö, Sweden).

Pro sledování generace trombinu jsme použili kit Technothrombin® TGA RC Low (RCL) obsahující nízkou koncentraci fosfolipidů a přibližně 5 pmol rekombinantního TF v Tris-Hepes-NaCl pufru, který je určen pro hodnocení trombofilních nebo krvácivých stavů a kit Technothrombin® TGA RC High (RCH) obsahující vyšší koncentraci fosfolipidů a přibližně 5 pmol rekombinantního TF v Tris-Hepes-NaCl pufru, který by měl odrážet účinek antikoagulační léčby. Měření byla prováděna na automatickém analyzátoru s fluorimetrickým modulem Ceveron® Alpha (Technoclone GmbH, Vienna, Austria) v souladu s technickými instrukcemi výrobce.

4.2.1 Laboratorní metody skupiny vrozené a získané trombofilie

Vyšetření mutace v genu pro faktor V – FV Leiden (1691G/A) bylo provedeno metodou real-time PCR. Aktivita faktoru VIII v plazmě byla stanovena jednofázovou koagulační metodou s faktor VIII deficitní plazmou, reagencií aPTT Actin® FSL a roztoku chloridu vápenatého (Siemens, SRN).

4.2.2 Laboratorní metody skupiny užívající přímé inhibitory koagulace

Inhibice faktoru IIa při podávání dabigatranu byla stanovena metodou dilutovaného trombinového času Biophen DTI a inhibice faktoru Xa při podávání rivaroxabanu, apixabanu a edoxabanu byla určena chromogenní metodou inhibice FXa kitem BIOPHEN® Heparin LRT (Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France) s kalibrací na každý jednotlivý lék.

4.2.3 Laboratorní metody skupiny těhotných žen s profylaxí LMWH

Inhibice faktoru Xa byla měřena s použitím chromogenního testu BIOPHEN® Heparin LRT (Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France). Biophen Heparin je reagencie, která nevyžaduje přídavek exogenního antitrombinu, a je tedy závislá na hodnotách antitrombinu endogenního, který je obsažen v pacientově plazmě. Pro stanovení fyziologicky aktivního antitrombinu jsme použili diagnostické soupravy Berichrom Antitrombin (IIa) a INNOVANCE Antithrombin (Exner, Michalopoulos et al.), (Siemens, SRN). Při stanovení antigenu antitrombinu (N Antiserum to Human Antithrombin III, Siemens na analyzátoru BN ProSpec, Siemens) jsme využili imunochemické reakce antitrombinu se specifickou protilátkou za tvorby imunokomplexů, které způsobují rozptyl dopadajícího světla.

Pro určení deficitu antitrombinu byla použita metoda amplifikace PCR produktů exonů a přilehlých intronových oblastí v genu pro SERPINC1 a sekvenační analýza: [#]Číslování sekvence cDNA vychází z referenční sekvence NM_000488.3, kde +1 značí první nukleotid první aminokyseliny methionin. [†]Číslování pořadí aminokyselin je dle referenční sekvence NP_000479.1.

Pro výběr nejvhodnějšího typu heparinu jsme využili připravené vzorky s nasimulovanou antikoagulační léčbou (Enoxaparinum natricum (Clexane) 4000 IU/0,4mL, Nadroparinum calcicum (Fraxiparine) 9 500 IU/mL, Dalteparinum natricum (Fragmin) 10 000 IU/mL, Fondaparinuxum natrium (Arixtra) 2,5 mg/0,5 mL a Heparinum natricum 5000 IU/mL). Uvedené tekuté preparáty jsme ředili pomocí normální standardní lidské plazmy na koncentraci 1,0 IU/mL u Clexanu, Fragminu a Arixtry, na koncentraci 0,9 IU/mL u Fraxiparinu a koncentraci 2,0 IU/mL u UFH. Následně jsme vždy porovnávali ve dvojici vzorek normální plazmy zdravých dárců (Control) a vzorek pacientky (AT def) s přidaným léčivem do obou vzorků. Využili jsme plazmu pacientky s prokázanou homozygotní mutací AT z odběru v době, kdy ještě žádná antikoagulační léčba nebyla podávána. Jako kontrolní vzorky bez léčby jsme opět použili vzorek normální plazmy zdravých dárců a plazmu pacientky.

4.3 Normální hodnoty laboratoře

Tabulka 2 Normální laboratorní hodnoty

Metoda	Jednotky	Referenční rozmezí
Antitrombin	%	75–125
Antitrombin antigen	g/L	0,19–0,31
D-dimer	µg/L	<190
Koagulační faktor VIII	%	60–50
Protein C	%	70–140
Protein S	%	65–40
APC rezistence	index	2,0–5,0
Antifosfolipidové protilátky APA IgG, IgM	U/mL	0–10
Lupus antikoagulans	LCA index	<15
Lupus antikoagulans konfirmace	LCA index	<8
dRVVT	Ratio	<1,2

4.4 Statistická analýza dat

Ke statistické analýze dat a pro grafické znázornění výsledků studie byl použit program STATISTICA CZ (StatSoft, Inc., Version 12, Tulsa, USA).

Pro grafické znázornění porovnání parametrů TGT u všech sledovaných skupin byl použit krabicový graf (box plot graf) s uvedením mediánu, 25. a 75. percentilu.

T-test byl použit pro porovnání rozdílů u parametrů s normální distribucí hodnot, zatímco Kolmogorov-Smirnovův test byl použit u parametrů s nenormálním rozdělením hodnot. Normalitu hodnot u všech parametrů jsme posuzovali pomocí normálních-pravděpodobnostních grafů. Hladina statistické významnosti (p) byla pro každý test stanovena na $\leq 0,05$.

Ke zjištění vztahů mezi proměnnými byl proveden výpočet korelačního koeficientu za použití lineární regrese (grafy 11-12, 18-19, 25-26 a 32-33) a Spearmanova korelace. Hladina statistické významnosti byla pro každý test stanovena na $p \leq 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Výsledky laboratorních vyšetření skupiny vrozené a získané trombofilie

V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty generace trombinu u dvou typů reagencií (RCL a RCH) s obsahem stejného množství tkáňového faktoru, ale lišící se obsahem fosfolipidů (FL) u zdravé skupiny FV Leiden negativní, v tabulkách 4 a 5 jsou výsledky porovnávaných skupin. V grafech 1–5 jsou znázorněny výsledky jednotlivých parametrů generace trombinu při použití reagencie RCL. Statistická analýza je uvedena v tabulkách 6–10 u každého parametru TGT.

Tabulka 3 Normální hodnoty generace trombinu u kontrolní zdravé skupiny

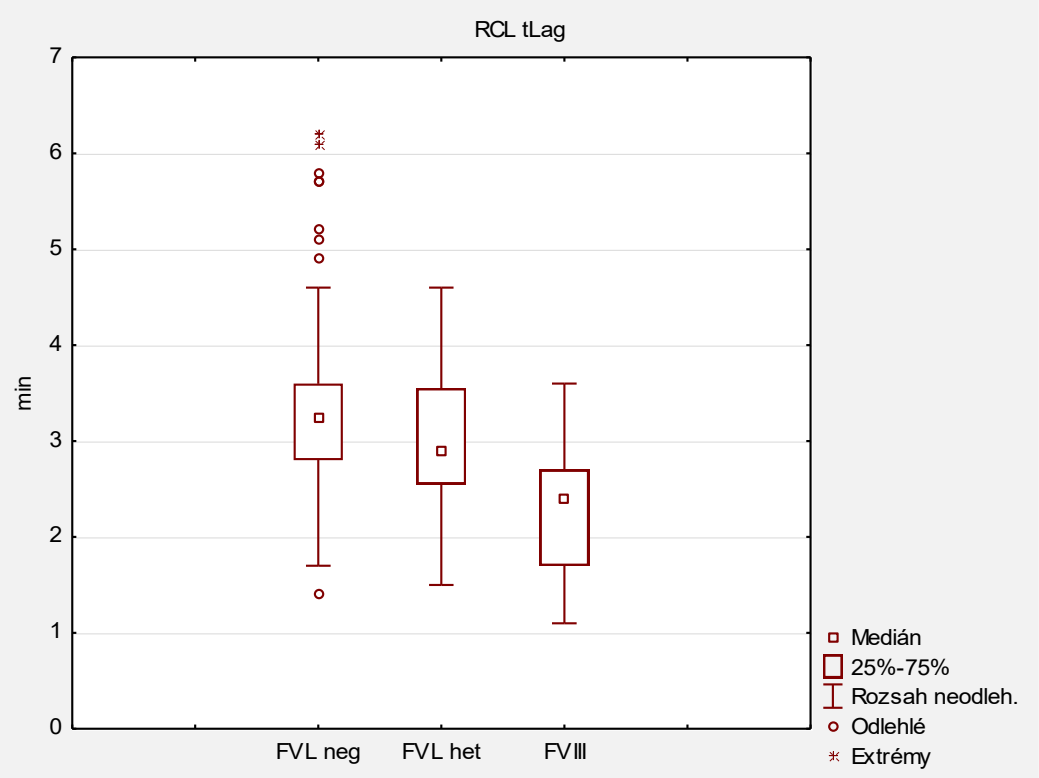
FVL neg n = 170	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	SD
BMI (kg/m^2)	24,2	24,6	15,7	28,9	22,3	26,4	2,75
RCL tLag (min)	3,27	3,25	1,40	6,20	2,80	3,60	0,83
RCL tPeak (min)	8,08	7,55	4,20	13,80	6,50	9,40	2,07
RCL Peak (nM/L)	238,8	217,9	58,9	493,8	164,0	302,8	93,4
RCL VI (nM/min)	57,69	47,60	7,30	181,60	27,60	80,40	36,36
RCL AUC (nM/L.min)	2042,4	2028,7	1268,5	2895,5	1850,0	2263,8	318,3
RCH tLag (min)	1,75	1,60	0,70	5,40	1,10	2,30	0,78
RCH tPeak (min)	5,33	5,05	2,90	10,10	4,10	6,50	1,58
RCH Peak (nM/L)	375,6	368,3	128,7	794,2	277,8	461,6	140,8
RCH VI (nM/min)	124,81	111,40	21,40	378,00	67,80	170,00	74,83
RCH AUC (nM/L.min)	2093,9	2073,2	1190,3	2954,4	1828,7	2336,5	344,4

Tabulka 4 Hodnoty generace trombinu u skupiny faktor V Leiden heterozygoti

FVL het n = 44	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	SD
BMI (kg/m^2)	25,8	25,4	18,2	29,1	23,6	28,3	3,73
RCL tLag (min)	3,03	2,90	1,50	4,60	2,55	3,55	0,72
RCL tPeak (min)	7,92	7,65	5,00	11,60	6,60	9,35	1,78
RCL Peak (nM/L)	325,2	335,7	102,4	667,1	232,9	418,3	123,6
RCL VI (nM/min)	92,42	94,20	12,00	247,70	41,35	126,50	52,66
RCL AUC (nM/L.min)	2183,3	2146,8	1558,1	2885,9	1934,6	2493,0	359,9
RCH tLag (min)	0,99	0,90	0,70	1,40	0,90	1,10	0,18
RCH tPeak (min)	3,61	3,70	2,40	5,20	3,00	4,00	0,69
RCH Peak (nM/L)	499,1	479,4	231,9	840,0	428,2	567,4	127,3
RCH VI (nM/min)	206,04	197,15	56,00	446,40	150,25	276,60	83,60
RCH AUC (nM/L.min)	2184,3	2158,1	1568,1	2972,0	1973,5	2360,3	317,1

Tabulka 5 Hodnoty generace trombinu u skupiny s vysokým faktorem VIII

F VIII n = 38	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	SD
BMI (kg/m^2)	26,2	25,7	19,1	29,4	24,1	28,6	3,84
F VIII (%)	221,1	192,7	151,3	392	167,8	327,6	67,05
RCL tLag (min)	2,24	2,40	1,10	3,60	1,70	2,70	0,63
RCL tPeak (min)	4,70	4,70	3,00	6,50	3,90	5,50	0,90
RCL Peak (nM/L)	504,8	495,4	224,9	853,0	368,8	594,8	163,0
RCL VI (nM/min)	208,03	196,40	78,70	425,60	118,70	269,80	92,60
RCL AUC (nM/L.min)	2558,1	2515,5	1900,7	3584,2	2092,9	2832,2	458,3
RCH tLag (min)	1,97	2,05	1,00	3,20	1,40	2,30	0,63
RCH tPeak (min)	4,17	4,10	2,70	6,30	3,40	4,90	0,93
RCH Peak (nM/L)	666,5	623,9	267,0	1103,4	598,4	749,3	154,5
RCH VI (nM/min)	315,17	304,15	89,10	594,50	250,60	358,80	105,18
RCH AUC (nM/L.min)	2652,7	2698,0	1903,9	3606,9	2330,9	2902,8	411,8



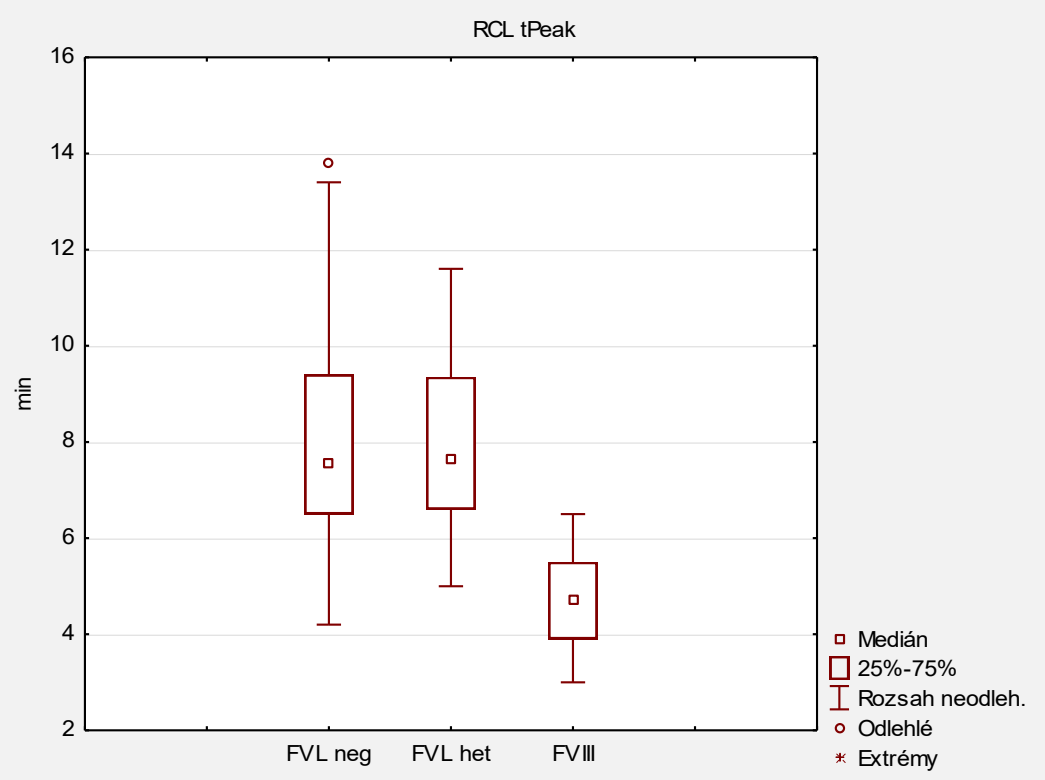
Graf 1 tLag – čas nástupu generace trombinu

Tabulka 6 Statistický význam tLag – času nástupu generace trombinu

RCL tLag	hodnota p	statisticky významné	RCH tLag	hodnota p	statisticky významné
FVL neg vs. FVL het	0,094	ne	FVL neg vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVIII	0,000	ano	FVL neg vs. FVIII	0,109	ne
FVL het vs. FVIII	0,000	ano	FVL het vs. FVIII	0,000	ano

U parametru tLag není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVIII. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

U stanovení TGT s nižší koncentrací fosfolipidů se významně zkracuje doba nástupu tvorby trombinu u FVIII ve srovnání s negativní skupinou. U vyšší koncentrace FL je čas nástupu tvorby trombinu rychlejší u FVL het proti negativní skupině, u faktoru VIII rychlejší nástup prokázán nebyl.



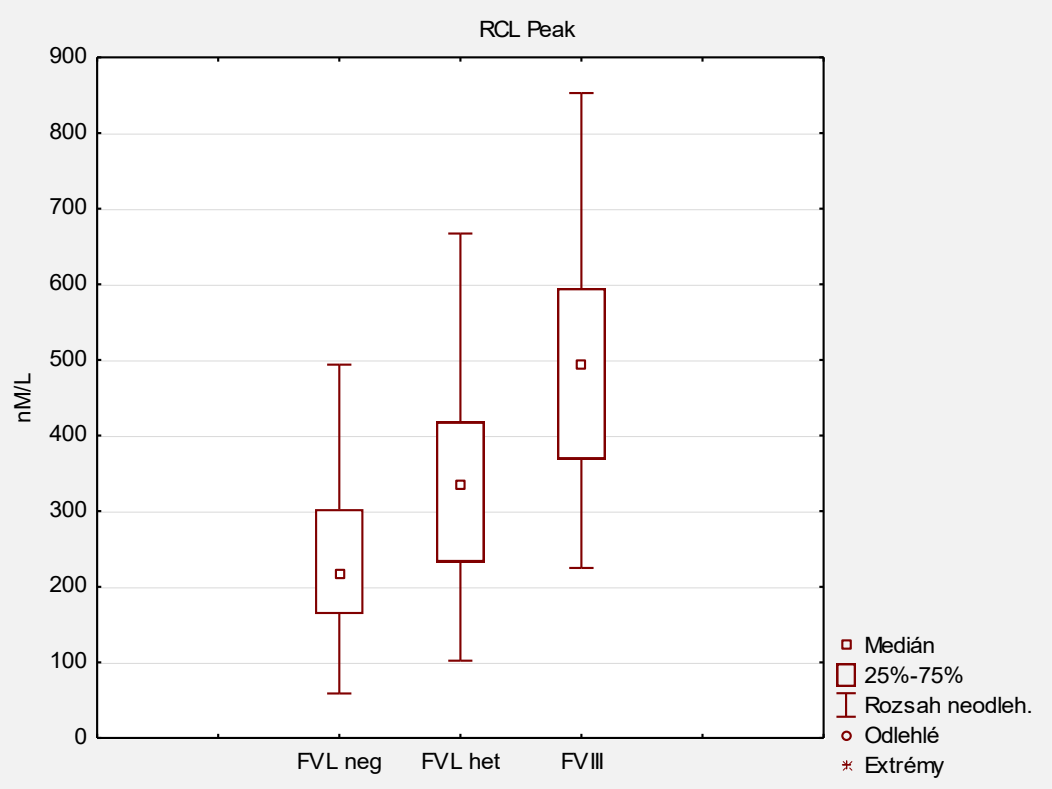
Graf 2 tPeak – čas dosažení maximální koncentrace trombinu

Tabulka 7 Statistický význam tPeak – času dosažení maximální koncentrace trombinu

RCL tPeak	hodnota p	statisticky významné	RCH tPeak	hodnota p	statisticky významné
FVL neg vs. FVL het	0,639	ne	FVL neg vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVIII	0,000	ano	FVL neg vs. FVIII	0,000	ano
FVL het vs. FVIII	0,000	ano	FVL het vs. FVIII	0,030	ano

U parametru tPeak není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

U stanovení TGT s nižší koncentrací fosfolipidů se významně zkracuje doba dosažení peaku trombinu u FVIII ve srovnání s negativní skupinou i s FVL het. U vyšší koncentrace fosfolipidů je čas dosažení peaku trombinu nižší u FVL het proti negativní skupině i proti faktoru VIII.



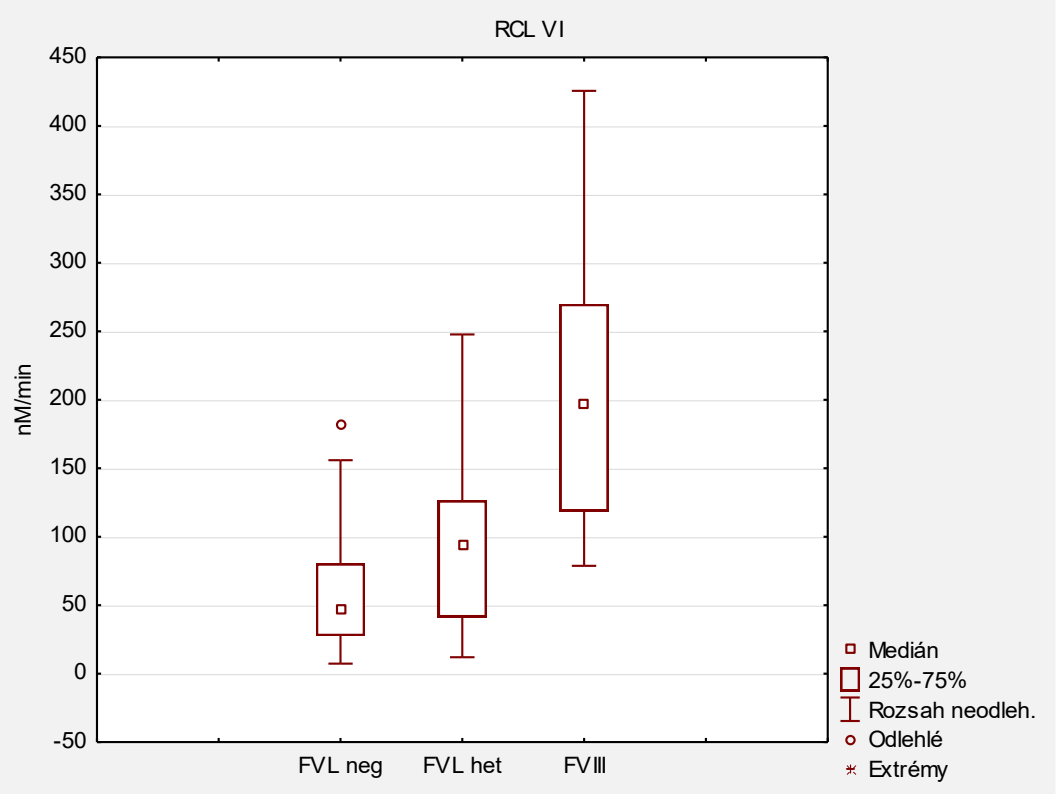
Graf 3 Peak – maximální koncentrace trombinu

Tabulka 8 Statistický význam Peak – maximální koncentrace trombinu

RCL Peak	hodnota p	statisticky významné	RCH Peak	hodnota p	statisticky významné
FVL neg vs. FVL het	0,000	ano	FVL neg vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVIII	0,000	ano	FVL neg vs. FVIII	0,000	ano
FVL het vs. FVIII	0,000	ano	FVL het vs. FVIII	0,000	ano

U parametru Peak jsou všechna porovnání statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

U stanovení TGT s nižší koncentrací fosfolipidů se zvyšuje peak trombinu u FVL het a FVIII ve srovnání s negativní skupinou a zvyšuje se i peak trombinu u FVIII proti FVL het. U vyšší koncentrace fosfolipidů se rovněž zvyšuje peak trombinu u FVL het a FVIII ve srovnání s negativní skupinou, i peak trombinu u FVIII proti FVL het.



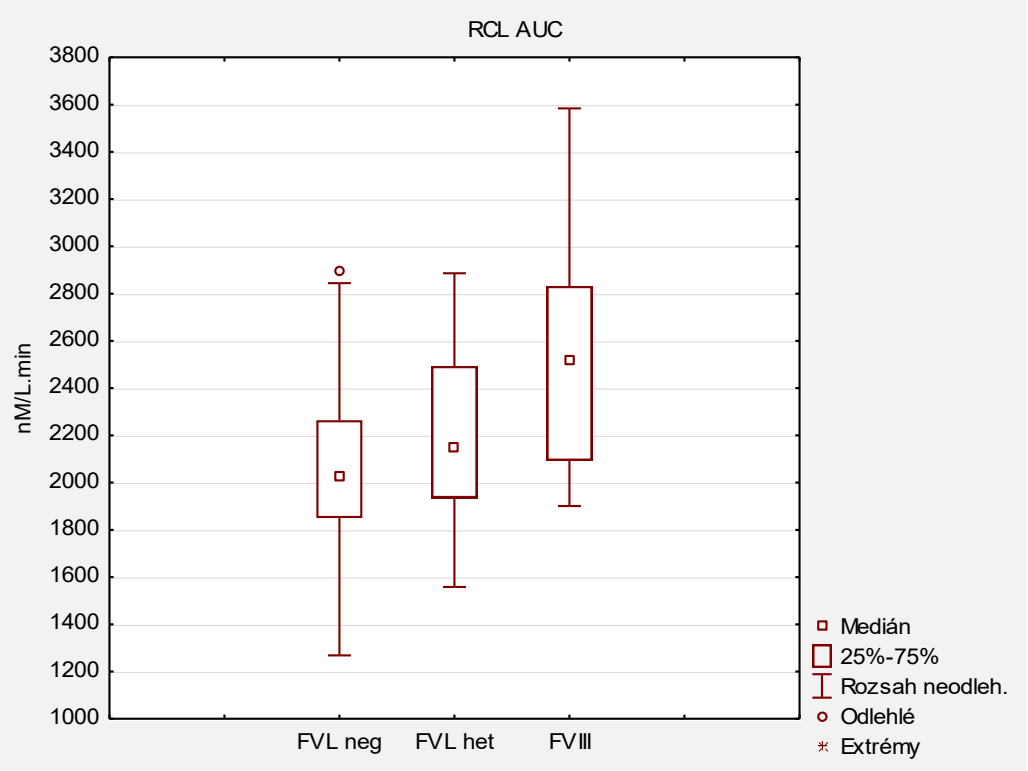
Graf 4 VI – rychlost tvorby trombinu

Tabulka 9 Statistický význam VI – rychlosti tvorby trombinu

RCL VI	hodnota p	statisticky významné	RCH VI	hodnota p	statisticky významné
FVL neg vs. FVL het	0,000	ano	FVL neg vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVIII	0,000	ano	FVL neg vs. FVIII	0,000	ano
FVL het vs. FVIII	0,000	ano	FVL het vs. FVIII	0,000	ano

U parametru Velocity index (VI) jsou všechna porovnání statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

U stanovení TGT s nižší koncentrací fosfolipidů se zvyšuje rychlost tvorby trombinu u FVL het a FVIII ve srovnání s negativní skupinou a zvyšuje se i VI u FVIII proti FVL het. Zvýšení rychlosti tvorby trombinu je průkazné i u vyšší koncentrace fosfolipidů.



Graf 5 AUC – endogenní trombinový potenciál

Tabulka 10 Statistický význam AUC – endogenního trombinového potenciálu

RCL AUC	hodnota p	statisticky významné	RCH AUC	hodnota p	statisticky významné
FVL neg vs. FVL het	0,012	ano	FVL neg vs. FVL het	0,116	ne
FVL neg vs. FVIII	0,000	ano	FVL neg vs. FVIII	0,000	ano
FVL het vs. FVIII	0,000	ne	FVL het vs. FVIII	0,000	ano

U parametru AUC není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

U stanovení TGT s nižší koncentrací fosfolipidů se zvyšuje endogenní trombinový potenciál u FVL het a FVIII ve srovnání s negativní skupinou a zvyšuje se i AUC u FVIII proti FVL het. Zvýšení rychlosti tvorby trombinu je průkazné u porovnávaných skupin i u vyšší koncentrace fosfolipidů.

5.2 Výsledky skupiny laboratorních vyšetření skupiny užívající přímé inhibitory koagulace

5.2.1 Dabigatran

V tabulce 11 a 12 jsou uvedeny výsledky měření generace trombinu u skupiny faktor V Leiden negativní a faktor V Leiden heterozygoti užívající dabigatran v minimu a maximu účinku léčby. V grafech 6–10 jsou znázorněny výsledky jednotlivých parametrů generace trombinu při použití dvou typů reagencií (RCL a RCH) s obsahem stejného množství tkáňového faktoru, ale lišící se obsahem fosfolipidů. Výsledky jsou také rozděleny v grafech podle doby odběru – při minimálním (min) nebo maximálním (max) účinku léku dabigatran. Pod každým grafem jsou uvedena statistická zhodnocení (tabulky 13–17).

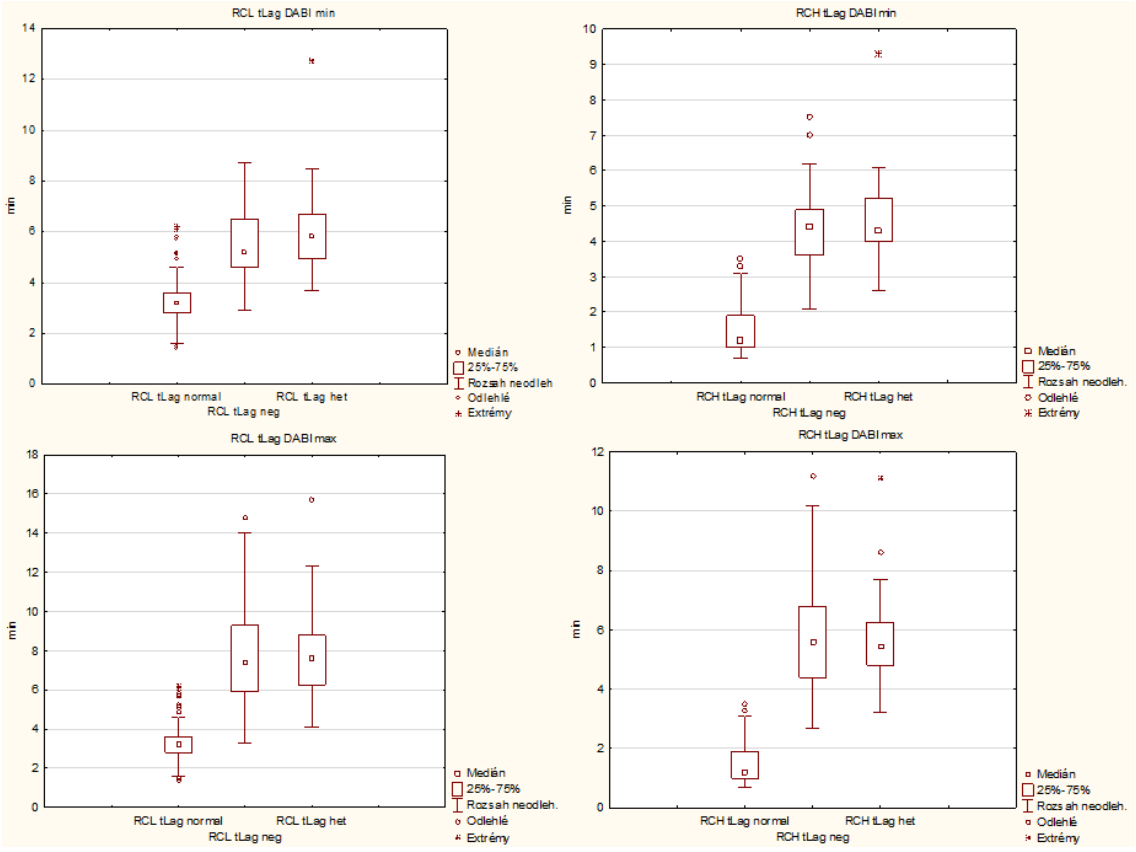
V grafech 11 a 12 jsou výsledky regresní analýzy závislosti generace trombinu na hladině užívaného léku u skupiny faktor V Leiden negativní a faktor V Leiden heterozygoti. Pod grafy jsou uvedena tabulka 18 s hodnotami statistické významnosti.

Tabulka 11 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden negativní užívající dabigatran

FVL neg n = 71	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	Sm.odch.
BMI (kg/m^2)	28,3	27,6	22,1	30,2	24,5	29,2	2,94
Min. účinek léku							
RCL tLag (min)	5,55	5,20	2,90	8,70	4,60	6,50	1,39
RCL tPeak (min)	8,93	8,50	6,00	13,60	7,80	10,00	1,72
RCL Peak (nM/L)	308,6	296,6	141,2	652,0	228,6	373,6	95,7
RCL VI (nM/min)	96,08	88,20	32,40	229,00	66,70	123,10	39,75
RCL AUC (nM/L.min)	2211,7	2194,8	836,3	3277,5	1968,0	2420,8	390,1
RCH tLag (min)	4,32	4,40	2,10	7,50	3,60	4,90	1,09
RCH tPeak (min)	7,11	7,20	4,30	10,70	6,10	8,00	1,40
RCH Peak (nM/L)	472,9	452,7	175,3	781,4	377,3	573,2	135,8
RCH VI (nM/min)	179,84	162,10	52,90	408,90	123,30	230,10	75,17
RCH AUC (nM/L.min)	2302,9	2282,8	828,4	3178,2	2012,3	2668,1	454,4
Max. účinek léku							
RCL tLag (min)	7,85	7,40	3,30	14,80	5,90	9,30	2,62
RCL tPeak (min)	11,40	10,90	5,80	20,40	9,10	13,10	3,17
RCL Peak (nM/L)	266,0	255,0	88,7	456,6	194,6	331,3	96,2
RCL VI (nM/min)	80,96	72,80	15,00	181,40	55,40	109,60	40,02
RCL AUC (nM/L.min)	2017,8	2004,5	875,7	3087,4	1636,1	2335,3	439,7
RCH tLag (min)	5,73	5,60	2,70	11,20	4,40	6,80	1,69
RCH tPeak (min)	8,50	8,30	4,80	14,40	6,90	9,60	2,03
RCH Peak (nM/L)	418,8	400,5	101,7	778,3	309,6	539,9	151,7
RCH VI (nM/min)	160,41	148,60	25,70	365,60	100,90	224,40	74,59
RCH AUC (nM/L.min)	2074,3	2060,1	839,3	3292,2	1649,0	2451,2	515,5

Tabulka 12 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden heterozygoti užívající dabigatran

FVL het n = 24	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	Sm.odch.
BMI (kg/m^2)	29,1	28,7	22,8	30,6	24,9	29,3	3,08
Min. účinek léku							
RCL tLag (min)	6,13	5,80	3,70	12,70	4,95	6,70	1,90
RCL tPeak (min)	9,79	9,25	6,80	17,70	8,45	11,25	2,34
RCL Peak (nM/L)	271,5	266,3	140,1	480,6	210,6	304,3	83,2
RCL VI (nM/min)	79,98	76,75	28,00	174,40	52,10	96,90	37,36
RCL AUC (nM/L.min)	2105,2	2130,4	1394,7	2632,1	1946,7	2282,1	286,8
RCH tLag (min)	4,55	4,30	2,60	9,30	4,00	5,20	1,38
RCH tPeak (min)	7,33	7,35	4,80	13,30	6,45	7,95	1,77
RCH Peak (nM/L)	470,5	475,9	184,4	730,5	415,1	540,9	125,1
RCH VI (nM/min)	181,54	184,70	45,80	315,90	131,20	227,55	71,04
RCH AUC (nM/L.min)	2266,3	2285,3	1331,6	3058,6	2066,0	2468,7	375,0
Max. účinek léku							
RCL tLag (min)	7,92	7,65	4,10	15,70	6,25	8,80	2,62
RCL tPeak (min)	11,48	11,00	6,60	20,90	9,80	12,35	3,12
RCL Peak (nM/L)	263,9	246,3	67,7	470,9	194,9	304,0	100,7
RCL VI (nM/min)	79,94	68,25	12,90	181,90	55,90	101,05	41,33
RCL AUC (nM/L.min)	1944,0	1941,6	919,5	2752,1	1859,9	2037,4	334,2
RCH tLag (min)	5,67	5,45	3,20	11,10	4,80	6,25	1,69
RCH tPeak (min)	8,29	8,10	5,30	14,30	7,35	8,75	1,88
RCH Peak (nM/L)	424,5	429,8	110,2	593,4	402,0	474,5	91,3
RCH VI (nM/min)	166,13	159,85	34,30	281,50	150,95	188,20	47,00
RCH AUC (nM/L.min)	2017,4	2063,9	862,4	2495,0	1918,3	2158,1	307,4



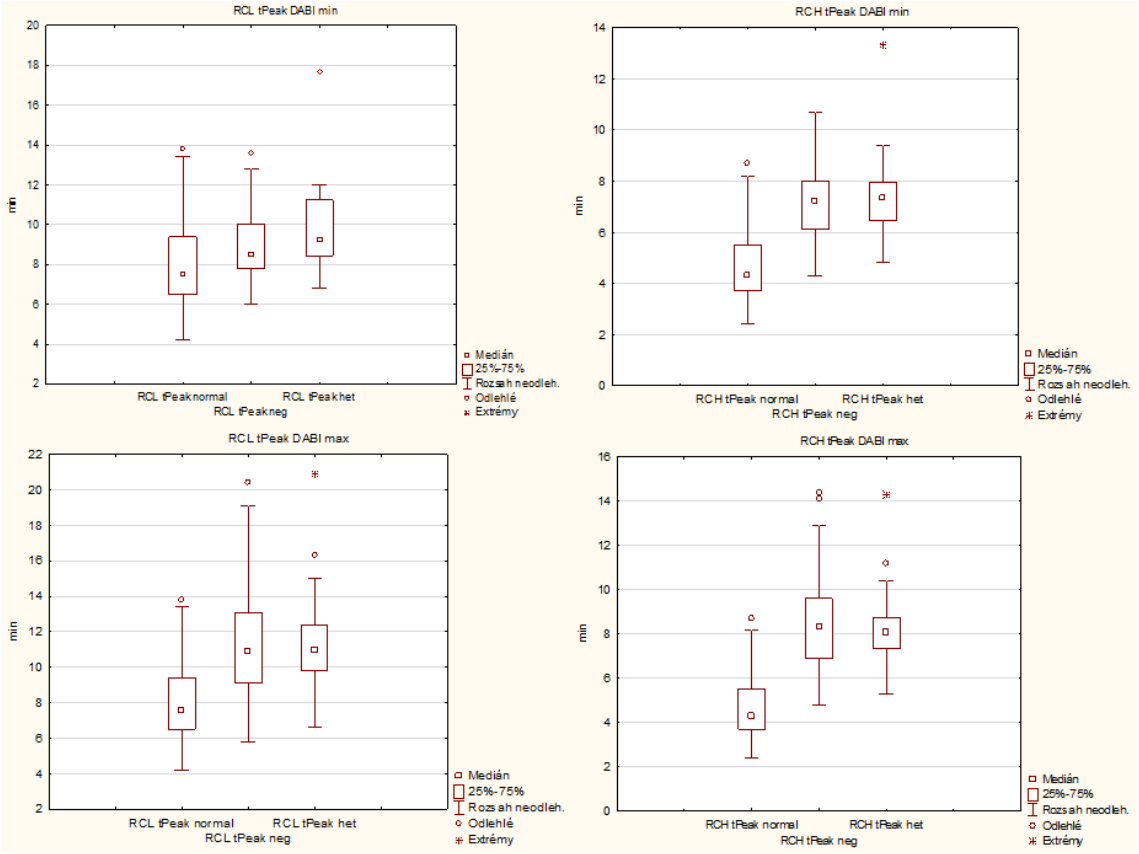
Graf 6 tLag – čas nástupu generace trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 13 Statistický význam tLag – času nástupu generace trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL tLag	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH tLag	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,904	ne	FVL neg vs. FVL het	0,886	ne

U parametru tLag není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se čas nástupu generace trombinu vlivem léčby prodlužuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné prodloužení času nástupu generace trombinu v minimu a maximu účinku léčby, ale mezi skupinou FVL neg a FVL het významný rozdíl není.



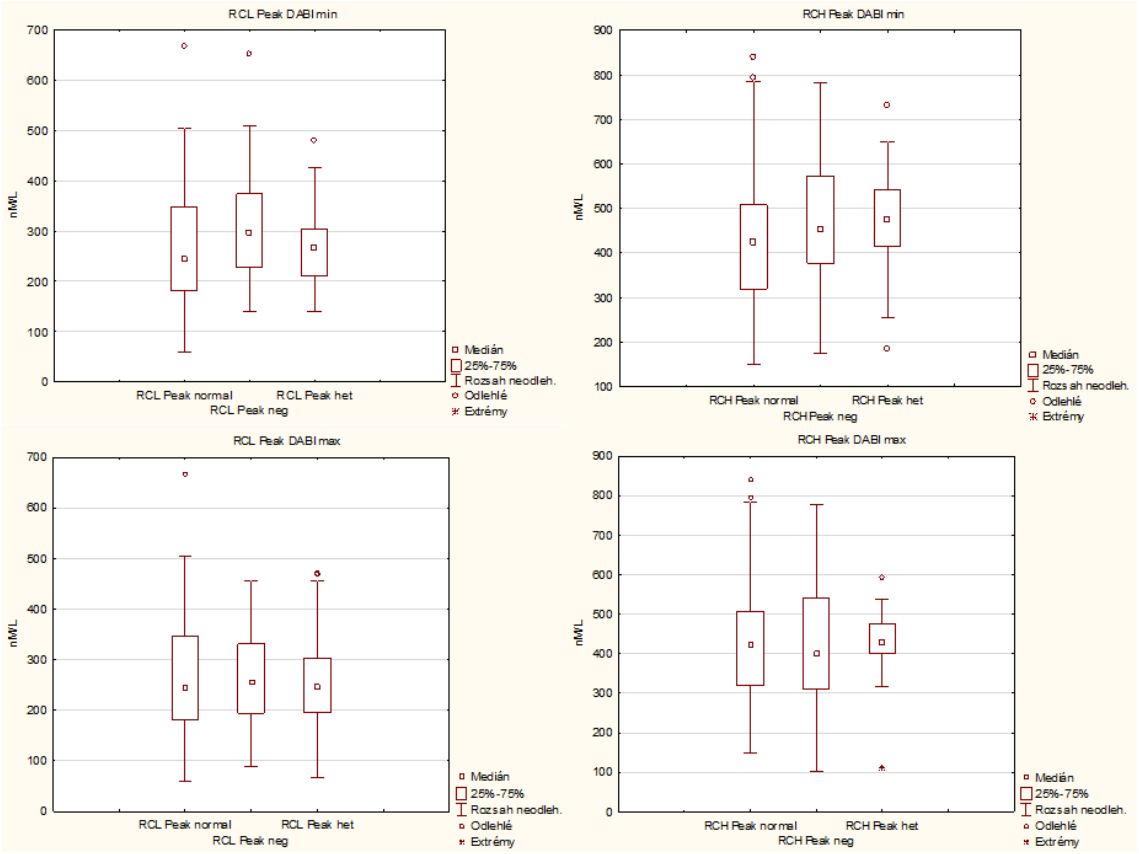
Graf 7 tPeak – čas dosažení peaku trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 14 Statistický význam tPeak – času dosažení peaku trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL tPeak	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH tPeak	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,914	ne	FVL neg vs. FVL het	0,661	ne

U parametru tPeak není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se čas dosažení peaku trombinu vlivem léčby prodlužuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné prodloužení času peaku trombinu v minimu a maximu účinku léčby, ale mezi skupinou FVL neg a FVL het významný rozdíl není.

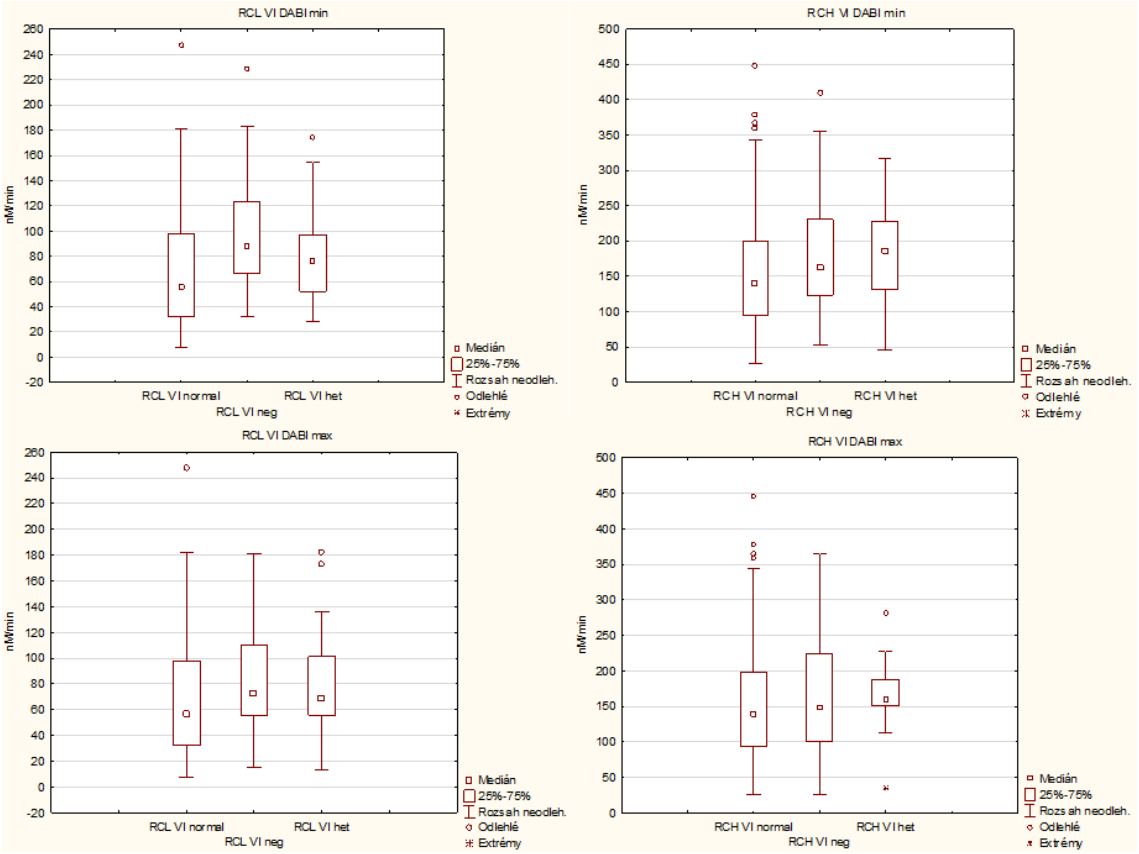


Graf 8 Peak – maximální koncentrace trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 15 Statistický význam Peak – maximální koncentrace trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL Peak	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH Peak	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,643	ne
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,898	ne
FVL neg vs. FVL het	0,929	ne	FVL neg vs. FVL het	0,864	ne

U parametru Peak není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Stejně tak není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCH normal a FVL neg i FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

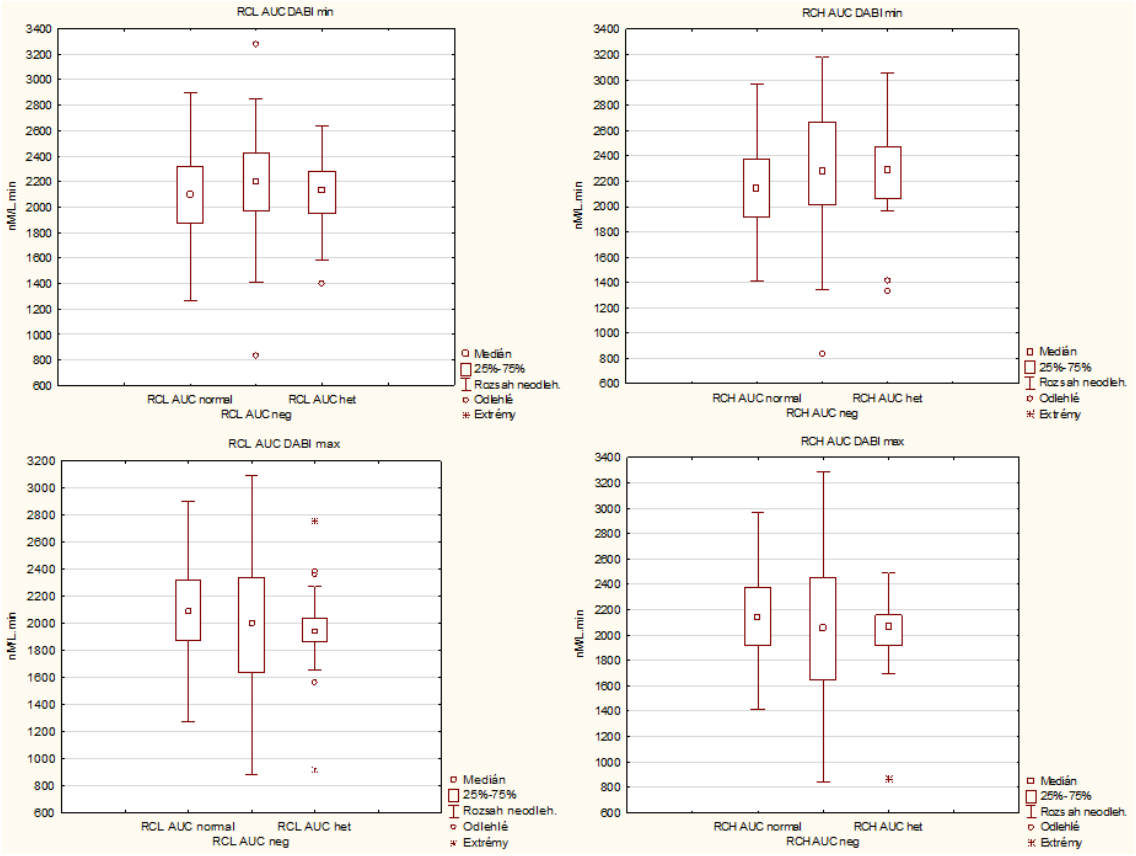


Graf 9 Velocity index – rychlost tvorby trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 16 Statistický význam Velocity index – rychlosti tvorby trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL VI	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH VI	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,034	ano	normal vs. FVL neg	0,618	ne
normal vs. FVL het	0,130	ne	normal vs. FVL het	0,512	ne
FVL neg vs. FVL het	0,915	ne	FVL neg vs. FVL het	0,736	ne

U parametru VI je statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL normal a FVL neg. Ostatní porovnání nejsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

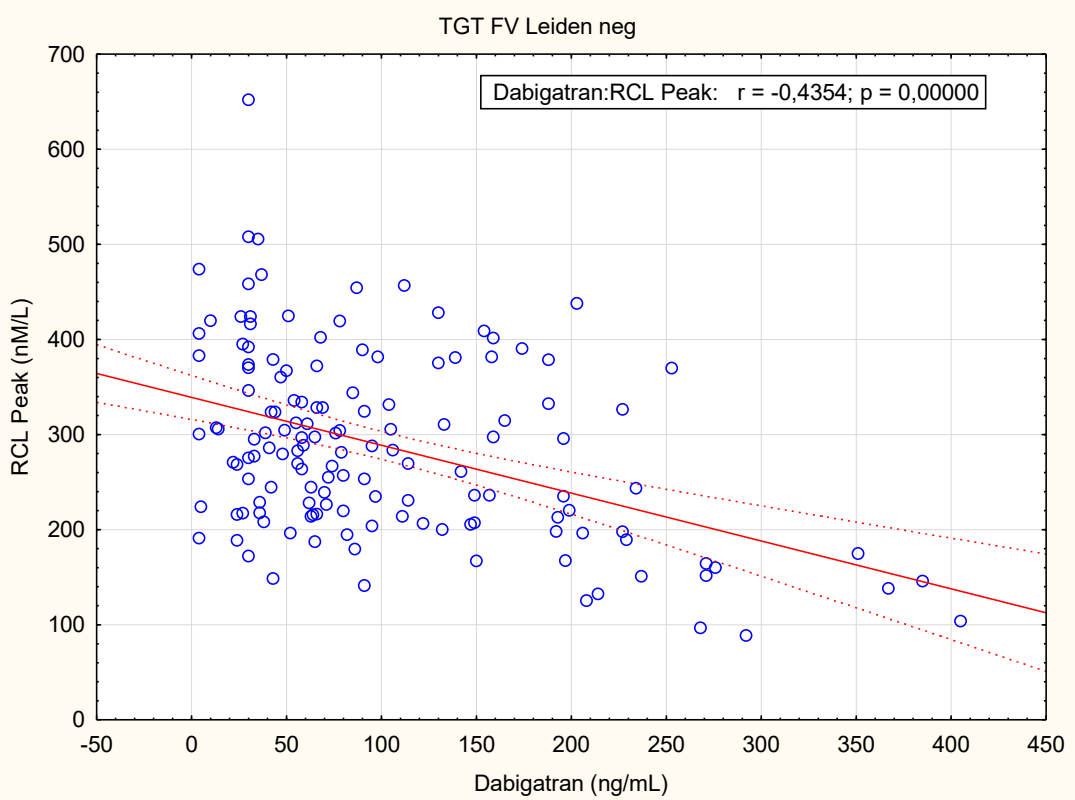


Graf 10 AUC – endogenní trombinový potenciál v minimu a maximu léčby

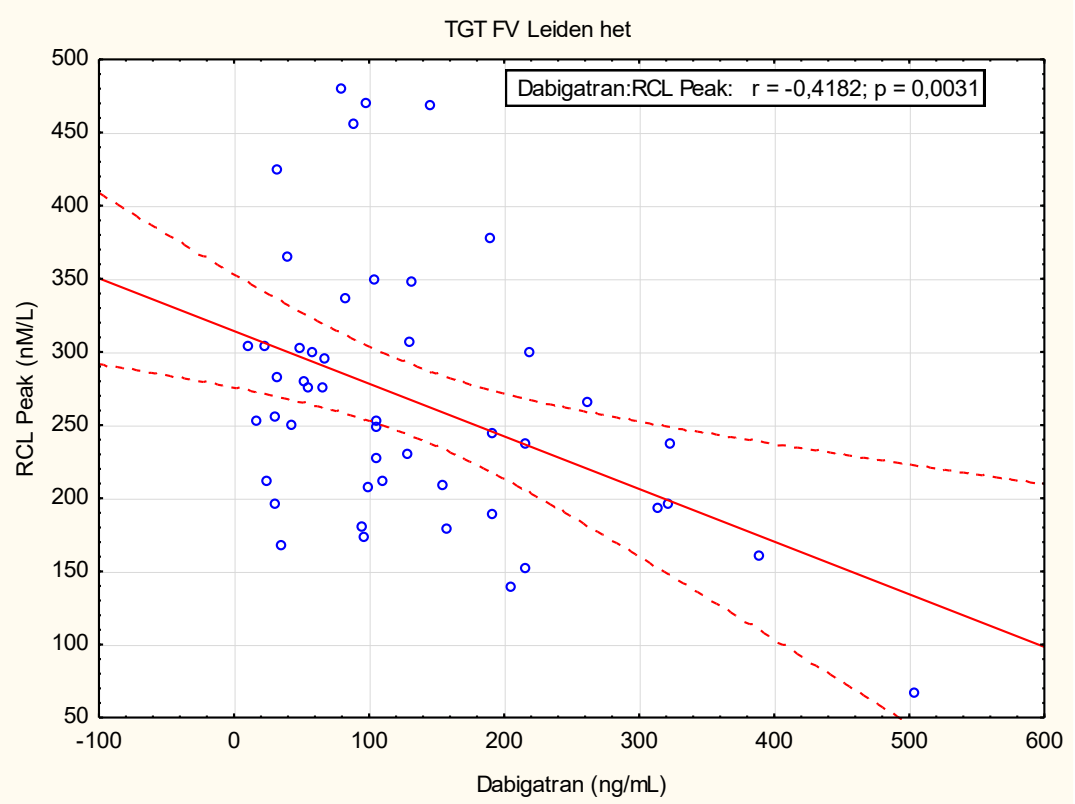
Tabulka 17 Statistický význam AUC – endogenního trombinového potenciálu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL AUC	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH AUC	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,119	ne	normal vs. FVL neg	0,084	ne
normal vs. FVL het	0,035	ano	normal vs. FVL het	0,031	ano
FVL neg vs. FVL het	0,455	ne	FVL neg vs. FVL het	0,611	ne

U parametru AUC je statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL normal a RCL FVL het a RCH normal a RCH FVL het. Ostatní porovnání nejsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.



Graf 11 Korelace hladiny dabigatranu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL neg



Graf 12 Korelace hladiny dabigatranu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL het

Tabulka 18 Korelace hladiny dabigatranu a generace trombinu u skupin FVL neg a FVL het

Dabigatran (ng/mL)	RCL Peak	RCL AUC	RCH Peak	RCH AUC
FV Leiden neg	-0,370252	-0,502170	-0,445328	-0,513894
FV Leiden het	-0,366844	-0,534524	-0,342471	-0,556509

Korelace je významná na hladině $p \leq 0,05$ u všech uvedených parametrů, ale hodnoty korelačních koeficientů jsou nízké.

5.2.2 Rivaroxaban

V tabulce 19 a 20 jsou uvedeny výsledky měření generace trombinu u skupiny faktor V Leiden negativní a faktor V Leiden heterozygoti užívající rivaroxaban v minimu a maximu účinku léčby. V grafech 13–17 jsou znázorněny výsledky jednotlivých parametrů generace trombinu při použití dvou typů reagencií (RCL a RCH) s obsahem stejného množství tkáňového faktoru, ale lišící se obsahem fosfolipidů. Výsledky jsou také rozděleny v grafech podle doby odběru – při minimálním (min) nebo maximálním (max) účinku léku rivaroxaban. Pod každým grafem jsou uvedena statistická zhodnocení (tabulky 21–25).

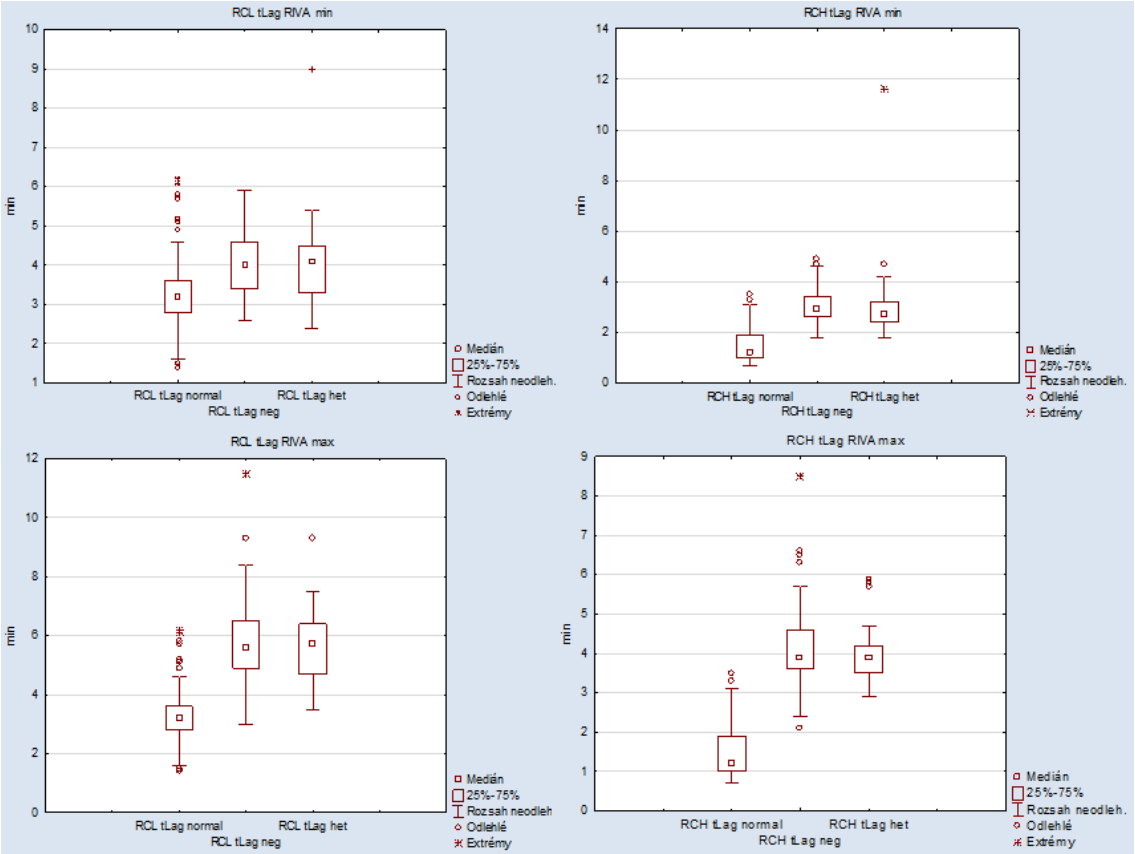
V grafech 18 a 19 jsou výsledky regresní analýzy závislosti generace trombinu na hladině užívaného léku u skupiny faktor V Leiden negativní a faktor V Leiden heterozygoti. Pod grafy je uvedena tabulka 26 s hodnotami statistické významnosti.

Tabulka 19 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden negativní užívající Rivaroxaban

FVL neg n = 73	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	Sm.odch.
BMI (kg/m^2)	29,5	28,9	20,9	30,6	23,6	29,7	3,03
Min. účinek léku							
RCL tLag (min)	4,09	4,00	2,60	5,90	3,40	4,60	0,85
RCL tPeak (min)	8,94	8,30	6,00	17,10	7,30	9,50	2,31
RCL Peak (nM/L)	227,2	202,3	77,7	661,2	158,3	274,8	105,0
RCL VI (nM/min)	58,39	44,80	10,10	250,20	29,60	72,30	45,92
RCL AUC (nM/L.min)	2236,4	2212,1	1391,7	3898,2	2007,5	2416,2	353,9
RCH tLag (min)	3,00	2,90	1,80	4,90	2,60	3,40	0,63
RCH tPeak (min)	6,20	5,80	4,10	12,10	5,00	7,00	1,61
RCH Peak (nM/L)	445,8	449,1	95,5	720,8	343,8	575,5	164,0
RCH VI (nM/min)	163,13	163,30	10,80	315,30	108,20	234,60	83,41
RCH AUC (nM/L.min)	2429,6	2418,2	1430,0	3300,2	2088,8	2784,3	457,3
Max. účinek léku							
RCL tLag (min)	5,86	5,60	3,00	11,50	4,90	6,50	1,51
RCL tPeak (min)	15,22	14,50	5,50	26,20	12,60	17,30	4,46
RCL Peak (nM/L)	114,9	92,0	36,2	656,9	73,3	121,3	103,9
RCL VI (nM/min)	20,26	9,80	2,00	379,90	7,10	16,20	46,12
RCL AUC (nM/L.min)	1757,4	1702,7	1051,4	3781,5	1495,3	1969,2	417,3
RCH tLag (min)	4,16	3,90	2,10	8,50	3,60	4,60	1,03
RCH tPeak (min)	10,35	9,70	4,50	18,10	7,90	12,40	3,24
RCH Peak (nM/L)	199,6	155,0	58,9	680,9	121,1	231,9	136,5
RCH VI (nM/min)	48,74	27,10	4,80	337,90	15,40	49,10	61,94
RCH AUC (nM/L.min)	1859,8	1779,9	990,4	3399,2	1598,2	2094,6	447,2

Tabulka 20 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden heterozygoti užívající Rivaroxaban

FVL het n = 39	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	Sm.odch.
BMI (kg/m^2)	28,7	28,4	21,2	30,8	22,9	29,1	2,99
Min. účinek léku							
RCL tLag (min)	4,16	4,10	2,40	9,00	3,30	4,50	1,35
RCL tPeak (min)	9,26	8,40	5,90	23,30	7,30	9,80	3,53
RCL Peak (nM/L)	212,4	199,9	35,0	395,1	171,2	266,4	77,7
RCL VI (nM/min)	51,57	43,00	2,50	140,80	28,50	75,10	30,36
RCL AUC (nM/L.min)	2176,7	2240,4	609,0	2900,8	1993,3	2474,5	412,1
RCH tLag (min)	3,08	2,70	1,80	11,60	2,40	3,20	1,55
RCH tPeak (min)	6,86	5,50	4,00	37,90	4,90	6,60	5,47
RCH Peak (nM/L)	444,9	457,6	31,6	724,4	337,7	565,8	172,5
RCH VI (nM/min)	164,81	176,10	1,20	335,40	112,20	222,70	87,33
RCH AUC (nM/L.min)	2373,9	2458,8	894,8	3134,8	2132,2	2782,7	496,3
Max. účinek léku							
RCL tLag (min)	5,67	5,70	3,50	9,30	4,70	6,40	1,33
RCL tPeak (min)	15,49	15,20	9,20	30,40	12,40	17,30	4,35
RCL Peak (nM/L)	95,7	88,9	40,5	187,6	65,5	123,2	34,6
RCL VI (nM/min)	11,94	10,20	1,90	35,90	6,30	16,00	7,87
RCL AUC (nM/L.min)	1706,2	1682,5	1167,6	2385,8	1494,6	1828,5	277,4
RCH tLag (min)	3,94	3,90	2,90	5,90	3,50	4,20	0,73
RCH tPeak (min)	10,16	9,50	5,70	20,00	7,80	12,40	3,32
RCH Peak (nM/L)	199,2	167,5	55,1	544,8	119,5	236,3	114,9
RCH VI (nM/min)	46,61	31,30	4,10	197,10	13,70	56,00	45,70
RCH AUC (nM/L.min)	1878,8	1803,1	984,0	2960,5	1590,0	2136,7	456,5



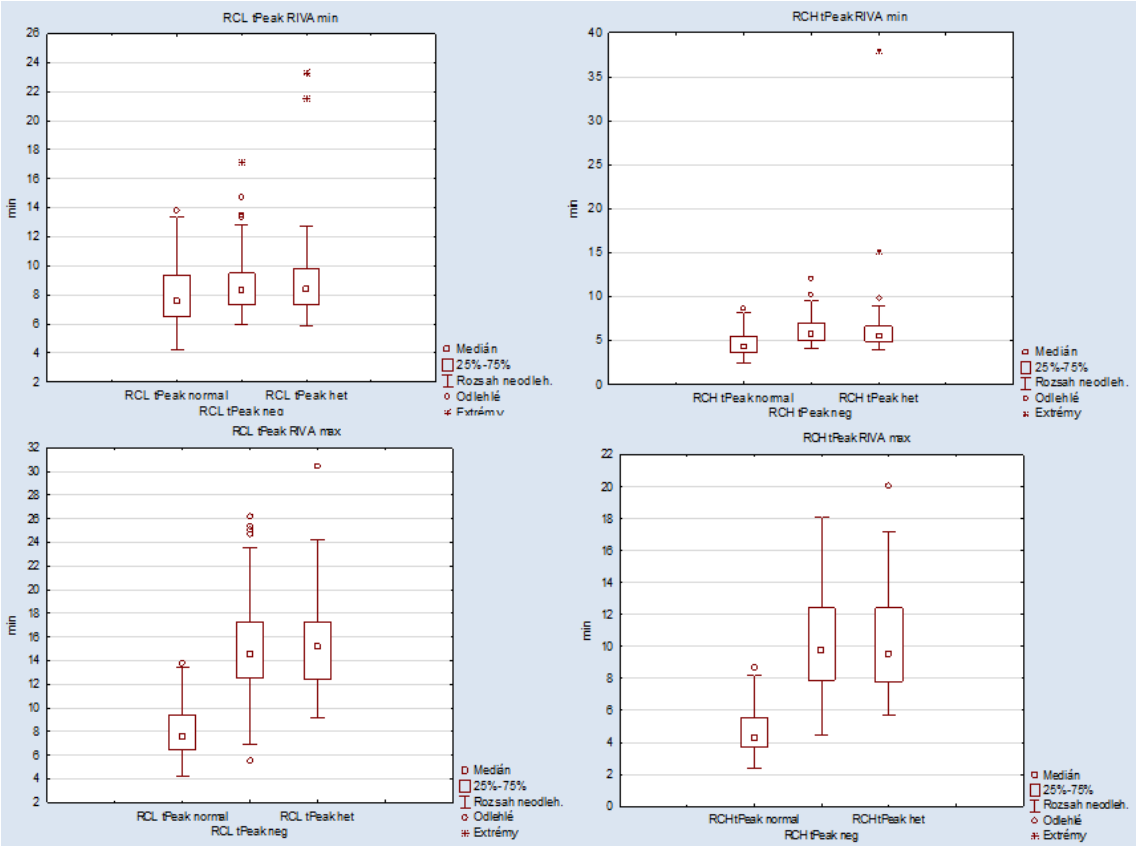
Graf 13 tLag – čas nástupu generace trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 21 Statistický význam tLag – času nástupu generace trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL tLag	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH tLag	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,512	ne	FVL neg vs. FVL het	0,231	ne

U parametru tLag není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se čas nástupu generace trombinu vlivem léčby prodlužuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné prodloužení času nástupu generace trombinu v minimu a maximu účinku léčby, ale mezi skupinou FVL neg a FVL het významný rozdíl není.



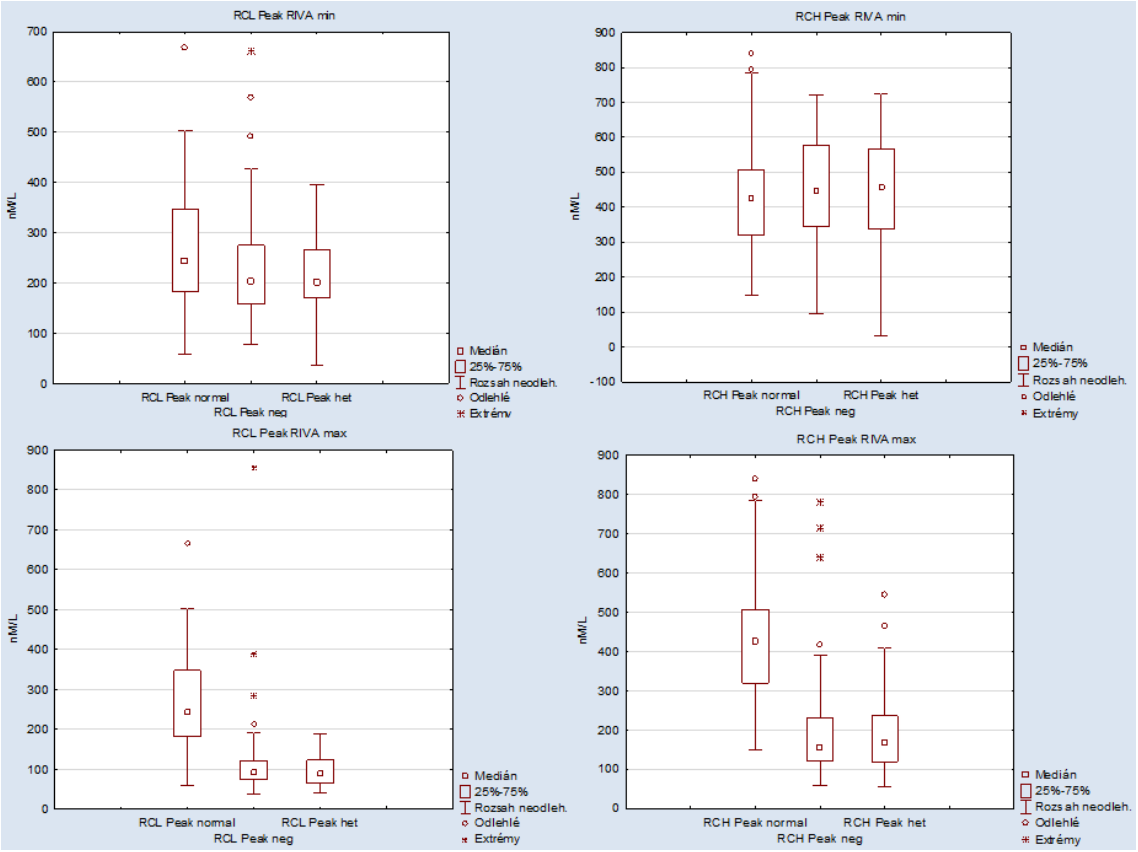
Graf 14 tPeak – čas dosažení peaku trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 22 Statistický význam tPeak – času dosažení peaku trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL tPeak	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH tPeak	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,758	ne	FVL neg vs. FVL het	0,781	ne

U parametru tPeak není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se čas dosažení peaku trombinu vlivem léčby v maximu účinku prodlužuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné prodloužení času peaku trombinu v minimu a maximu účinku léčby, ale mezi skupinou FVL neg a FVL het významný rozdíl není.



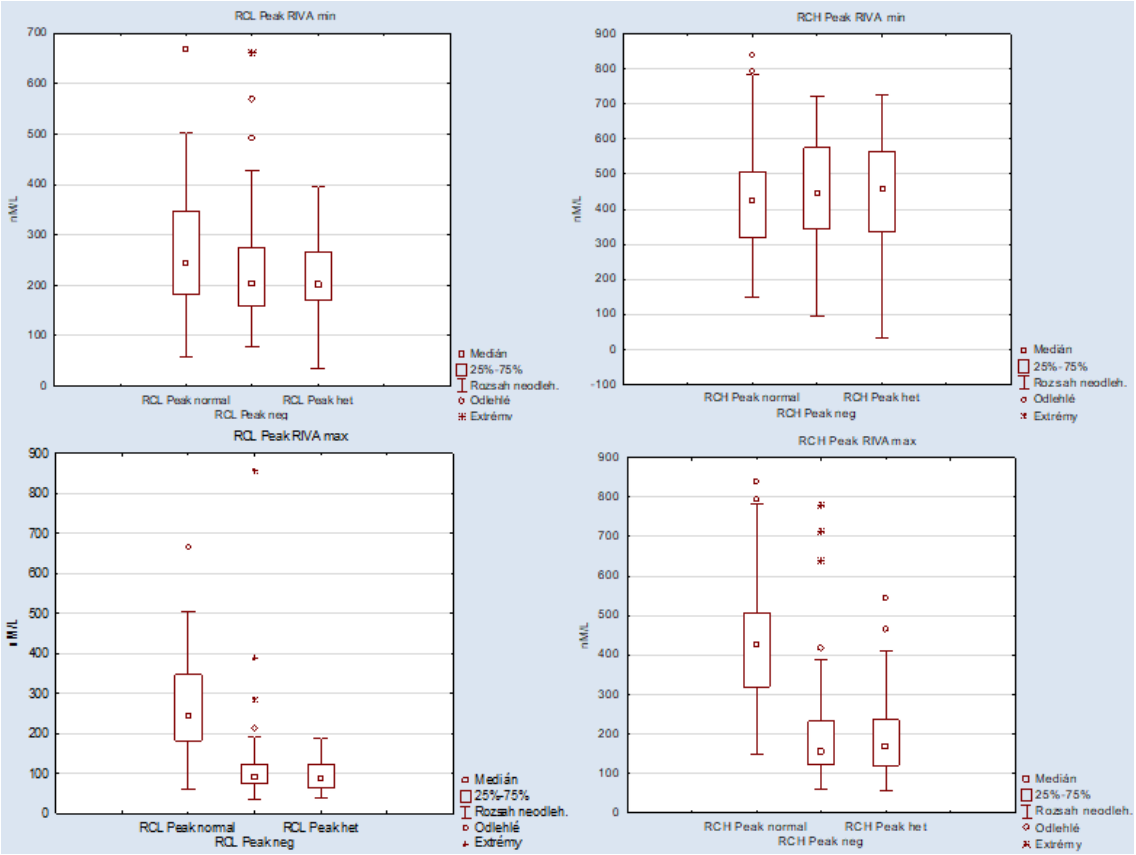
Graf 15 Peak – maximální koncentrace trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 23 Statistický význam Peak – maximální koncentrace trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL Peak	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH Peak	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,267	ne	FVL neg vs. FVL het	0,988	ne

U parametru Peak není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se peak trombinu vlivem léčby snižuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné snížení peaku trombinu v minimu a maximu účinku léčby, ale mezi skupinou FVL neg a FVL het významný rozdíl není.



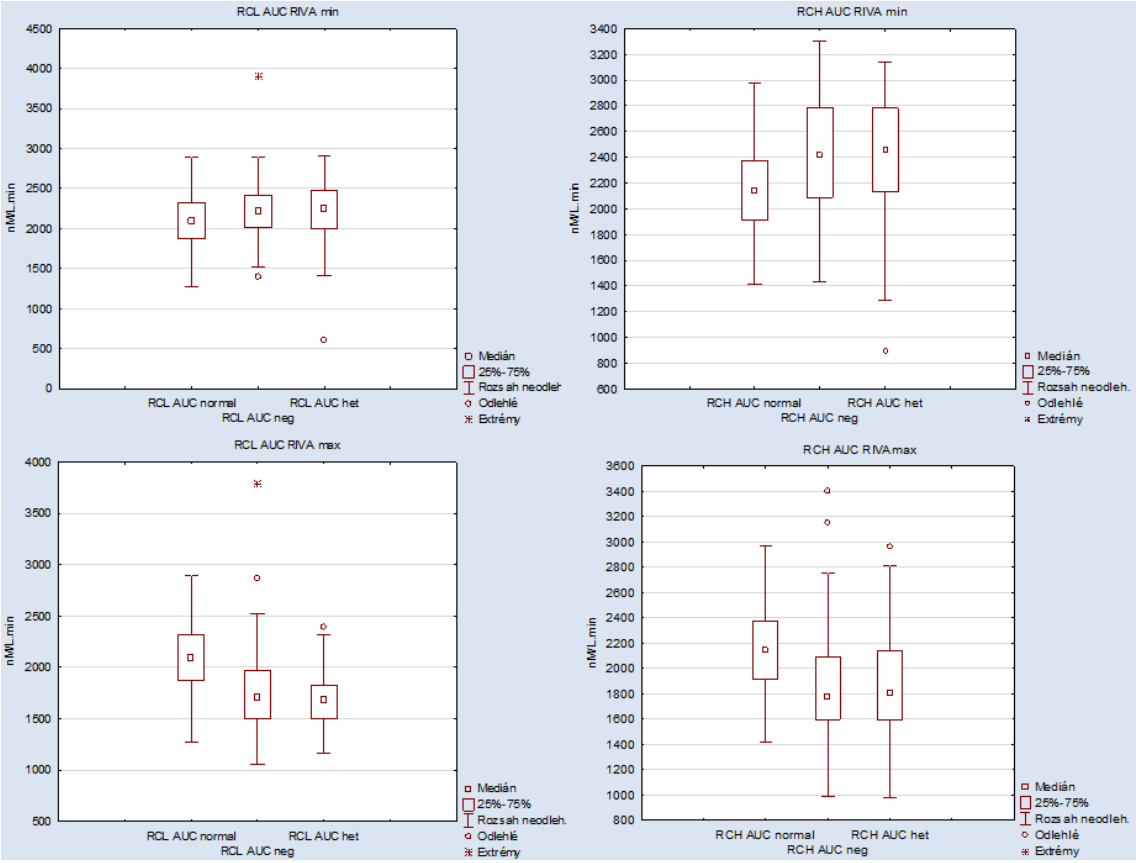
Graf 16 Velocity index – rychlost tvorby trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 24 Statistický význam Velocity index – rychlosti tvorby trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL VI	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH VI	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,268	ne	FVL neg vs. FVL het	0,850	ne

U parametru VI není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se rychlost tvorby trombinu (VI) vlivem léčby v maximu účinku snižuje proti skupině bez léčby. Také je vidět rozdílné snížení VI v minimu a maximu účinku léčby, ale mezi skupinou FVL neg a FVL het významný rozdíl není.



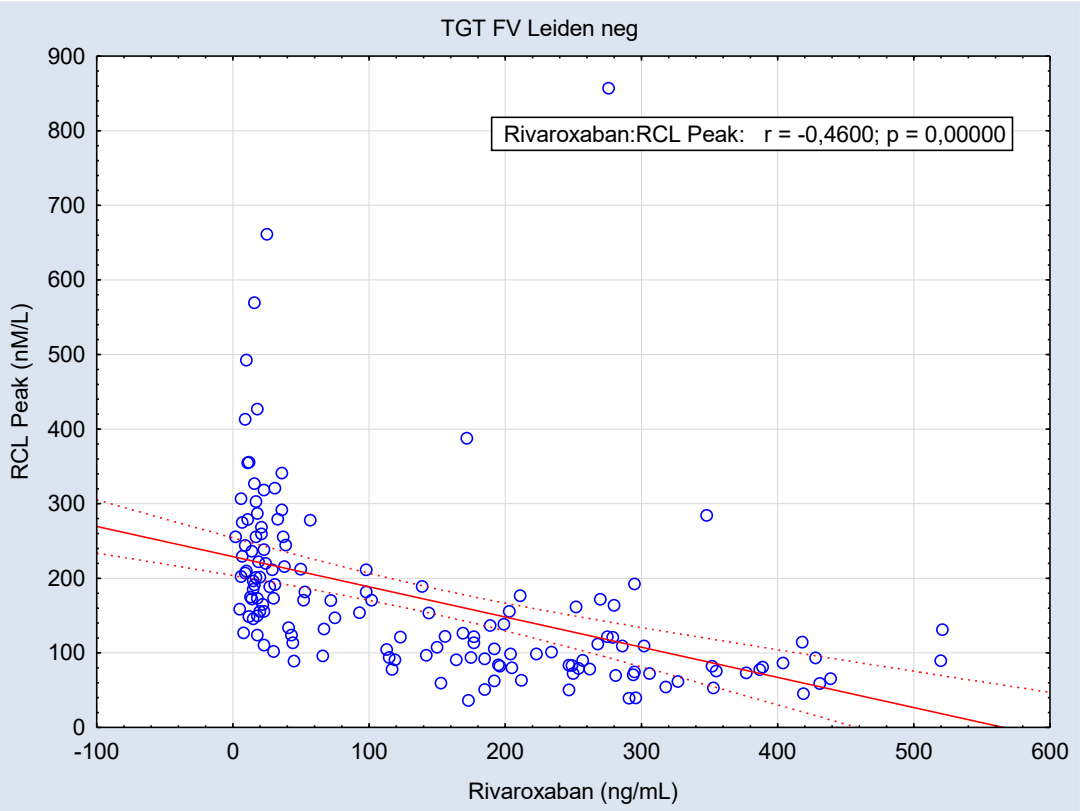
Graf 17 AUC – endogenní trombinový potenciál v minimu a maximu léčby

Tabulka 25 Statistický význam AUC – endogenního trombinového potenciálu v maximu léčby

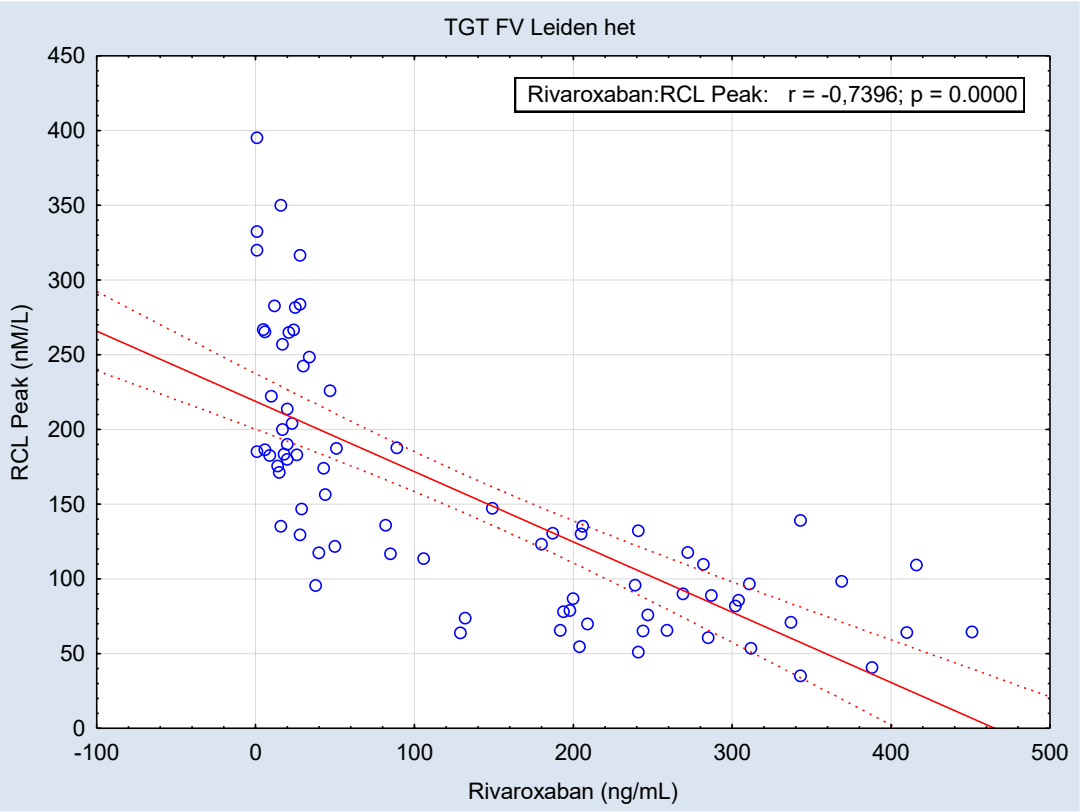
Max. účinek léčby RCL AUC	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH AUC	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,492	ne	FVL neg vs. FVL het	0,832	ne

U parametru AUC není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se endogenní trombinový potenciál (AUC) vlivem léčby v maximu účinku snižuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné snížení AUC v minimu a maximu účinku léčby. Mezi skupinou FVL neg a FVL het ale významný rozdíl není.



Graf 18 Korelace hladiny rivaroxabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL neg



Graf 19 Korelace hladiny rivaroxabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL het

Tabulka 26 Korelace hladiny rivaroxabanu a generace trombinu u skupiny FVL het a FVL neg

Rivaroxaban (ng/mL)	RCL Peak	RCL AUC	RCH Peak	RCH AUC
FV Leiden neg	-0,812411	-0,760995	-0,661663	-0,574117
FV Leiden het	-0,704690	-0,644947	-0,653225	-0,584681

Korelace je významná na hladině $p \leq 0,05$ u všech uvedených parametrů. Hodnoty korelačního koeficientu jsou vyšší pro skupinu FV Leiden neg i FV Leiden het u parametrů RCL Peak a RCL AUC.

5.2.3 Apixaban

V tabulce 27 a 28 jsou uvedeny výsledky měření generace trombinu u skupiny faktor V Leiden negativní a faktor V Leiden heterozygoti užívající apixaban v minimu a maximu účinku léčby. V grafech 20–24 jsou znázorněny výsledky jednotlivých parametrů generace trombinu při použití dvou typů reagencií (RCL a RCH) s obsahem stejného množství tkáňového faktoru, ale lišící se obsahem fosfolipidů. Výsledky jsou také rozděleny v grafech podle doby odběru – při minimálním (min) nebo maximálním (max) účinku léku apixabanu. Pod každým grafem jsou uvedena statistická zhodnocení (tabulky 29–33).

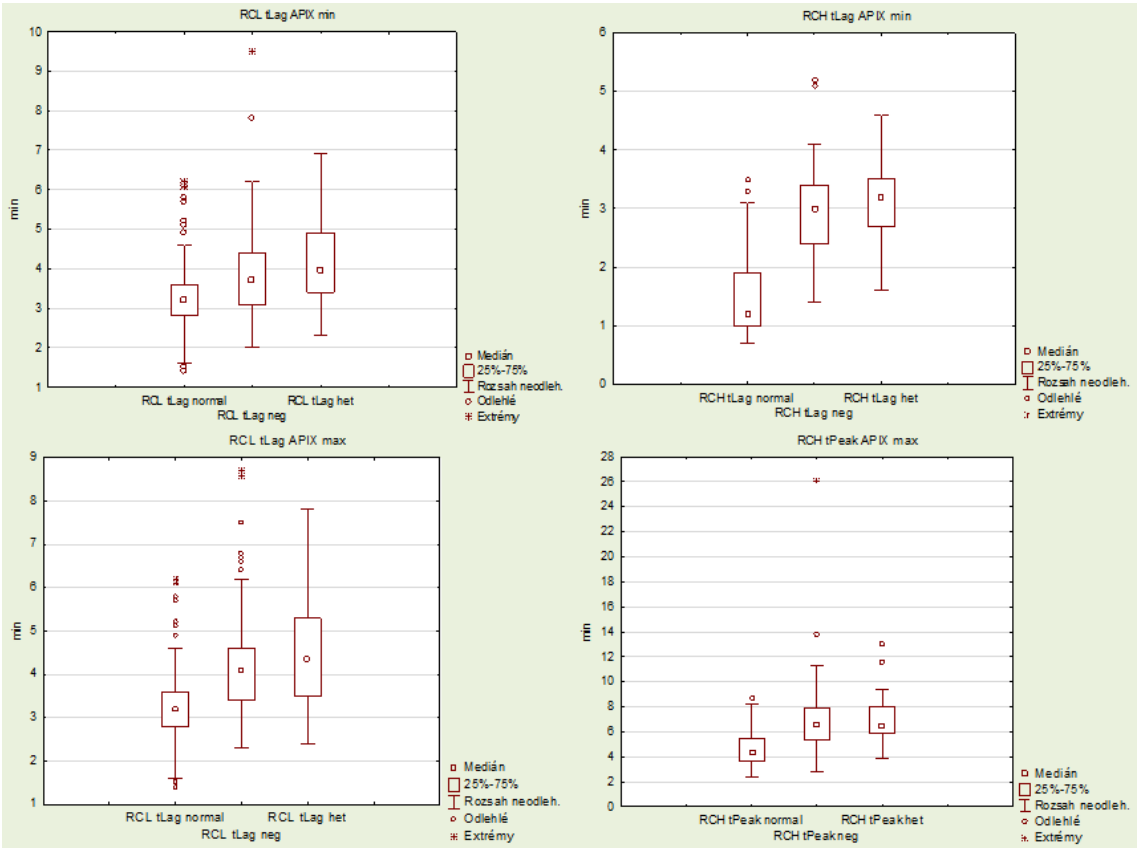
V grafech 25 a 26 jsou výsledky regresní analýzy závislosti generace trombinu na hladině užívaného léku u skupiny faktor V Leiden negativní a faktor V Leiden heterozygoti. Pod grafy jsou uvedena tabulka 34 s hodnotami statistické významnosti.

Tabulka 27 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden negativní užívající apixaban

FVL neg n = 79	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	Sm.odch.
BMI (kg/m^2)	29,5	28,9	20,9	30,6	23,6	29,7	3,03
Min. účinek léku							
RCL tLag (min)	3,95	3,70	2,00	9,50	3,10	4,40	1,22
RCL tPeak (min)	8,39	7,80	4,60	22,10	6,80	9,30	2,75
RCL Peak (nM/L)	210,3	182,4	43,1	531,1	145,4	265,3	107,0
RCL VI (nM/min)	57,96	46,60	3,40	203,00	30,20	73,60	42,95
RCL AUC (nM/L.min)	2138,3	2143,1	1012,3	3095,8	1906,2	2363,5	373,2
RCH tLag (min)	3,00	3,00	1,40	5,20	2,40	3,40	0,71
RCH tPeak (min)	6,13	5,90	3,70	12,90	4,90	7,00	1,61
RCH Peak (nM/L)	404,5	400,5	63,3	778,7	255,7	560,3	175,3
RCH VI (nM/min)	150,39	139,80	9,20	344,40	71,90	226,10	88,49
RCH AUC (nM/L.min)	2298,0	2346,7	843,1	3396,5	1945,8	2622,5	475,6
Max. účinek léku							
RCL tLag (min)	4,29	4,10	2,30	8,70	3,40	4,60	1,31
RCL tPeak (min)	10,29	8,80	6,00	27,90	7,60	12,00	4,18
RCL Peak (nM/L)	140,1	123,6	25,2	424,7	86,7	167,3	72,6
RCL VI (nM/min)	32,61	25,40	1,60	154,00	14,20	45,50	26,46
RCL AUC (nM/L.min)	1922,2	1957,0	714,2	2713,1	1742,0	2120,5	372,5
RCH tLag (min)	3,29	3,30	1,50	6,10	2,70	3,70	0,81
RCH tPeak (min)	7,15	6,60	2,80	26,10	5,40	7,90	2,88
RCH Peak (nM/L)	303,6	277,0	6,3	670,0	160,4	442,8	175,7
RCH VI (nM/min)	103,44	86,40	1,80	296,10	37,90	161,70	79,59
RCH AUC (nM/L.min)	2066,4	2081,1	193,4	3057,4	1722,5	2557,7	569,8

Tabulka 28 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden heterozygoti užívající apixaban

FVL het n = 46	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	Sm.odch.
BMI (kg/m^2)	28,7	28,4	21,2	30,8	22,9	29,1	2,99
Min. účinek léku							
RCL tLag (min)	4,13	3,95	2,30	6,90	3,40	4,90	1,12
RCL tPeak (min)	8,60	8,00	4,80	16,10	7,10	9,70	2,34
RCL Peak (nM/L)	198,8	176,8	51,7	503,0	150,3	244,2	88,6
RCL VI (nM/min)	52,47	43,55	5,70	213,50	32,10	62,20	37,34
RCL AUC (nM/L.min)	2153,1	2106,5	1189,3	3131,3	1948,3	2387,8	347,5
RCH tLag (min)	3,04	3,20	1,60	4,60	2,70	3,50	0,71
RCH tPeak (min)	6,25	6,25	3,70	11,20	5,30	6,90	1,48
RCH Peak (nM/L)	401,3	396,4	66,0	724,0	328,6	527,9	156,6
RCH VI (nM/min)	143,50	140,90	8,90	324,00	92,90	193,60	77,72
RCH AUC (nM/L.min)	2334,3	2387,5	990,7	3177,0	2106,8	2617,0	434,0
Max. účinek léku							
RCL tLag (min)	4,44	4,35	2,40	7,80	3,50	5,30	1,34
RCL tPeak (min)	10,46	9,55	5,30	26,40	8,70	11,10	3,81
RCL Peak (nM/L)	139,3	122,4	45,9	411,0	102,1	155,9	70,3
RCL VI (nM/min)	30,93	23,00	2,20	147,20	18,70	31,20	29,10
RCL AUC (nM/L.min)	1964,2	1939,2	1229,0	2664,2	1792,3	2166,7	291,9
RCH tLag (min)	3,25	3,20	1,70	4,90	2,90	3,90	0,69
RCH tPeak (min)	6,92	6,50	3,90	13,00	5,90	8,00	1,81
RCH Peak (nM/L)	311,8	300,8	55,2	676,7	188,9	441,4	153,8
RCH VI (nM/min)	103,39	89,30	6,50	313,50	46,70	143,20	70,54
RCH AUC (nM/L.min)	2148,7	2131,3	965,4	2974,7	1883,3	2561,9	473,0



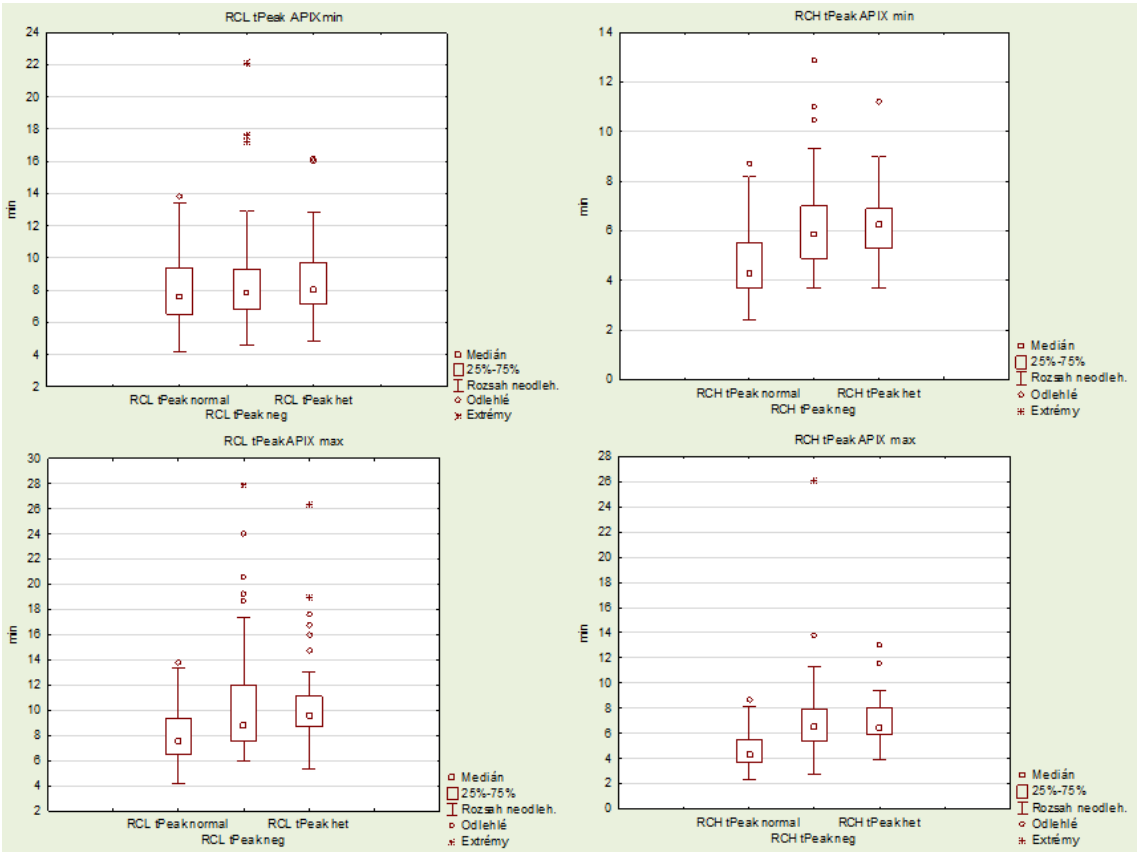
Graf 20 tLag – čas nástupu generace trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 29 Statistický význam tLag – času nástupu generace trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL tLag	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH tLag	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,562	ne	FVL neg vs. FVL het	0,769	ne

U parametru tLag není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se čas nástupu generace trombinu vlivem léčby prodlužuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné prodloužení času nástupu generace trombinu v minimu a maximu účinku léčby, ale mezi skupinou FVL neg a FVL het významný rozdíl není.



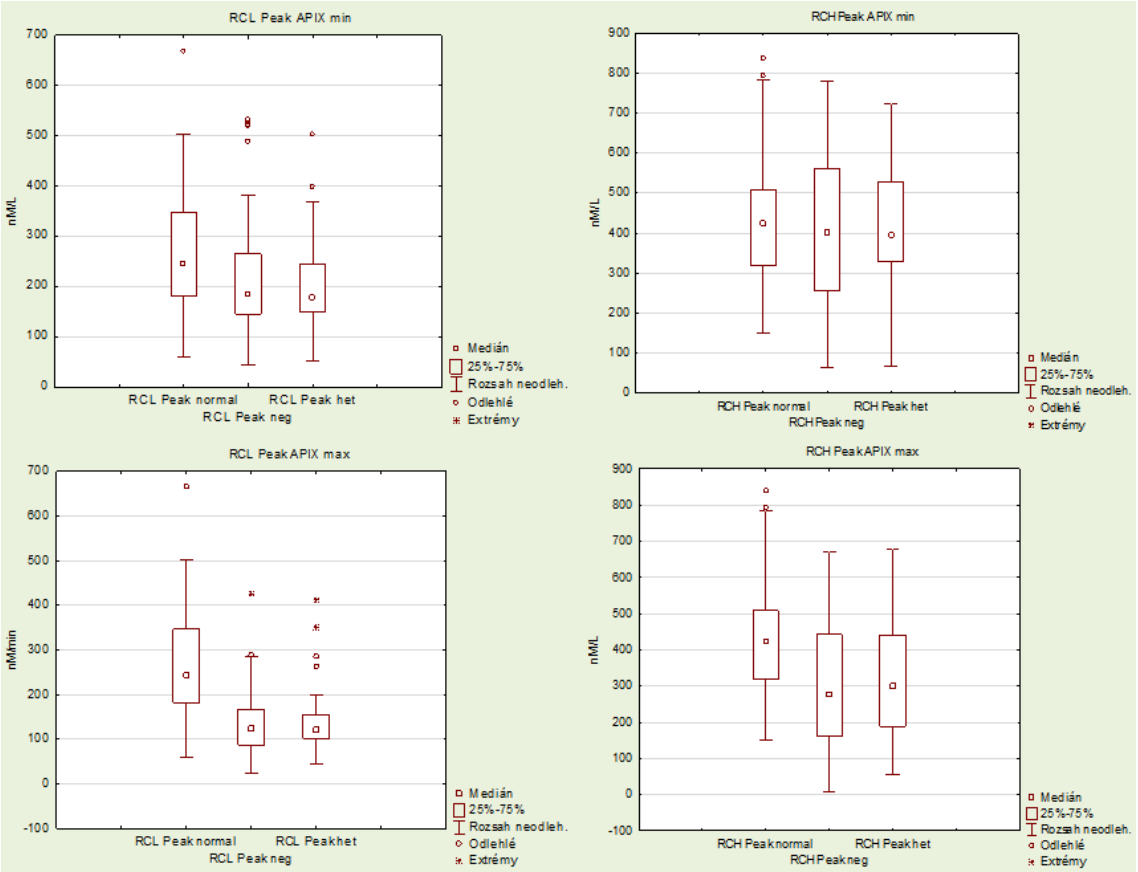
Graf 21 tPeak – čas dosažení peaku trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 30 Statistický význam tPeak – času dosažení peaku trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL tPeak	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH tPeak	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,819	ne	FVL neg vs. FVL het	0,632	ne

U parametru tPeak není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se čas peaku trombinu vlivem léčby v maximu účinku prodlužuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné prodloužení času peaku trombinu v minimu a maximu účinku léčby, ale mezi skupinou FVL neg a FVL het významný rozdíl není.



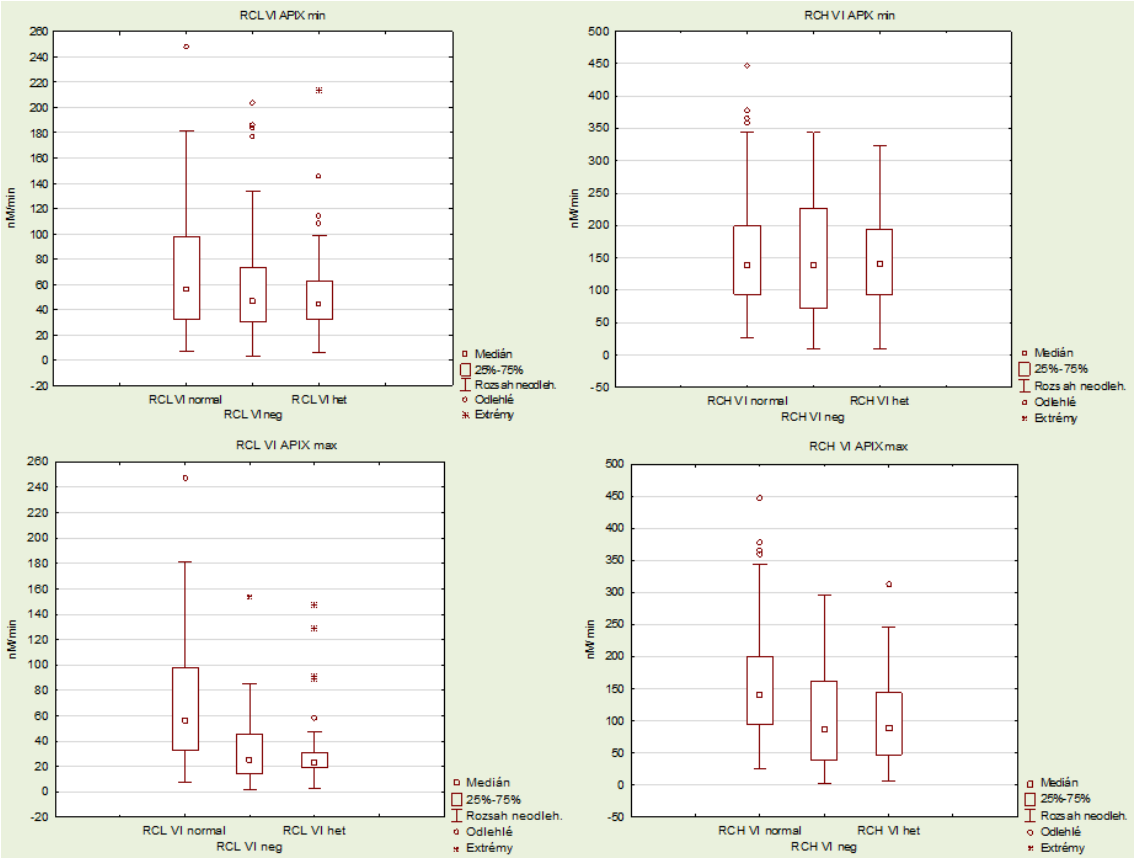
Graf 22 Peak – maximální koncentrace trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 31 Statistický význam Peak – maximální koncentrace trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL Peak	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH Peak	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,950	ne	FVL neg vs. FVL het	0,792	ne

U parametru Peak není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se peak trombinu vlivem léčby snižuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné snížení peaku trombinu v minimu a maximu účinku léčby, ale mezi skupinou FVL neg a FVL het významný rozdíl není.



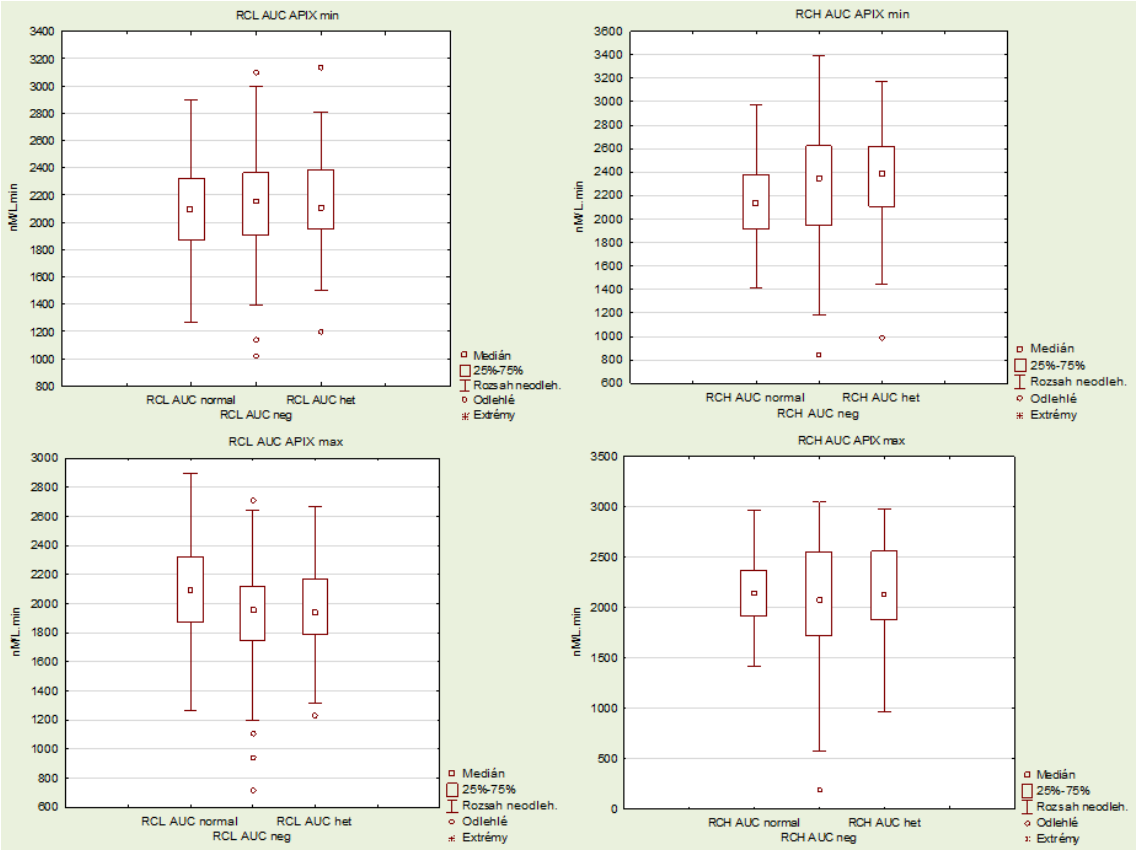
Graf 23 Velocity index – rychlost tvorby trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 32 Statistický význam Velocity index – rychlosti tvorby trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL VI	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH VI	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,741	ne	FVL neg vs. FVL het	0,997	ne

U parametru VI není statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVL het. Ostatní porovnání jsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se rychlost tvorby trombinu vlivem léčby v maximálním účinku snižuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné snížení VI v minimu a maximu účinku léčby, ale mezi skupinou FVL neg a FVL het významný rozdíl není.



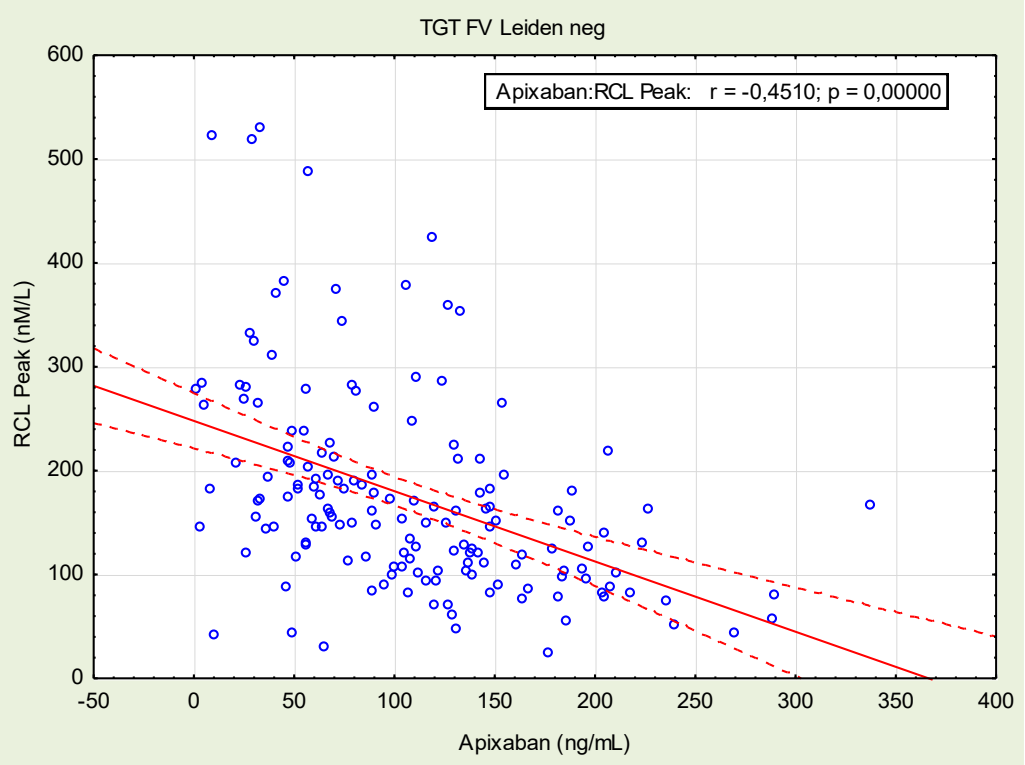
Graf 24 AUC – endogenní trombinový potenciál v minimu a maximu léčby

Tabulka 33 Statistický význam AUC – endogenního trombinového potenciálu v maximu léčby

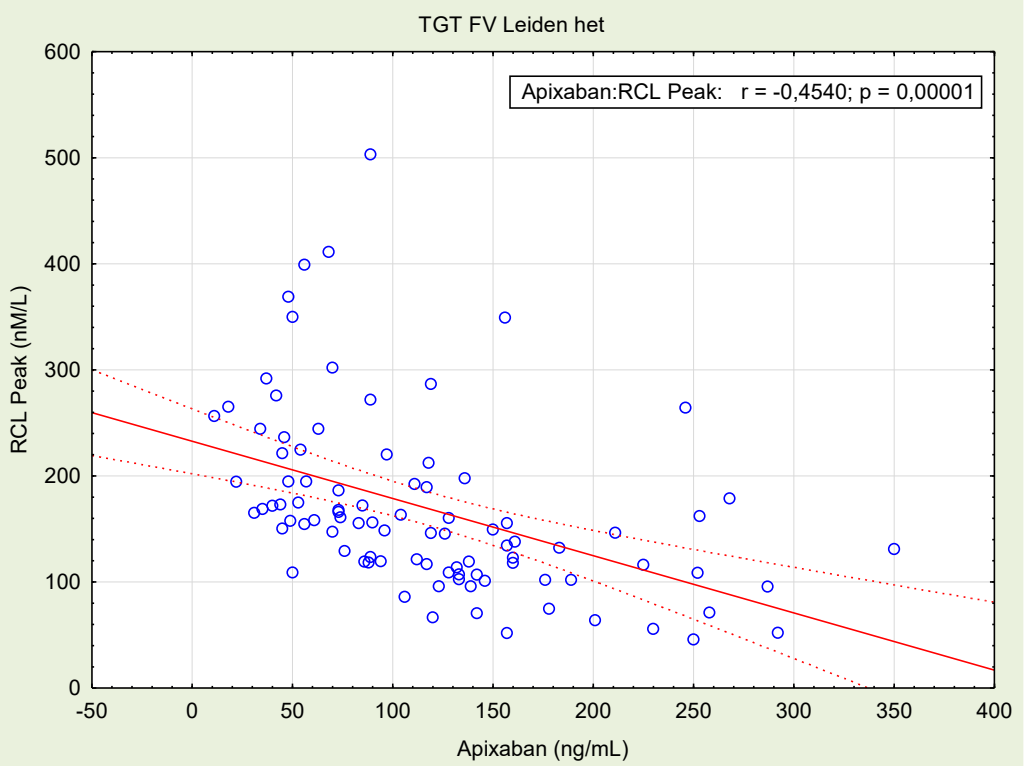
Max. účinek léčby RCL AUC	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH AUC	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,069	ne
normal vs. FVL het	0,013	ano	normal vs. FVL het	0,725	ne
FVL neg vs. FVL het	0,513	ne	FVL neg vs. FVL het	0,410	ne

U parametru AUC je statisticky významný rozdíl mezi výsledky RCL normal a RCL FVL neg a RCL normal a RCL FVL het. Ostatní porovnání nejsou statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$.

Z grafického znázornění je patrné, že se endogenní trombinový potenciál (AUC) vlivem léčby v maximu účinku mírně snižuje proti skupině bez léčby a také je vidět mírný rozdíl ve snížení AUC v minimu a maximu účinku léčby. Mezi skupinou FVL neg a FVL het ale významný rozdíl není.



Graf 25 Korelace hladiny apixabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL neg



Graf 26 Korelace hladiny apixabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL het

Tabulka 34 Korelace hladiny apixabanu generace trombinu u skupiny FVL neg a FVL het

Apixaban (ng/mL)	RCL Peak	RCL AUC	RCH Peak	RCH AUC
FV Leiden neg	-0,503731	-0,414352	-0,442654	-0,388383
FV Leiden het	-0,454012	-0,441803	-0,407828	-0,385015

Korelace je významná na hladině $p \leq 0,05$ u všech uvedených parametrů, ale hodnoty korelačních koeficientů jsou nízké.

5.2.4 Edoxaban

V tabulce 35 a 36 jsou uvedeny výsledky měření generace trombinu u skupiny faktor V Leiden negativní a faktor V Leiden heterozygoti užívající edoxaban v minimu a maximu účinku léčby. V grafech 27–31 jsou znázorněny výsledky jednotlivých parametrů generace trombinu při použití dvou typů reagencií (RCL a RCH) s obsahem stejného množství tkáňového faktoru, ale lišící se obsahem fosfolipidů. Výsledky jsou také rozděleny v grafech podle doby odběru – při minimálním (min) nebo maximálním (max) účinku léku edoxaban. Pod každým grafem jsou uvedena statistická zhodnocení (tabulky 37–41).

V grafech 32 a 33 jsou výsledky regresní analýzy závislosti generace trombinu na hladině užívaného léku u skupiny faktor V Leiden negativní a faktor V Leiden heterozygoti. Pod grafy je uvedena tabulka 42 s hodnotami statistické významnosti.

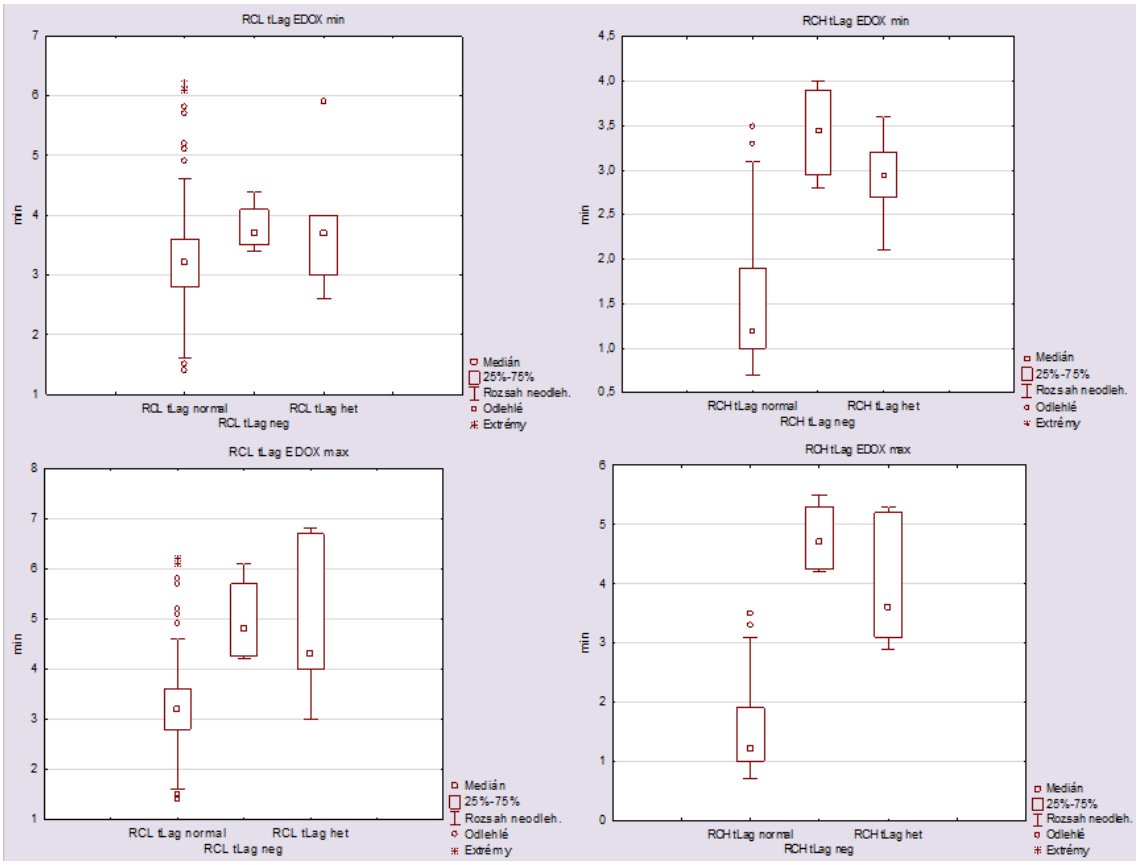
Limitace vyšetřené skupiny: Ve skupině se podařilo shromáždit výsledky pouze od 10 pacientů, protože tento lék užívá malá skupina jedinců. Výsledky tedy nemají dostatečnou statistickou výpověď.

Tabulka 35 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden negativní užívající edoxaban

FVL neg n = 4	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	Sm.odch.
BMI (kg/m^2)	27,9	27,2	25,3	28,6	25,6	28,2	1,82
Min. účinek léku							
RCL tLag (min)	3,80	3,70	3,40	4,40	3,50	4,10	0,43
RCL tPeak (min)	9,63	9,20	6,60	13,50	7,05	12,20	3,18
RCL Peak (nM/L)	227,0	234,6	110,2	328,8	171,0	283,1	89,7
RCL VI (nM/min)	52,80	44,90	12,10	109,30	22,75	82,85	41,79
RCL AUC (nM/L.min)	2418,9	2321,8	1884,7	3147,5	2100,0	2737,9	527,6
RCH tLag (min)	3,43	3,45	2,80	4,00	2,95	3,90	0,57
RCH tPeak (min)	8,08	8,15	6,20	9,80	6,45	9,70	1,89
RCH Peak (nM/L)	339,2	346,5	149,1	514,6	192,0	486,4	175,1
RCH VI (nM/min)	109,65	101,90	21,80	213,00	28,40	190,90	95,69
RCH AUC (nM/L.min)	2350,9	2453,9	1840,7	2655,2	2132,3	2569,5	354,0
Max. účinek léku							
RCL tLag (min)	4,98	4,80	4,20	6,10	4,25	5,70	0,90
RCL tPeak (min)	16,23	16,70	9,00	22,50	10,65	21,80	6,60
RCL Peak (nM/L)	120,2	106,8	50,8	216,3	64,0	176,4	73,4
RCL VI (nM/min)	17,70	11,00	3,00	45,80	4,10	31,30	19,69
RCL AUC (nM/L.min)	1867,1	1901,9	1469,4	2195,1	1639,0	2095,1	308,5
RCH tLag (min)	4,78	4,70	4,20	5,50	4,25	5,30	0,63
RCH tPeak (min)	12,10	12,40	8,00	15,60	9,00	15,20	3,69
RCH Peak (nM/L)	213,0	156,3	75,0	464,4	87,0	339,0	178,2
RCH VI (nM/min)	55,60	27,95	7,10	159,40	7,90	103,30	71,64
RCH AUC (nM/L.min)	1838,4	1747,0	1266,0	2593,7	1400,1	2276,8	578,9

Tabulka 36 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden heterozygoti užívající edoxaban

FVL het n = 6	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	Sm.odch.
BMI (kg/m^2)	28,4	28,2	21,2	30,8	22,9	30,1	2,85
Min. účinek léku							
RCL tLag (min)	3,82	3,70	2,60	5,90	3,00	4,00	1,16
RCL tPeak (min)	9,17	8,10	7,10	12,80	7,30	11,60	2,42
RCL Peak (nM/L)	276,8	281,3	123,5	421,3	157,6	395,7	120,8
RCL VI (nM/min)	58,58	63,95	18,10	97,70	20,90	86,90	33,01
RCL AUC (nM/L.min)	2996,9	2938,6	1983,9	3924,5	2640,8	3555,0	698,2
RCH tLag (min)	2,92	2,95	2,10	3,60	2,70	3,20	0,51
RCH tPeak (min)	6,58	6,55	4,70	8,80	5,60	7,30	1,44
RCH Peak (nM/L)	486,2	507,0	178,6	672,4	446,4	605,7	172,0
RCH VI (nM/min)	150,57	153,50	34,80	262,30	111,40	187,90	78,60
RCH AUC (nM/L.min)	3183,6	3320,8	1899,6	3878,3	3185,9	3496,2	676,4
Max. účinek léku							
RCL tLag (min)	4,85	4,30	3,00	6,80	4,00	6,70	1,56
RCL tPeak (min)	13,85	11,85	6,80	25,80	10,80	16,00	6,55
RCL Peak (nM/L)	211,6	179,4	68,9	484,2	96,6	260,9	150,1
RCL VI (nM/min)	38,02	24,00	3,60	127,00	10,40	39,10	45,33
RCL AUC (nM/L.min)	2740,7	2727,6	1900,7	3673,8	1991,0	3423,4	723,1
RCH tLag (min)	3,95	3,60	2,90	5,30	3,10	5,20	1,05
RCH tPeak (min)	9,90	8,80	6,30	15,30	8,10	12,10	3,25
RCH Peak (nM/L)	280,3	296,2	98,1	529,1	135,1	327,0	154,2
RCH VI (nM/min)	60,63	58,80	9,90	154,80	19,60	61,90	51,27
RCH AUC (nM/L.min)	2640,8	2768,2	1651,6	3627,4	1747,1	3282,1	807,6

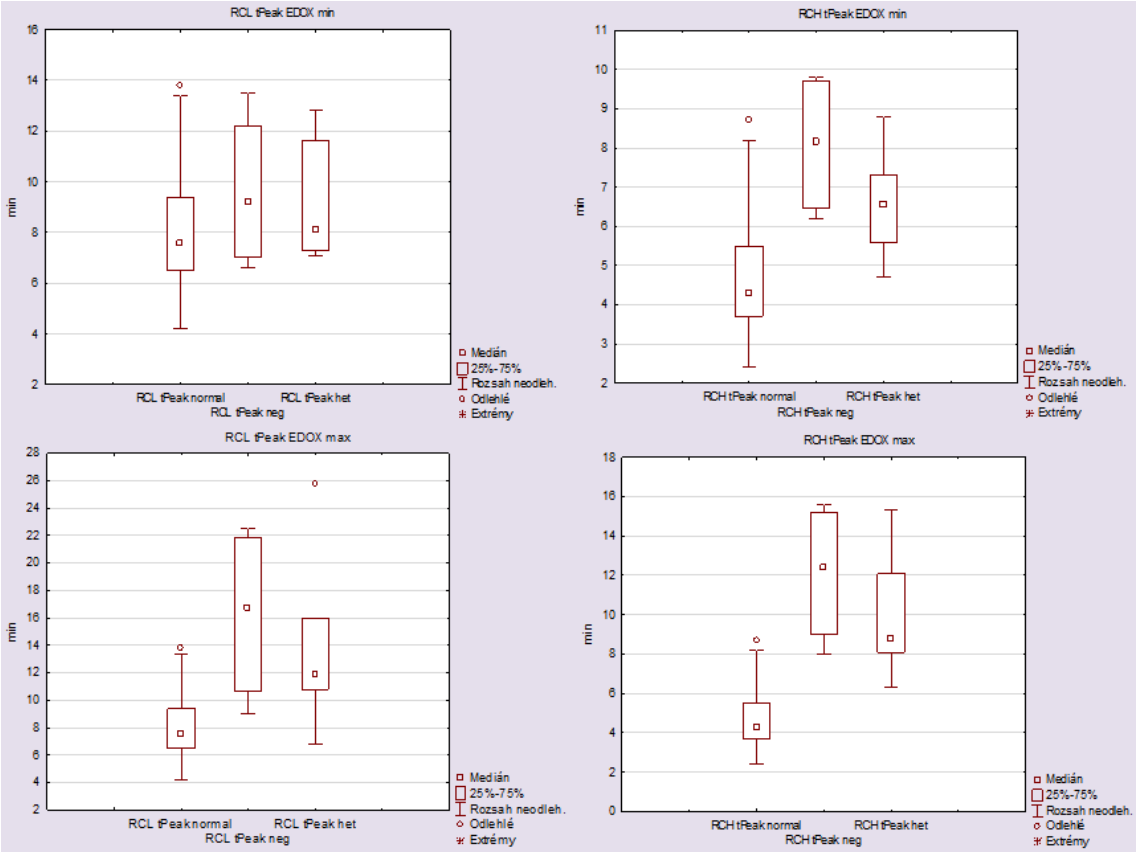


Graf 27 tLag – čas nástupu generace trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 37 Statistický význam tLag – času nástupu generace trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL tLag	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH tLag	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,889	ne	FVL neg vs. FVL het	0,201	ne

Z grafického znázornění je patrné, že se čas nástupu generace trombinu vlivem léčby prodlužuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné prodloužení času nástupu generace trombinu v minimu a maximu účinku léčby.

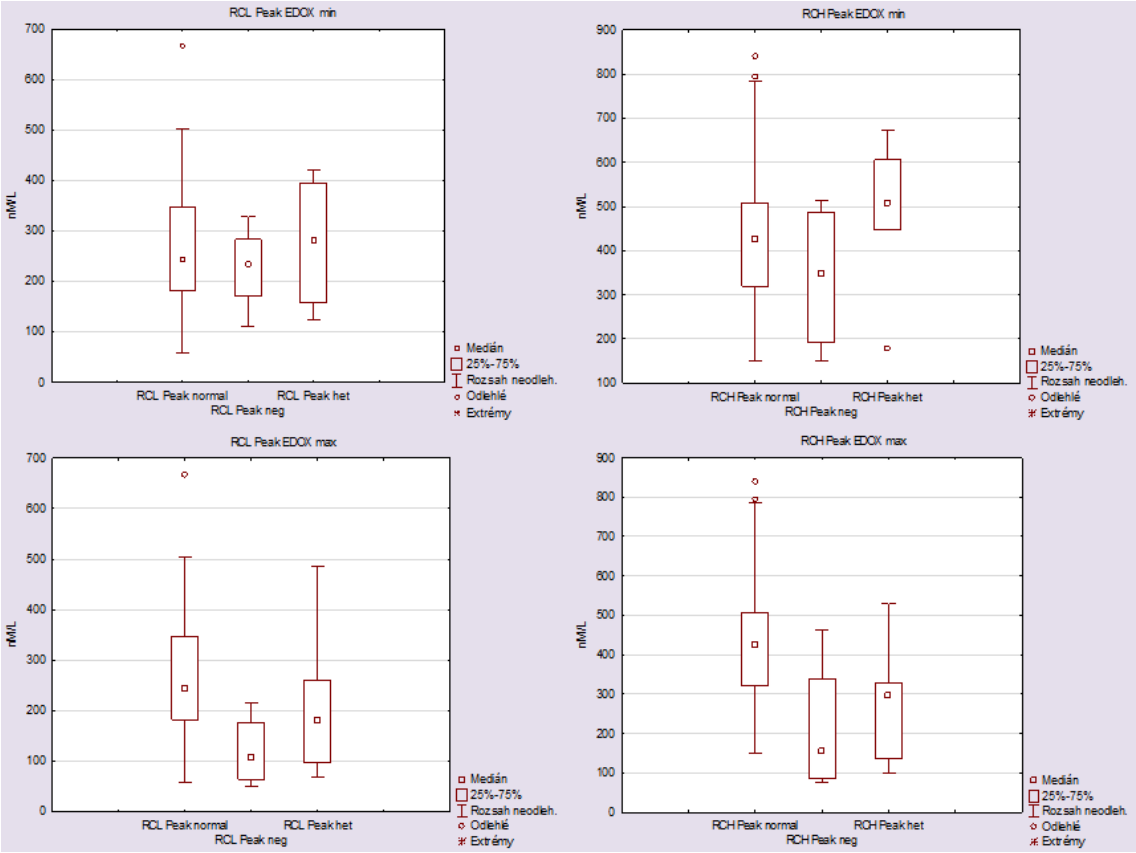


Graf 28 tPeak – čas dosažení peaku trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 38 Statistický význam tPeak – času dosažení peaku trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL tPeak	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH tPeak	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,003	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,591	ne	FVL neg vs. FVL het	0,644	ne

Z grafického znázornění je patrné, že se čas peaku trombinu vlivem léčby v maximu účinku prodlužuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné prodloužení času peaku trombinu v minimu a maximu účinku léčby.

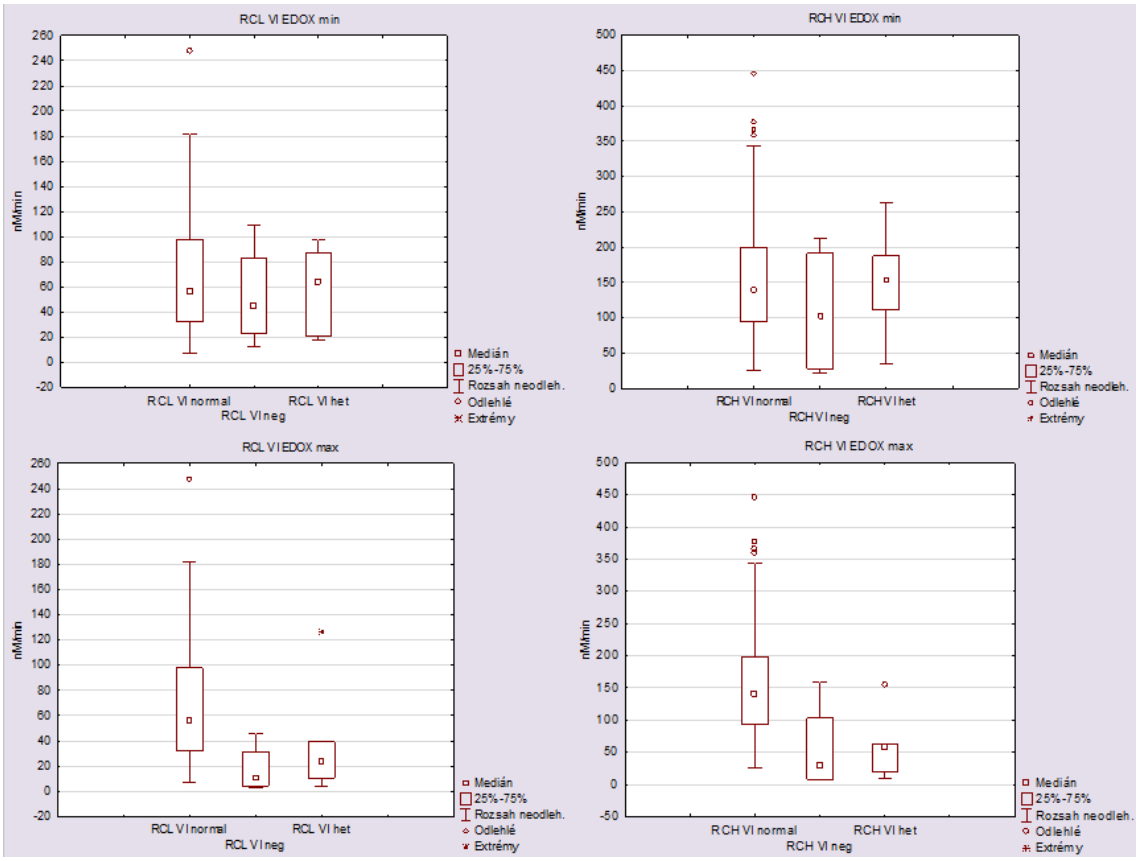


Graf 29 Peak – maximální koncentrace trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 39 Statistický význam Peak – maximální koncentrace trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL Peak	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH Peak	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,000	ano	normal vs. FVL neg	0,000	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,000	ano
FVL neg vs. FVL het	0,297	ne	FVL neg vs. FVL het	0,542	ne

Z grafického znázornění je patrné, že se peak trombinu vlivem léčby snižuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné snížení peaku trombinu v minimu a maximu účinku léčby.

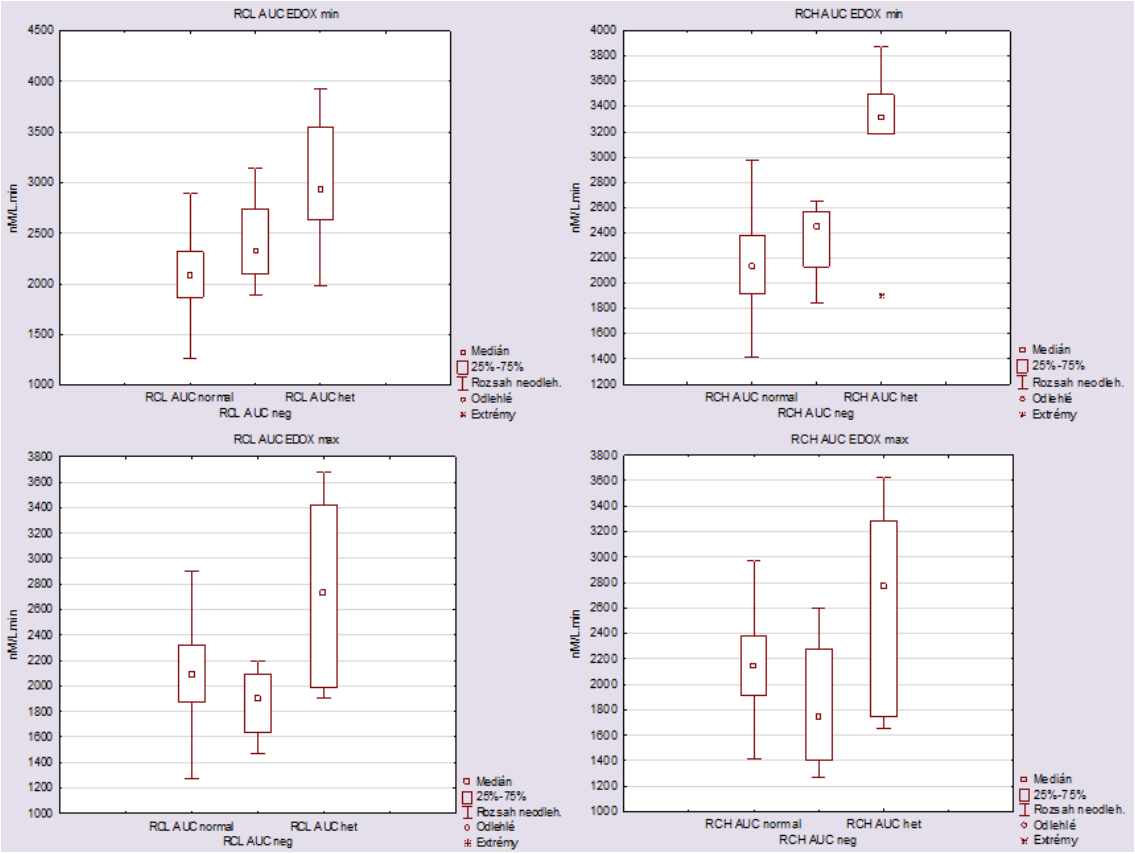


Graf 30 Velocity index – rychlost tvorby trombinu v minimu a maximu léčby

Tabulka 40 Statistický význam Velocity index – rychlosti tvorby trombinu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL VI	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH VI	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,026	ano	normal vs. FVL neg	0,019	ano
normal vs. FVL het	0,109	ne	normal vs. FVL het	0,007	ano
FVL neg vs. FVL het	0,429	ne	FVL neg vs. FVL het	0,899	ne

Z grafického znázornění je patrné, že se rychlost tvorby trombinu vlivem léčby snižuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné snížení VI v minimu a maximu účinku léčby.

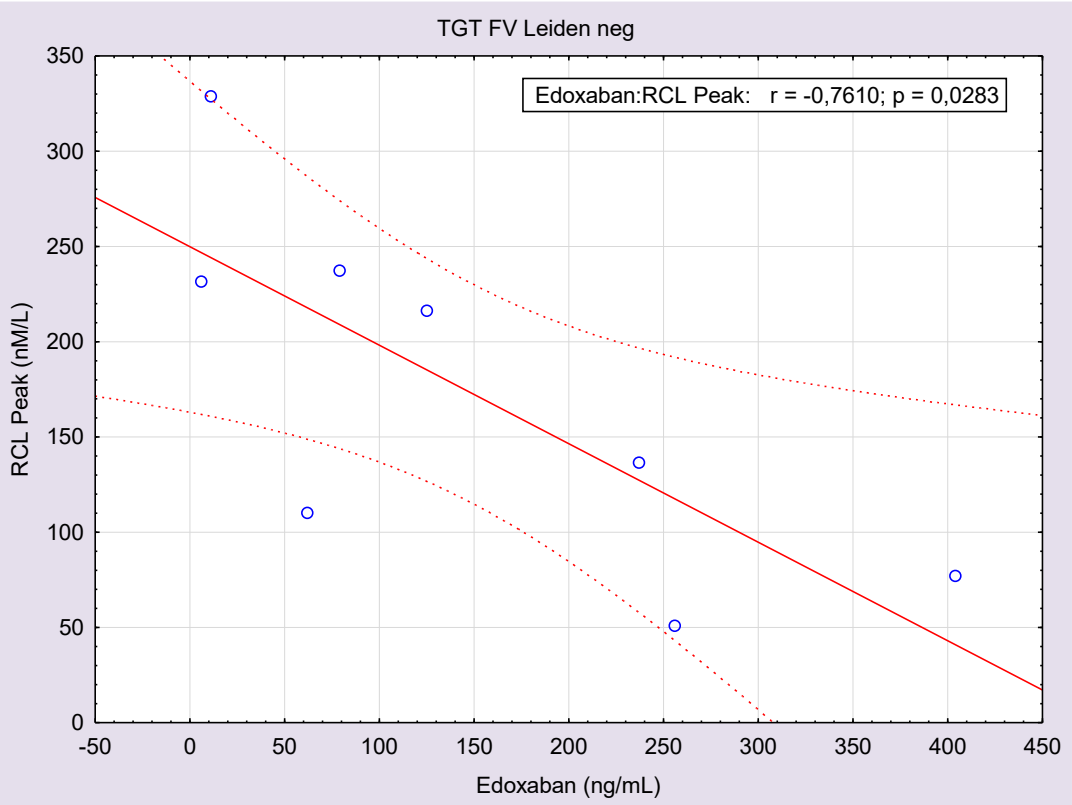


Graf 31 AUC – endogenní trombinový potenciál v minimu a maximu léčby

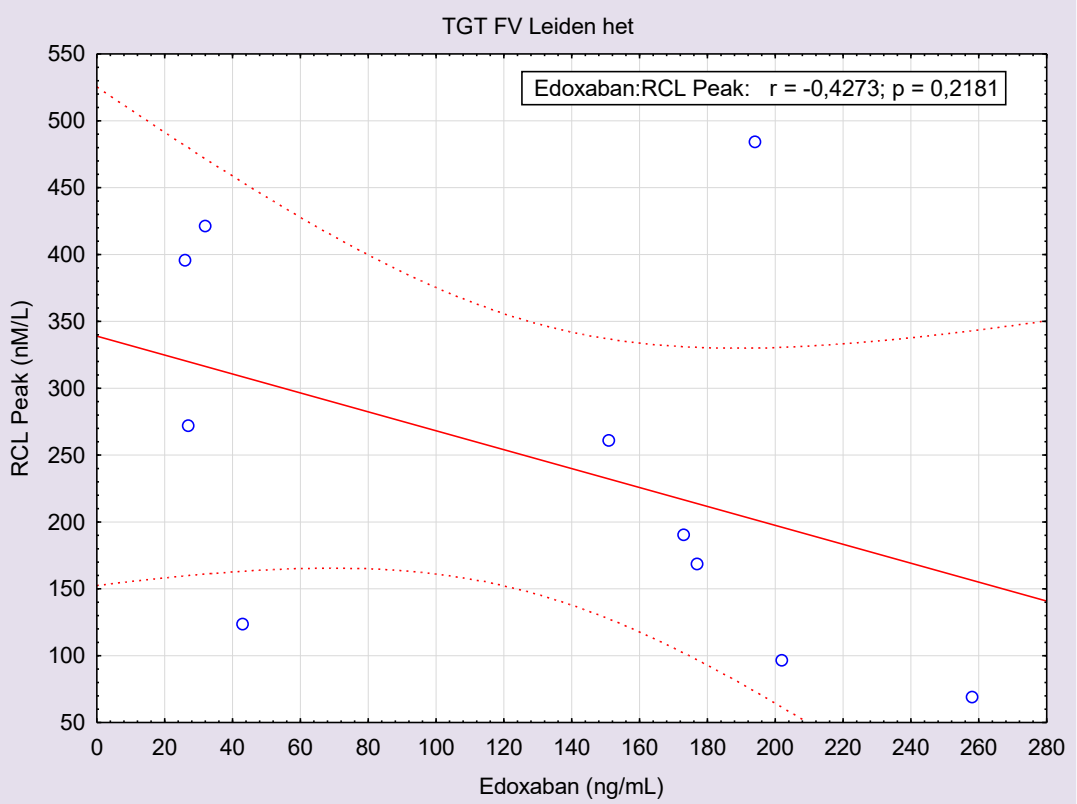
Tabulka 41 Statistický význam AUC – endogenního trombinového potenciálu v maximu léčby

Max. účinek léčby RCL AUC	hodnota p	statisticky významné	Max. účinek léčby RCH AUC	hodnota p	statisticky významné
normal vs. FVL neg	0,133	ne	normal vs. FVL neg	0,048	ano
normal vs. FVL het	0,000	ano	normal vs. FVL het	0,001	ano
FVL neg vs. FVL het	0,055	ne	FVL neg vs. FVL het	0,127	ne

Z grafického znázornění je patrné, že se endogenní trombinový potenciál (AUC) vlivem léčby v maximu účinku snižuje proti skupině bez léčby a také je vidět rozdílné snížení AUC v minimu a maximu účinku léčby.



Graf 32 Korelace hladiny edoxabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL neg



Graf 33 Korelace hladiny edoxabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL het

Tabulka 42 Korelace hladiny edoxabanu a generace trombinu u skupiny FVL neg a FVL het

Edoxaban (ng/mL)	RCL Peak	RCL AUC	RCH Peak	RCH AUC
FV Leiden neg	**-0,738095**	-0,690476	-0,690476	-0,547619
FV Leiden het	-0,551515	-0,418182	**-0,660606**	-0,563636

Korelace je významná na hladině $p \leq 0,05$ u parametrů označených zvýrazněným písmem. Z výsledků těchto statistických výpočtů nemůžeme učinit závěr kvůli nízkému počtu zařazených pacientů.

5.3 Výsledky laboratorních vyšetření skupiny těhotných žen s profylaxí LMWH

Výsledky u jednotlivých sledovaných skupin jsou znázorněny v tabulkách 43 a 44 a v grafech 34–36. V tabulce 43 je patrné, že se hladiny antitrombinu u dvou kontrolních skupin těhotných a netěhotných neliší, ale je významně snížena aktivita i antigen u těhotné s prokázaným deficitem antitrombinu (tabulka 44). V případě aktivity antitrombinu stanoveného s kitem obsahujícím faktor Xa jsou u pacientky s deficitem antitrombinu výrazně nižší hodnoty než při stanovení kitem obsahujícím trombin. V grafu 34 je znázorněn rozdíl aktivit antitrombinu pomocí kitu obsahujícího faktor Xa.

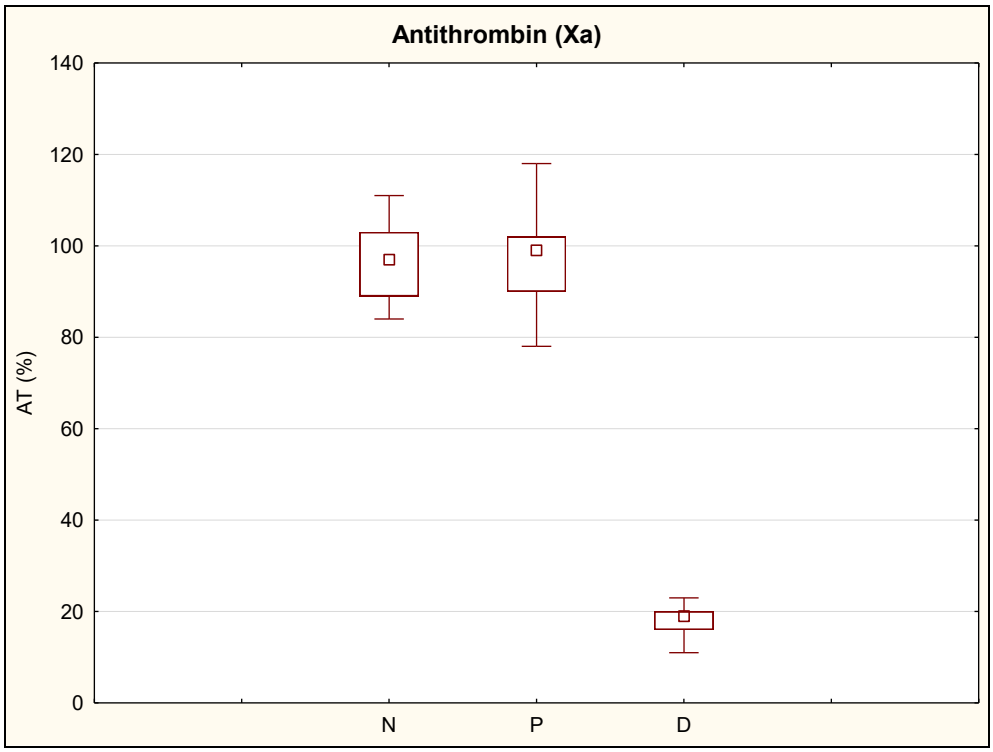
*Tabulka 43 Hodnoty sledovaného kontrolního souboru, 0 = před podáním LMWH, 4 = 4 hodiny po podání LMWH, NA= neanalyzováno, *) statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolním souborem*

Parametry (jednotky)	Normální laboratorní hodnoty	Netěhotné (N0)	Netěhotné (N4)	Těhotné (P0)	Těhotné (P4)
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
AT Aktivita Xa (%)	99.6±10.80	97.0±7.5	NA	99.0±8.7	NA
AT Aktivita IIa (%)	100.5±11.90	97.0±7.6	NA	98 .0±7.9	NA
AT Antigen (g/L)	0.24±0.02	0.24±0.03	NA	0.24±0.03	NA
anti-FXa (IU/mL)	0.020±0.020	0.026±0.025	0.394±0.077*	0.032±0.025	0.253±0.093*
D-dimer (μg/L)	97.97±164.60	76.7±57.6	NA	507.6±54.7*	NA
TGA RCL Peak (nM/L)	265.83±109.38	217.4±88.6	119.3±50.1*	527.2±217.4*	361.9±126.6*
TGA RCL AUC (nM/L.min)	2095.78±330.79	2060.0±317.6	1539.2±347.5*	3104.2±149.9*	2821.9±241.1*
TGA RCH Peak (nM/L)	427.86±138.71	312.0±133.4	180.0±88.9*	690.9±147.7*	564.8±484.9*
TGA RCH AUC (nM/L.min)	2168.78±318.47	2091.1±370.3	1552.8±414.9*	3113.7±163.8*	2856.3±266.5*

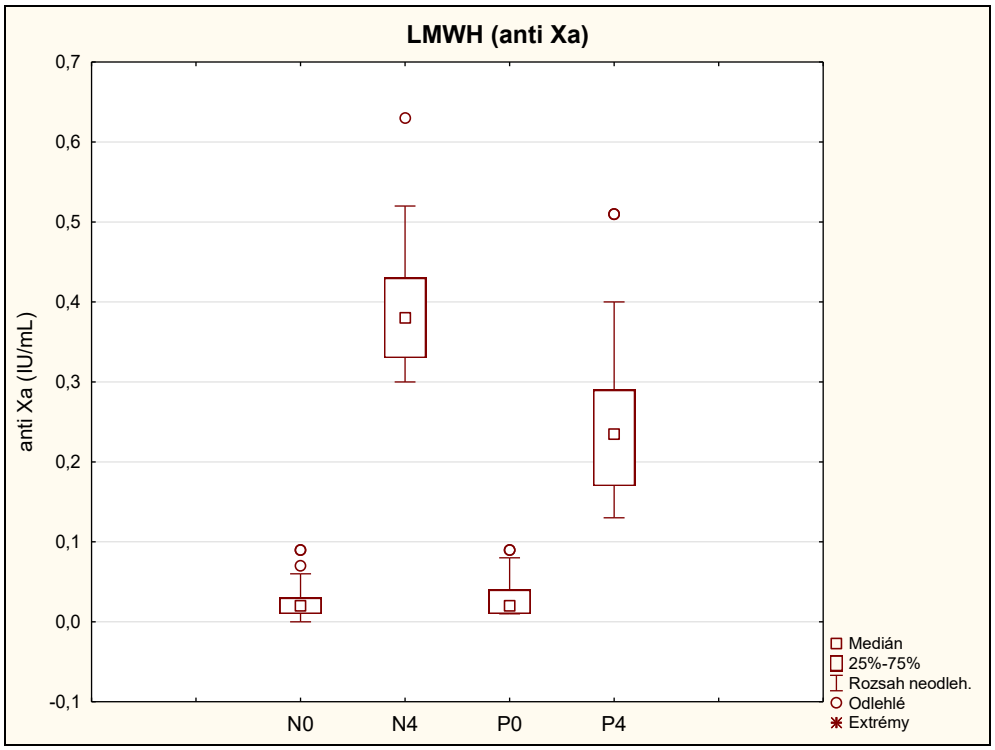
V tabulce 43 a 44 je vidět téměř nulová hladina aktivity anti Xa před podáním LMWH u všech tří skupin, ale hladina po podání LMWH se významně liší. U skupiny netěhotných žen se aktivity blíží horní hranici profylaktického rozmezí, u skupiny těhotných jsou aktivity spíše u dolní hranice (graf 35). Těhotná s deficitem antitrombinu na léčbu hladinou anti Xa nereagovala.

*Tabulka 44 Hodnoty těhotné s deficitem AT v průběhu těhotenství, GT = gestační týden, 0 = před podáním LMWH, 4 = 4 hodiny po podání LMWH, *) statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolním souborem*

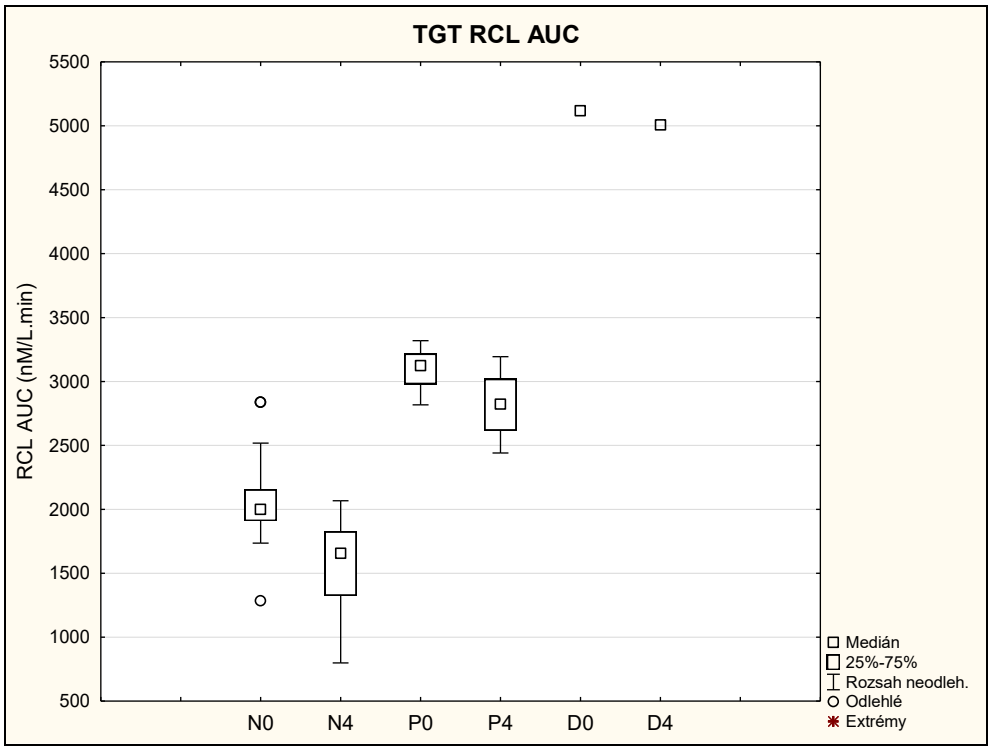
Parametry (jednotky)	Normální laboratorní hodnoty	Těhotná s deficitem AT (D0)	Těhotná s deficitem AT (D4)
	Mean±SD	Range 9-37 GT	Range 9-37 GT
AT Aktivita Xa (%)	99.6±10.80	11.0-23.0*	NA
AT Aktivita IIa (%)	100.5±11.90	49.6-69.5*	NA
AT Antigen (g/L)	0.24±0.02	0.13-0.18*	NA
anti-FXa (IU/mL)	0.020±0.020	0.0-0.0	0.00-0.05
D-dimer (µg/L)	97.97±164.60	370.1-791.3*	NA
TGA RCL Peak (nM/L)	265.83±109.38	564.0-799.2*	430.9-792.1*
TGA RCL AUC (nM/L.min)	2095.78±330.79	3998.4-5116.2*	3660.2-5005.8*
TGA RCH Peak (nM/L)	427.86±138.71	645.6-954.6*	640.8-954.1*
TGA RCH AUC (nM/L.min)	2168.78±318.47	4023.4-5111.2*	3998.3-5105.8*



Graf 34 Hodnoty antitrombinu stanovené kitem s faktorem Xa u skupiny netěhotných (N), těhotných (P) a těhotné s deficitem antitrombinu (D)



Graf 35 Hodnoty aktivity anti Xa u netěhotných (N) a těhotných (P), 0 = před podáním LMWH, 4 = 4 hodiny po podání LMWH



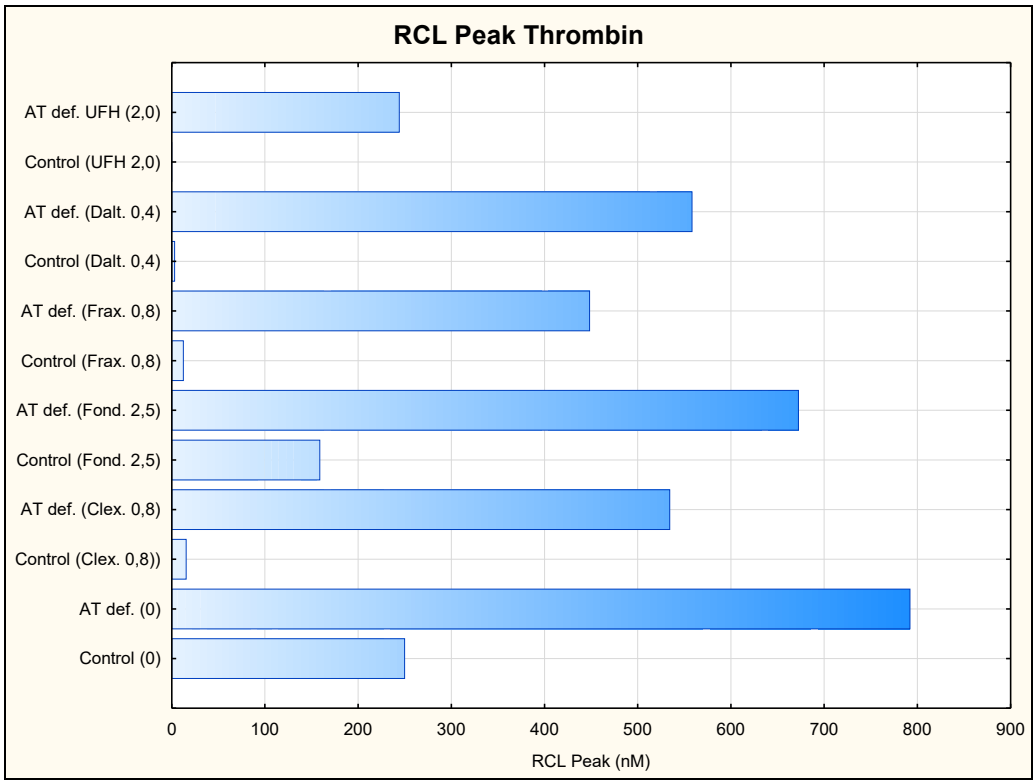
Graf 36 Hodnoty AUC u netěhotných (N), těhotných (P) a těhotné s deficitem AT ve 37. GT (D), 0 = před podáním LMWH, 4 = 4 hodiny po podání LMWH

Výsledky v tabulce 43 a 44 ukazují, že těhotné mají zvýšenou generaci trombinu u parametru peak trombin i AUC u obou koncentrací fosfolipidů proti skupině netěhotných a těhotná s deficitem antitrombinu má zvýšené hodnoty proti oběma skupinám. Hodnoty generace trombinu (RCL Peak a AUC (graf 36)) jsou 4 hodiny po podání LMWH nižší ve všech případech, ale ke snížení dochází úměrně vzhledem k výchozí hodnotě před podáním LMWH. V případě hodnot RCH Peak a AUC dochází k významnému snížení generace trombinu u skupiny netěhotných a těhotných, takže je patrný účinek LMWH, ale u těhotné s deficitem AT ke snížení generace trombinu nedochází (tabulka 44), což koresponduje s neúčinnou hladinou aXa.

V tabulce 45 a grafu 37 jsou výsledky porovnání každé dvojice vzorku normální plazmy zdravých dárců (Kontrola) a vzorku pacientky (AT def) s přidaným léčivem do obou vzorků. U všech typů léčby ke snížení generace trombinu došlo (Graf 37), ale v některých případech bylo snížení minimální (Fondaparinux). Největší pokles generace trombinu byl zaznamenán u nefrakcionovaného heparinu s hodnotami anti Xa v rozmezí 0,03 – 0,10 IU/ml, ale jedná se o přípravek, který je nutné podávat při hospitalizaci. Z injekčních přípravků vykazoval větší pokles generace trombinu Fraxiparin.

Tabulka 45 Výsledky kontrol a AT deficitní plazmy (AT def) před a po přidání heparinů UFH — nefrakcionovaný heparin, Dalt. — dalteparin (Fragmin), Nadr. — nadroparin (Fraxiparin), Fond. — fondaparinux (Arixtra), Enox. — enoxaparin (Clexane)

Vzorek	AT (%)	anti-FXa (IU/mL)	RCL Peak (nM/L)	RCL AUC (nM/L.min)	RCH Peak (nM/L)	RCH AUC (nM/L.min)
Kontrola (0)	95.8	0,00	250	2851.4	368.3	2848.8
AT def. (0)	17.1	0,00	792.1	4572.4	790.6	4410.3
Kontrola (Enox.)	NA	0.97	15.5	318.4	64.1	817.1
AT def. (Enox)	NA	0.02	534.4	4096.2	576.2	4139.7
Kontrola (Fond.)	NA	1.25	158.9	2441.3	254.2	2732.7
AT def. (Fond.)	NA	0,00	672.6	4384.4	700.0	4200.1
Kontrola (Nadr.)	NA	0.90	12.5	270.1	62.7	712.4
AT def. (Nadr.)	NA	0.03	448.4	4011.9	570.0	3894.2
Kontrola (Dalt.)	NA	0.97	3.1	66.1	31.4	494.4
AT def. (Dalt.)	NA	0.02	558.4	4322.5	643.3	4418
Kontrola (UFH)	NA	1.67	0.1	10.0	0.10	13.0
AT def. (UFH)	NA	0.06	244.2	3292.3	286.2	3283.9



Graf 37 Ovlivnění Peaku trombinu jednotlivými typy heparinů u zdravé kontroly (Control) a těhotné s deficitem antitrombinu (AT def.), UFH — nefrakcionovaný heparin, Dalt. — dalteparin (Fragmin), Frax. — nadroparin (Fraxiparin), Fond. — fondaparinux (Arixtra), Clex. — enoxaparin (Clexane)

6 Diskuze

Na základě změřených výsledků kontrolního souboru 170 zdravých jedinců bez prokázané trombofilie či jiné nemoci a s negativní rodinnou anamnézou tromboembolické nemoci jsme získali normální hodnoty generace trombinu a s nimi jsme pak porovnávali předpokládané změny v generaci trombinu. Získané hodnoty jsou v souladu s publikovanými hodnotami pro evropskou populaci. (Danforth, Orfeo et al. 2012, Depasse, Binder et al. 2021)

6.1 Skupina vrozené a získané trombofilie

Z publikovaných prací je zřejmé, že vrozené trombofilie jako je heterozygotní mutace faktoru V Leiden zvyšují generaci trombinu. (Catto, Carter et al. 1995, Hézard, Bouaziz-Borgi et al. 2006, Couturaud, Duchemin et al. 2008, Segers, Simioni et al. 2014) Naproti tomu není známo, že by byly publikovány studie věnující se porovnání generace trombinu u pacientů s heterozygotní mutací faktoru V Leiden, se současným vyloučením mutace faktoru II, deficitu AT, proteinu C, proteinu S a antifosfolipidového syndromu a vysoké hladiny faktoru VIII, a generace trombinu u pacientů s vysokou hladinou faktoru VIII při současném vyloučení jiných trombofilií.

Domnívali jsme se, že se heterozygotní mutace faktoru V Leiden projeví u sledovaných jedinců větším zvýšením generace trombinu než u jedinců s hladinou faktoru VIII>150 %. Výsledky porovnání nám však tuto domněnku nepotvrdily. Kromě parametru tLag a tPeak, kde není statisticky významný rozdíl ($p>0,05$) mezi výsledky RCL FVL neg a RCL FVL het a RCH FVL neg a RCH FVIII, jsou ostatní porovnání statisticky významná na hladině $p \leq 0,05$. U stanovení TGT s nižší koncentrací fosfolipidů se významně zkracuje doba nástupu tvorby trombinu u skupiny s vysokým FVIII ve srovnání s negativní skupinou. U vyšší koncentrace FL je čas nástupu tvorby trombinu rychlejší u FVL het proti negativní skupině, u faktoru VIII rychlejší nástup prokázán nebyl, zkracuje se také čas tvorby maximálního peaku trombinu.

U všech dalších parametrů Peak, Velocity index (VI) i AUC dochází ke zvýšení generace trombinu skupiny FVL het a skupiny FVIII proti skupině FVL neg a zároveň je patrné i významné zvýšení uvedených parametrů u skupiny FVIII proti skupině FVL het (graf 3–5). Větší zvýšení generace trombinu u skupiny vysokého faktoru VIII si můžeme vysvětlit možnou reakcí akutní fáze, která podporuje sekundární protrombogenní stav.

(Kvasnička 2003) Je uváděno, že v etiopatogenezi protrombotických komplikací zaujímá zánět důležité postavení, a to nejen jako příčina, ale i jako následek. Je také nejčastějším hyperkoagulačním stavem v klinické praxi. (Gabay and Kushner 1999)

Získaná trombofilie v podobě zvýšených hladin faktoru VIII, kdy maximální hladina dosáhla až 392 %, je v našem sledování demonstrována reaktivním nárůstem peaku trombinu a endogenního trombinového potenciálu.

6.2 Skupina užívající přímé inhibitory koagulace

Antikoagulační léčbě a zejména přímým inhibitorům koagulace je dlouhodobě věnováno hodně pozornosti a zkoumá se její účinek v různých situacích a při různých zdravotních komplikacích. Jednotlivé preparáty Dabigatran etexilát (Pradaxa), Rivaroxaban (Xarelto), apixaban (Eliquis) a edoxaban (Lixiana) se liší svým účinkem, biologickým poločasem a dobou maximálního účinku. (Tripodi, Padovan et al. 2015, Kvasnicka, Malikova et al. 2017, Kirchhof, Toennis et al. 2023)

Uvedené preparáty jsou přímé selektivní inhibitory trombinu nebo aktivovaného koagulačního faktoru Xa, takže jejich blokádou se zpomalí koagulační děj v celé kaskádě, neboť vzniká méně trombinu.

Nás zajímal vliv podávaných antitrombotik v souvislosti s prokázanou (FVL het) nebo neprokázanou (FVL neg) mutací faktor V Leiden. Domnívali jsme se, že neodpovídající účinek léčby u některých pacientů, sledovaný pomocí měření hodnoty aktuální hladiny preparátu, by mohl souviset právě s tímto typem vrozené trombofilie. Porovnali jsme tedy výsledky jednotlivých parametrů generace trombinu změřené metodou s nižší i vyšší koncentrací fosfolipidů u všech uvedených léků. Ve skupinách jednotlivých léků jsme porovnali předpokládanou míru snížení generace trombinu u skupiny FVL neg a FVL het mezi sebou a také s kontrolní skupinou bez léčby.

U léku **dabigatran** nebyl u žádného z parametrů generace trombinu zjištěn statisticky významný rozdíl mezi výsledky FVL neg a FVL het na hladině $p \leq 0{,}05$. V maximu léčby nedošlo k předpokládanému snížení peaku trombinu, VI ani AUC ve srovnání s kontrolní skupinou. Mohli bychom si to vysvětlit tím, že se jedná o pacienty s VTE indikované k antikoagulační léčbě a mohou mít počáteční generaci trombinu výrazně vyšší proti kontrolní skupině. V grafech 8 a 10 je snížení generace trombinu v maximu účinku léčby proti minimu účinku léčby patrné a odpovídá to také některým publikovaným studiím.

Rovněž odpovídá i velmi široké rozmezí naměřených hodnot hladin léku v minimu a maximu léčby. (Metze, Pfrepper et al. 2020, Shaw, Castellucci et al. 2023)

Antitrombotickou aktivitu dabigatranu dokumentuje i postupný pokles generace trombinu v závislosti na hladině podávané léčby, r = -0,37, p <0,05 pro skupinu FV Leiden neg a r = -0,37, p <0,05 pro skupinu FV Leiden het znázorněný též v grafech 11 a 12. V celém rozsahu sledování byly naměřeny hodnoty <5 ng/mL v minimu účinku léčby i hladiny okolo 400 ng/mL v maximu účinku. I přes vyšší hladiny léku jsme u našich pacientů nezaznamenali žádné závažné krvácení.

U léku **rivaroxaban** nebyl u žádného z parametrů generace trombinu zjištěn statisticky významný rozdíl mezi výsledky FVL neg a FVL het na hladině p ≤ 0,05. V grafech 13–17 je patrné snížení generace trombinu v maximu účinku léčby proti minimu účinku léčby a odpovídá to také některým publikovaným studiím stejně jako u předchozího preparátu. Rovněž odpovídá i širší rozmezí naměřených hodnot hladin léku v minimu a maximu léčby. (Metze, Pfrepper et al. 2020, Metze, Klöter et al. 2021, Shaw, Castellucci et al. 2023)

Antitrombotickou aktivitu rivaroxabanu dokumentuje rovněž pokles generace trombinu v závislosti na hladině podávané léčby, r = -0,81, p <0,05 pro skupinu FV Leiden neg a r = -0,70, p <0,05 pro skupinu FV Leiden het znázorněný též v grafech 18 a 19. V celém rozsahu sledování byly naměřeny hodnoty <5 ng/mL v minimu účinku léčby i hladiny okolo 500 ng/mL v maximu účinku. I přes vyšší hladiny léku jsme u našich pacientů nezaznamenali žádné závažné krvácení. Rivaroxaban, který je selektivní inhibitor FXa, má proti dabigatranu tu výhodu, že působí silně antitromboticky, ale bez většího sklonu ke krvácení.

U léku **apixaban** nebyl u žádného z parametrů generace trombinu zjištěn statisticky významný rozdíl mezi výsledky FVL neg a FVL het na hladině p ≤ 0,05. V maximu léčby nedošlo k předpokládanému snížení AUC ve srovnání s kontrolní skupinou. Mohli bychom si to podobně jako u léku dabigatran vysvětlit tím, že se jedná o pacienty s VTE indikované k antikoagulační léčbě a mohou mít počáteční generaci trombinu výrazně vyšší proti kontrolní skupině. V grafech 20–24 je patrné snížení generace trombinu v maximu účinku léčby proti minimu účinku léčby a odpovídá to také některým publikovaným studiím stejně jako u dvou předchozích preparátů. Rovněž odpovídá i širší rozmezí naměřených hodnot hladin léku v minimu a maximu léčby. (Metze, Pfrepper et al. 2020, Metze, Klöter et al. 2021, Shaw, Castellucci et al. 2023)

Antitrombotickou aktivitu apixabanu dokumentuje pokles generace trombinu v závislosti na hladině podávané léčby, r = -0,50, p <0,05 pro skupinu FV Leiden neg a r = -0,45, p <0,05 pro skupinu FV Leiden het znázorněný též v grafech 25 a 26. V celém rozsahu sledování byly naměřeny hodnoty <5 ng/mL v minimu účinku léčby i hladiny okolo 350 ng/mL v maximu účinku.

U léku **edoxaban** nebyl u žádného z parametrů generace trombinu zjištěn významný rozdíl mezi výsledky FVL neg a FVL het na hladině p ≤ 0,05. Bohužel se ve skupině podařilo shromáždit výsledky pouze od 10 pacientů, protože tento lék užívá malá skupina jedinců. Výsledky tedy nemají dostatečnou statistickou výpověď a bylo by potřeba doplnit více sledování.

Po shrnutí všech vyhodnocení je patrné, že mezi skupinami FVL neg a FVL het není významný rozdíl v odpovědi na antikoagulační léčbu přímými inhibitory trombinu ani přímými inhibitory faktoru Xa.

6.3 Skupina těhotných žen s profylaxí LMWH

U této skupiny byl také trombin generační test vybrán pro svou hlavní roli v procesu koagulace jako marker sledování trombofilního rizika a ev. účinnosti léčby. Z výsledků je patrné že těhotné mají zvýšenou generaci trombinu u parametru peak trombin i AUC u obou koncentrací fosfolipidů v porovnání se skupinou netěhotných a těhotná s deficitem antitrombinu má zvýšené hodnoty oproti oběma skupinám (tabulky 43 a 44). Čtyři hodiny po podání LMWH dochází u netěhotných i těhotných ke snížení generace trombinu (RCL Peak a AUC) úměrně vzhledem k výchozí hodnotě před podáním LMWH, u těhotné s deficitem antitrombinu je mírné snížení TG také vidět. Stanovení s reagenciemi RCL (nižší obsah fosfolipidů) by mělo lépe odrážet trombofilní riziko. (Andresen, Iversen et al. 2002, Hemker, Al Dieri et al. 2006, Tripodi 2016) U hodnot RCH Peak a AUC je patrné významné snížení generace trombinu u skupiny netěhotných a těhotných, takže je patrný účinek LMWH, ale u těhotné s deficitem AT ke snížení generace trombinu nedochází, takže výsledek koresponduje s téměř nulovou hladinou aXa, která vyplývá z principu účinku nízkomolekulárních heparinů, které antitrombin ke svému působení potřebují. Stanovení s reagenciemi RCH (vyšší obsah fosfolipidů) by mělo lépe odrážet účinek antikoagulační léčby. (Walker and Royston 2002, Tripodi 2016)

U preparátu Clexane (enoxaparin), který byl podáván jako první, se hodnoty anti Xa pohybovaly u pacientky v rozmezí 0,0–0,01 IU/ml (tabulka 44). Vzhledem k absenci

odborných doporučení ohledně profylaktické léčby u těhotných žen s homozygotní mutací antitrombinu typu II (vazebného místa pro heparin) jsme provedli studii in vitro, abychom pacientku nezatěžovali aplikací preparátu s neověřeným účinkem v případě deficitu AT. V naší studii jsme využili připravené vzorky s nasimulovanou antikoagulační léčbou, kde jsme vždy porovnali ve dvojici vzorek normální plazmy zdravých dárců (Control) a vzorek pacientky (AT def) s přidaným léčivem do obou vzorků. Využili jsme plazmu pacientky s prokázanou homozygotní mutací AT z odběru v době, kdy ještě žádná antikoagulační léčba nebyla podávána. Jako kontrolní vzorky bez léčby jsme opět použili vzorek směsné normální plazmy zdravých žen a plazmu pacientky. V tomto odběru jsme změřili počáteční generaci trombinu, která u pacientek s tímto deficitem bývá významně zvýšena. U všech dalších vzorků s léčbou jsme opět měřili TG a kromě aktivity anti Xa jsme u jednotlivých preparátů sledovali, zda dojde k určitému poklesu TG. U všech typů léčby ke snížení generace trombinu došlo (graf 37, tabulka 45), ale v některých případech bylo snížení minimální (Fondaparinux). Fraxiparin (nadroparin) vykazoval v porovnáních výsledků z testování in vitro větší pokles generace trombinu. Ještě větší pokles generace trombinu byl zaznamenán u nefrakcionovaného heparinu s hodnotami anti Xa v rozmezí 0,03–0,10 IU/ml u těhotné s deficiten AT. I tak byla stále hodnota anti Xa nedostatečná, a navíc by pacientka nemohla být léčena ambulantně. V souladu s nejvyšším poklesem generace trombinu po Fraxiparinu byl tento přípravek těhotné s deficitem antitrombinu dále podáván za podmínky pravidelné kontroly generace trombinu.

Jak už bylo zmíněno, sledovaná pacientka měla výrazně zvýšenou generaci trombinu oproti oběma kontrolním souborům. Při sledování v průběhu těhotenství ovšem k dalšímu výraznějšímu zvýšení TG nedošlo, stejně tak ani k významnému zvýšení D-dimerů, takže jsme předpokládali, že pacientka z podávané léčby profitovala, i když se ani v jednom případě nedosáhlo profylaktické dávky. (Buyue, Misenheimer et al. 2012) K významnému poklesu generace trombinu došlo při substituci AT před porodem a po porodu. Hladina AT stanovená pomocí kitu obsahujícího faktor Xa se pohybovala v rozmezí 11,0–23,0 % (bez hladin po substituci) a po substituci bylo dosaženo hodnoty 103,5 %. Hladina AT stanovená pomocí kitu obsahujícího trombin se pohybovala v rozmezí 49,6–69,5 % (bez hladin po substituci) a po substituci bylo dosaženo hodnoty 133 %. Tato data jsou zde uvedena pouze v kontextu studie, nebyla předmětem této práce.

Limitace: Naše studie měla pouze průzkumný charakter a byla navržena tak, abychom mohli porovnat rozdíly mezi skupinou těhotných a netěhotných a k nim vztáhnout

výsledky těhotné s deficitem antitrombinu. Naše výsledky vyžadují ještě další potvrzení. Ideální by bylo porovnat výsledky stejného počtu těhotných s tímto deficitem, což ale není možné vzhledem k raritnímu výskytu tohoto deficitu. V Trombotickém centru VFN je dispenzarizována pouze jedna pacientka s tímto typem deficitu ve fertilním věku. Proto jsme také zahrnuli do tabulek její výsledky z průběhu celého těhotenství, zatímco u dalších dvou skupin bylo provedeno pouze jednorázové sledování. U sledování změn v generaci trombinu byly graficky znázorněny výsledky těhotné s deficitem antitrombinu ve 37.GT.

7 Závěr

7.1 Závěr skupiny vrozené a získané trombofilie

Z analýzy vlastních výsledků vyplývá, že se potvrdila vyšší generace trombinu u skupiny s vysokým faktorem VIII v porovnání s nosiči vrozené trombofilní mutace faktor V Leiden. Naše hypotéza se nepotvrdila, předpokládali jsme vyšší generaci trombinu u mutace faktor V Leiden. Toto zjištění má však velký význam při hodnocení trombofilního rizika. Získaná trombofilie v podobě zvýšených hladin faktoru VIII, kdy maximální hladina dosahovala více než dvojnásobku horní hranice normálního rozmezí, byla v našem sledování demonstrována reaktivním nárůstem peaku trombinu a endogenního trombinového potenciálu. U pacientů s vrozeným trombofilním stavem by např. po přidružení získaného trombofilního stavu mohlo dojít k extrémně vysoké generaci trombinu a tím i k trombotickým komplikacím ev. nižší odpovědi na antikoagulační léčbu.

7.2 Závěr skupiny užívající přímé inhibitory koagulace

Přímá perorální antikoagulancia jsou prezentována jako tzv. ideální antitrombotika, která nepotřebují laboratorní sledování. Z této skupiny antikoagulancií jsou nejvíce využívány přímé inhibitory faktoru Xa rivaroxaban a apixaban a přímý inhibitor trombinu dabigatran. Edoxaban je využíván jen ojediněle, jak jsme si mohli ověřit při získávání výsledků pacientů s touto léčbou a bylo by vhodné tento soubor ještě doplnit v rámci dalších sledování. Dosud nejsou k dispozici studie, které by srovnávaly jednotlivé přípravky mezi sebou. Při výběru konkrétního přípravku se lékaři řídí především dostupnými daty o účinnosti a bezpečnosti v dané situaci. Je však také potřeba zohlednit individuální charakteristiky pacienta, jako jsou věk, riziko krvácení, další komorbidity a ev. další léčba, a při tomto rozhodování by posouzení aktuální generace trombinu mohlo sehrát významnou roli.

Předpokládali jsme, že budou v odpovědi na účinek léčby rozdíly mezi skupinou faktor V Leiden negativní a skupinou nosičů heterozygotní mutace faktor V Leiden, ale tato hypotéza se nepotvrdila. Antitrombotickou aktivitu dabigatranu, rivaroxabanu a apixabanu jsme zdokumentovali poklesem generace trombinu v závislosti na hladině podávané léčby, kdy byla tato závislost významná, $p < 0,05$. Významné rozdíly při

sledování změn generace trombinu mezi skupinou faktor V Leiden negativní a skupinou nosičů heterozygotní mutace faktor V Leiden nalezeny nebyly. Sledování hladin léku může upozornit na nedostatečnou účinnost léku nebo naopak nebezpečí krvácení, ale sledování generace trombinu, zvláště pak peaku trombinu a endogenního trombinového potenciálu, se nám jeví jako účinnější z hlediska odpovědi celého hemostatického systému.

7.3 Závěr skupiny těhotných žen s profylaxí LMWH

Parametry peak trombin a AUC při měření generace trombinu se jeví jako dobrý ukazatel prokoagulační aktivity a účinnosti antikoagulační léčby u těhotných žen. Je vhodné ho pravidelně kontrolovat u gravidních pacientek s prokázaným závažným trombofilním stavem, kdy náhlé zvýšení generace trombinu ukazuje na zhoršený trombofilní stav. Data popisující léčbu těhotných s deficitem antitrombinu s homozygotní mutací HBS II jsou poměrně vzácná. Sledování generace trombinu spolu s monitorováním hladiny antitrombinu při substituci antitrombinem a současným podáváním LMWH se ukazuje také jako dobrý prognostický ukazatel účinnosti léčby. U takto závažného deficitu antitrombinu je pak vhodnější sledovat aktivitu antitrombinu kitem s faktorem Xa, protože lépe odráží velmi nízké hladiny antitrombinu. V uvedeném sledování byla potvrzena naše hypotéza, že v průběhu těhotenství u žen s deficitem antitrombinu předpokládáme vyšší generaci trombinu a tím i horší odpověď na podávanou léčbu nízkomolekulárním heparinem ve srovnání s těhotnými ženami bez deficitu AT. Jedná se sice o jeden případ těhotné s tímto závažným deficitem, ale šlo o první těhotenství úspěšně zakončené porodem bez vážných trombotických komplikací v průběhu těhotenství, porodu i šestinedělí.

7.4 Souhrn závěrů

Měření generace trombinu formou vyhodnocení trombin generační křivky přestavuje možnost komplexního hodnocení hemostázy u fyziologických stavů. Mnohem více ale měření generace trombinu využíváme u stavů patologických, kde hodnocením míry snížení nebo zvýšení generace trombinu můžeme napomoci dalším indikacím nebo léčebným postupům. Důsledné sledování generace trombinu, hladin antitrombinu při podávání antikoagulační léčby a podání antitrombinu před porodem a po porodu může zlepšit celkový stav těhotných se závažným deficitem antitrombinu a kvalitu péče o ně.

8 Dedikace

Dizertační práce byla finančně podpořena Ministerstvem zdravotnictví České republiky (RVO-VFN 64165: Institucionální podpora – Projekt dlouhodobého koncepčního rozvoje výzkumné organizace).

9 Seznam použité literatury

1. Abbattista, M., F. Gianniello, C. Novembrino, M. Clerici, A. Artoni, P. Bucciarelli, M. Capecchi, F. Peyvandi and I. Martinelli (2020). "Risk of pregnancy-related venous thromboembolism and obstetrical complications in women with inherited type I antithrombin deficiency: a retrospective, single-centre, cohort study." Lancet Haematol **7**(4): e320-e328.
2. Adler, G., J. S. Clark, B. Loniewska, E. Czerska, N. N. Salkic and A. Ciechanowicz (2012). "Prevalence of 1691G>A FV mutation in Poland compared with that in other Central, Eastern and South-Eastern European countries." Bosn J Basic Med Sci **12**(2): 82-87.
3. Andresen, M. S., N. Iversen and U. Abildgaard (2002). "Overall haemostasis potential assays performed in thrombophilic plasma: the effect of preactivating protein C and antithrombin." Thromb Res **108**(5-6): 323-328.
4. Bellesini, M., H. Robert-Ebadi, C. Combescure, C. Dedionigi, G. Le Gal and M. Righini (2021). "D-dimer to rule out venous thromboembolism during pregnancy: A systematic review and meta-analysis." J Thromb Haemost **19**(10): 2454-2467.
5. Bertina, R. M., B. P. Koeleman, T. Koster, F. R. Rosendaal, R. J. Dirven, H. de Ronde, P. A. van der Velden and P. H. Reitsma (1994). "Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C." Nature **369**(6475): 64-67.
6. Bland, J. M. and D. G. Altman (1995). "Calculating correlation coefficients with repeated observations: Part 2--Correlation between subjects." Bmj **310**(6980): 633.
7. Bleker, S. M., A. Buchmüller, C. Chauleur, F. Ní Áinle, J. Donnelly, P. Verhamme, A. F. Jacobsen, W. Ganzevoort, M. Prins, J. Beyer-Westendorf, M. DeSancho, S. Konstantinides, I. Pabinger, M. Rodger, H. Decousus and S. Middeldorp (2016). "Low-molecular-weight heparin to prevent recurrent venous thromboembolism in pregnancy: Rationale and design of the Highlow study, a randomised trial of two doses." Thromb Res **144**: 62-68.
8. Bremme, K. A. (2003). "Haemostatic changes in pregnancy." Best Pract Res Clin Haematol **16**(2): 153-168.
9. Brenner, B. (2004). "Haemostatic changes in pregnancy." Thromb Res **114**(5-6): 409-414.
10. Brummel-Ziedins, K. (2013). "Models for thrombin generation and risk of disease." J Thromb Haemost **11 Suppl 1**: 212-223.
11. Brummel-Ziedins, K. E., T. Orfeo, P. W. Callas, M. Gissel, K. G. Mann and E. G. Bovill (2012). "The prothrombotic phenotypes in familial protein C deficiency are differentiated by computational modeling of thrombin generation." PLoS One **7**(9): e44378.
12. Buyue, Y., T. M. Misenheimer and J. P. Sheehan (2012). "Low molecular weight heparin inhibits plasma thrombin generation via direct targeting of factor IXa: contribution of the serpin-independent mechanism." J Thromb Haemost **10**(10): 2086-2098.
13. Castoldi, E. and J. Rosing (2011). "Thrombin generation tests." Thromb Res **127 Suppl 3**: S21-25.
14. Catto, A., A. Carter, H. Ireland, T. A. Bayston, H. Philippou, J. Barrett, D. A. Lane and P. J. Grant (1995). "Factor V Leiden gene mutation and thrombin generation

in relation to the development of acute stroke." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(6): 783-785.
15. Cohen, M. J. and S. A. Christie (2017). "Coagulopathy of Trauma." Crit Care Clin **33**(1): 101-118.
16. Connolly, A. J., H. Ishihara, M. L. Kahn, R. V. Farese, Jr. and S. R. Coughlin (1996). "Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor." Nature **381**(6582): 516-519.
17. Couturaud, F., J. Duchemin, C. Leroyer, B. Delahousse, J. F. Abgrall and D. Mottier (2008). "Thrombin generation in first-degree relatives of patients with venous thromboembolism who have factor V Leiden. A pilot study." Thromb Haemost **99**(1): 223-228.
18. Crawley, J. T., S. Zanardelli, C. K. Chion and D. A. Lane (2007). "The central role of thrombin in hemostasis." J Thromb Haemost **5 Suppl 1**: 95-101.
19. Čápová, I. e., P. t. Salaj and I. g. Hrachovinová (2021). "Hereditary antithrombin deficiency in pregnancy - severe thrombophilic disorder as a danger for mother and foetus." Ceska Gynekol **86**(3): 175-182.
20. Danforth, C. M., T. Orfeo, S. J. Everse, K. G. Mann and K. E. Brummel-Ziedins (2012). "Defining the boundaries of normal thrombin generation: investigations into hemostasis." PLoS One **7**(2): e30385.
21. Dempfle, C. E. (2004). "Coagulopathy of sepsis." Thromb Haemost **91**(2): 213-224.
22. Depasse, F., N. B. Binder, J. Mueller, T. Wissel, S. Schwers, M. Germer, B. Hermes and P. L. Turecek (2021). "Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine." J Thromb Haemost **19**(12): 2907-2917.
23. Di Cera, E. (2003). "Thrombin interactions." Chest **124**(3 Suppl): 11s-17s.
24. Di Cera, E. (2008). "Thrombin." Mol Aspects Med **29**(4): 203-254.
25. Dielis, A. W., W. M. Balliël, R. van Oerle, W. T. Hermens, H. M. Spronk, H. Ten Cate and K. Hamulyák (2008). "Thrombomodulin-modified thrombin generation after in vivo recombinant factor VIII treatment in severe hemophilia A." Haematologica **93**(9): 1351-1357.
26. Doshi, B. S., B. Gangadharan, C. B. Doering and S. L. Meeks (2012). "Potentiation of thrombin generation in hemophilia A plasma by coagulation factor VIII and characterization of antibody-specific inhibition." PLoS One **7**(10): e48172.
27. Dulíček, P. (2022). Poruchy hemostázy v klinické praxi. Praha, Grada Publishing, a.s.
28. Durai, S., L. K. Tan and S. Lim (2016). "Antithrombin deficiency in pregnancy." BMJ Case Rep **2016**.
29. Exner, T., N. Michalopoulos, J. Pearce, R. Xavier and M. Ahuja (2018). "Simple method for removing DOACs from plasma samples." Thromb Res **163**: 117-122.
30. Fenton, J. W., 2nd (1995). "Thrombin functions and antithrombotic intervention." Thromb Haemost **74**(1): 493-498.
31. Gabay, C. and I. Kushner (1999). "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation." N Engl J Med **340**(6): 448-454.
32. Gehlen, R., A. Vandevelde, B. de Laat and K. M. J. Devreese (2023). "Application of the thrombin generation assay in patients with antiphospholipid syndrome: A systematic review of the literature." Front Cardiovasc Med **10**: 1075121.
33. Goldsack, N. R., R. C. Chambers, K. Dabbagh and G. J. Laurent (1998). "Thrombin." Int J Biochem Cell Biol **30**(6): 641-646.

34. Haghpanah, S., A. Bazrafshan, S. Silavizadeh, J. Dehghani, A. Afrasiabi and M. Karimi (2016). "Evaluation of Thrombin Generation Assay in Patients With Hemophilia." Clin Appl Thromb Hemost **22**(4): 322-326.
35. Hathaway, W. E. (1991). "Clinical aspects of antithrombin III deficiency." Semin Hematol **28**(1): 19-23.
36. Hemker, H. C. (2011). "[Thrombinoscopy: measuring thrombin generation]." Ned Tijdschr Geneeskd **155**: A2572.
37. Hemker, H. C. (2015). "The application of thrombin generation in real life clinical situations." Thromb Res **136**(1): 3-4.
38. Hemker, H. C. (2015). "Thrombin generation: biochemical possibilities and clinical reality." Blood **126**(3): 288-289.
39. Hemker, H. C. (2016). "[Measuring thrombin formation]." Ned Tijdschr Geneeskd **160**: D318.
40. Hemker, H. C., R. Al Dieri, E. De Smedt and S. Béguin (2006). "Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system." Thromb Haemost **96**(5): 553-561.
41. Hemker, H. C., P. Giesen, R. Al Dieri, V. Regnault, E. de Smedt, R. Wagenvoord, T. Lecompte and S. Béguin (2003). "Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma." Pathophysiol Haemost Thromb **33**(1): 4-15.
42. Hemker, H. C., P. L. Giesen, M. Ramjee, R. Wagenvoord and S. Béguin (2000). "The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma." Thromb Haemost **83**(4): 589-591.
43. Hemker, H. C., S. Wielders, H. Kessels and S. Béguin (1993). "Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential." Thromb Haemost **70**(4): 617-624.
44. Hemker, H. C., G. M. Willems and S. Béguin (1986). "A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes." Thromb Haemost **56**(1): 9-17.
45. Hepner, M. and V. Karlaftis (2013). "Protein C." Methods Mol Biol **992**: 365-372.
46. Hézard, N., L. Bouaziz-Borgi, M. G. Remy and P. Nguyen (2006). "Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency." Clin Chem **52**(4): 665-670.
47. Hirmerová, J., D. Karetová, R. Malý, D. Musil and K. Roztočil (2014). Akutní žilní trombóza 2014: Současný stav, prevence, diagnostiky a léčby: Doporučený postup české angiologické společnosti ČLS JEP. Česká společnost pro trombózu a hemostázu ČLS JEP [online]. 2014; 1 (1): 1-68 [cit. 2018-01-30].
48. Howell, D. C., G. J. Laurent and R. C. Chambers (2002). "Role of thrombin and its major cellular receptor, protease-activated receptor-1, in pulmonary fibrosis." Biochem Soc Trans **30**(2): 211-216.
49. Hulshof, A. M., H. C. Hemker, H. M. H. Spronk, Y. M. C. Henskens and H. Ten Cate (2021). "Thrombin-Fibrin(ogen) Interactions, Host Defense and Risk of Thrombosis." Int J Mol Sci **22**(5).
50. Chantarangkul, V., M. Clerici, C. Bressi, P. L. Giesen and A. Tripodi (2003). "Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability." Haematologica **88**(5): 547-554.
51. Choi, P. M. and A. M. Vogel (2014). "Acute coagulopathy in pediatric trauma." Curr Opin Pediatr **26**(3): 343-349.
52. Khor, B. and E. M. Van Cott (2010). "Laboratory tests for antithrombin deficiency." Am J Hematol **85**(12): 947-950.

53. Kirchhof, P., T. Toennis, A. Goette, A. J. Camm, H. C. Diener, N. Becher, E. Bertaglia, C. Blomstrom Lundqvist, M. Borlich, A. Brandes, N. Cabanelas, M. Calvert, G. Chlouverakis, G. A. Dan, J. R. de Groot, W. Dichtl, B. Kravchuk, A. Lubiński, E. Marijon, B. Merkely, L. Mont, A. K. Ozga, K. Rajappan, A. Sarkozy, D. Scherr, R. Sznajder, V. Velchev, D. Wichterle, S. Sehner, E. Simantirakis, G. Y. H. Lip, P. Vardas, U. Schotten and A. Zapf (2023). "Anticoagulation with Edoxaban in Patients with Atrial High-Rate Episodes." N Engl J Med **389**(13): 1167-1179.
54. Kitagawa, Y. (2005). "[Antiphospholipid syndrome and stroke]." Rinsho Shinkeigaku **45**(11): 852-855.
55. Kottke-Marchant, K. and A. Duncan (2002). "Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis." Arch Pathol Lab Med **126**(11): 1326-1336.
56. Kvasnicka, J., J. Horak, Z. Zenahlikova, T. Kvasnicka, S. Simek, T. Kovarnik, I. Malikova, A. Linhart and M. Aschermann (2011). "Reduced Thrombin Generation and Soluble P-selectin After Intravenous Enoxaparin During PCI." Cardiovascular Drugs and Therapy **25**(3): 243-250.
57. Kvasnicka, T., J. Hajkova, P. Bobcikova, V. Cverhova, I. Malikova, J. Ulrych, J. Briza, D. Duskova, S. Poletinova, V. Kieferova and J. Kvasnicka (2014). "The Frequencies of Six Important Thrombophilic Mutations in a Population of the Czech Republic." Physiological Research **63**(2): 245-253.
58. Kvasnicka, T., I. Malikova, Z. Zenahlikova, K. Kettnerova, R. Brzezkova, T. Zima, J. Ulrych, J. Briza, I. Netuka and J. Kvasnicka (2017). "Rivaroxaban - Metabolism, Pharmacologic Properties and Drug Interactions." Curr Drug Metab **18**(7): 636-642.
59. Kvasnička, J. (2003). Trombofile a trombotické stavy v klinické praxi. Praha, Grada Publishing a.s.
60. Kvasnička, J. (2003). Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi. Praha, Grada Publishing a.s.
61. Kvasnička, J. (2010). "Dědičné trombofilie–doporučení k provádění genetických testů v klinické praxi." Časopis lékařů českých **149**(10): 424-427.
62. Kvasnička, T. (2012). "Tromboembolizmus, hemokoagulace a aterotrombóza." Intervenční a akutní kardiologie **11**(1): 15-17.
63. Langer, F., B. Eifrig, S. Hegewisch-Becker, G. Marx, K. Neuber and D. K. Hossfeld (2002). "[Complicated antiphospholid antibody syndrome]." Dtsch Med Wochenschr **127**(27): 1458-1462.
64. Licari, L. G. and J. P. Kovacic (2009). "Thrombin physiology and pathophysiology." J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) **19**(1): 11-22.
65. Macfarlane, R. G. and R. Biggs (1953). "A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia." J Clin Pathol **6**(1): 3-8.
66. Malikova, I., M. Husakova, J. Bilkova, R. Brzezkova, I. Hrachovinova and T. Kvasnicka (2023). "The Homozygous Type II Antithrombin Deficient Pregnant Woman Monitored by Thrombin Generation Assay." Clin Lab **69**(10).
67. Malikova, I., M. Husakova, J. Bilkova, R. Brzezkova, I. Hrachovinova and T. Kvasnicka (2023). "Thrombin Generation Decrease After LMWH Administration in an Antithrombin-Deficient Pregnant Woman With a Homozygous HBS II Mutation." Clin Appl Thromb Hemost **29**: 10760296231197174.
68. Malikova, I., M. Husakova, J. Bilkova, R. Brzezkova and T. Kvasnicka (2023). "Thrombin Decrease in Thrombin Generation after Heparin Administration in a Homozygous Type II Heparin Binding Site Antithrombin-Deficient Pregnant Woman." Med Princ Pract: 1.

69. Mancuso, M. E. and M. R. Fasulo (2016). "Thrombin Generation Assay as a Laboratory Monitoring Tool during Bypassing Therapy in Patients with Hemophilia and Inhibitors." Semin Thromb Hemost **42**(1): 30-35.
70. Meihandoest, T., J. D. Studt, A. Mendez, L. Alberio, P. Fontana, W. A. Wuillemin, A. Schmidt, L. Graf, B. Gerber, G. M. Maeder, C. Bovet, T. C. Sauter and M. Nagler (2021). "Automated Thrombin Generation Assay for Rivaroxaban, Apixaban, and Edoxaban Measurements." Front Cardiovasc Med **8**: 717939.
71. Metze, M., T. Klöter, S. Stöbe, B. Rechenberger, R. Siegemund, T. Siegemund, U. Laufs, S. Petros and C. Pfrepper (2021). "Plasma levels do not predict thrombin generation in patients taking direct oral anticoagulants." Int J Lab Hematol **43**(6): 1539-1548.
72. Metze, M., C. Pfrepper, T. Klöter, S. Stöbe, R. Siegemund, T. Siegemund, E. Edel, U. Laufs and S. Petros (2020). "Inhibition of thrombin generation 12 hours after intake of direct oral anticoagulants." Res Pract Thromb Haemost **4**(4): 610-618.
73. Nieman, M. T. and A. H. Schmaier (2007). "Interaction of thrombin with PAR1 and PAR4 at the thrombin cleavage site." Biochemistry **46**(29): 8603-8610.
74. Patnaik, M. M. and S. Moll (2008). "Inherited antithrombin deficiency: a review." Haemophilia **14**(6): 1229-1239.
75. Penka, M. and E. a. k. Tesařová (2011). Hematologie a transfuzní lékařství. I, Hematologie. Praha, Grada Publishing, a.s.
76. Pitney, W. R. and J. V. Dacie (1953). "A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma; application in the investigation of haemophilia." J Clin Pathol **6**(1): 9-14.
77. Poul, H. (2006). "Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci." Vnitřní lékařství **12**: 17-25.
78. Rugeri, L., S. Beguin, C. Hemker, J. C. Bordet, R. Fleury, B. Chatard, C. Negrier and Y. Dargaud (2007). "Thrombin-generating capacity in patients with von Willebrand's disease." Haematologica **92**(12): 1639-1646.
79. Saibeni, S., V. Saladino, V. Chantarangkul, F. Villa, S. Bruno, M. Vecchi, R. de Franchis, C. Sei and A. Tripodi (2010). "Increased thrombin generation in inflammatory bowel diseases." Thromb Res **125**(3): 278-282.
80. Segers, O., P. Simioni, D. Tormene and E. Castoldi (2014). "Influence of single nucleotide polymorphisms on thrombin generation in factor V Leiden heterozygotes." Thromb Haemost **111**(3): 438-446.
81. Shaw, J. R., L. A. Castellucci, D. Siegal and M. Carrier (2023). "DOAC-associated bleeding, hemostatic strategies, and thrombin generation assays - a review of the literature." J Thromb Haemost **21**(3): 433-452.
82. Siegemund, A., S. Petros, T. Siegemund, U. Scholz, H. J. Seyfarth and L. Engelmann (2004). "The endogenous thrombin potential and high levels of coagulation factor VIII, factor IX and factor XI." Blood Coagul Fibrinolysis **15**(3): 241-244.
83. Simone, B., V. De Stefano, E. Leoncini, J. Zacho, I. Martinelli, J. Emmerich, E. Rossi, A. R. Folsom, W. Y. Almawi, P. Y. Scarabin, M. den Heijer, M. Cushman, S. Penco, A. Vaya, P. Angchaisuksiri, G. Okumus, D. Gemmati, S. Cima, N. Akar, K. I. Oguzulgen, V. Ducros, C. Lichy, C. Fernandez-Miranda, A. Szczeklik, J. A. Nieto, J. D. Torres, V. Le Cam-Duchez, P. Ivanov, C. Cantu-Brito, V. M. Shmeleva, M. Stegnar, D. Ogunyemi, S. S. Eid, N. Nicolotti, E. De Feo, W. Ricciardi and S. Boccia (2013). "Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of Factor V Leiden, Prothrombin 20210A and

Methylenetethraydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls." Eur J Epidemiol **28**(8): 621-647.
84. Tripodi, A. (2013). "The laboratory and the new oral anticoagulants." Clin Chem **59**(2): 353-362.
85. Tripodi, A. (2016). "Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory." Clin Chem **62**(5): 699-707.
86. Tripodi, A., A. Branchi, V. Chantarangkul, M. Clerici, G. Merati, A. Artoni and P. M. Mannucci (2011). "Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay." J Thromb Thrombolysis **31**(2): 165-172.
87. Tripodi, A., A. L. Fracanzani, M. Primignani, V. Chantarangkul, M. Clerici, P. M. Mannucci, F. Peyvandi, C. Bertelli, L. Valenti and S. Fargion (2014). "Procoagulant imbalance in patients with non-alcoholic fatty liver disease." J Hepatol **61**(1): 148-154.
88. Tripodi, A., V. Chantarangkul, F. Gianniello, M. Clerici, L. Lemma, L. Padovan, L. Gatti, P. M. Mannucci and F. Peyvandi (2013). "Global coagulation in myeloproliferative neoplasms." Ann Hematol **92**(12): 1633-1639.
89. Tripodi, A. and P. M. Mannucci (2011). "The coagulopathy of chronic liver disease." N Engl J Med **365**(2): 147-156.
90. Tripodi, A., L. Padovan, C. Veena, E. Scalambrino, S. Testa and F. Peyvandi (2015). "How the direct oral anticoagulant apixaban affects thrombin generation parameters." Thromb Res **135**(6): 1186-1190.
91. Tripodi, A., M. Primignani, V. Chantarangkul, M. Clerici, A. Dell'Era, F. Fabris, F. Salerno and P. M. Mannucci (2006). "Thrombin generation in patients with cirrhosis: the role of platelets." Hepatology **44**(2): 440-445.
92. van Veen, J. J., A. Gatt, P. C. Cooper, S. Kitchen, A. E. Bowyer and M. Makris (2008). "Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombin-generation measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters." Blood Coagul Fibrinolysis **19**(3): 183-189.
93. van Veen, J. J., A. Gatt, P. C. Cooper, S. Kitchen and M. Makris (2006). "Between-batch variation of calibrator activity can significantly influence fluorogenic measurement of thrombin generation." J Thromb Haemost **4**(11): 2514-2516.
94. Walker, C. P. and D. Royston (2002). "Thrombin generation and its inhibition: a review of the scientific basis and mechanism of action of anticoagulant therapies." Br J Anaesth **88**(6): 848-863.

10 Seznam publikací

10.1 Publikace ve vztahu k dizertaci

1. Malikova I, Husakova M, Bilkova J, Brzezkova R, Hrachovinova I, Kvasnicka T. The Homozygous Type II Antithrombin Deficient Pregnant Woman Monitored by Thrombin Generation Assay. Clinical laboratory. 2023;69(10). [Journal IF 2023 = 1,053]
2. Malikova I, Husakova M, Bilkova J, Brzezkova R, Hrachovinova I, Kvasnicka T. Thrombin Generation Decrease After LMWH Administration in an Antithrombin-Deficient Pregnant Woman With a Homozygous HBS II Mutation. Clin Appl Thromb Hemost. 2023;29:10760296231197174. [Journal IF 2023 = 2,9]
3. Malikova I, Husakova M, Bilkova J, Brzezkova R, Kvasnicka T. Thrombin Decrease in Thrombin Generation after Heparin Administration in a Homozygous Type II Heparin Binding Site Antithrombin-Deficient Pregnant Woman. Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre. 2023:1. [Journal IF 2023 = 3,19]
4. Hartinger JM, Svobodová A, Malíková I, Šachl R, Slanař O. Effective use of fondaparinux in patient with unresponsiveness to nadroparin. Journal of clinical pharmacy and therapeutics. 2021;46(2):539-42. [Journal IF 2021 = 2,145]
5. Kudrnova Z, Kvasnicka J, Kudrna K, Mazoch J, Malikova I, Zenahlikova Z, et al. Favorable coagulation profile with fondaparinux after hip surgery in elderly patients. International Journal of Hematology. 2009;90(4):476-82. [Journal IF 2009 = 1,168]
6. Kutac D, Bohonek M, Landova L, Staskova E, Blahutova M, Malikova I, et al. Cryopreservation of apheresis platelets treated with riboflavin and UV light. Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis. 2023;62(2):103580. [Journal IF 2023 = 1,9]
7. Kvasnicka J, Bobcikova P, Hajkova J, Kvasnicka T, Malikova I, Brzezkova R, et al. The frequencies of thrombophilic alleles known from GWAS studies in healthy population and in group of patients with venous thromboembolism (VTE) in Czech Republic. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2014;12:82-3. [Journal IF 2014 = 5,72]
8. Kvasnicka J, Horak J, Zenahlikova Z, Kvasnicka T, Simek S, Kovarnik T, et al. Reduced Thrombin Generation and Soluble P-selectin After Intravenous Enoxaparin During PCI. Cardiovascular Drugs and Therapy. 2011;25(3):243-50. [Journal IF 2011 = 2,673]
9. Kvasnicka J, Krska Z, Bobcikova P, Cverhova V, Hajkova J, Malikova I, et al. The frequencies of thrombophilic alleles known from GWAS studies in healthy population and in group of patients with venous thromboembolism (VTE) in the Czech Republic. Multidisciplinary Approach To Cardiovascular Diseases. 2016:75-7.
10. Kvasnicka J, Viklický O, Umlaufová A, Kvasnicka T, Teplá E, Homolková H, et al. [Increased sP-selectin and other cardiovascular risk factors: fibrinogen, tissue plasminogen activator (t-PA Ag) and acute phase proteins after kidney transplantation]. Sbornik lekarsky. 2002;103(3):411-7. [Journal IF 2023 = 2,9]
11. Kvasnicka T, Hajkova J, Bobcikova P, Cverhova V, Kvasnickova P, Ulrych J, et al. The prevalence of gene polymorfisms of thrombocytes in patients with evidential venous thromboembolism (VTE). Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2014;12:105. [Journal IF 2014 = 5,72]

12. Kvasnicka T, Hajkova J, Bobcikova P, Cverhova V, Malikova I, Ulrych J, et al. The Frequencies of Six Important Thrombophilic Mutations in a Population of the Czech Republic. Physiological Research. 2014;63(2):245-53. [Journal IF 2014 = 1,293]
13. Kvasnicka T, Malikova I, Zenahlikova Z, Kettnerova K, Brzezkova R, Zima T, et al. Rivaroxaban - Metabolism, Pharmacologic Properties and Drug Interactions. Current drug metabolism. 2017;18(7):636-42. [Journal IF 2017 = 2,277]
14. Sedlar M, Kudrnova Z, Erhart D, Trca S, Kvasnicka J, Krska Z, et al. Older age and type of surgery predict the early inflammatory response to hip trauma mediated by interleukin-6 (IL-6). Archives of Gerontology and Geriatrics. 2010;51(1):E1-E6. [Journal IF 2010 = 1,438]
15. Sedlar M, Kudrnova Z, Trca S, Mazoch J, Malikova I, Kvasnicka J, et al. Inflammatory response in patients undergoing hip surgery due to osteoarthrosis or different types of hip fractures. Osteoarthritis and Cartilage. 2008;16(1):26-33. [Journal IF 2008 = 4,082]
16. Tesarova P, Kalousova M, Zima T, Suchanek M, Malikova I, Kvasnicka J, et al. Endotelial activation and flow-mediated vasodilation in young patients with breast cancer. Neoplasma. 2013;60(6):690-7. [Journal IF 2013 = 1,642]
17. Ulrych J, Kvasnicka T, Fryba V, Komarc M, Malikova I, Brzezkova R, et al. The impact of hereditary thrombophilia on the incidence of postoperative venous thromboembolism in colorectal cancer patients: a prospective cohort study. European Surgery. 2019;51(1):5-12. [Journal IF 2019 = 0,798]
18. Zenahlikova Z, Kvasnicka J, Kudrnova Z, Sudrova M, Brzezkova R, Mazoch J, et al. FXa Inhibition and Coagulation Changes During DVT Prophylaxis by Enoxaparin Over the Course of a 15-Day Follow-Up in Septic Patients. Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis. 2010;16(5):584-90. [Journal IF 2010 = 1,476]

10.2 Publikace bez vztahu k dizertaci

1. Ulrych J, Kvasnicka T, Fryba V, Komarc M, Malikova I, Burget F, et al. 28 day post-operative persisted hypercoagulability after surgery for benign diseases: a prospective cohort study. Bmc Surgery. 2016;16. [Journal IF 2016 = 1,422]
2. Vítek L, Jirásková A, Malíková I, Dostálová G, Eremiášová L, Danzig V, et al. Serum Bilirubin and Markers of Oxidative Stress and Inflammation in a Healthy Population and in Patients with Various Forms of Atherosclerosis. Antioxidants (Basel, Switzerland). 2022;11(11). [Journal IF 2022 = 7,0]
3. Vitek L, Malikova I, Kvasnicka J, Benakova H, Novotny L. Relationship between serum bilirubin and markers of inflammation and oxidative stress. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2007;22:A235. [Journal IF 2007 = 1,673]
4. Cukrova V, Neuwirtova R, Dolezalova L, Belickova M, Bartunkova J, Jonasova A, et al. Defective cytotoxicity of T lymphocytes in myelodysplastic syndrome. Experimental Hematology. 2009;37(3):386-94. [Journal IF 2007 = 3,147]
5. Just S, Chau SSS, Malikova I, Drescher V, Reichardt P, Smith L, et al. HIGH LEVEL OF AGREEMENT BETWEEN CP3000 AND FIVE OTHER COAGULATION ANALYZERS FOR INR IN A MULTICENTER STUDY. International Journal of Laboratory Hematology. 2017;39:52. [Journal IF 2017 = 1,919]
6. Netuka I, Kvasnicka J, Kvasnicka T, Hrachovinova I, Ivak P, Bilkova J, et al. Serial Evaluation of Von Willebrand Factor Performance with a Fully Magnetically Levitated Centrifugal Continuous Flow Left Ventricular Assist Device. Journal of Heart and Lung Transplantation. 2016;35(4):S83. [Journal IF 2016 = 7,114]

7. Netuka I, Kvasnicka T, Kvasnicka J, Hrachovinova I, Ivak P, Marecek F, et al. Evaluation of von Willebrand factor with a fully magnetically levitated centrifugal continuous-flow left ventricular assist device in advanced heart failure. Journal of Heart and Lung Transplantation. 2016;35(7):860-7. [Journal IF 2016 = 7,114]

11 Seznam použitých zkratek

APC – aktivovaný protein C

APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas (*Activated Partial Tromboplastine Time)*

AT – antitrombin

AUC – plocha pod křivkou (*Area under the Curve*)

α2M – alfa 2 makrobulin

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ETP – endogenní trombinový potenciál

FII – faktor II

FVIII – faktor VIII

FIX – faktor IX

FX – faktor X

FXI – faktor XI

FXII – faktor XII

FXIII – faktor XIII

GT – gestační týden

HMWK – vysokomolekulární kininogen (*High Molecular Weight Kininogen*)

LIA – Liquid Immuno Assay

LMWH – nízkomolekulární heparin *(Low Molecular Weight Heparin*)

PAI-1 – inhibitor aktivátoru plazminogenu typu 1 *(Plasminogen Activator Inhibitor-1)*

PAR-1 – receptor aktivovaný proteázou -1 *(Protease Activated Receptor-1)*

PAR-4 – receptor aktivovaný proteázou -4 *(Protease Activated Receptor-4)*

PC – protein C

PCR – polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)

PE – plicní embolie

PF 4 – faktor 4 krevních destiček *(Platelet Factor-4)*

PFA – test funkce krevních destiček (*Platelet Function Assay)*

PFP – bezdestičková plazma *(Platelet Free Plasma)*

PL – fosfolipidy *(phospholipids)*

PPP – plazma chudá na destičky (*Platelet Poor Plasma*)

PRP – plazma bohatá na destičky (*Platelet Rich Plasma*)

PT – protrombinový test

PS – protein S

TAFI – trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy *(Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor)*

TF – tkáňový faktor *(Tissue Factor)*

TFPI – inhibitor tkaňového faktoru (*Tissue Factor Pathway Inhibitor)*

TG – generace trombinu *(Thrombin Generation)*

TGA – Thrombin Generation Assay

TGT – trombin generační čas *(Thrombin GenerationTtime)*

TNF – faktor nádorové nekrózy *(Tumor Necrosis Factor)*

t-PA – aktivátor tkáňového plazminogenu *(Tissue Plasminogen Activator)*

TXA – tromboxan A

VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor *(Vascular Endothelial Growth Factor)*

VCAM-1 – molekula adheze vaskulárních buněk typu 1 *(Vascular Cell Adhesion Molecule-1)*

VI – rychlost tvorby trombinu, strmost křivky (*Velocity Index*)

vWF – von Willebrandův faktor *(von Willebrand Factor)*

VTE – žilní tromboembolizmus (*Venous Thromboembolism*)

12 Seznam tabulek, grafů a obrázků

12.1 Seznam tabulek

Tabulka 1 Základní charakteristika skupin s antikoagulační léčbou 31
Tabulka 2 Normální laboratorní hodnoty 34
Tabulka 3 Normální hodnoty generace trombinu u kontrolní zdravé skupiny 35
Tabulka 4 Hodnoty generace trombinu u skupiny faktor V Leiden heterozygoti 36
Tabulka 5 Hodnoty generace trombinu u skupiny s vysokým faktorem VIII 36
Tabulka 6 Statistický význam tLag – času nástupu generace trombinu 37
Tabulka 7 Statistický význam tPeak – času dosažení maximální koncentrace trombinu 38
Tabulka 8 Statistický význam Peak – maximální koncentrace trombinu 39
Tabulka 9 Statistický význam VI – rychlosti tvorby trombinu 40
Tabulka 10 Statistický význam AUC – endogenního trombinového potenciálu 41
Tabulka 11 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden negativní užívající dabigatran 43
Tabulka 12 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden heterozygoti užívající dabigatran 44
Tabulka 13 Statistický význam tLag – času nástupu generace trombinu v maximu léčby 45
Tabulka 14 Statistický význam tPeak – času dosažení peaku trombinu v maximu léčby 46
Tabulka 15 Statistický význam Peak – maximální koncentrace trombinu v maximu léčby 47
Tabulka 16 Statistický význam Velocity index – rychlosti tvorby trombinu v maximu léčby 48
Tabulka 17 Statistický význam AUC – endogenního trombinového potenciálu v maximu léčby 49
Tabulka 18 Korelace hladiny dabigatranu a generace trombinu u skupin FVL neg a FVL het 51
Tabulka 19 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden negativní užívající Rivaroxaban 52

Tabulka 20 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden heterozygoti užívající Rivaroxaban 53
Tabulka 21 Statistický význam tLag – času nástupu generace trombinu v maximu léčby 54
Tabulka 22 Statistický význam tPeak – času dosažení peaku trombinu v maximu léčby 55
Tabulka 23 Statistický význam Peak – maximální koncentrace trombinu v maximu léčby 56
Tabulka 24 Statistický význam Velocity index – rychlosti tvorby trombinu v maximu léčby 57
Tabulka 25 Statistický význam AUC – endogenního trombinového potenciálu v maximu léčby 58
Tabulka 26 Korelace hladiny rivaroxabanu a generace trombinu u skupiny FVL het a FVL neg 60
Tabulka 27 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden negativní užívající apixaban 61
Tabulka 28 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden heterozygoti užívající apixaban 62
Tabulka 29 Statistický význam tLag – času nástupu generace trombinu v maximu léčby 63
Tabulka 30 Statistický význam tPeak – času dosažení peaku trombinu v maximu léčby 64
Tabulka 31 Statistický význam Peak – maximální koncentrace trombinu v maximu léčby 65
Tabulka 32 Statistický význam Velocity index – rychlosti tvorby trombinu v maximu léčby 66
Tabulka 33 Statistický význam AUC – endogenního trombinového potenciálu v maximu léčby 67
Tabulka 34 Korelace hladiny apixabanu generace trombinu u skupiny FVL neg a FVL het 69
Tabulka 35 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden negativní užívající edoxaban 70
Tabulka 36 Hodnoty generace trombinu u skupiny Faktor V Leiden heterozygoti užívající edoxaban 71

Tabulka 37 Statistický význam tLag – času nástupu generace trombinu v maximu léčby 72
Tabulka 38 Statistický význam tPeak – času dosažení peaku trombinu v maximu léčby 73
Tabulka 39 Statistický význam Peak – maximální koncentrace trombinu v maximu léčby 74
Tabulka 40 Statistický význam Velocity index – rychlosti tvorby trombinu v maximu léčby 75
Tabulka 41 Statistický význam AUC – endogenního trombinového potenciálu v maximu léčby 76
Tabulka 42 Korelace hladiny edoxabanu a generace trombinu u skupiny FVL neg a FVL het 78
Tabulka 43 Hodnoty sledovaného kontrolního souboru, 0 = před podáním LMWH, 4 = 4 hodiny po podání LMWH, NA= neanalyzováno, *) statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolním souborem 79
Tabulka 44 Hodnoty těhotné s deficitem AT v průběhu těhotenství, GT = gestační týden, 0 = před podáním LMWH, 4 = 4 hodiny po podání LMWH, *) statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolním souborem 80
Tabulka 45 Výsledky kontrol a AT deficitní plazmy (AT def) před a po přidání heparinů UFH — nefrakcionovaný heparin, Dalt. — dalteparin (Fragmin), Nadr. — nadroparin (Fraxiparin), Fond. — fondaparinux (Arixtra), Enox. — enoxaparin (Clexane) 82

12.2 Seznam grafů

Graf 1 tLag – čas nástupu generace trombinu 37
Graf 2 tPeak – čas dosažení maximální koncentrace trombinu 38
Graf 3 Peak – maximální koncentrace trombinu 39
Graf 4 VI – rychlost tvorby trombinu 40
Graf 5 AUC – endogenní trombinový potenciál 41
Graf 6 tLag – čas nástupu generace trombinu v minimu a maximu léčby 45
Graf 7 tPeak – čas dosažení peaku trombinu v minimu a maximu léčby 46
Graf 8 Peak – maximální koncentrace trombinu v minimu a maximu léčby 47
Graf 9 Velocity index – rychlost tvorby trombinu v minimu a maximu léčby 48

Graf 10 AUC – endogenní trombinový potenciál v minimu a maximu léčby 49
Graf 11 Korelace hladiny dabigatranu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL neg 50
Graf 12 Korelace hladiny dabigatranu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL het 50
Graf 13 tLag – čas nástupu generace trombinu v minimu a maximu léčby 54
Graf 14 tPeak – čas dosažení peaku trombinu v minimu a maximu léčby 55
Graf 15 Peak – maximální koncentrace trombinu v minimu a maximu léčby 56
Graf 16 Velocity index – rychlost tvorby trombinu v minimu a maximu léčby 57
Graf 17 AUC – endogenní trombinový potenciál v minimu a maximu léčby 58
Graf 18 Korelace hladiny rivaroxabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL neg 59
Graf 19 Korelace hladiny rivaroxabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL het 59
Graf 20 tLag – čas nástupu generace trombinu v minimu a maximu léčby 63
Graf 21 tPeak – čas dosažení peaku trombinu v minimu a maximu léčby 64
Graf 22 Peak – maximální koncentrace trombinu v minimu a maximu léčby 65
Graf 23 Velocity index – rychlost tvorby trombinu v minimu a maximu léčby 66
Graf 24 AUC – endogenní trombinový potenciál v minimu a maximu léčby 67
Graf 25 Korelace hladiny apixabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL neg 68
Graf 26 Korelace hladiny apixabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL het 68
Graf 27 tLag – čas nástupu generace trombinu v minimu a maximu léčby 72
Graf 28 tPeak – čas dosažení peaku trombinu v minimu a maximu léčby 73
Graf 29 Peak – maximální koncentrace trombinu v minimu a maximu léčby 74
Graf 30 Velocity index – rychlost tvorby trombinu v minimu a maximu léčby 75
Graf 31 AUC – endogenní trombinový potenciál v minimu a maximu léčby 76
Graf 32 Korelace hladiny edoxabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL neg 77
Graf 33 Korelace hladiny edoxabanu a generace maximální koncentrace trombinu u skupiny FVL het 77
Graf 34 Hodnoty antitrombinu stanovené kitem s faktorem Xa u skupiny netěhotných (N), těhotných (P) a těhotné s deficitem antitrombinu (D) 80

Graf 35 Hodnoty aktivity anti Xa u netěhotných (N) a těhotných (P), 0 = před podáním LMWH, 4 = 4 hodiny po podání LMWH 81
Graf 36 Hodnoty AUC u netěhotných (N), těhotných (P) a těhotné s deficitem AT ve 37. TG (D), 0 = před podáním LMWH, 4 = 4 hodiny po podání LMWH 81
Graf 37 Ovlivnění Peaku trombinu jednotlivými typy heparinů u zdravé kontroly (Control) a těhotné s deficitem antitrombinu (AT def.), UFH — nefrakcionovaný heparin, Dalt. — dalteparin (Fragmin), Frax. — nadroparin (Fraxiparin), Fond. — fondaparinux (Arixtra), Clex. — enoxaparin (Clexane) 83

12.3 Seznam obrázků

Obrázek 1 Schéma iniciace 10
Obrázek 2 Schéma amplifikace 11
Obrázek 3 Schéma propagace 12
Obrázek 4 Centrální úloha trombinu v hemostáze (převzato z Thrombosis and Haemostasis 106(6):1020-33) 20
Obrázek 5 Základní parametry křivky generace trombinu (upraveno dle Loeffen et al.) 22
Obrázek 6 Mechanizmus účinku heparinu a pentasacharidu (upraveno dle Katzung et al.) 25
Obrázek 7 Schéma účinku přímých inhibitorů koagulace (upraveno dle Dimitrios et al.) 26

13 Seznam příloh

V přílohách jsou uvedeny původní publikace s impakt faktorem.

Příloha č. 1:

Malikova I, Husakova M, Bilkova J, Brzezkova R, Kvasnicka T. Thrombin Decrease in Thrombin Generation after Heparin Administration in a Homozygous Type II Heparin Binding Site Antithrombin-Deficient Pregnant Woman. Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre. 2023:1. [Journal IF 2023 = 3,19]

Příloha č. 2:

Malikova I, Husakova M, Bilkova J, Brzezkova R, Hrachovinova I, Kvasnicka T. Thrombin Generation Decrease After LMWH Administration in an Antithrombin-Deficient Pregnant Woman With a Homozygous HBS II Mutation. Clin Appl Thromb Hemost. 2023;29:10760296231197174. [Journal IF 2023 = 2,9]

Příloha č. 3:

Malikova I, Husakova M, Bilkova J, Brzezkova R, Hrachovinova I, Kvasnicka T. The Homozygous Type II Antithrombin Deficient Pregnant Woman Monitored by Thrombin Generation Assay. Clinical laboratory. 2023;69(10). [Journal IF 2023 = 1,053]