

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát dizertační práce

Doktorský studijní program v biomedicíně
Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Generace trombinu u patofyziologických stavů

Thrombin generation in pathophysiological conditions

Mgr. Ivana Malíková

2024

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc., MBA

Školící pracoviště: Centrální hematologické laboratoře a Trombotické centrum, ÚLBLD
VFN a 1. LF UK v Praze, U Nemocnice 499/2, 128 00 Praha 2

Školitel: doc. MUDr. Tomáš Kvasnička, CSc.

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

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 mutace 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, 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: One of the aims of our study was to compare thrombin generation in individuals with a proven factor V Leiden mutation and individuals with elevated levels of factor VIII. Other aim was to compare patients with VTE and also with or without a proven factor V 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 factor V 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 thrombin generation 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. Also, no high correlation was 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.....	6
2	Hypotéza a cíle práce	7
2.1	Hypotézy.....	7
2.2	Cíle práce.....	7
3	Metody	8
3.1	Soubor pacientů a kontrolních skupin	8
3.2	Laboratorní metody	9
3.3	Statistická analýza dat	10
4	Výsledky	10
4.1	Výsledky laboratorních vyšetření skupiny vrozené a získané trombofilie....	11
4.2	Výsledky skupiny laboratorních vyšetření skupiny užívající přímé inhibitory koagulace	12
4.3	Výsledky laboratorních vyšetření skupiny těhotných žen s profylaxí LMWH	13
5	Diskuze.....	14
5.1	Skupina vrozené a získané trombofilie.....	14
5.2	Skupina užívající přímé inhibitory koagulace	14
5.3	Skupina těhotných žen s profylaxí LMWH.....	15
6	Závěr	17
7	Seznam použité literatury.....	18
8	Seznam publikací	23
8.1	Publikace jako podklad dizertace	23
8.2	Publikace bez vztahu k dizertaci	24

1 Úvod

Sledování procesu generace trombinu by mělo podat celkový obraz o hemostatickém stavu organismu, 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)

Některé aplikace TGT jsou již dobře známy a pomáhají objasňovat koagulační mechanismy v různých klinických stavech. 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)

V souvislosti se sledováním generace trombinu existují některé závažné klinické stavy jako např. venózní tromboembolismus (VTE), který zahrnuje hlubokou žilní trombózu a plicní embolii. Je to velmi časté onemocnění v běžné populaci. 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) Venózní tromboembolismus (VTE) vyžaduje antikoagulační léčbu a měření generace trombinu umožňuje posuzování efektivity právě této léčby.

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. U této skupiny je pak sledování stavu jejich hemostázy obzvláště důležité.

2 Hypotéza a cíle práce

2.1 Hypotézy

1. U pacientů s trombofilním 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 %).

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.

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.

2.2 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 /a nebo/ bez prokázané mutace faktoru V Leiden 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.

3 Metody

3.1 Soubor pacientů a kontrolních skupin

Do kontrolní skupiny (n = 170) byli zařazeni zdraví dobrovolníci a dárce 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 dárce podepsali informovaný souhlas s odběrem krve.

Do skupiny vrozené trombofilie byli zahrnuti jedinci s mutací faktoru V Leiden (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).

Do další 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 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.

Soubor (n=60) tvořily jak těhotné ženy (3. trimestr, věk 32 ± 6) sledované v poradně pro graviditu na Porodnicko gynekologické 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.

3.2 Laboratorní metody

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. Hodnotili jsme 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)

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

U skupiny užívající přímé inhibitory koagulace byla inhibice faktoru IIa při podávání dabigatranu 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.

U skupiny těhotných žen s profylaxí LMWH byla inhibice faktoru Xa měřena s použitím chromogenního testu BIOPHEN® Heparin LRT (Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France). Pro stanovení fyziologicky aktivního antitrombinu jsme použili diagnostické soupravy Berichrom Antitrombin (IIa) a INNOVANCE Antithrombin (Exner, Michalopoulos et al.), (Siemens, SRN).

Pro výběr nejvhodnějšího typu heparinu jsme využili připravené vzorky s nasimulovanou antikoagulační léčbou (Enoxaparinum natrium (Clexane) 4000 IU/0,4mL, Nadroparinum calcicum (Fraxiparine) 9 500 IU/mL, Dalteparinum natrium (Fragmin) 10 000/mL, Fondaparinuxum natrium (Arixtra) 2,5 mg/0,5 mL a Heparinum natrium 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.

3.3 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 $\leq 0,05$.

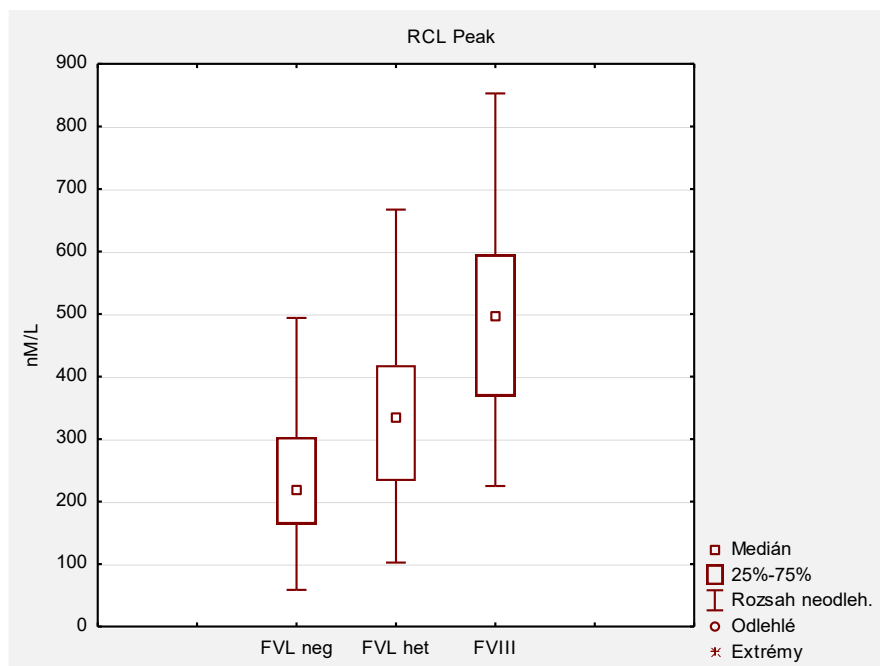
Ke zjištění vztahů mezi proměnnými byl proveden výpočet korelačního koeficientu za použití lineární regrese (grafy 11-12, 18-19, 25-26 a 32-33) a Spearmanova korelace. Hladina statistické významnosti byla pro každý test stanovena na $p \leq 0,05$.

4 Výsledky

4.1 Výsledky laboratorních vyšetření skupiny vrozené a získané trombofilie

U této skupiny jsme porovnali všech pět parametrů křivky generace trombinu u obou typů reagensů (RCL a RCH) u zdravé skupiny FV Leiden negativní, u jedinců s mutací faktoru V Leiden (FVL het) a jedinců s hladinou faktoru VIII > 150 %.

U stanovení tLag s nižší koncentrací fosfolipidů se zkracuje doba nástupu tvorby trombinu u FVIII ve srovnání s negativní skupinou. U stanovení tPeak s nižší koncentrací fosfolipidů se významně zkracuje doba dosažení peaku trombinu u FVIII ve srovnání s negativní skupinou i s FVL het. U stanovení Peak 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 (Graf 1).



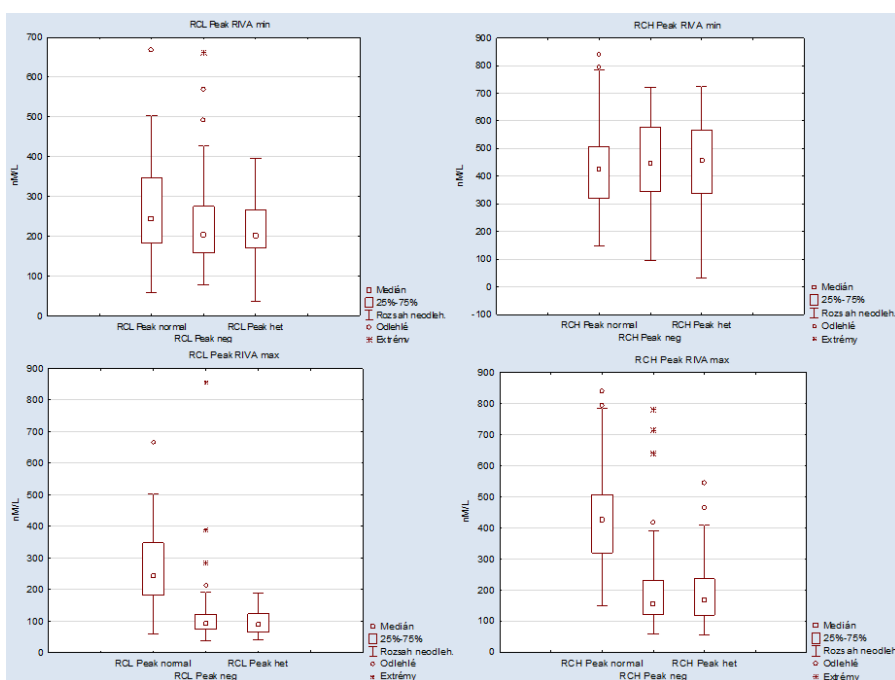
Graf 1 Peak – maximální koncentrace trombinu

U stanovení VI 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.

U stanovení AUC 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.

4.2 Výsledky skupiny laboratorních vyšetření skupiny užívající přímé inhibitory koagulace

Výsledky všech vyhodnocení ukazují, že mezi skupinami FVL neg a FVL het není významný rozdíl v odpovědi na antikoagulační léčbu přímými inhibitory trombinu ani přímými inhibitory faktoru Xa, které je vidět graficky např. u léku rivaroxaban (graf 2) Antitrombotickou aktivitu dokumentuje rovněž pokles generace trombinu v závislosti na hladině podávané léčby, dabigatran: $r = -0,37$, rivaroxaban: $r = -0,81$, apixaban: $r = -0,50$, $p < 0,05$ pro skupinu FV Leiden neg a dabigatran: $r = -0,37$, rivaroxaban: $r = -0,70$, apixaban: $r = -0,45$, $p < 0,05$ pro skupinu FV Leiden het.

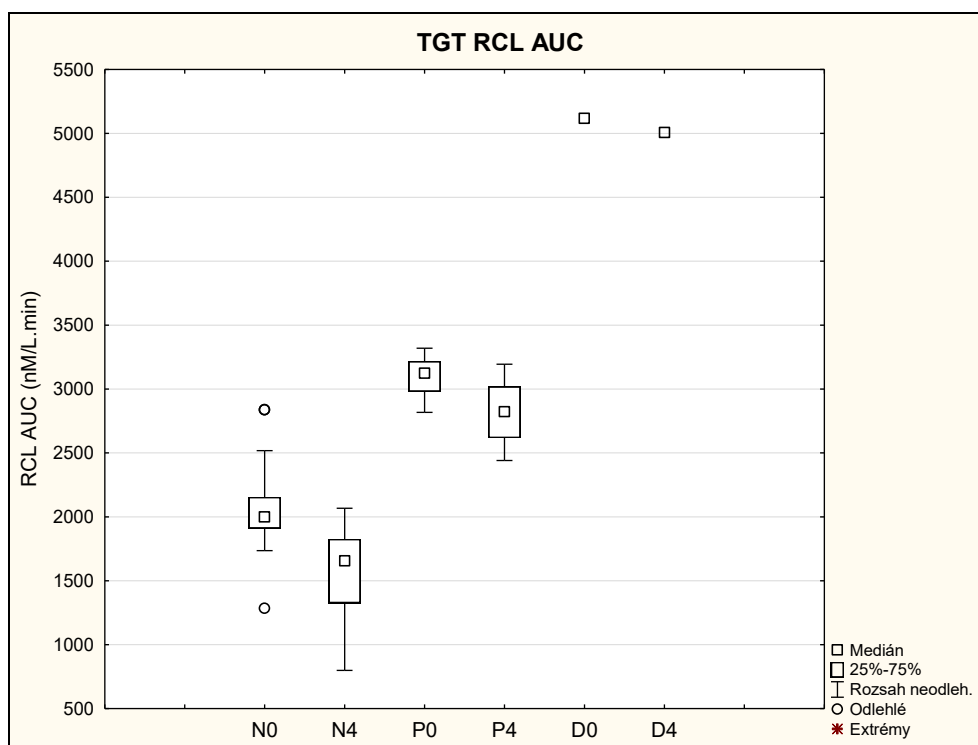


Graf 2 Peak – Maximální koncentrace trombinu v minimu a maximu léčby Rivaroxabanem

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

4.3 Výsledky laboratorních vyšetření skupiny těhotných žen s profylaxí LMWH

Z výsledků jednotlivých sledovaných skupin znázorněných v grafu 34 je vidět že těhotné mají zvýšenou generaci trombinu u parametru AUC proti skupině netěhotných a těhotná s deficitem antitrombinu má zvýšené hodnoty proti oběma skupinám. Hodnoty generace trombinu RCLAUC jsou 4 hodiny po podání LMWH nižší ve všech případech, ale ke snížení dochází úměrně vzhledem k výchozí hodnotě před podáním LMWH.



Graf 3 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 porovnání každé dvojice vzorku normální plazmy (Kontrola) a vzorku pacientky (AT def) s přidaným léčivem do obou vzorků ukazují snížení generace trombinu u všech typů léčby, 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 nutný podávat při hospitalizaci. Z injekčních přípravků vykazoval větší pokles generace trombinu Fraxiparin.

5 Diskuze

5.1 Skupina vrozené a získané trombofilie

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 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 1). Větší zvýšení generace trombinu u skupiny vysokého faktoru VIII si můžeme vysvětlit možnou reakcí akutní fáze, která podporuje sekundární protrombogenní stav. (Kvasnička 2003) 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.

5.2 Skupina užívající přímé inhibitory koagulace

Preparáty Dabigatran etexilát (Pradaxa), Rivaroxaban (Xarelto), apixaban (Eliquis) a edoxaban (Lixiana) 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 pokázanou (FVL het) nebo neprokázanou (FVL neg) mutací faktor V Leiden. Domnívali jsme se, že neodpovídající účinek léčby u některých pacientů, sledovaný hodnotou aktuální hladiny preparátu, by mohl souviset právě s tímto typem vrozené trombofilie.

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.

U léku **rivaroxaban** nebyl u žádného z parametrů generace trombinu zjištěn statisticky významný rozdíl mezi výsledky FVL neg a FVL het na hladině $p \leq 0,05$. 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.

U léku **apixaban** 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 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.

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

Z výsledků je dále patrné snížení generace trombinu v maximu účinku léčby proti minimu účinku léčby a odpovídá to také publikovaným studiím. 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) Po shrnutí všech vyhodnocení je však patrné, že není mezi skupinami FVL neg a FVL het významný rozdíl v odpovědi na antikoagulační léčbu přímými inhibitory trombinu ani přímými inhibitory faktoru Xa.

5.3 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). 4 hodiny po podání LMWH dochází u netěhotných i těhotných ke snížení generace

trombinu (RCL Peak a AUC) všem úměrně vzhledem k výchozí hodnotě před podáním LMWH, u těhotné s deficitem antitrombinu je mírné snížení GT také vidět.

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. 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 deficitem 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.

Limitace: Naše studie byla pouze průzkumného charakteru 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. To 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.

6 Závěr

Z analýzy výsledků skupiny vrozené a získané trombofilie vyplývá, že se významně potvrdila vyšší generace trombinu u skupiny vysokého faktoru VIII v porovnání s nosiči vrozené trombofilní mutace faktor V Leiden. Naše hypotéza se nepotvrdila, předpokládali jsme generaci trombinu vyšší u mutace faktor V Leiden. Toto zjištění má však velký význam při hodnocení trombofilního rizika. 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.

Dosud nejsou k dispozici studie, které by srovnávaly přímé inhibitory faktoru Xa rivaroxaban, apixaban a edoxaban a přímý inhibitor trombinu dabigatran mezi sebou. Při výběru konkrétního přípravku se lékaři řídí především dostupnými daty o účinnosti a bezpečnosti v dané situaci. 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. Významné rozdíly ale nalezeny nebyly.

Parametry peak trombin a AUC při měření generace trombinu se jeví jako dobrý ukazatel prokoagulační aktivity a účinnosti antikoagulační léčby u těhotných žen. Data popisující léčbu těhotných s deficitem antitrombinu s homozygotní mutací HBS II jsou poměrně vzácná. V našem sledování byla potvrzena 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.

Měření generace trombinu formou vyhodnocení trombin generační křivky představuje 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.

7 Seznam použité literatury

- Abbattista, M., F. Gianniello, C. Novembrino, M. Clerici, A. Artoni, P. Bucciarelli, M. Capecci, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bland, J. M. and D. G. Altman (1995). "Calculating correlation coefficients with repeated observations: Part 2--Correlation between subjects." *Bmj* **310**(6980): 633.
- Bleker, S. M., A. Buchmüller, C. Chauleur, F. Ni Ainle, 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.
- Bremme, K. A. (2003). "Haemostatic changes in pregnancy." *Best Pract Res Clin Haematol* **16**(2): 153-168.
- Brenner, B. (2004). "Haemostatic changes in pregnancy." *Thromb Res* **114**(5-6): 409-414.
- Brummel-Ziedins, K. (2013). "Models for thrombin generation and risk of disease." *J Thromb Haemost* **11 Suppl 1**: 212-223.
- 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.
- 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.
- Castoldi, E. and J. Rosing (2011). "Thrombin generation tests." *Thromb Res* **127 Suppl 3**: S21-25.
- 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.
- Cohen, M. J. and S. A. Christie (2017). "Coagulopathy of Trauma." *Crit Care Clin* **33**(1): 101-118.
- 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.
- 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.
- 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.
- Čáповá, 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.

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.

Dempfle, C. E. (2004). "Coagulopathy of sepsis." Thromb Haemost **91**(2): 213-224.

Depasse, F., N. B. Binder, J. Mueller, T. Wissel, S. Schwerts, 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.

Di Cera, E. (2003). "Thrombin interactions." Chest **124**(3 Suppl): 11s-17s.

Di Cera, E. (2008). "Thrombin." Mol Aspects Med **29**(4): 203-254.

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.

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.

Dulíček, P. (2022). Poruchy hemostázy v klinické praxi. Praha, Grada Publishing, a.s.

Durai, S., L. K. Tan and S. Lim (2016). "Antithrombin deficiency in pregnancy." BMJ Case Rep **2016**.

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.

Fenton, J. W., 2nd (1995). "Thrombin functions and antithrombotic intervention." Thromb Haemost **74**(1): 493-498.

Gabay, C. and I. Kushner (1999). "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation." N Engl J Med **340**(6): 448-454.

Gehlen, R., A. Vandeveld, 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.

Goldsack, N. R., R. C. Chambers, K. Dabbagh and G. J. Laurent (1998). "Thrombin." Int J Biochem Cell Biol **30**(6): 641-646.

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.

Hathaway, W. E. (1991). "Clinical aspects of antithrombin III deficiency." Semin Hematol **28**(1): 19-23.

Hemker, H. C. (2011). "[Thrombinoscopy: measuring thrombin generation]." Ned Tijdschr Geneesk **155**: A2572.

Hemker, H. C. (2015). "The application of thrombin generation in real life clinical situations." Thromb Res **136**(1): 3-4.

Hemker, H. C. (2015). "Thrombin generation: biochemical possibilities and clinical reality." Blood **126**(3): 288-289.

Hemker, H. C. (2016). "[Measuring thrombin formation]." Ned Tijdschr Geneesk **160**: D318.

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.

Hemker, H. C., P. Giesen, R. Al Dieri, V. Regnault, E. de Smedt, R. Wagenvoort, T. Lecompte and S. Béguin (2003). "Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma." Pathophysiol Haemost Thromb **33**(1): 4-15.

Hemker, H. C., P. L. Giesen, M. Ramjee, R. Wagenvoort and S. Béguin (2000). "The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma." Thromb Haemost **83**(4): 589-591.

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.

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.

Hepner, M. and V. Karlaftis (2013). "Protein C." Methods Mol Biol **992**: 365-372.

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.

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].

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.

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).

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.

Choi, P. M. and A. M. Vogel (2014). "Acute coagulopathy in pediatric trauma." Curr Opin Pediatr **26**(3): 343-349.

Khor, B. and E. M. Van Cott (2010). "Laboratory tests for antithrombin deficiency." Am J Hematol **85**(12): 947-950.

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.

Kitagawa, Y. (2005). "[Antiphospholipid syndrome and stroke]." Rinsho Shinkeigaku **45**(11): 852-855.

Kottke-Marchant, K. and A. Duncan (2002). "Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis." Arch Pathol Lab Med **126**(11): 1326-1336.

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.

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.

Kvasnicka, T., I. Malikova, Z. Zenahlikova, K. Kettnerova, R. Brzezakova, 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.

Kvasnicka, J. (2003). Trombofile a trombotické stavy v klinické praxi. Praha, Grada Publishing a.s.

Kvasnicka, J. (2003). Trombofile a trombotické stavy v klinické praxi. Praha, Grada Publishing a.s.

Kvasnicka, J. (2010). "Dědičné trombofilie–doporučení k provádění genetických testů v klinické praxi." Časopis lékařů českých **149**(10): 424-427.

Kvasnicka, T. (2012). "Tromboembolizmus, hemokoagulace a aterotrombóza." Intervenční a akutní kardiologie **11**(1): 15-17.

Langer, F., B. Eifrig, S. Hegewisch-Becker, G. Marx, K. Neuber and D. K. Hossfeld (2002). "[Complicated antiphospholipid antibody syndrome]." Dtsch Med Wochenschr **127**(27): 1458-1462.

Licari, L. G. and J. P. Kovacic (2009). "Thrombin physiology and pathophysiology." J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) **19**(1): 11-22.

Macfarlane, R. G. and R. Biggs (1953). "A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia." J Clin Pathol **6**(1): 3-8.

Malikova, I., M. Husakova, J. Bilkova, R. Brzezakova, I. Hrachovinova and T. Kvasnicka (2023). "The Homozygous Type II Antithrombin Deficient Pregnant Woman Monitored by Thrombin Generation Assay." Clin Lab **69**(10).

Malikova, I., M. Husakova, J. Bilkova, R. Brzezakova, 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.

Malikova, I., M. Husakova, J. Bilkova, R. Brzezakova 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.

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.

Meiandoest, 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.

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.

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.

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.

Patnaik, M. M. and S. Moll (2008). "Inherited antithrombin deficiency: a review." Haemophilia **14**(6): 1229-1239.

Penka, M. and E. a. k. Tesařová (2011). Hematologie a transfuzní lékařství. I. Hematologie. Praha, Grada Publishing, a.s.

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.

Poul, H. (2006). "Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci." Vnitřní lékařství **12**: 17-25.

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.

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.

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.

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.

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.

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. Angehaisuksiri, 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 Methylenetetrahydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls." Eur J Epidemiol **28**(8): 621-647.

Tripodi, A. (2013). "The laboratory and the new oral anticoagulants." Clin Chem **59**(2): 353-362.

Tripodi, A. (2016). "Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory." Clin Chem **62**(5): 699-707.

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.

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.

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.

Tripodi, A. and P. M. Mannucci (2011). "The coagulopathy of chronic liver disease." N Engl J Med **365**(2): 147-156.

Tripodi, A., L. Padovan, C. Veena, E. Scalabrino, S. Testa and F. Peyvandi (2015). "How the direct oral anticoagulant apixaban affects thrombin generation parameters." Thromb Res **135**(6): 1186-1190.

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.

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.

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.

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.

8 Seznam publikací

8.1 Publikace jako podklad dizertace

1. Malikova I, Husakova M, Bilkova J, Brzezko 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, Brzezko 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, Brzezko 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, Brzezko 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 polymorphisms 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, Brzezakova 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 osteoarthritis 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, Brzezakova 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, Brzezakova 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]

8.2 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. Vitek 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]