



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Syndrom lepivých destiček
– stanovení referenčního rozmezí

Sticky Platelet Syndrome
– Reference Range Determination

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Zuzana Prášilová

Vedoucí práce: Ing. Jana Bílková

Kladno 2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Prášilová** Jméno: **Zuzana** Osobní číslo: **496223**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Syndrom lepivých destiček - stanovení referenčního rozmezí

Název bakalářské práce anglicky:

Sticky Platelet Syndrom - Reference Range Determination

Pokyny pro vypracování:

Syndrom lepivých destiček (SPS - Sticky Platelet Syndrom) spočívá v prokázané hyperagregabilitě po nízkých koncentracích dvou induktorů, adenosin difosfátu a epinefrinu, kdy je zároveň agregace po indukci ostatními agonisty fyziologická. Klinický dopad této autozomálně dědičné trombocytopenie může být různý, např. zvýšený sklon k trombózám v mladším věku či spontánní aborty. U pacientů s prokázaným SPS se zavádí léčba kyselínou acetylsalicylovou, která vede ke snížení hyperagregability destiček a prevenci trombózy. Předmětem bakalářské práce bude vyšetřit skupinu zdravých dárců krve pro výpočet referenčních mezí agregace krevních destiček pomocí indukované agregace vybranými induktory. Získaná data budou použita u pacientů se syndromem lepivých destiček (SPS). Metodou použitou ke stanovení SPS bude optická agregometrie (LTA - Light Transmission Aggregometry).

Seznam doporučené literatury:

- [1] ŠKORŇOVÁ, Ingrid a Luděk SLAVÍK, Hemostáza: laboratorní metody, jejich využití a interpretace ve vybraných klinických situacích, ed. 1, P+M, 2020, ISBN 978-80-89694-78-5
- [2] YAGMUR, Eray, Eva BAST, Anja Susanne MÜHLFELD, Alexander KOCH, Ralf WEISKIRCHEN, Frank TACKE a Joseph NEULEN, High Prevalence of Sticky Platelet Syndrome in Patients with Infertility and Pregnancy Loss, online, Journal of Clinical Medicine, ed. 2019, ročník 8, číslo 9, Přístupné z: doi:10.3390/jcm8091328, ISSN 2077-0383
- [3] LE BLANC, Jessica, François MULLIER, Caroline VAYNE a Marie LORDKIPANIDZÉ, Advances in Platelet Function Testing—Light Transmission Aggregometry and Beyond, online, Journal of Clinical Medicine, ed. 2020, ročník 9, číslo 8, Přístupné z: doi:10.3390/jcm9082636, ISSN 2077-0383

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

Ing. Jana Bílková

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2021**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2023**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
děkan

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Syndrom lepidých destiček – stanovení referenčního rozmezí vypracovala samostatně a s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 12. 5. 2022

.....

Zuzana Prášilová

PODĚKOVÁNÍ

Zde bych ráda velice poděkovala především vedoucí své bakalářské práce Ing. Janě Bílkové za její odborné i praktické rady, připomínky, ochotu, vždy vlídný přístup, bezmeznou trpělivost a věnovaný čas. Poděkování patří rovněž panu primáři doc. MUDr. Tomáši Kvasničkovi, CSc. za umožnění realizace praktické části mé bakalářské práce v Trombotickém centru Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a pracovníkům Odběrového centra. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým nejbližším, obzvláště Martinovi, za podporu a toleranci během kompletace mé bakalářské práce.

ABSTRAKT

Předmětem této bakalářské práce bylo stanovit referenční rozmezí agregace destiček pro pacienty s případným tzv. syndromem lepivých destiček.

Pro získání výsledných hodnot referenčního rozmezí byla proměřena skupina 40 zdravých dobrovolníků za použití Bornovy optické transmisní agregometrie (Light Transmission Aggregometry – LTA). Byla stanovena indukovaná agregace destiček po přidání induktorů agregace epinefrinu (EPI) a adenosinu difosfátu (ADP) ve snížených koncentracích. Hodnoceným parametrem byla maximální agregace v %.

Rozdělení naměřených hodnot nevyhovovalo podmínkám normality dle Gaussovy křivky, a tak bylo referenční rozmezí vyjádřeno přímou neparametrickou metodou. Referenční rozmezí je pro dílčí koncentrace induktorů následující: EPI (konc. 1,0 $\mu\text{mol/l}$) = 2–77 %; EPI (konc. 0,1 $\mu\text{mol/l}$) = 1–19 %; EPI (konc. 0,05 $\mu\text{mol/l}$) = 1–5 %; ADP (konc. 2,34 $\mu\text{mol/l}$) = 19–76 %; ADP (konc. 1,17 $\mu\text{mol/l}$) = 4–65 %; ADP (konc. 0,58 $\mu\text{mol/l}$) = 1–11 %.

Podle stanoveného referenčního rozmezí je možné diagnosticky hodnotit výskyt syndromu lepivých destiček u pacientů s doposud neobjasněným zvýšeným sklonem k trombózám v mladším věku, s hemodialyzační léčbou, u pacientů po transplantaci ledviny nebo u pacientek, které prodělaly několikanásobné aborty.

Klíčová slova

Syndrom lepivých destiček (SPS); trombocyt; agregace; hyperagregabilita; optická transmisní agregometrie (LTA); referenční rozmezí

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to establish a reference range of platelet aggregation for patients with possible Sticky Platelet Syndrome.

A group of 40 healthy volunteers was studied using Born's Optical Transmission Aggregometry (LTA) to obtain the resulting reference range values. Induced platelet aggregation was determined after addition of the aggregation inducers epinephrine (EPI) and adenosine diphosphate (ADP) at reduced concentrations. The evaluated parameter was the maximum aggregation in %.

The distribution of the measured values did not satisfy the normality conditions according to the Gaussian curve, so the reference range was expressed by the direct non-parametric method. The reference ranges for the sub-concentrations of the inducers are as follows: EPI (conc. 1.0 $\mu\text{mol/l}$) = 2–77 %; EPI (conc. 0.1 $\mu\text{mol/l}$) = 1–19 %; EPI (conc. 0.05 $\mu\text{mol/l}$) = 1–5 %; ADP (conc. 2.34 $\mu\text{mol/l}$) = 19–76 %; ADP (conc. 1.17 $\mu\text{mol/l}$) = 4–65 %; ADP (conc. 0.58 $\mu\text{mol/l}$) = 1–11 %.

According to the established reference range, the incidence of sticky platelet syndrome can be diagnostically assessed in patients with a previously unexplained increased propensity to thrombosis at a younger age, with haemodialysis treatment, in patients after renal transplantation or in patients who have had multiple abortions.

Keywords

Sticky Platelet Syndrome (SPS); platelet; aggregation; hyperaggregability; Light Transmission Aggregometry (LTA); reference range

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍL PRÁCE	10
3	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU	11
3.1	Hemostáza	11
3.2	Primární hemostáza	12
3.3	Složky primární hemostázy	12
3.3.1	Cévní stěna.....	12
3.3.2	Trombocyty	14
3.4	Funkce trombocytů v hemostáze	18
3.4.1	Adheze a aktivace trombocytů.....	18
3.4.2	Uvolňovací reakce.....	19
3.4.3	Agregace	20
3.4.4	Retrakce.....	20
3.5	Syndrom lepivých destiček	21
3.5.1	Patogeneze SPS	21
3.5.2	Klasifikace SPS	22
3.5.3	Klinické projevy.....	22
3.5.4	Diagnostika a diagnostická kritéria SPS.....	23
3.5.5	Přístup k léčbě syndromu lepivých destiček.....	24
4	METODIKA	26
4.1	Soubor dárců	26
4.2	Preanalytická fáze.....	26
4.2.1	Příprava pacienta a odběr vzorku	26
4.2.2	Transport vzorků	28
4.2.3	Zpracování vzorků před analýzou.....	28
4.3	Analytická fáze	29

4.3.1	Použité přístroje a pomůcky.....	29
4.4	Optická agregometrie.....	31
4.4.1	Princip metody.....	31
4.4.2	Induktory	32
4.4.3	Postup měření	34
4.5	Koncentrace induktorů pro diagnostiku SPS.....	35
4.5.1	Příprava nízkých koncentrací ADP	36
4.5.2	Příprava nízkých koncentrací EPI	36
4.6	Stanovení referenčního rozmezí.....	37
4.6.1	Přímá neparametrická metoda stanovení referenčního rozmezí	37
5	VÝSLEDKY	40
5.1	Kontrola kvality.....	40
5.2	Deskriptivní statistika.....	42
5.3	Histogramy.....	43
5.4	Referenční rozmezí pro stanovení SPS.....	46
5.5	Měření z roku 2018.....	46
5.6	Návrh na následná měření	47
5.7	Porovnání naměřených koncentrací	47
5.8	Grafické zobrazení daných koncentrací EPI.....	48
6	DISKUZE	50
7	ZÁVĚR.....	54
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	55
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
10	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ.....	64
11	SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK	66

1 ÚVOD

Syndrom lepivých destiček (SPS) představuje lékaři mnohdy opomíjenou autozomálně dědičnou trombocytopenii. Charakteristikou SPS je prokázaná hyperagregabilita po 3 nízkých koncentracích induktorů, adenosin difosfátu a epinefrinu, přičemž agregace destiček po indukci jinými induktory zůstává fyziologická.

Klinický projev tohoto onemocnění spočívá např. ve zvýšeném sklonu k trombózám v mladším věku a ve výskytu několikanásobných abortů. Dle nejnovějších studií byl prokázán SPS u pacientů s hemodialyzační léčbou nebo u pacientů po transplantaci ledviny.

Etiologie SPS je stále ve fázi výzkumu. Za nejpravděpodobnější příčinu jsou považovány změny v membránových glykoproteinech krevních destiček nebo na intracelulárních signálních dráhách. Jejich variabilita pravděpodobně vede k hyperagregabilitě krevních destiček.

Účinnou léčbou je podávání kyseliny acetylsalicylové (ASA), která snižuje hyperagregabilitu destiček, a tímto snižuje riziko výskytu opakovaných trombembolických komplikací.

Důvodem, proč se zabývám tématem SPS ve své bakalářské práci, je přispět alespoň malým dílem na cestě ke standardizaci metody pro laboratorní vyšetření SPS. Rovněž by tato práce mohla čtenáře, zejména ze zdravotnického prostředí, obohatit získanými informacemi o syndromu lepivých destiček s následným uplatněním znalosti SPS při výkonu lékařské praxe.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo vyšetřit indukovanou agregaci krevních destiček zdravých dárců krve a naměřené hodnoty použít pro výpočet referenčního rozmezí potřebného pro diagnostiku syndromu lepivých destiček. Měření proběhlo v návaznosti na neúspěšný pokus o stanovení referenčního rozmezí SPS po indukci epinefrinem v Trombotickém centru VFN v roce 2018. Následně byly porovnány nově naměřené hodnoty agregace destiček po indukci ADP a EPI ve snížených koncentracích s dostupnými daty v literatuře. Získaná data mohou být využita v klinické praxi u pacientů s podezřením na SPS.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Hemostáza

Hemostázu lze jednoduše definovat jako děj vedoucí k zástavě krvácení. Za normálních okolností, tedy bez porušení cév/y, je krev v krevním řečišti v tekutém stavu. Dojde-li k narušení cévní výstelky (endotelu), úlohou hemostatického mechanismu je uzavření místa poranění cévy, následná přeměna tekuté krve na krevní koagulum, které je po zahojení rány rozpuštěno, a je tak obnovena cirkulace krve. Hlavní funkce hemostázy jsou: zachování tekuté krve uvnitř cév a jejího složení, zabránění úniku krve z cév a případnému poškození cévy a zacelení poškozených cév. Lze říci, že hemostáza je přesně regulovaný děj nezbytný pro životaschopnost organismu [1, 2, 3, 4].

V rámci snahy o zjednodušení je celý proces rozdělen na primární hemostázu, jež je tvořena vazokonstrikcí (okamžitý nástup), adhezí krevních destiček (nástup v sekundách) a agregací (dochází k ní v průběhu několika minut), a sekundární hemostázu. V této části se aktivují koagulační faktory, kdy během minut dochází k vytvoření fibrinového koagula a následuje zapojení fibrinolytického systému, v němž se v řádech minut aktivuje fibrinolýza, kdy v průběhu několika hodin nastává lýza fibrinového koagula. Dříve byla sekundární hemostáza rozdělena na vnitřní a vnější cestu. Od tohoto modelu se v současné době upouští, jelikož v něm není přesný popis spolupráce koagulačních faktorů a destiček při vytváření krevní sraženiny *in vivo* [2, 3, 5].

Mezi hlavní složky, které se podílí na zajišťování funkcí hemostázy, patří: cévní stěna, trombocyty, tkáňová složka a plazmatický koagulační systém. Nejedná se však o jediné komponenty podílející se na hemostáze. Dalšími složkami jsou téměř všechny látky přítomné v krvi a na vnitřní straně cévy, tj. erytrocyty, leukocyty, minerály, lipidy, plazmatické proteiny, proteiny akutní fáze a vápenaté ionty [2, 3, 4].

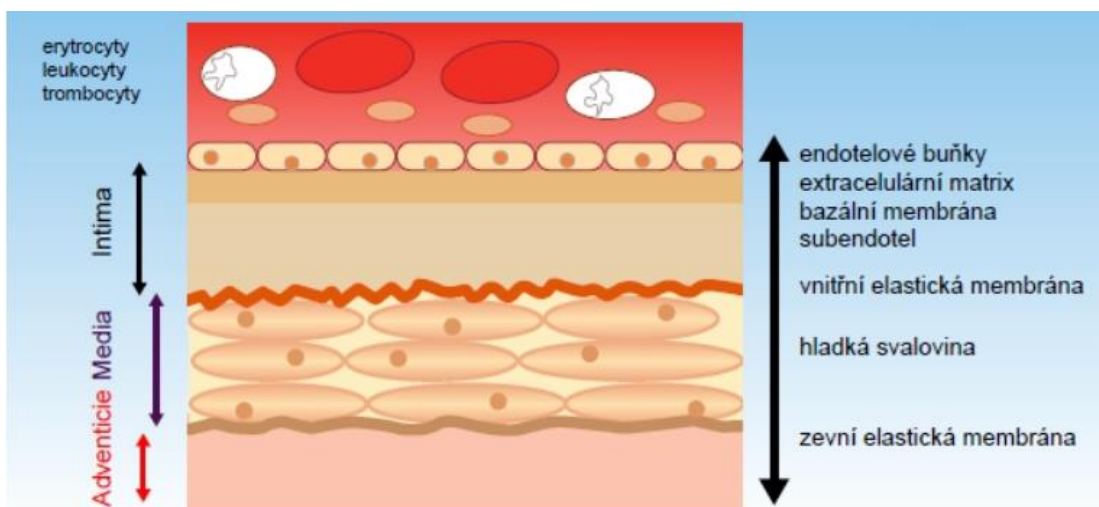
3.2 Primární hemostáza

V případě narušení integrity cévní stěny je nezbytné znovu zacelit porušené místo výstavbou tzv. primární hemostatické zátky (neboli bílý rozpustný trombem) po sobě následujícími ději: vasokonstrikcí v místě poraněné cévy a následnou adhezí, aktivací a agregací krevních destiček. V situaci, kdy by nedošlo ke vzniku bílého rozpustného trombu, by nedošlo k zástavě krvácení [3, 4, 6].

3.3 Složky primární hemostázy

3.3.1 Cévní stěna

Cévy, kromě kapilár, jsou tvořeny 3 vrstvami: intimou, medií a adventicií. Intimu tvoří jedna vrstva endotelových buněk na bazální membráně, která je v nepřetržitém kontaktu s protékající krví. Media se skládá z buněk hladkého svalstva (regulují cévní tonus), které jsou obklopeny pojivovou tkání. Ta obsahuje kolagenní a elastická vlákna (zodpovídají za elasticitu cévy). Změna průsvitu cévy je zajištěna medií pomocí hladké svaloviny a elastických vláken. Adventicie je vnější vrstva s fibroblasty, kolagenním vazivem, adipocyty a žírnými buňkami. Má ochrannou funkci [1, 4, 6, 7].



Obrázek 1 – Stavba cévní stěny [8]

Buňky endotelu tvoří 700–1000 m² velký povrch, kde jsou v přímém kontaktu s krví. Úloha endoteliálního systému spočívá v reakci organismu na konkrétní situaci, zda je potřeba hemostázu stimulovat či inhibovat [4].

Neporušený, nesmáčivý endotel je fyziologicky nejvýznamnější antitrombotickou (protisrážlivou) složkou organismu. Protisrážlivé účinky endotelu jsou zajištěny jeho elektronegativním povrchovým nábojem, glykosaminoglykany (heparan sulfát, heparin), přirozenými inhibitory srážení krve vázanými na endotel (antitrombin), receptory membrány (trombomodulin) a produkcí prostacyklinu a oxidu dusnatého (NO), společně působícími jako inhibitory adheze a aktivace destiček a vazodilatátory. Funkce uvedených inhibitorů spočívá v zachování inaktivní hemostázy za normálních podmínek. [1, 4, 5].

Endotel je za vhodné stimulace (například trombinem) schopen, kromě obvyklejší inhibice hemostázy, se také účastnit na procesu její aktivace. K tomuto ději dochází v případě porušení cévy, kdy je potřeba krvácení zastavit. Fyziologicky je endotelem syntetizován a do krve uvolňován zejména von Willebrandův faktor (dále jen vWF) mající minimálně 2 funkce: stabilizaci koagulačního faktoru VIII (dále jen FVIII) a ochranu FVIII před proteolytickou degradací v plazmě, dále vysokoafinitní navázání vWF na kolagen, a tím aktivování krevní destičky. Důsledkem narušení endotelu dochází k vazbě vWF s kolagenem, jenž je exprimován na subendoteliální vrstvě. Tím dochází k aktivaci první destičky [4, 5, 8].

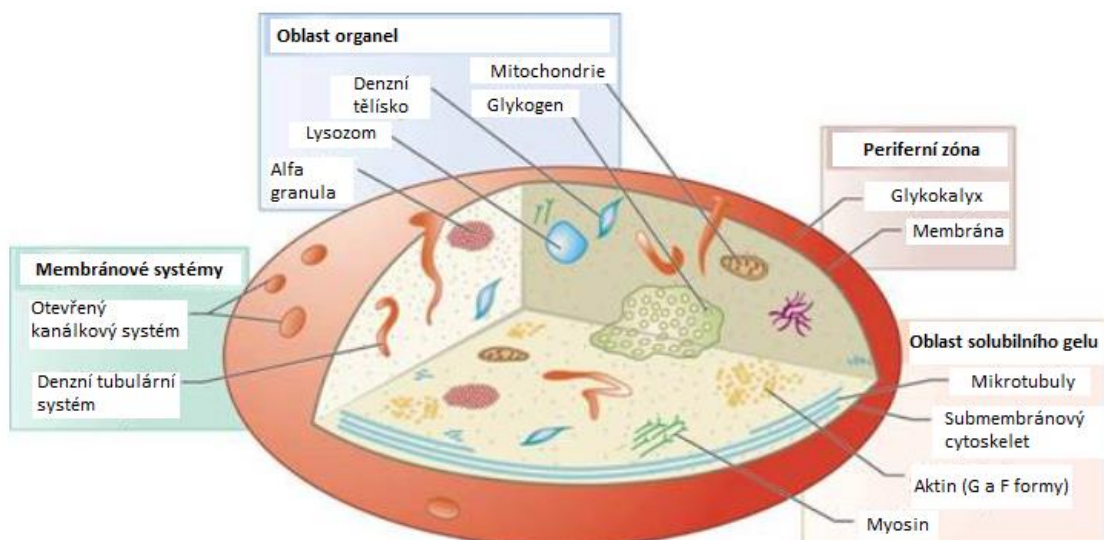
Obnažený subendotel je vysoce trombogenní a za fyziologického stavu se do kontaktu s krví dostává pouze při poranění, čímž nastává okamžitá aktivace veškerých systémů hemostázy. Mezi nejvýznamnější složky hemostázy subendotelu patří kolageny a tkáňový faktor (dále jen TF). TF při poškození endoteliálních buněk po uvolnění do cévního řečiště aktivuje „vnější“ cestu koagulace krve. Naopak na negativně nabitým povrchu kolagenu dochází k aktivaci „vnitřní“ koagulační kaskády a dále k adhezi destiček na endotel zapříčiněné vazbou kolagenu na vWF a receptory na povrchu trombocytů [4, 5].

3.3.2 Trombocyty

Krevní destičky neboli trombocyty (PLT) jsou malé bezjaderné, tzv. neúplné buňky diskoidního tvaru. Vznikají fragmentací cytoplazmy megakaryocytů v kostní dřeni. Krevní destička je velká v průměru 2–4 μm , objem se pohybuje mezi 7,8–12,8 fl. Počet trombocytů v periferní krvi za fyziologických podmínek spadá do rozmezí $150\text{--}400 \times 10^9/\text{l}$. Jejich životnost v periferní krvi je 7–10 dní [4, 9, 10, 11, 12].

Obecná struktura trombocytu:

- **periferní oblast:** zahrnuje „plazmatický obal“, glykokalyx, membránové a submembránové struktury;
- **oblast solubilního gelu:** viskózní matrix, která je tvořena převážně fibrilárními proteiny, obvodovým pásem mikrotubulů, submembránových filamentů a mikrofilamentů a proteinovou podjednotkou \Rightarrow základní jednotka kontraktilního systému destičky;
- **oblast organel:** denzní tělíska, granula, mitochondrie;
- **membránové systémy:** otevřený kanálkový systém a denzní tubulární systém [12].



Obrázek 2 – Struktura trombocytu [41]

Membrána trombocytů

Plazmatický obal vzniká absorbcí menšího množství plazmatických bílkovin na povrch trombocytu. Je složen zejména z albuminu, fibrinogenu, dalších složek koagulační kaskády a Ca^{2+} . Obal ovlivňuje přilnavost destiček a je podstatný při jejich interakcích [12, 13].

Nejsvrchnější vrstvu destičkové membrány tvoří glykokalyx. Je tvořen zejména glykoproteiny (GP) a z menší části glykolipidy. Složení glykoproteinů odpovídá složení glykoproteinů jiných membrán a plní funkci receptorů. Zastoupeny jsou hlavně tyto skupiny: integriny (GPIIb/GPIIIa; GPIa/GPIIa), receptory pro aktivaci trombocytů – trombin, ADP (adenosindifosfát), epinefrin, tromboxan A_2 (TXA_2) a receptory inhibující agregaci prostacyklin (PGI_2) a prostaglandin (PGE_2) [4, 12, 14].

Do nitra destičky zasahují zvlněné vchlípené kanálky, které tvoří tzv. otevřený kanálkový systém. Systém vytváří síť, která je současně spojena s denzním tubulárním systémem. Jeho funkcí je zvětšení povrchu krevní destičky a urychlení membránového transportu. Jeho působením dochází k vyplavení obsahu granul [12].

Vlastní membránu tvoří dvojvrstva fosfolipidů na vnitřní straně membrány (za klidového stavu destičky) s negativními náboji fosfatidylserin (PS) a fosfatidyletanolamin (PE). Na povrchu destičky je fosfatidilcholin (PC) a sfingomyelin (SM). Po aktivaci destičky může dojít k přetočení vnitřní a vnější fosfolipidové membrány, tzv. flip-flop fenomén. Po přetočení destička nese na svém povrchu negativní náboj [12].

Cytoskelet

Jedná se o kontraktilní systém složený z vláknitých proteinových struktur, mikrotubulů a mikrofilament. Cytoskelet udržuje diskoidní tvar destičky a umožňuje změnu jejího tvaru při aktivaci [12].

Největší zastoupení filament v cytoskeletu má monomer aktin, který po aktivaci destičky polymeruje. Významnou součástí mikrofilament je i hexamer myozin. Základní kontraktilní jednotkou mikrofilament je aktin-myozinový

komplex zajišťující změnu tvaru destičky na kulovitou a tvorbu pseudopodií, která zvětšují aktivační povrch trombocytů. Destičky jsou tvořeny i řadou dalších proteinů mikrofilamentární struktury, kam patří spektrin, tropomyozin, gelsolin, profilin, kaldesmon, talin a α -aktinin [12, 14].

Základní stavební jednotkou mikrotubulů je protein tubulin, polymer strukturovaný do tvaru trubiček. Struktura destičky je udržována prstencem mikrotubulů nacházejícím se pod plazmatickou membránou. Při aktivaci destičky dochází k narušení prstence potlačením tvorby mikrotubulů. Funkce mikrotubulů je udržování diskoidního tvaru trombocytu, podílejí se na redistribuci granul do blízkosti membránových kanálků a sekreci obsahu granul [12, 14].

Denzní tubulární systém

Tento systém tvoří souvislá nitrobuněčná síť tenkých kanálků, které jsou místy napojeny na otevřený kanálkový systém. Jsou v něm obsaženy enzymy cyklu kyseliny arachidonové, ATP-áza a cyklooxygenáza (COX-1), které se podílejí na tvorbě prostaglandinů. Slouží jako zásobník Ca^{2+} [12, 14].

Mitochondrie

Mitochondrie slouží pro trombocyt jako energetický zdroj. Podílí se na tvorbě destičkových proteinů, zejména destičkového faktoru 4 (PF4), β -tromboglobulinu (β TG) a faktoru aktivujícího destičky (PAF) [12].

Sekreční granula

V cirkulující krevní destičce se nachází několik typů sekrečních granul, která jsou ohraničena membránou. Pokud není destička aktivní, jsou volně rozptýlena v cytoplazmě. Při aktivaci destičky se shromažďují v centrální části destičky [12].

Dělení granul:

- α -granula – jsou v destičkách zastoupena v nejvyšším počtu 50–80 α -granul na destičku. Jejich velikost se v průměru pohybuje mezi 200–500 nm. Tvoří okolo 10 % objemu trombocytu. Granula obsahují **adhezivní proteiny**: vWF, fibronektin, trombospondin, **prokoagulační látky**: PF4, β TG, fibrinogen a faktor V (FV), **faktory fibrinolýzy**: plazminogen (PLG), inhibitor plazminogenového aktivátoru (PAI-1), α_2 -antiplazmin, **inhibitory proteáz**:

α_1 -antitrypsin a α_2 -makroglobulin, **růstové faktory**: destičkový růstový faktor (PDGF), transformující růstový faktor β (TGF- β), vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) a **membránové složky granul**, které se po vyplavení upevňují na povrchový receptor destičky GPIIb/IIIa [4, 12, 14, 15, 16, 17, 18].

- Denzní granula (δ -granula) – oproti α -granulům je jejich zastoupení v buňce přibližně 10x nižší. Jedna destička obsahuje zhruba 5–8 denzních granul. Velikost jednoho granula činí v průměru 150 nm. Obsahují vysoké koncentrace (až 2M) Ca^{2+} , serotonin, pyrofosfát, P-selektin, velké množství nukleotidů ADP, ATP (adenosintrifosfát) a katecholaminy. Díky vápenatým iontům jsou denzní granula dobře pozorovatelná elektronovým mikroskopem [14, 15, 16, 18].
- Lysozomy – obsahují hydrolytické enzymy: kyselou fosfatázu, arylsulfatázu a β -glukuronidázu. K jejich vylučování dochází po aktivaci destičky trombinem nebo kolagenem [12, 14].
- Peroxizómy – obsahem je enzym glutathionperoxidáza [12].

Receptory trombocytů

Na povrchu krevních destiček nalezneme přes 50 receptorů, z nichž pouze některé mají klinický význam [8].

Na membránové dvojvrstvě fosfolipidů jsou zakotveny adhezivní receptory (integriny) – glykoproteinové receptory (GP). Vyskytují se v otevřeném kanálkovém systému i na membráně α -granul. VWF a trombin váže receptor pro adhezi – GPIIb/V/IX. Zásadní agregační receptor je GPIIb/IIIa, který tvoří vazbu s fibrinogenem. Receptory pro ADP dělíme na 2 kategorie. První kategorii tvoří receptory P2X, které jsou vstupními ligandovými kanály. Umožňují rychlý vstup Ca^{2+} a následnou změnu tvaru destiček. Nejsou však schopny aktivovat agregaci. Pro agregaci indukovanou ADP jsou významné receptory P2Y, které aktivují GPIIb/IIIa. Další receptory jsou pro trombin – proteázami aktivované receptory, PAR-1 a PAR-4, které aktivují GPIIb/IIIa, obdobně jako receptory pro ADP. Poslední klinicky významnou skupinou jsou receptory pro prostaglandiny. Na tromboxan-prostaglandinový (TP) receptor se váže TXA_2 . Touto vazbou dochází k aktivaci, sekreci a agregaci destiček. Pokud dojde k vazbě mezi dalšími prostaglandinovými

metabolity se specifickými prostaglandinovými receptory, zvyšuje se koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a agregace destiček se inhibuje. Jiné specifické receptory váží další agonisty agregace destiček – epinefrin, serotonin, vazopresin [19].

3.4 Funkce trombocytů v hemostáze

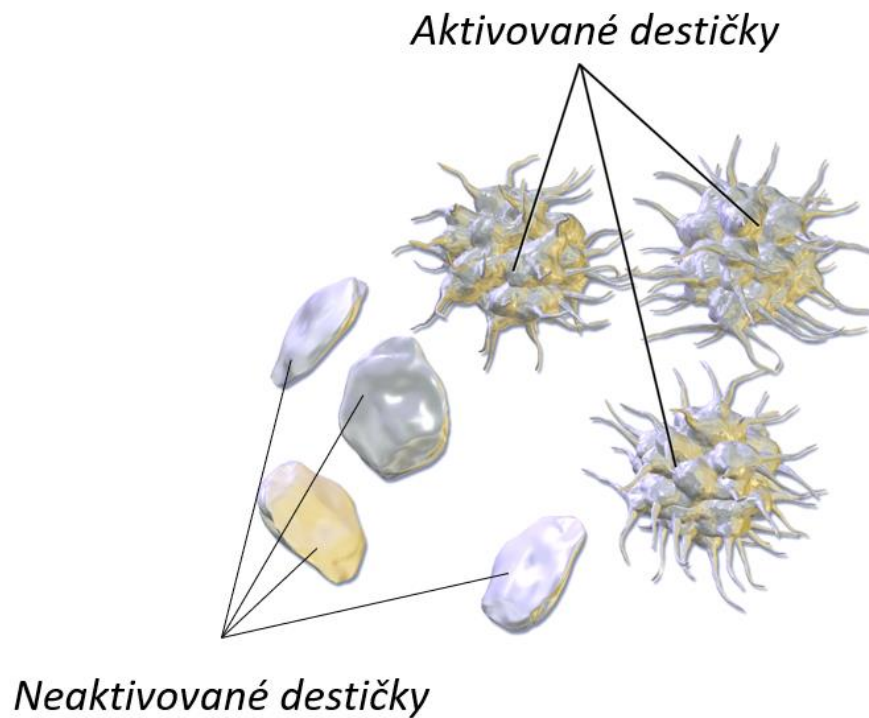
Trombocyty mají podstatnou úlohu v primární hemostáze, ve které dochází k interakci mezi destičkami a poraněným endotelem. Výsledkem interakce je vytvoření primární hemostatické zátky. Tento děj se skládá z adheze, uvolňovací reakce a agregace destiček, a neměl by trvat déle než 5 minut. Následujícím dějem je retrakce (v řádu hodin), kdy trombocyty zajišťují pevnost krevní sraženiny [4, 19].

3.4.1 Adheze a aktivace trombocytů

Za fyziologického stavu krevní destička putuje v krevním řečišti v nezměněném tvaru. Po narušení endotelové výstelky dochází k obnažení kolagenních vláken ze subendotelové vrstvy. V místě obnažených kolagenních vláken se k nim přichycují krevní destičky (nastává adheze) pomocí svých glykoproteinových receptorů (GPIa/IIa/IIb vázících se na kolagenní vlákna a GPIb/V/IX vázících se na vWF). Vzniklá vazba je zajištěna adhezivními proteiny vWF a fibronektinem. Adheze je stimulována účinkem ADP z okolní perivaskulární tkáně [4, 8, 12].

Paralelně s adhezí probíhá aktivace destiček činností agonistů ADP, epinefrinu, trombinu a kolagenu, které se váží na své specifické receptory. Po navázání všech agonistů dochází k aktivaci fosfolipázy C (PLC) a uvolnění Ca^{2+} ve vysokých koncentracích. To způsobuje uvolnění kyseliny arachidonové, inhibici tvorby protiagregačního cAMP a aktivaci proteinkinázy. Výsledkem je změna tvaru destičky. Granula se centralizují, destička se stává kulovitou s výběžky, kterými se značně zvětšuje povrch destičky. Aktivace destiček podnítl již zmíněný flip-flop

fenomén, kdy se působením enzymu skramblázy dostávají na vnější stranu membrány negativně nabitě fosfolipidy. Ty jsou zásadní pro aktivaci koagulačních faktorů v sekundární hemostáze [4, 8, 12, 19].



Obrázek 3 – Porovnání neaktivované a aktivované krevní destičky [42]

3.4.2 Uvolňovací reakce

Při uvolňovací reakci nastává shromažďování granul do centra trombocytu a uvolňování jejich obsahu prostřednictvím kanálkového systému. Krevní destička mění svůj tvar na kulovitý [12].

3.4.3 Agregace

TXA₂ a ADP jsou významnými mediátory produkovanými destičkami během aktivačního procesu. Jejich působením dochází v rámci mezibuněčné signalizace k aktivování dalších destiček. Aktivované destičky posléze exprimují receptor pro vazbu fibrinogenu. Agregaci samotnou způsobí spojení fibrinogenu s receptorem GPIIb/IIIa na membráně destiček. Vystavování receptorů GPIIb/IIIa spolu se změnou tvaru destiček a jejich povrchovými vlastnostmi souvisí s termínem lepivost destiček. Čím více receptorů GPIIb/IIIa destička vystaví, tím je „lepivější“ – dochází k většímu shlukování s jinými destičkami [4, 5, 12].

Agregaci lze rozdělit na primární (vratnou) a sekundární (nevratnou). Při primární agregaci vyvolá ADP z perivaskulární tkáně shluknutí destiček, kdy vzniklý trombocytární agregát není stabilní. Následným uvolňováním dalších proagregačních působků (TXA₂ a ADP) a trombospondinu vznikají stabilní můstky upevňující destičky a agregace je již nevratná – sekundární agregace. Následuje aktivace dalších destiček a celý děj se amplifikuje (zesiluje). Výsledkem je vznik primární hemostatické zátky – rozpustného bílého trombu [3, 12].

Agregaci je možné vyvolat nejen působením ADP nebo TXA₂, ale i působením ostatních induktorů: trombinem, epinefrinem (=adrenalinem), kolagenem, kyselinou arachidonovou [4, 5].

3.4.4 Retrakce

Retrakce je schopnost krevních destiček smrštit (retrahovat) vytvořenou krevní zátku. Tuto funkci lze přirovnat analogicky ke svalové kontrakci. Pseudopodia trombocytů se pomocí receptoru GPIIb/IIIa přichytí na fibrinová vlákna a retrakce kontraktilních bílkovin destiček vyvolá retrakci sraženiny. Tento proces slouží k podpoře zacelení rány [19, 20].

3.5 Syndrom lepivých destiček

Syndrom lepivých destiček (Sticky Platelet Syndrome – SPS) poprvé popsal Holliday jako samostatný klinický syndrom v roce 1983 na konferenci o cévních mozkových příhodách a mozkové cirkulaci v Arizoně (The Ninth Conference on Stroke and Cerebral Circulation, Phoenix, Arizona). Jedná se o dědičnou protrombotickou trombocytopatii s četným výskytem arteriálních a žilních trombóz. *In vitro* se projevuje jako hyperagregabilita krevních destiček v reakci na nízké koncentrace přidaných induktorů ADP a/nebo EPI a současně je agregace po aktivaci jinými induktory fyziologická [21, 22, 23, 24, 25].

3.5.1 Patogeneze SPS

Podle dosavadních informací je možné SPS zařadit mezi multifaktoriálně podmíněná onemocnění, na patogenезi se podílí jak genetická složka, tak vliv prostředí. Tyto faktory kooperují a pravděpodobně zapříčiňují změny v membránových glykoproteinech krevních destiček nebo na intracelulárních signálních dráhách, které se účastní aktivace a agregace destiček. Většina dosud provedených studií dokazuje, že variabilita určitých genů může být příčinou patogenезe SPS. Patří mezi ně:

- GP6 (gen pro glykoprotein VI; hlavní receptor pro kolagen);
- GAS6 (gen pro protein GAS6 zvyšující reaktivitu destiček);
- PEAR1 (gen pro protein PEAR1 zvyšující reaktivitu destiček) [26].

Studie ukázaly, že se mohou vyskytovat různé mutace stejného nebo podobného typu na stejných nebo jiných genových lokusech, které vedou k podobnému fenotypovému projevu. Kromě SPS je tomu tak i u jiných hemostatických poruch, např. u von Willebrandovy choroby [26].

Důležité je zdůraznit, že hyperagregabilita destiček po indukci fyziologickými induktory v nižších než pro LTA běžně užívaných koncentracích (např. ADP a EPI) s následným zvýšeným rizikem trombofilních stavů byla popsána již v předchozích

studiích u pacientů s onemocněním diabetes mellitus 2. typu a chronickým onemocněním ledvin. Nejnovější studie prokazují hyperagregabilitu trombocytů u pacientů po transplantaci ledviny [22, 26].

3.5.2 Klasifikace SPS

Syndrom lepkavých destiček lze rozdělit na 3 typy podle induktoru, po jehož snížených koncentracích byla prokázána hyperagregace:

- SPS typu I: hyperagregabilita po indukci ADP i EPI;
- SPS typu II: hyperagregabilita po indukci pouze EPI (nejčastější);
- SPS typu III: hyperagregabilita po indukci pouze ADP [21].

3.5.3 Klinické projevy

U pacientů s diagnostikovaným vrozeným SPS se projevuje sklon k výskytu tromboembolických příhod. Mezi charakteristiky klinické manifestace SPS patří běžný výskyt první trombotické příhody u mladých dospělých ve věku <40 let bez předchozích rizikových faktorů pro trombembolismus (TE), ovšem nejsou výjimečné ani případy v dětském věku, a u pacientů s nevysvětlitelným trombembolismem, dále opakované ztráty plodu u těhotných (Fetal Loss Syndrome), arteriální nebo žilní trombózy, atypické trombózy (postižení retinální vény nebo cerebrálních sinusů), plicní embolie, cévní mozkové příhody, migrény. Výskyt SPS byl zjištěn u pacientů s recidivou trombózy navzdory adekvátní antikoagulační léčbě (použití antagonisty vitamínu K). Typické je, že častým vyvolávajícím podnětem je stres, a může být i zcela asymptomatický [25, 26].

První případ SPS

V roce 1984 byl SPS diagnostikován těhotné 24leté ženě, která překonala akutní infarkt myokardu. Koronarografie ani angiografie neodhalily žádné známky cévní léze včetně aterosklerózy, ani žádné faktory zvyšující protrombotické riziko.

Z rodinné anamnézy, matka postižené pacientky prodělala ve svém těhotenství rovněž infarkt myokardu a 18letý bratr trpěl anginou pectoris bez jakéhokoliv postižení věnčitých tepen. U nikoho nebyla opakovaným laboratorním vyšetřením prokázána hemostatická abnormalita kromě zvýšené hyperagregability destiček po indukci ADP či EPI [23].

Výskyt SPS u onemocnění ledvin

V posledním desetiletí vyšly zprávy o hyperagregabilitě destiček u pacientů s chronickým onemocněním ledvin nebo v posttransplantační reakci štěpu proti hostiteli (Graft versus Host Disease – GvHD). Nejrozsáhlejší publikovaná studie posuzovala agregaci vyvolanou přídavkem EPI u 30 hemodialyzovaných pacientů a 34 příjemců transplantované ledviny. Laboratorní nález SPS byl diagnostikován u 82 % hemodialyzovaných pacientů a 67 % pacientů po transplantaci ledviny [22, 24].

3.5.4 Diagnostika a diagnostická kritéria SPS

Před samotným testováním pacienta s podezřením na SPS se navrhuje kompletní vyšetření tromboembolických rizikových faktorů: přítomnost mutace faktoru V Leiden a faktoru II protrombinu, aktivita koagulačního faktoru VIII a hladiny dalších koagulačních faktorů, aktivita a antigen antitrombinu a proteinu C, abnormality fibrinolýzy a detekce plazmatických hladin látek uvolňovaných z krevních destiček (PF4, β TG a TXA₂). Následně se provádí vyšetření agregace destiček se třemi nízkými koncentracemi induktorů ADP a EPI [23].

Referenční meze – literární zdroje

Tabulka 1 – Diagnostická kritéria a laboratorní klasifikace SPS dle Mammena a Bicka (upraveno) [22, 25]

Agregace trombocytů	ADP			EPI		
koncentrace induktorů ^a (μmol/l)	0,58	1,17	2,34	0,55	1,10	11,00
*NCHT Martin (% max. agregace)	3-10	11-23	20-60	8-15	10-30	20-60
Diagnostická kritéria						
Suspektní dg.:	anamnéza TE + hyperagr. po 1 konc. 1 induktoru					
Potvrzená dg.:	anamnéza TE + hyperagr. po 2 konc. 1 induktoru					
	anamnéza TE + hyperagr. po 1 konc. 2 induktoru					
	anamnéza TE + opakovaná hyperagr. po 1 konc. 1 induktoru					
Laboratorní klasifikace:	ADP hyperagr.		EPI hyperagr.		prevalence	
typ I	+		+		1/3	
typ II	-		+		2/3	
typ III	+		-		zřídka	

zkratky: ADP – adenosindifosfát, EPI – epinefrin, *NCHT – Národné centrum trombózy a hemostázy, dg. – diagnóza, TE – tromboembolismus, hyperagr. – hyperagregabilita, konc. – koncentrace

^a Koncentrace navržené Mammenem použité pro stanovení agregace pomocí světelné transmisní agregometrie (LTA), později přijaty většinou výzkumníků

3.5.5 Přístup k léčbě syndromu lepivých destiček

Al-Mefty s kolektivem pozorovali dobrou účinnost protideštičkových látek, zejména kyseliny acetylsalicylové (ASA). Její účinek spočívá v inaktivaci destičkové cyklooxygenázy 1 (COX-1), čímž dochází k potlačení produkce TXA₂, který je silným aktivátorem destiček. V 90. letech 20. století Mammen a Bick potvrdili účinnost ASA na vlastních souborech pacientů s klinickými projevy hlavně žilní a arteriální trombózy. U majoritní skupiny pacientů byly dostačující nízké dávky ASA (80–100 mg p. o. denně), avšak u některých byla nezbytná dávka vyšší (až 325 mg p. o. denně). Po těchto výzkumech byla ASA doporučena jako lék první volby

u pacientů se SPS. Údaje o jiných lécích účinných jako protidestičková léčba jsou v souvislosti se SPS ojedinělé. Existují však nedávno popsané případy úspěšného použití clopidogrelu ve standardním dávkování (75 mg p. o. denně) nebo užití ASA a clopidogrelu v duální protidestičkové léčbě [22, 23].

Délka léčby vzhledem k nedostatečnému množství dat není specifikována. Vzhledem ke specifickým vlastnostem SPS (opakovaná recidiva TE po přerušení protidestičkové léčby, výskyt u mladších pacientů a možné genetické dispozice) je délka léčby prodloužená nebo dokonce doživotní (v případě velmi závažných TE příhod). Účinnost dlouhodobé protidestičkové léčby byla popsána v nedávné studii Velázquez-Sánchez-de-Cima et al. Zahrnovala 55 pacientů se SPS s trombózou na protidestičkové léčbě v anamnéze během mediánu sledování 13 (1–129) měsíců. 40 pacientů užívalo ASA, 2 pacienti clopidogrel a 13 pacientů bylo na duální protidestičkové léčbě. Během sledovaného období byly zaznamenány pouze 2 případy recidivy trombózy (52 a 129 měsíců od zahájení léčby). Tedy u obou léků byla prokázána jejich pozitivní účinnost v léčbě SPS [22, 23].

Ve studii Chittoor et al. v roce 1998 byl popsán případ podezření na SPS, a to u nedostatečně účinné standardní antikoagulační léčby v prevenci vzniku další trombotické příhody. Týkal se 30leté ženy, která prodělala neprovokovanou trombózu horního sagitálního sinu. Léčena byla standardní antikoagulační léčbou antagonistou vitamínu K (VKA) – warfarinem. I přes správné vedení léčby a dlouhodobé podávání warfarinu pacientka utrpěla během 10 měsíců další 2 žilní trombózy. Defekt agregace krevních destiček byl zjištěn až po rozšířeném screeningu trombofilie. Místo VKA byla nasazena ASA z důvodu prevence a během užívání ASA se u pacientky nevyskytly další TE problémy [22, 23].

4 METODIKA

4.1 Soubor dárců

Soubor dárců obsahoval celkem 40 zdravých jedinců (10 mužů, 30 žen), nekuřáků, bez indikovaných poruch srážlivosti, s počtem destiček v normálním rozmezí, ve věku 21–51 let. Dárci min. 10 dní před odběrem neužívali léky ani jiné látky ovlivňující funkci krevních destiček. Vzorky jsme analyzovali v Trombotickém centru Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (VFN) v Laboratoři vyšetření funkce destiček v období září 2021–únor 2022. Odběr vzorků byl proveden v Odběrovém centru Fakultní polikliniky VFN.

4.2 Preanalytická fáze

K nejrizikovější a časově nejnáročnější části vyšetření patří preanalytická fáze. Není výjimkou, když tato fáze probíhá mimo laboratoř, a tedy není možné ovlivnit všechny její faktory. Ovlivněním těchto faktorů by v ideální případě bylo možné eliminovat až 70 % chyb, které v preanalytické části vznikají. Mezi tyto faktory patří správná indikace laboratorního vyšetření, příprava pacienta a odběr vzorku, transport vzorku, příjem a uchovávání vzorku před analýzou a příprava vzorku ke zpracování [27, 28, 29, 30].

4.2.1 Příprava pacienta a odběr vzorku

Pro vyšetření agregace destiček se provádí odběr venózní krve z loketní žíly. Pacient by měl být nalačno a nejméně 12 hodin před odběrem by neměl konzumovat tučnou stravu (důvodem je zabránit chylozitě plazmy) či alkohol. Rovněž je nezbytná dostatečná hydratace neslazenými vodami (snížení „hustoty“ krve a zajištění dostatečného množství plazmy pro vyšetření agregace destiček) [28].

Odběr plné krve probíhá vsedě, za použití uzavřeného vakuového odběrového systému. Jedná se o venepunkci, nepřípustný je odběr z katetru či kanyly (hrozila by následná hemolýza plazmy) [29].

Plná krev byla odebrána do 4 koagulačních zkumavek (modré víčko) potřebných k vyšetření SPS a 1 zkumavky na krevní obraz (fialové víčko) za účelem ověření dostatečného počtu trombocytů u jednotlivých subjektů. Před odběrem se zkumavky označily jménem daného jedince v jeho přítomnosti, aby nedocházelo k záměnám vzorků. V Odběrovém centru VFN se využívá odběrového systému Vacutainer [31].

Koagulační zkumavky obsahují antikoagulant citrát sodný o konc. 0,109 mol/l (tzn. 3,2 %), který zabraňuje vzniku sraženiny krve vyvázáním vápenatých iontů. V souladu s normou ISO 6710:1995 je nezbytné dodržet doporučené pořadí zkumavek při odběru. Koagulační zkumavka by měla být nabrána jako druhá v pořadí, neboť po odejmutí jehly dochází k aktivaci koagulační kaskády a ke znehodnocení odebraného materiálu. Dle doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČSL JEP by měl zdravotnický pracovník provádějící odběr vzorku dbát na dodržení poměru antikoagulačního činidla a množství odebrané krve, tzn. provést odběr po vyznačenou rysku. V případě koagulačních zkumavek se jedná o poměr 1:9 (tj. 1 díl citrátu ku 9 dílům krve). Po odběru je nutné zkumavky ihned jemně převrátit (3–6x) [29, 31].



Obrázek 4 – Koagulační zkumavka Vacutainer [vlastní zdroj]

Zkumavka na krevní obraz obsahuje K_2EDTA (didraselnou sůl kyseliny etylendiamintetraoctové; chelatonát sodný). Chelatonáty mají vysokou afinitu k iontům, v tomto případě vápenatým, čímž zabraňují srážení. Správný poměr antikoagulačního činidla (soli EDTA) a krve činí $1,5 \pm 0,3$ mg EDTA ku 1 ml krve [31, 32].



Obrázek 5 – Zkumavka s K_2EDTA Vacutainer [vlastní zdroj]

4.2.2 Transport vzorků

Po odběru je nezbytné v co nejkratším možném časovém intervalu dodat vzorky do laboratoře. Je třeba dbát na opatrné zacházení, a zabránit tak mechanickému poškození erytrocytů (např. silným třepáním) s následným vznikem hemolýzy. Dále je třeba se vyvarovat možné aktivace krevních destiček, proto se nedoporučuje posílat vzorky potrubní poštou, ale je vhodný osobní transport. Rovněž není žádoucí vzorky vystavit extrémním teplotám. Teplotní rozmezí vhodné pro transport je 20–25 °C [29, 31, 33].

4.2.3 Zpracování vzorků před analýzou

Stanovení agregace krevních destiček se provádí v plazmě. Centrifugací citrátových zkumavek po dobu 10 minut při 900 rpm získáváme plazmu bohatou na destičky (Platelet Rich Plasma – PRP), vhodnou pro toto vyšetření.

Tzv. blank, který je také potřebný k analýze, si připravíme odebráním části PRP Pasteurovou pipetou a centrifugací v plastové Eppendorf zkumavce po dobu 5 minut při 12 500 rpm. Takto získáváme plazmu tzv. bezdestičkovou.

4.3 Analytická fáze

Analytickou fází rozumíme vlastní analýzu zkoumaného materiálu za daných podmínek pomocí příslušné metody. V celém procesu provedení metody se řadí mezi méně časově náročné (záleží na typu zvolené analytické metody) a jejím cílem je dopracovat se k výsledku [28].

4.3.1 Použité přístroje a pomůcky

Přístrojové vybavení

- Analyzátor agregace destiček, model PAP-8E (Platelet Aggregation Profiler, Bio/Data Corporation, USA);
- centrifuga Eppendorf MiniSpin;
- centrifuga Eppendorf 5702;
- lednice Zanussi ZXAN9FW0;
- válečkové míchadlo Lambada MIX 03 (Unimed Praha s.r.o.).

Laboratorní pomůcky

- Zkumavky Vacutainer 4,5 ml, sodium citrate 0,109 M;
- zkumavky Vacutainer 3 ml, K₂EDTA;
- skleněné kyvetky;
- Pasteurovy pipety;
- mikrozkušavky typ Eppendorf Tubes® 3810X, 1,5 mL, g-safe®;
- magnetická míchadla;
- pipeta Eppendorf Research® plus, jednokanálová, verze: 100–1000 µl;
- pipeta Eppendorf Research® plus, jednokanálová, verze: 10–100 µl;
- mikropipeta Sartorius Biohit Proline mechanická 10–100 µl jednokanálová.

Platelet Aggregation Profiler PAP-8E

Agregometr PAP-8E je 8kanálový analyzátor. Pracuje na principu turbidimetrie. Zdrojem světla jsou LED diody. Analyzátor měří při vlnové délce 400–430 nm. Analyzátor obsahuje termoblok, který umožňuje temperaci inkubačních a měřících jamek na 37 °C. Promíchávání vyšetřované plazmy s induktory probíhá za použití magnetických míchadel. PAP-8E je připojen na stolní počítač Dell Optiplex 755 s platformou Windows® XP Professional. Kromě diagnostiky SPS lze na analyzátoru provádět např. monitoring účinnosti protidestičkové léčby, diagnostiku heparinem indukované trombocytopenie (HIT), stanovení aktivity ristocetinového kofaktoru (při podezření na von Willebrandovu chorobu) [34, 35].

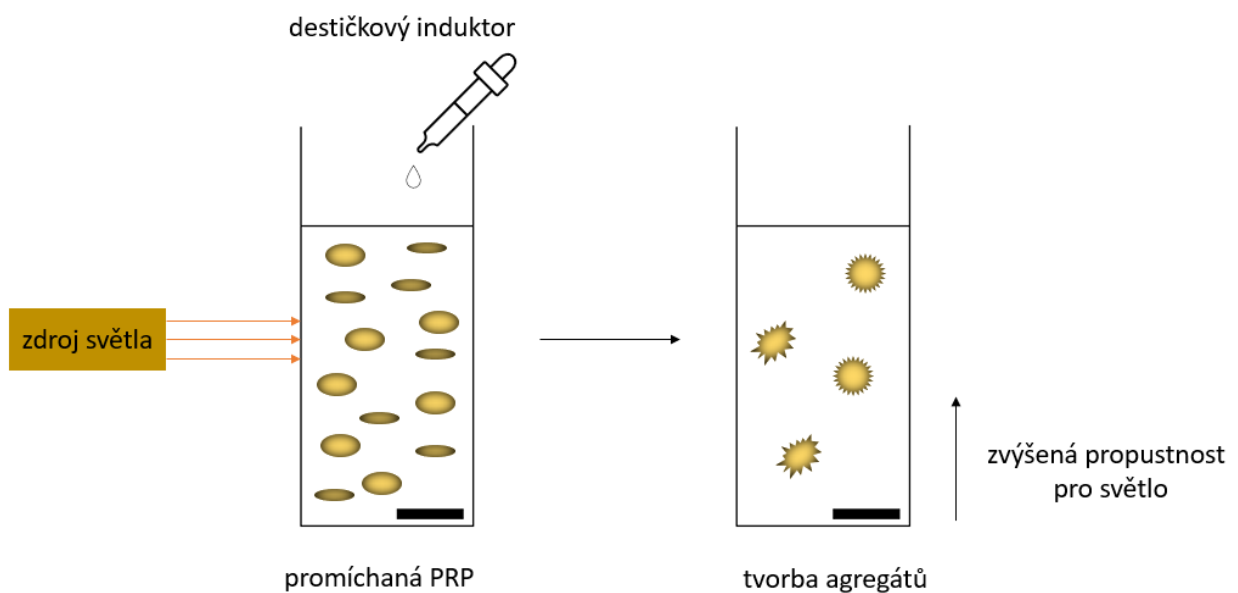


Obrázek 6 – Agregometr PAP-8E [vlastní zdroj]

4.4 Optická agregometrie

4.4.1 Princip metody

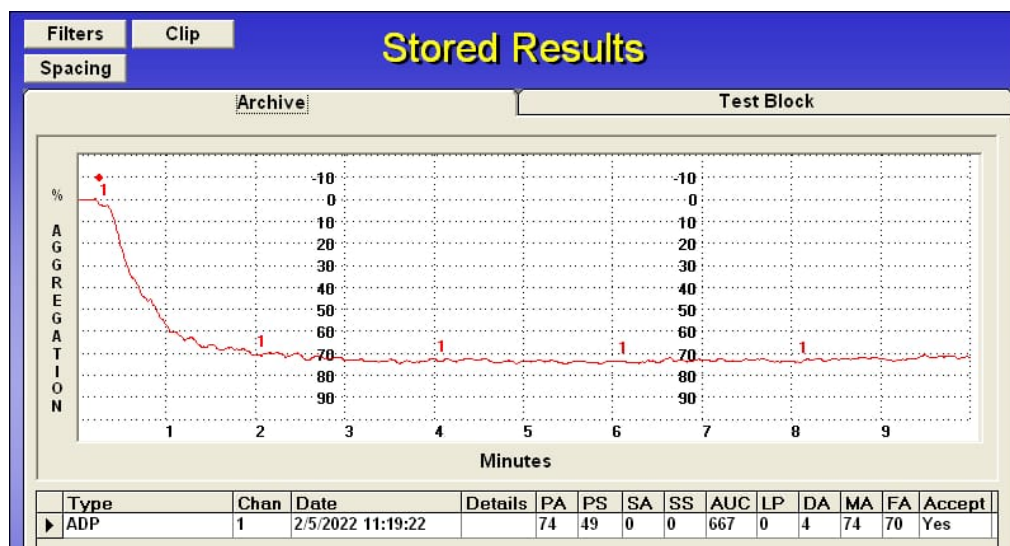
Optická transmisní agregometrie (Light Transmission Aggregometry – LTA) bývá považována za „zlatý standard“ pro vyšetřování funkce krevních destiček. Po přidání induktoru dochází v plazmě bohaté na destičky (Platelet Rich Plasma – PRP) ke tvorbě destičkových agregátů. Vznik agregátů způsobuje změnu transmise světelného paprsku při průchodu kyvetou. PRP s induktory představuje 0 % agregaci, zatímco plazma chudá na destičky (Platelet Poor Plasma – PPP) či plazma tzv. bezdestičková se využívá k nastavení 100 % agregace. V průběhu vzniku destičkových agregátů se postupně zakalená PRP plazma stává čirou. Průchodnost světelného paprsku je tím vyšší, čím více destiček agreguje. Změna transmise je po celou dobu měření graficky zaznamenávána [5].



Obrázek 7 – Princip agregometrie a vznik agregátů, upraveno [5]

Výstupem je agregační křivka, ze které software agregometru automaticky vyhodnocuje určité parametry, např. maximální amplitudu, která se vyjadřuje v procentech rozdílné propustnosti světla PRP-PPP, rychlost nástupu agregační křivky slope, atd. Nejčastěji hodnoceným parametrem je maximální amplituda [5].

Parametry výsledkového grafu jsou: PA – primární agregace, PS – primární směrnice (slope), SA – sekundární agregace, SS – sekundární směrnice, AUC – plocha pod agregační křivkou, LP – lag fáze, DA – desagregace, MA – maximální agregace/ amplituda, FA – finální agregace.



Obrázek – 8 Graf agregační křivky [vlastní zdroj]

4.4.2 Induktory

ADP

ADP se řadí mezi slabé induktory agregace destiček. Pro agregaci je podstatné navázání na 2 typy receptorů na destičce. Pokud se ADP naváže na receptor P2Y₁, trombocyt změni svůj tvar a dochází k uvolnění intracelulárního kalcia a dalšího ADP z granulí. Uvolněné ADP umožňuje i vazbu na receptor P2Y₁₂, která vede k sekundární agregaci. Z klinického hlediska je sledování agregace trombocytů po přidavku ADP adekvátní metodou ke sledování účinnosti protideštičkové léčby thienopyridiny. Terapie ASA a nesteroidními protizánětlivými léky (např. Ibalgin) potlačuje druhou vlnu agregace, kterou vyvolává ADP [5].

Epinefrin (adrenalin)

Epinefrin se rovněž řadí mezi slabší induktory agregace. Při vazbě na 2 adrenergní receptory dochází k uvolnění intracelulárního kalcia, uvolnění ADP a následuje druhá vlna agregace. Při terapii nesteroidními protizánětlivými léky a ASA můžeme pozorovat sníženou agregaci [5].

Kyselina arachidonová (AA)

AA je výchozí látkou v metabolismu tromboxanu A_2 v trombocytech. Uvolňuje se z destičkové membrány po aktivaci. TXA_2 se řadí mezi silné induktory agregace a jeho působením dochází k uvolnění aktivních látek z trombocytů, zvyšuje se tvorba TXA_2 a aktivuje se GPIIb/IIIa. AA je klinicky významná pro agregační vyšetření při sledování účinku protideštičkové léčby ASA [5].

Ristocetin

Antibiotikum ristocetin indukuje agregaci trombocytů prostřednictvím vazby vWF a GPIIb/V/IX. U von Willebrandovy choroby je možné pozorovat nedostatečnou agregaci. K potvrzení diagnózy jsou nezbytná další vyšetření [5].

Kolagen

Kolagen hraje důležitou úlohu při adhezi destiček, kdy dochází k jeho navázání na receptory GPIa/IIa. Následně se kolagen váže na GPVI, a tím nastává aktivace a tvorba TXA_2 [5].

Trombin

Trombin je nejsilnějším induktorem agregace destiček. Váže se na receptory PAR-1 a PAR-4. Trombin dokáže ve velmi nízkých koncentracích (100 nmol/l) způsobit plnou agregaci u zdravých trombocytů [5].

4.4.3 Postup měření

- 1) Příprava skleněných kyvetek a vložení magnetických míchadel do všech kyvetek mimo BLANK.
- 2) Reverzní pipetování 225 μ l PRP do připravených kyvetek.
- 3) Pipetování 250 μ l bezdestičkové plazmy (tj. BLANK) do kyvetky bez míchadla.
- 4) Rozmražení induktorů v mikrozkuřkách Eppendorf táním při laboratorní teplotě.
- 5) Příprava měřicí desky pod monitorem počítače.
- 6) Spuštění aplikace Start PAP-8E V2.1.0.
- 7) Následuje několik po sobě jdoucích kroků: stisk **Routine aggregation** (*Rutinní agregace*) → **Select a test** (*Vybrat test*) → **Multiple tests** (*Vícenásobné testy*) → **Run Sample** (*Spustit vzorek*) → **Sample Data** (*Údaje o vzorku*) → **Entry** (*Vstup*) → Zadat název vzorku → **Fill down** (*Vyplnit*) – kliknout na číslo, které značí konečný počet induktorů → **Select test Type** (*Vybrat typ testu*) – Zadat induktory → **Next** (*Další*).
- 8) PRP před měřením nechat cca 2 minuty předeřhát v inkubačních jamkách.
- 9) Změřit BLANK. Postupně vkládat BLANK do měřicích pozic 1–8 (pod poklopem) → po každém vložení stisknout BLANK.
- 10) Přesunutí kyvetek z inkubačních jamek do měřicích pozic pod poklopem, kde byl proměřen BLANK. Odstartování měření stisknutím **Start** ve všech pozicích a zavření poklopu.
- 11) Pipetování 25 μ l induktorů se současným stisknutím **Inject** (*Vstříknout*).
- 12) Stisknutím **Hide** (*Schovat*) je možné sledovat průběh agregační křivky (stiskem **Status** proběhne navrácení do pipetovacího menu).
- 13) Po dokončení analýzy potvrdit **Accept** (*Přijmout*) → **Done** (*Hotovo*) → **Print** (*Tisk*).
- 14) Uchování výsledků pro vyhodnocení a statistické zpracování.

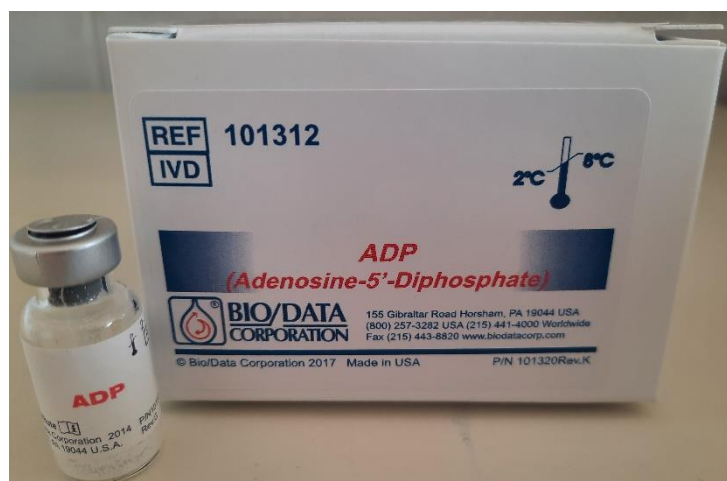
4.5 Koncentrace induktorů pro diagnostiku SPS

Reagencie

- ADP reagent 3x 0,5 ml, adenosin-5'-difosfát, koncentrace po rekonstituci je 20 $\mu\text{mol/l}$ (Bio/Data Corporation)
- Epinefrin reagent 2x 1 ml, koncentrace po rekonstituci je 300 $\mu\text{mol/l}$ (Hart Biologicals)
- pufr Owren ($\text{pH} = 7,25 \pm 0,05$)



Obrázek 9 – Reagent EPI [vlastní zdroj]




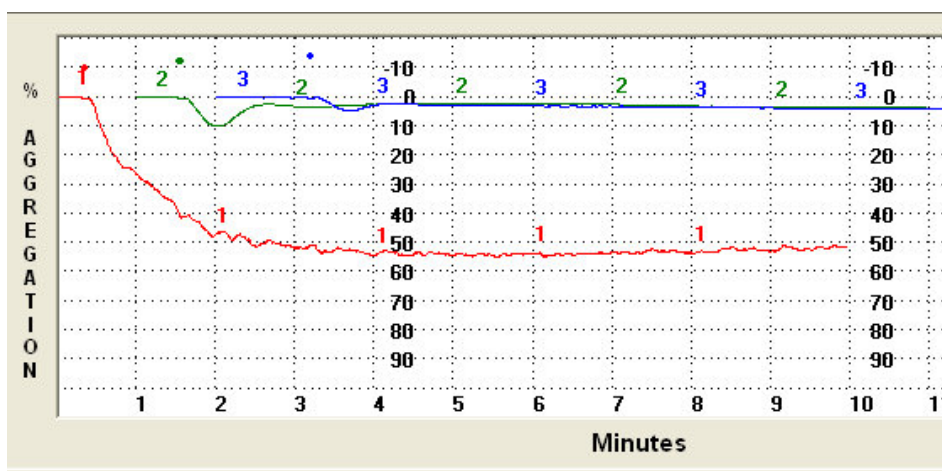
Obrázek 10 – Reagent ADP [vlastní zdroj]

Při přípravě reaglií (ADP a EPI) jsem postupovala dle pokynů v příbalovém letáku od výrobce. K lyofilizovaným reagliím jsem přidala 500 μl – ADP a 1000 μl – EPI injekční vody a nechala jsem reaglii promíchat na válečkovém míchadle po dobu 30 minut. Alikvoty jsem rozpipetovala po 27 μl a zamrazila.

4.5.1 Příprava nízkých koncentrací ADP

Tabulka 2– Příprava koncentrací ADP [vlastní zdroj]

ředění ADP			výsledná koncentrace
Roztok 1	20 µl ADP + 140 µl OWREN		2,34 µmol/l
Roztok 2 (R2)	20 µl ADP + 380 µl OWREN		1,17 µmol/l
Roztok 3	200 µl R2 + 200 µl OWREN		0,58 µmol/l

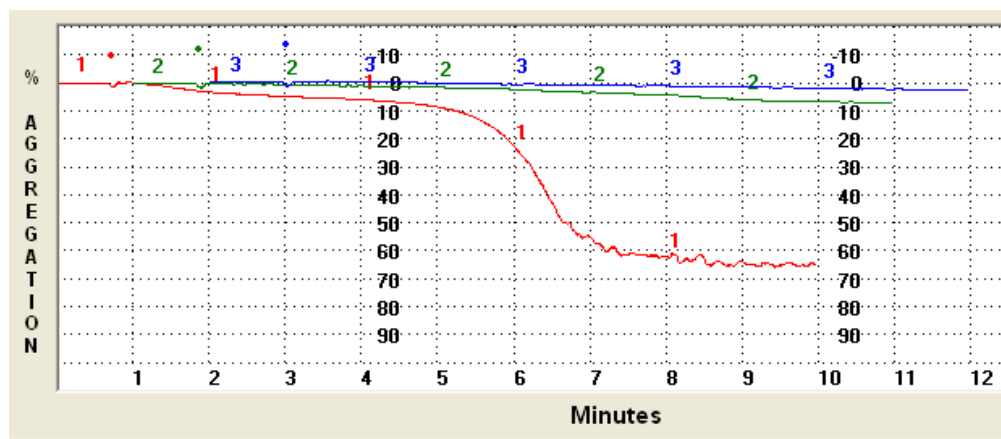


Obrázek 11 – Závislost agregace na čase po přidání snížených koncentrací ADP, **křivka 1**– 2,34 µmol/l; **křivka 2** – 1,17 µmol/l; **křivka 3** – 0,58 µmol/l [vlastní zdroj]

4.5.2 Příprava nízkých koncentrací EPI

Tabulka 3 –Příprava koncentrací EPI [vlastní zdroj]

ředění EPI		výsledná koncentrace
Výchozí roztok (VR)	10 µl EPI + 290 µl OWREN	11 µmol/l
Ředěný roztok A (RA)	50 µl VR + 450 µl OWREN	1,0 µmol/l
Ředěný roztok B (RB)	50 µl RA + 450 µl OWREN	0,10 µmol/l
Ředěný roztok C	200 µl RB + 200 µl OWREN	0,05 µmol/l



Obrázek 12 – Závislost agregace na čase po přidání nízkých koncentrací EPI, **křivka 1**– 1,0 μmol/l; **křivka 2** – 0,1 μmol/l; **křivka 3** – 0,05 μmol/l [vlastní zdroj]

4.6 Stanovení referenčního rozmezí

Pro stanovení referenčního rozmezí jsem zvolila přímou (induktivní) neparametrickou metodu [36].

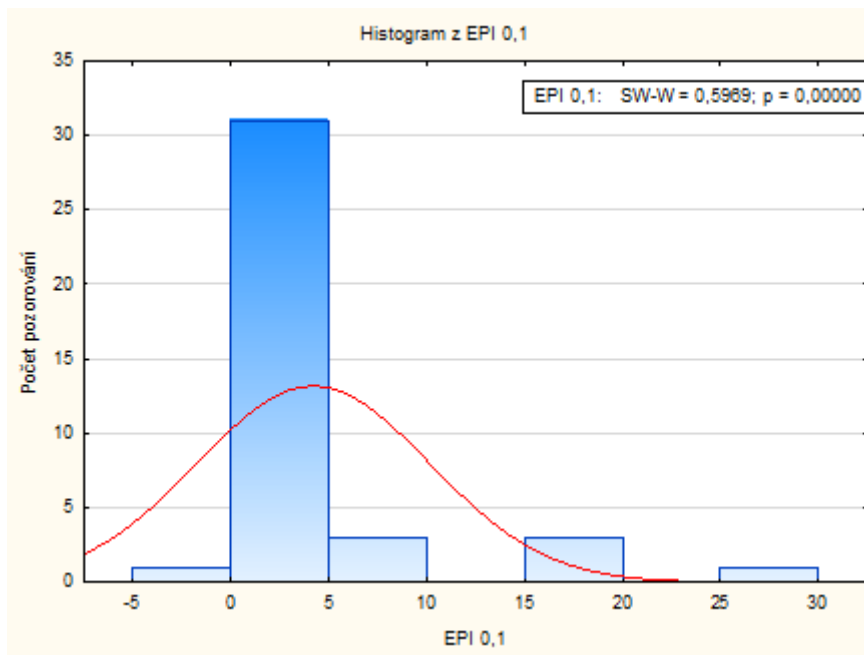
4.6.1 Přímá neparametrická metoda stanovení referenčního rozmezí

Přímá metoda předpokládá, že data jsou získána od referenční skupiny splňující určité podmínky. V tomto případě je podmínkou pracovat se souborem zdravých jedinců, respektive jedinců, kteří netrpí onemocněním ovlivňujícím měřený marker [36].

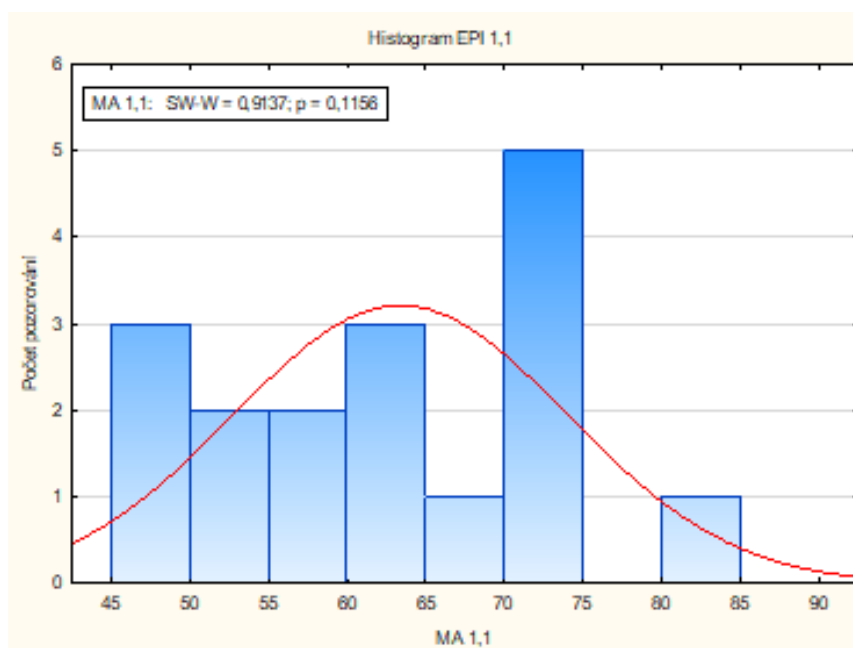
Neparametrickou metodu lze použít bez ohledu na typ rozložení výsledků, tedy i v případě, že měřený parametr nesplňuje v populaci normální rozdělení četnosti, a tedy není možné jej graficky vyjádřit pomocí Gaussovy křivky [36].

Naměřené hodnoty v % jsme seřadili do tabulky 5 sestupně podle velikosti. Aby bylo zachováno 95 % procent výsledků uvnitř referenčního rozmezí, vyškrtli jsme 2,5 % výsledků maximálních a minimálních hodnot [36].

Pro ilustraci přikládám 2 histogramy z měřených hodnot, podle kterých je možno určit, zda budou statistické výpočty prováděny parametrickou nebo neparametrickou metodou dle velikosti p-hodnoty. Pokud je p-hodnota menší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$, bude využita neparametrická metoda, protože data nesplňují normální rozdělení (obrázek 13). V případě, že p-hodnota $> 0,05$, použijeme metodu parametrickou (obrázek 14).



Obrázek 13 Ukázka histogramu nesplňující podmínku normálního rozložení dat [vlastní zdroj]



Obrázek 14 – Ukázka histogramu splňující podmínku normálního rozložení dat [vlastní zdroj]

Výpočet horní a dolní referenční meze

Horní mez (k_h) i dolní mez (k_d) určuje k -tá hodnota seřazeného výběru [37].

Pro ADP i EPI platí:

$$k_d = 0,025 \cdot (n + 1), k_d = 0,025 \cdot (37 + 1) = 1$$

$$k_h = 0,975 \cdot (n + 1), k_h = 0,975 \cdot (37 + 1) = 37$$

5 VÝSLEDKY

Naměřená data byla zpracována a statisticky vyhodnocena v systému Microsoft® Excel® pro Microsoft 365 MSO a Statistica 12.

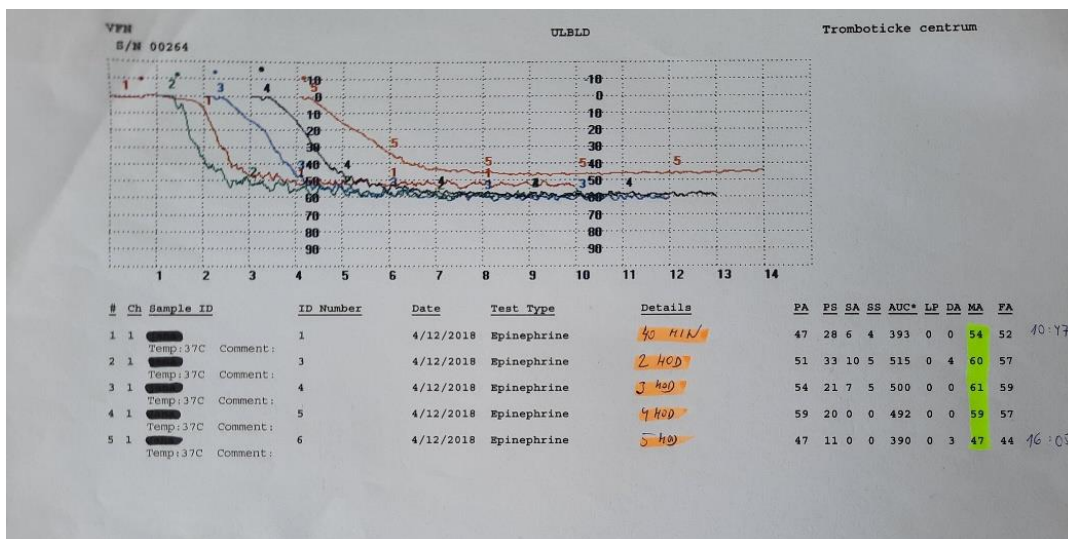
5.1 Kontrola kvality

Vlastní interní kontrola kvality spočívala v hodnocení maximální agregace (MA). Bylo provedeno posuzování MA v čase za použití roztoku EPI, kdy byl vzorek proměřován v určitých časových intervalech. Nejnižší hodnota MA byla očekávána po 5 hodinách, kdy už dochází k degradaci destiček a ovlivnění jejich aktivity (výrobce uvádí 4 hod od odběru jako horní hranici vyšetření).

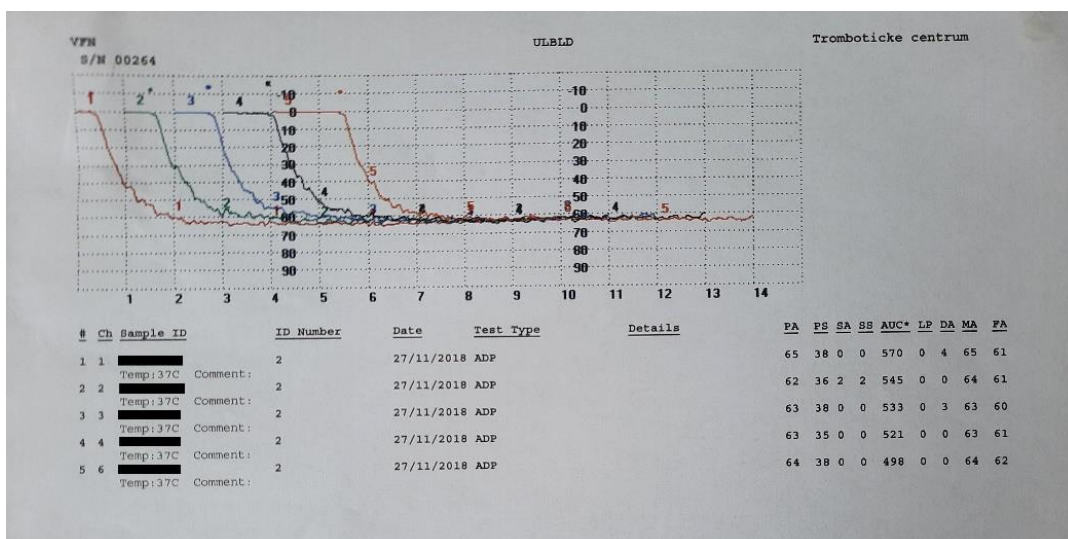
Kontrola měřicích kanálů byla provedena za použití roztoku ADP. Variační koeficient MA ve všech měřicích kanálech byl <5 %. Výsledné hodnoty uvádím v tabulce 4. Přikládám i grafy měření – obrázek 15 a 16.

Tabulka 4 – Hodnoty MA při kontrole kvality [vlastní zdroj]

agregace v čase	MA EPI [%]
40 minut	54
2 hodiny	60
3 hodiny	61
4 hodiny	59
5 hodin	47
kontrola měřicích kanálů	MA ADP [%]
1	65
2	64
3	63
4	63
5	64
CV [%]	1,31



Obrázek 15 – Kontrola kvality měření: MA v čase [vlastní zdroj]



Obrázek 16 – Kontrola měřicích kanálů [vlastní zdroj]

5.2 Deskriptivní statistika

V tabulce 5 uvádím naměřené hodnoty agregace destiček v % (MA) pro jednotlivé koncentrace. Soubor dárců čítal 40 zdravých jedinců ve věkovém rozmezí 22–51 let (10 mužů, 30 žen). Po odstranění extrémních hodnot a vyškrtnutí 2,5 % minimálních a maximálních hodnot bylo v rámci práce vyhodnocováno 37 hodnot pro ADP i pro EPI.

Tabulka 5 – Naměřené hodnoty MA dárců v různých koncentracích EPI a ADP [vlastní zdroj]

Dárci	ADP				EPI			
	20 μmol/l	2,34 μmol/l	1,17 μmol/l	0,58 μmol/l	300 μmol/l	1,00 μmol/l	0,10 μmol/l	0,05 μmol/l
1	81	76	65	11	79	77	19	5
2	78	69	64	11	77	73	19	4
3	76	69	63	9	75	72	17	4
4	76	69	62	9	74	70	9	3
5	74	68	58	7	74	70	7	3
6	73	68	56	6	73	70	6	3
7	73	67	28	6	73	69	4	3
8	73	67	22	6	72	69	4	3
9	72	67	19	5	71	69	4	2
10	72	66	19	5	71	68	4	2
11	71	66	18	4	71	67	3	2
12	70	65	18	4	70	66	3	2
13	70	65	15	4	69	66	3	2
14	70	64	15	4	68	66	3	2
15	70	64	14	3	68	66	2	2
16	69	64	13	3	68	65	2	2
17	68	63	11	3	67	64	2	2
18	68	62	11	3	67	63	2	2
19	68	61	10	2	67	63	2	1
20	68	60	9	2	67	62	2	1
21	68	60	9	2	67	61	2	1
22	68	59	9	2	67	58	2	1
23	67	57	8	2	67	58	1	1
24	67	55	8	2	67	57	1	1
25	66	52	8	2	66	55	1	1
26	65	49	8	2	65	19	1	1
27	65	49	7	2	65	16	1	1
28	65	45	6	2	63	12	1	1
29	64	41	6	1	63	11	1	1
30	62	33	6	1	63	10	1	1
31	62	27	5	1	63	10	1	1
32	62	26	5	1	63	8	1	1
33	61	24	4	1	62	8	1	1
34	60	23	4	1	62	5	1	1
35	59	20	4	1	57	5	1	1
36	58	19	4	1	56	3	1	1
37	58	19	4	1	56	2	1	1

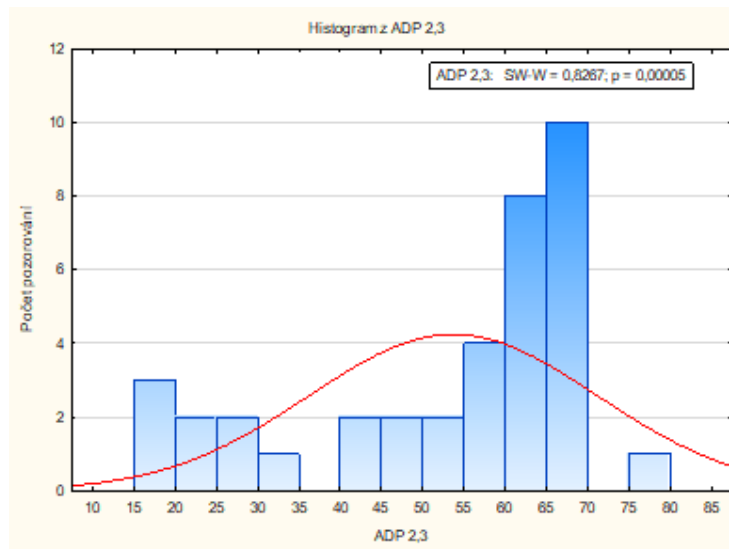
V tabulce 6 je uvedena základní (deskriptivní) statistika celého souboru dárců: počet (n), průměr (P), medián, minimum (min), maximum (max) a směrodatná odchylka (SD).

Tabulka 6 – Deskriptivní statistika [vlastní zdroj]

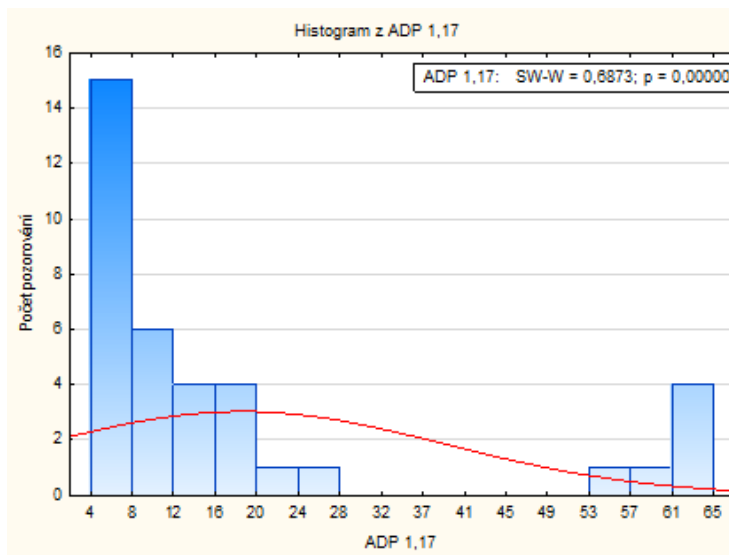
měření 2021-2022						
	n	P	medián	min	max	SD
ADP 2,34	37	53,46	61	19	76	17,40
ADP 1,17	37	18,78	10	4	65	19,83
ADP 0,58	37	3,57	2	1	11	2,83
EPI 1,0	37	47,38	63	2	77	27,39
EPI 0,1	37	3,68	2	1	19	4,78
EPI 0,05	37	1,81	1	1	5	1,05
EPI 0,5	18	33,61	32	1	71	29,65
EPI 0,25	18	9,28	5	1	65	15,02
PLT	35	242,63	240	150	365	55,02
měření 2018						
ADP MA 2,34	21	33,67	24	4	76	26,04
ADP MA 1,17	21	4,95	4	0	13	3,65
ADP MA 0,58	21	2,43	2	1	6	1,63
EPI MA 11	20	62,50	64	49	78	9,27
EPI MA 1,1	20	59,65	62	19	82	14,31
EPI MA 0,55	20	52,80	61	10	74	19,99

5.3 Histogramy

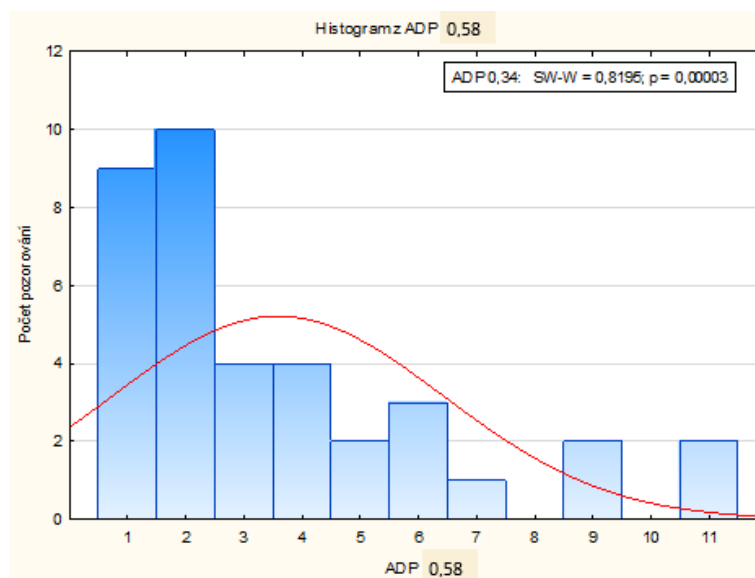
V této části uvádím na obrázcích 17, 18, 19, 20, 21 a 22 histogramy závislosti počtu pozorování (počet jedinců) na % hodnotě MA pro daný induktor a koncentraci. Všechny p-hodnoty jsou menší než 0,05. Na základě tohoto výsledku jsem následně použila neparametrickou metodu pro získání potřebných dat.



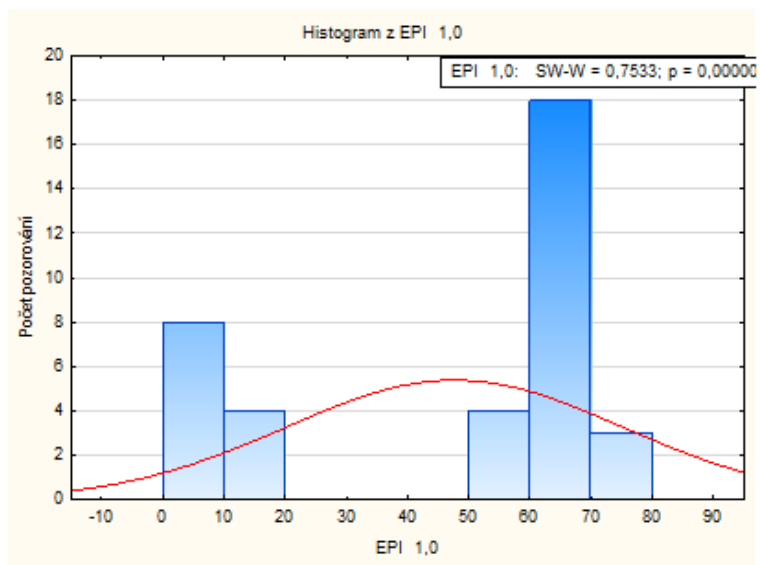
Obrázek 17 – Histogram z ADP o koncentraci 2,34 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]



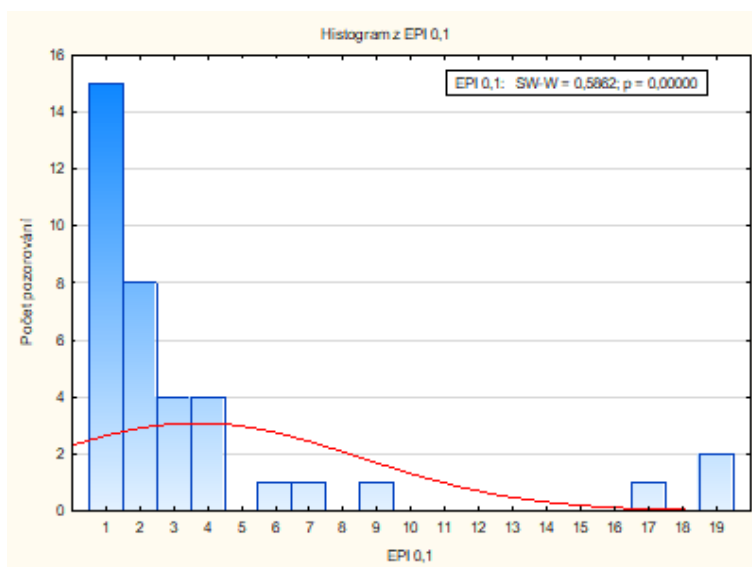
Obrázek 18 – Histogram z ADP o koncentraci 1,17 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]



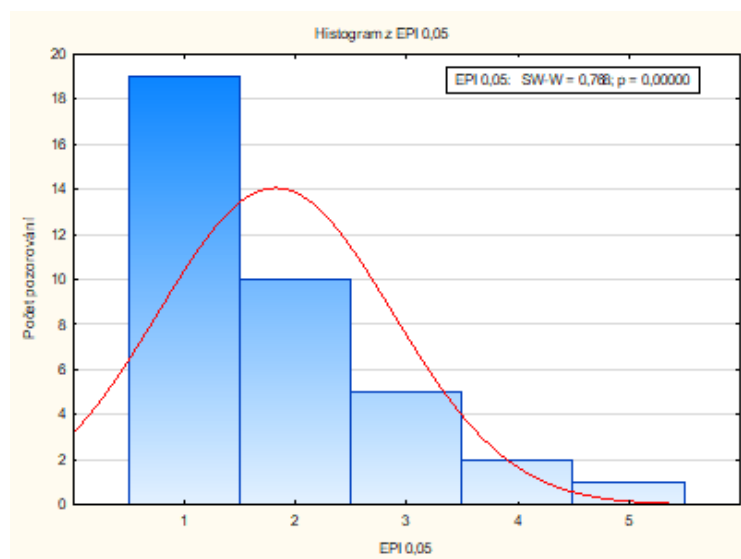
Obrázek 19 – Histogram z ADP o koncentraci 0,58 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]



Obrázek 20 – Histogram z EPI o koncentraci 1,0 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]



Obrázek 21 – Histogram z EPI o koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]



Obrázek 22 – Histogram z EPI o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]

5.4 Referenční rozmezí pro stanovení SPS

Na základě dat naměřených v roce 2021–2022 jsem stanovila referenční rozmezí agregace destiček, které uvádím v tabulce 7.

Tabulka 7 – Referenční rozmezí [vlastní zdroj]

ADP	normální rozmezí [%]	EPI	normální rozmezí [%]
2,34 $\mu\text{mol/l}$	19–76	1,00 $\mu\text{mol/l}$	2–77
1,17 $\mu\text{mol/l}$	4–65	0,10 $\mu\text{mol/l}$	1–19
0,58 $\mu\text{mol/l}$	1–11	0,05 $\mu\text{mol/l}$	1–5

5.5 Měření z roku 2018

V tabulce 8 uvádím hodnoty deskriptivní statistiky vycházející z měření v Trombotickém centru VFN v roce 2018.

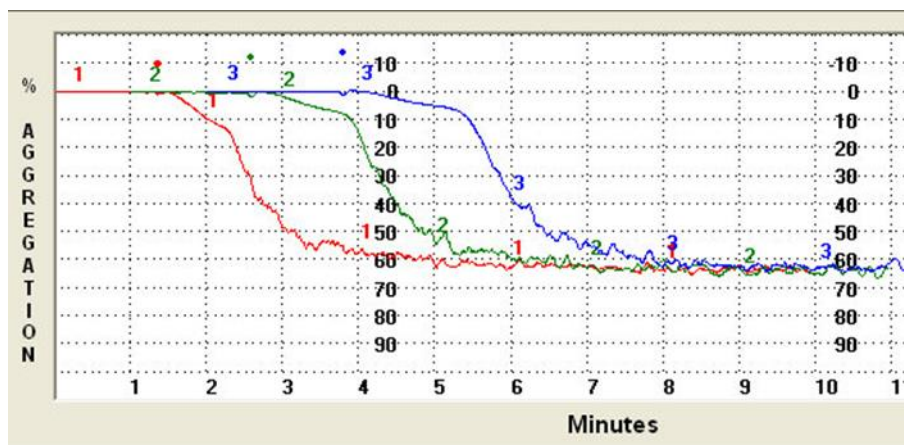
Tabulka 8 – Deskriptivní statistika pro data z roku 2018 [vlastní zdroj]

2018	n	P	medián	min	max	SD
ADP MA 2,34	21	33,67	24	4	76	26,04
ADP MA 1,17	21	4,95	4	0	13	3,65
ADP MA 0,58	21	2,43	2	1	6	1,63
EPI MA 11	20	62,50	64	49	78	9,27
EPI MA 1,1	20	59,65	62	19	82	14,31
EPI MA 0,55	20	52,80	61	10	74	19,99

V tabulce 9 předkládám hodnoty referenčního rozmezí stanovené z hodnot naměřených v roce 2018. Na obrázku 23 je zobrazen graf závislosti agregace na čase po přidavku nízkých koncentrací EPI.

Tabulka 9 – Referenční rozmezí stanovené v roce 2018 [vlastní zdroj]

ADP	normální rozmezí [%]	EPI	normální rozmezí [%]
2,34 $\mu\text{mol/l}$	4–76	11,00 $\mu\text{mol/l}$	49–78
1,17 $\mu\text{mol/l}$	0–13	1,10 $\mu\text{mol/l}$	19–82
0,58 $\mu\text{mol/l}$	1–6	0,50 $\mu\text{mol/l}$	10–74



Obrázek 23 – Závislost agregace na čase po přidání nízkých koncentrací EPI v roce 2018, **křivka 1**– 11,0 µmol/l; **křivka 2** – 1,1 µmol/l; **křivka 3** – 0,55 µmol/l

5.6 Návrh na následná měření

Jako základ navazujících měření byla u některých dárců provedena analýza i při koncentracích EPI 0,50 µmol/l a 0,25 µmol/l. Deskriptivní statistiku tohoto souboru uvádím v tabulce 10.

Tabulka 10 – Deskriptivní statistika pro další koncentrace EPI [vlastní zdroj]

koncentrace EPI [µmol/l]	n	P	medián	min	max	SD
0,5	18	33,61	32	1	71	29,65
0,25	18	9,28	5	1	65	15,02

Referenční rozmezí pro další koncentrace EPI uvádím v tabulce 11.

Tabulka 11 – Referenční rozmezí pro další koncentrace EPI [vlastní zdroj]

EPI	normální rozmezí [%]
0,50 µmol/l	1–71
0,25 µmol/l	1–65

5.7 Porovnání naměřených koncentrací

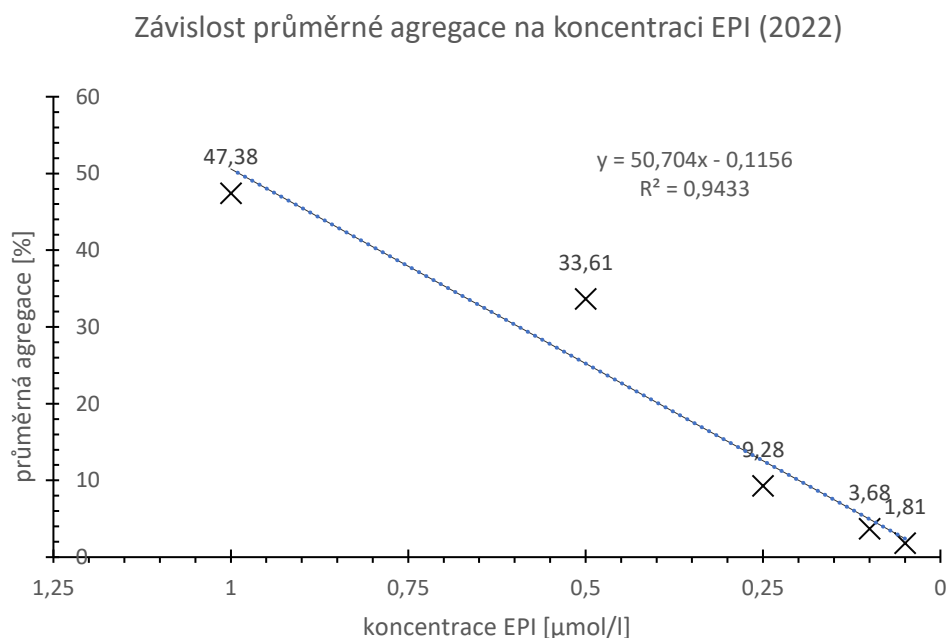
V tabulce 12 jsem použila Wilcoxonův párový test pro statistické porovnání naměřených hodnot MA (EPI) v různých koncentracích.

Tabulka 12 – Wilcoxonův párový test [vlastní zdroj]

Wilcoxonův test	
poměry koncentrací EPI [$\mu\text{mol/l}$]	p-hodnota
1,0 : 0,1	0,0000
0,1 : 0,05	0,0002
1,0 : 0,5	0,0002
0,5 : 0,25	0,0007
0,25 : 0,1	0,1706
11,0 : 1,1 (z roku 2018)	0,1298
1,1 : 0,55 (z roku 2018)	0,0001

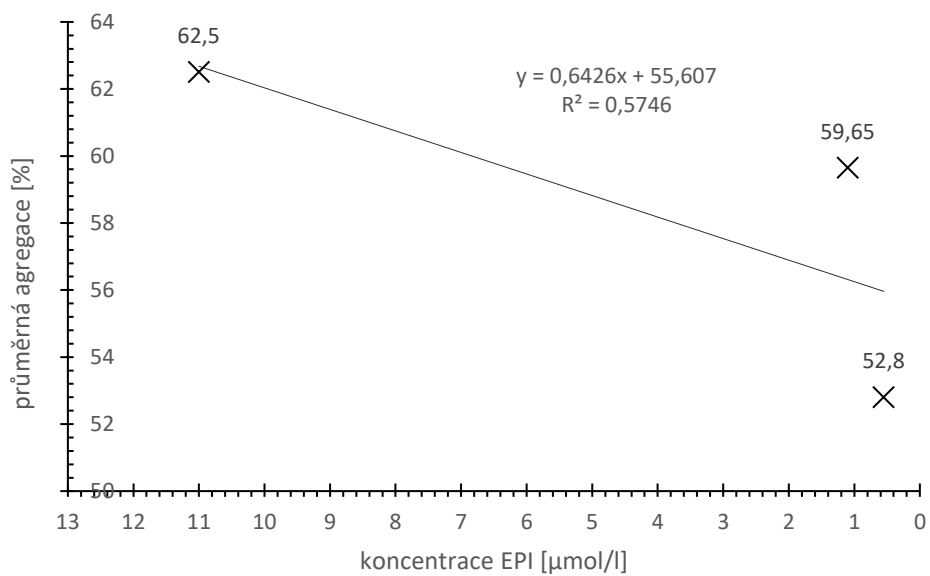
5.8 Grafické zobrazení daných koncentrací EPI

Na obrázcích 24 a 25 je znázorněna závislost průměrné agregace na koncentracích EPI z měření v roce 2022 a 2018.



Obrázek 24 – Grafické znázornění závislosti průměrné agregace na koncentraci EPI

Závislost průměrné agregace na koncentraci EPI (2018)



Obrázek 25 – Grafické znázornění závislosti průměrné agregace na koncentraci EPI– 2018

6 DISKUZE

Stanovení referenčního rozmezí SPS je pro laboratoře vyšetřující funkci krevních destiček velkým oříškem, poněvadž metoda pro vyšetření SPS není standardizována. Pracovní postupy laboratoří se liší například v časových intervalech mezi odběrem vzorku a jeho samotným měřením či v různé délce centrifugace. Snaha všech laboratoří zabývajících se problematikou SPS o standardizaci metody a zařazení tohoto vyšetření mezi rutinní je stále silnější.

Cílem mé práce bylo změřit indukovanou agregaci (induktory EPI a ADP) krevních destiček u 40 dobrovolníků (zdravých dárců) v rámci stanovení referenčního rozmezí pro SPS. Naměřené hodnoty maximální agregace [%] jsou uvedeny v tabulce 5. Tyto hodnoty sloužily jako podklad pro hodnocení souboru pomocí deskriptivní statistiky. Důležitými hodnotami deskriptivní statistiky (viz tabulka 6) pro stanovení referenčního rozmezí jsou minimum a maximum, určené pro jednotlivé koncentrace. Rovněž je v tabulce 6 uvedena průměrná hodnota počtu trombocytů v krevním obrazu, která činí $246,2 \times 10^9/l$. Počet trombocytů všech dárců se nacházel v referenčním rozmezí ($150-400 \times 10^9/l$) [11].

Přímou (induktivní) neparametrickou metodou bylo získáno z dat v tabulce 5 výsledné rozmezí hodnot pro jednotlivé koncentrace induktorů: EPI (konc. $1,0 \mu\text{mol/l}$) = 2–77 %; EPI (konc. $0,1 \mu\text{mol/l}$) = 1–19 %; EPI (konc. $0,05 \mu\text{mol/l}$) = 1–5 %; ADP (konc. $2,34 \mu\text{mol/l}$) = 19–76 %; ADP (konc. $1,17 \mu\text{mol/l}$) = 4–65 %; ADP (konc. $0,58 \mu\text{mol/l}$) = 1–11 %. Hodnoty referenčního rozmezí jsou uvedeny v tabulce 7.

Je nutno zmínit, že po měření v roce 2018 ve VFN, při vyhodnocení výsledků dle diagnostiky Mammena a Bicka (viz tabulka 1), se 17 z 22 zdravých dárců, viz tabulka 9 a graf na obrázku 23, projevovalo jako suspektní pro SPS typu II. To znamená, že nedocházelo ke snížení maximální agregace po indukci sníženými koncentracemi epinefrinu (obrázek 23). Pro ADP byla kritéria dle Mammena a Bicka vyhovující. Z měření agregace po snížených koncentracích ADP v roce 2018 ve VFN se jevil jako hyperagregabilní 1 dobrovolník, pravděpodobně se suspektním SPS [38].

V návaznosti na neúspěšný pokus stanovení referenčního rozmezí pro agregaci po indukci sníženými konc. EPI ve VFN r. 2018 byly za účelem optimalizace měření v letech 2021–2022, v rámci mé bakalářské práce, provedeny změny v metodice. Jednou z nejvýznamnějších úprav byla změna koncentrací EPI. Původní koncentrace EPI 11; 1,1 a 0,55 $\mu\text{mol/l}$ byly nahrazeny koncentracemi 1,0; 0,1 a 0,05 $\mu\text{mol/l}$. Další změny se týkaly centrifugace a času vyšetření uplynulého od odběru vzorku. V roce 2018 byla centrifugace vzorků provedena v rozmezí 0,5–1,0 h při 900 ot/min a vyšetření vzorků proběhlo do 2 hodin od odběru. V novém měření (2021–2022) byla centrifugace provedena v rozmezí 0,25–0,50 h při 900 ot/min a vzorky byly vyšetřeny do 1 hodiny od odběru.

Při srovnání referenčního rozmezí, které jsem stanovila (viz tabulka 7), s hodnotami doporučovaného referenčního rozmezí, které bylo stanoveno v Národném centru trombózy a hemostázy v Martině (viz tabulka 1), je u výsledků mého měření stále možno hovořit o lehké hyperagregabilitě destiček po indukci epinefrinem u zdravých dobrovolníků. Navzdory tomu bylo možné stanovit normální (referenční) rozmezí, protože snížením jednotlivých koncentrací EPI je patrné snížení hodnot agregace, ve srovnání s měřením ve VFN v roce 2018. Proto by nově stanovené referenční rozmezí (z měření 2021–2022) s nižšími koncentracemi, než je doporučováno dle Mammena a Bicka, mohlo lépe sloužit jako podklad při hodnocení případného SPS u pacientů.

V návaznosti na stále pozorovanou lehkou hyperagregabilitu po indukci EPI, byla snaha o optimalizaci uskutečněna vyšetřením agregace destiček s dalšími koncentracemi EPI. U 18 dobrovolníků z mého souboru byla kromě koncentrace EPI 1,0; 0,1 a 0,05 $\mu\text{mol/l}$ proměřována také agregace po indukci EPI o koncentracích 0,50 a 0,25 $\mu\text{mol/l}$. Hodnoty deskriptivní statistiky jsou uvedeny v tabulce 10. Důležitými hodnotami jsou maximum a minimum, pomocí nichž bylo stanoveno referenční rozmezí, které je pro EPI (konc. 0,50 $\mu\text{mol/l}$) = 1–71 % a EPI (konc. 0,25 $\mu\text{mol/l}$) = 1–65 %, a je uvedeno v tabulce 11.

Pro porovnání zvolených koncentrací mezi sebou byl použit Wilcoxonův neparametrický test. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 12. Červeně jsou zvýrazněny hodnoty Wilcoxonova testu pro koncentrace EPI, u kterých není statisticky významný rozdíl. Jedná se o koncentrace EPI 11:1,1 $\mu\text{mol/l}$

a EPI 0,25:0,1 $\mu\text{mol/l}$. V případě poměru EPI 11:1,1 $\mu\text{mol/l}$ výsledek Wilcoxonova testu naznačuje, že koncentrace 11 $\mu\text{mol/l}$ byla pravděpodobně špatně zvolena, protože výsledky agregace přesahovaly doporučené referenční meze a vykazovaly známky hyperagregability. Z vyhodnocení Wilcoxonova testu pro konc. EPI 0,25:0,1 $\mu\text{mol/l}$ můžeme usoudit, že při následujícím měření může být využito buď induktoru EPI o konc. 0,25 $\mu\text{mol/l}$ nebo EPI o konc. 0,1 $\mu\text{mol/l}$. Jinými slovy není nutné provádět analýzu s oběma těmito koncentracemi, protože mezi výsledky měření danými koncentracemi není statisticky významný rozdíl.

Z průměrných hodnot MA [%] po indukci EPI (konc. 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 $\mu\text{mol/l}$) bylo vytvořeno grafické znázornění, viz obrázek 24. Je patrné, že závislost je lineární. Koeficient determinance je $R^2 = 0,9433$. Po vynásobení 100 udává procento sdíleného rozptylu, v tomto případě proměnné sdílí 94,33 %, což vyjadřuje úspěšnou predikci hodnot závisle proměnné.

Na obrázku 25 je grafické znázornění průměrných hodnot MA [%] po indukci EPI z měření v roce 2018. Jsou použity koncentrace EPI (11; 1,1; 0,55 $\mu\text{mol/l}$). Koeficient determinance je $R^2 = 0,5746 \Rightarrow 57,46\%$. Ve srovnání s obrázkem 24 je vidět poněkud nižší koeficient spolehlivosti R^2 . Je tedy žádoucí volit nižší koncentrace EPI než původně doporučované.

Jako návrh pro úpravu referenčního rozmezí dle Mammena a Bicka se uvažuje o případném vyřazení koncentrace EPI 11 $\mu\text{mol/l}$. Tento postup je podpořen interním výzkumem na Oddělení hematologie a transfuziologie v Pelhřimově, kde byla analyzována skupina 100 zdravých dobrovolníků za účelem zjištění nových dat a následné standardizace metody. Získaná data jsou a budou konzultována mezi jednotlivými pracovišti zabývajícími se SPS. Studie byla prováděna měřeními různých koncentrací induktorů: EPI (10; 2,5; 1,0; 0,5 $\mu\text{mol/l}$) a ADP (2,5; 1,0; 0,5; 11 $\mu\text{mol/l}$). Výsledkem studie v Pelhřimově, vedené MUDr. Petrem Kesslerem a Mgr. Lenkou Loskotovou, bylo zjištěno, že koncentraci EPI (11 $\mu\text{mol/l}$) není možné považovat za dostatečně nízkou pro stanovení SPS. Rovněž bylo vyhodnoceno, že koncentrace EPI (1,0 a 0,5 $\mu\text{mol/l}$) je možné považovat za použitelné pro stanovení SPS. Tento výsledek se shoduje s měřením, které bylo provedeno v roce 2021–2022 v rámci této bakalářské práce [39].

Důvodem, proč se liší referenční rozmezí jednotlivých studií (studie Mammena a Bicka, v NCHT Martin, v Pelhřimově a studie ve VFN v rámci této práce), může být mimo jiné také odlišný počet sledovaných dárců. Společnou snahou je počet zdravých dárců rozšiřovat, což je problematické vzhledem k omezeným možnostem získání zdravých dárců. Také časová náročnost metody je nemalou překážkou. Navzdory zmiňovaným úskalím se snad metoda v blízké budoucnosti dočká i své mezilaboratorní standardizace.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit referenční rozmezí maximální agregace destiček [%] po přidání induktorů agregace EPI a ADP ve snížených koncentracích.

V teoretické části byla popsána hemostáza a její složky. Pozornost byla zaměřena především na primární hemostázu a složky primární hemostázy. Dále byla popsána obecná struktura trombocytu a jeho funkce v hemostáze. Značná část této části pojednávala o syndromu lepivých destiček, jeho patogenezi, klasifikaci, klinických projevech, diagnostice a následné možné léčbě.

V praktické části bylo stanoveno referenční rozmezí agregace destiček pro jednotlivé koncentrace induktorů EPI a ADP pomocí optické transmisní agregometrie (analyzátor PAP 8E). Měření bylo provedeno se vzorky 40 zdravých dobrovolníků. Výsledné referenční rozmezí je: EPI (konc. 1,0 $\mu\text{mol/l}$) = 2–77 %; EPI (konc. 0,1 $\mu\text{mol/l}$) = 1–19 %; EPI (konc. 0,05 $\mu\text{mol/l}$) = 1–5 %; ADP (konc. 2,34 $\mu\text{mol/l}$) = 19–76 %; ADP (konc. 1,17 $\mu\text{mol/l}$) = 4–65 %; ADP (konc. 0,58 $\mu\text{mol/l}$) = 1–11 % (tabulka 7).

Hodnoty dalších doměřovaných koncentrací a následné referenční rozmezí EPI (konc. 0,50 $\mu\text{mol/l}$) = 1–71 %; EPI (konc. 0,25 $\mu\text{mol/l}$) = 1–65 % (tabulka 11) může sloužit prozatím pouze jako podklad pro další studie za předpokladu rozšíření souboru dobrovolníků.

Bylo zjištěno, že data nemají normální rozdělení, a tak byla zvolena neparametrická metoda pro stanovení normálního rozmezí.

Dále je zřejmé, že koncentrace epinefrinu (11 $\mu\text{mol/l}$) pravděpodobně není dostatečně nízká pro diagnostiku SPS.

Tento soubor dobrovolníků je možno považovat za již statisticky významný příspěvek v rámci snahy o standardizaci metody. Cílem pro navazující práci je rozšířit soubor zdravých dárců na 30 mužů a 30 žen s následným porovnáním získaných výsledků na různých pracovištích [40].

Tato práce může sloužit jako základ pro diagnostiku SPS v Trombotickém centru VFN.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina arachidonová
ADP	adenosin difosfát
ASA	kyselina acetylsalicylová
ATP	adenosintrifosfát
Ca ²⁺	vápenaté ionty
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
COX-1	cyklooxygenáza 1
ČSL JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPI	epinefrin (adrenalin)
FV	faktor V
GAS6	gen pro protein GAS6
GP	glykoproteiny
GP6	gen pro glykoprotein VI
HIT	heparinem indukovaná trombocytopenie
K ₂ EDTA	didraselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
LTA	optická transmisní agregometrie
PAF	faktor ovlivňující destičky
PAI-1	inhibitor plazminogenového aktivátoru
PAR1	proteázami aktivovaný receptor 1
PAR4	proteázami aktivovaný receptor 4
PC	fosfatidylcholin

PDGF	destičkový růstový faktor
PE	fosfatidyletanolamin
PEAR1	gen pro protein PEAR1
PF4	destičkový faktor 4
PGE ₂	prostaglandin
PGI ₂	prostacyklin
PLC	fosfolipáza C
PLG	plazminogen
PLT	krevní destičky
PPP	plazma chudá na destičky
PRP	plazma bohatá na destičky
PS	fosfatidylserin
RMP	otáčky za minutu
SM	sfingomyelin
SPS	syndrom lepivých destiček
TE	trombembolismus
TF	tkáňový faktor
TGF- β	transformující růstový faktor B
TP	tromboprostaglandinový receptor
TXA ₂	tromboxan A ₂
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
VKA	antagonista vitamínu K

vWF von Willebrandův faktor

β TG β -tromboglobulin

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu*. 1. Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN 80-86682-01-3.
- [2] MALÍKOVÁ, Ivana a Jana BÍLKOVÁ. *Fyziologie krevního srážení: Výukový materiál*. Praha: ÚLBDL Centrální hematologická laboratoř a Trombotické centrum Všeobecná fakultní nemocnice, Praha 2.
- [3] ŠLECHTOVÁ, Jitka. Hemostáza – jak ji možná neznáme. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. **15**, 97-101 [cit. 2022-02-24]. Dostupné z: http://stara.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/2-07/KBM0702_Slechtova_97.pdf
- [4] PENKA, Miroslav a Tesařová EVA. *Hematologie a transfúzní lékařství I.: Hematologie* [online]. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2011 [cit. 2022-02-24]. ISBN 978-80-247-3459-0. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/hematologie-a-transfuzni-lekarstvi-i-770672/#>
- [5] ŠKORŇOVÁ, Ingrid a Luděk SLAVÍK. *Hemostáza: laboratorne metody, ich využitie a interpretácia vo vybraných klinických situáciach*. Turany: P+M, s. r. o., 2020. ISBN 978-80-89694-78-5.
- [6] CHARVÁT, Jiří. *Fyziologie a patologie hemostázy: prezentace poskytnutá Trombotickým centrem VFN*.
- [7] BATTY, Paul a J. SMITH. Haemostasis. *Surgery (Oxford)* [online]. 2010, **28**(11), 530-535 [cit. 2022-02-28]. ISSN 02639319. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpsur.2010.08.008
- [8] CAMPBELL, Sean. Hemostasis. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* [online]. Elsevier, 2020, s. 445-467 [cit. 2022-02-28]. ISBN 9780128154991. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815499-1.00026-0

- [9] ZAIDI, Abbas a Laura GREEN. Physiology of haemostasis. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* [online]. 2019, **20**(3), 152-158 [cit. 2022-03-01]. ISSN 14720299. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpaic.2019.01.005
- [10] VAN DER MEIJDEN, Paola a Johan HEEMSKERK. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology* [online]. 2019, **16**(3), 166-179 [cit. 2022-03-01]. ISSN 1759-5002. Dostupné z: doi:10.1038/s41569-018-0110-0
- [11] JURÁŇOVÁ, J., D. MIKULENKOVÁ, S. VYTISKOVÁ a I. FÁTOROVÁ. *Referenční meze krevního obrazu, retikulocytů, normoblastů a diferenciálního počtu leukocytů dospělých: Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP*. 2. Praha: ČHS ČLS JEP, 2021.
- [12] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: FINIDR, 2006. ISBN 80-86682-02-1.
- [13] ČÍŽ, Milan. *Krevní destičky: Interakce mezi destičkami a PMNL* [online]. In: . Oddělení fyziologie a imunologie živočichů - Ústav experimentální biologie - Biologická sekce - Přírodovědecká fakulta, MUNI, s. 1-24 [cit. 2022-03-02]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/sci/jaro2017/Bi6728/um/Desticky.pdf>
- [14] BOHONĚK, Miloš. *Trombocyt, přednáška k předmětu F7PBLHTS1 na FBMI (2020-2021)*. Praha: Ústřední vojenská nemocnice, 2020.
- [15] CHEN, Yuanying, Yefeng YUAN a Wei LI. Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from α -granules. *Bioscience Reports* [online]. 2018, **38** (5), 3-23 [cit. 2022-03-03]. ISSN 0144-8463. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20180458
- [16] FLAUMENHAFT, Robert a Anish SHARDA. Platelet Secretion. *Platelets* [online]. Elsevier, 2019, s. 349-370 [cit. 2022-03-03]. ISBN 9780128134566. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00019-9
- [17] POKROVSKAYA, Irina, Shilpi YADAV, Amith RAO et al. 3D ultrastructural analysis of α -granule, dense granule, mitochondria, and canalicular system

- arrangement in resting human platelets. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2020, **4**(1), 72-85 [cit. 2022-03-03]. ISSN 2475-0379. Dostupné z: doi:10.1002/rth2.12260
- [18] DUPUIS, Arnaud, Jean-Claude BORDET, Anita ECKLY a Christian GACHET. Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2020, **9**(8), 3-23 [cit. 2022-03-03]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm9082508
- [19] SAKALOVÁ, Adriena, Angelika BÁTOROVÁ, Martin MISTRÍK a Mikuláš HRUBIŠKO. *Klinická hematológia*. KD Osveta, 2011. ISBN 978-80-8063-324-0.
- [20] SMEJKAL, Petr. *Fyziologie hemostázy* [online]. In: . Brno: Katedra laboratorních metod - Pracoviště nelékařských oborů - Lékařská fakulta, 2015 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2015/BLKKH0411p/Bc-fyziol_hemostazy_2015.pdf
- [21] SOKOL, Juraj, Maria SKERENOVA, Jela IVANKOVA, Tomas SIMURDA a Jan STASKO. Association of Genetic Variability in Selected Genes in Patients With Deep Vein Thrombosis and Platelet Hyperaggregability. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* [online]. 2018, **24**(7), 1027-1032 [cit. 2022-03-08]. ISSN 1076-0296. Dostupné z: doi:10.1177/1076029618779136
- [22] KUBISZ, Peter, Pavol HOLLY a Jan STASKO. Sticky Platelet Syndrome: 35 Years of Growing Evidence. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [online]. 2019, **45**(01), 061-068 [cit. 2022-03-08]. ISSN 0094-6176. Dostupné z: doi:10.1055/s-0038-1676581
- [23] KUBISZ, Peter, Lucia STANCIAKOVA, Jan STASKO, Miroslava DOBROTOVA, Maria SKERENOVA, Jela IVANKOVA a Pavol HOLLY. Sticky platelet syndrome: an important cause of life-threatening thrombotic complications. *Expert Review of Hematology* [online]. 2015, **9**(1), 21-35 [cit. 2022-03-08]. ISSN 1747-4086. Dostupné z: doi:10.1586/17474086.2016.1121095

- [24] YAGMUR, Eray, Eva BAST, Anja MÜHLFELD, Alexander KOCH, Ralf WEISKIRCHEN, Frank TACKE a Joseph NEULEN. High Prevalence of Sticky Platelet Syndrome in Patients with Infertility and Pregnancy Loss. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2019, **8**(9) [cit. 2022-03-08]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm8091328
- [25] STAŠKO, Ján, Miroslava DOBROTOVÁ, Jela IVANKOVÁ, Mária ŠKEREŇOVÁ, Pavol HOLLÝ, Juraj SOKOL, Lucia STANČIAKOVÁ a Peter KUBISZ. Sticky platelet syndrome - current status and perspectives. *Intervenční a akutní kardiologie* [online]. 2017, **16**(2), 56-60 [cit. 2022-03-09]. ISSN 1213807X. Dostupné z: doi:10.36290/kar.2017.010
- [26] SOKOL, Juraj, Maria SKERENOVA, Zuzana JEDINAKOVA, Tomas SIMURDA, Ingrid SKORNOVA, Jan STASKO a Peter KUBISZ. Progress in the Understanding of Sticky Platelet Syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [online]. 2017, **43**(01), 008-013 [cit. 2022-03-08]. ISSN 0094-6176. Dostupné z: doi:10.1055/s-0036-1584352
- [27] PLEBANI, Mario, Laura SCIACOVELLI, Ada AITA, Michela PELLOSO a Maria CHIOZZA. Performance criteria and quality indicators for the pre-analytical phase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. 2015, **53**(6), 2 [cit. 2022-02-23]. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2014-1124
- [28] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie. 2.*, přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-726-2324-9.
- [29] MAŠKOVÁ, Václava. *Koagulační měření, přednáška k předmětu F7PBLHTS1 na FBMI (2020-2021)*. Praha: Ústřední vojenská nemocnice, 2020.
- [30] RACEK, Jaroslav. Preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření. *Klinická biochemie: Výukový materiál* [online]. 1. Ostrava: Střední zdravotnická škola a Vyšší odborná škola zdravotnická, Ostrava, 2019, s. 7-9 [cit. 2022-02-20]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/189/page07.html>

- [31] ŠIGUTOVÁ, P. a I. HRACHOVINOVÁ. *Preanalytika v hematologické laboratoři: Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP*. 1. Praha: ČHS ČLS JEP, 2021.
- [32] MAŠKOVÁ, Václava. *Analýza krevního obrazu, základy cytologie krevních tekutin, sedimentace ery, přednáška k předmětu F7PBLHTS1 na FBMI (2020-2021)*. Praha: Ústřední vojenská nemocnice.
- [33] RACEK, Jaroslav. Hemolýza. *Klinická biochemie: Výukový materiál* [online]. 1. Ostrava: Střední zdravotnická škola a Vyšší odborná škola zdravotnická, Ostrava, 2019, s. 13 [cit. 2022-02-20]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/189/page13.html#heading29>
- [34] MUNNIX, I.C.A., R. VAN OERLE, P. VERHEZEN et al. Harmonizing light transmission aggregometry in the Netherlands by implementation of the SSC-ISTH guideline. *Platelets* [online]. 2021, **32**(4), 516-523 [cit. 2022-03-30]. ISSN 0953-7104. Dostupné z: doi:10.1080/09537104.2020.1771549
- [35] *Aggregometer* [online]. In: . Milano: Sentinel CH. S.p.A. [cit. 2022-03-30]. Dostupné z: <https://www.sentinel diagnostics.com/laboratory/aggregometer/>
- [36] RACEK, Jaroslav. Způsoby určení referenčního rozmezí. *Klinická biochemie: Výukový materiál* [online]. 1. Ostrava: Střední zdravotnická škola a Vyšší odborná škola zdravotnická, Ostrava, 2019, s. 29 [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/189/page29.html>
- [37] DOHNAL, Luděk a Petr SCHNEIDERKA. *Referenční hodnoty v praxi* [online]. In: . Referenční laboratoř pro klinickou biochemii MZ ČR při ÚKBLD 1.LF UK a VFN, Praha; Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice, Olomouc [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/210/Referen%C4%8Dn%C3%AD%20hodnoty%20v%20praxi.pdf>

- [38] BÍLKOVÁ, Jana. *Stanovení normálního rozmezí – Syndrom lepivých destiček: Přednáška na konferenci XXVIII. Pařízkovy dny a III. Ostravská konference paliativní péče*. Ostrava, 2022.
- [39] LOSKOTOVÁ, Lenka. *SPS - analýza výsledků 100 zdravých dobrovolníků: Přednáška na konferenci XXVIII. Pařízkovy dny a III. Ostravská konference paliativní péče*. Ostrava, 2022.
- [40] KESSLER, Petr, Lenka LOSKOTOVÁ. *Syndrom lepivých destiček – jak dál?: Přednáška na konferenci XXVIII. Pařízkovy dny a III. Ostravská konference paliativní péče*. Ostrava, 2022.
- [41] *Struktura trombocytu* [online]. In: . [cit. 2022-03-02]. Dostupné z: https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_07671-L0000006.htm
- [42] Medical gallery of Blausen Medical 2014. *WikiJournal of Medicine* [online]. 2014, 1(2) [cit. 2022-03-04]. ISSN 20024436. Dostupné z: [doi:10.15347/wjm/2014.010](https://doi.org/10.15347/wjm/2014.010)

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Stavba cévní stěny [8]	12
Obrázek 2 – Struktura trombocytu [41].....	14
Obrázek 3 – Porovnání neaktivované a aktivované krevní destičky [42].....	19
Obrázek 4 – Koagulační zkumavka Vacutainer [vlastní zdroj].....	27
Obrázek 5 – Zkumavka s K ₂ EDTA Vacutainer [vlastní zdroj]	28
Obrázek 6 – Agregometr PAP-8E [vlastní zdroj].....	30
Obrázek 7 – Princip agregometrie a vznik agregátů, upraveno [5].....	31
Obrázek – 8 Graf agregační křivky [vlastní zdroj].....	32
Obrázek 9 – Reagent EPI [vlastní zdroj].....	35
Obrázek 10 – Reagent ADP [vlastní zdroj]	35
Obrázek 11 – Závislost agregace na čase po přidání snížených koncentrací ADP, křivka 1 – 2,34 $\mu\text{mol/l}$; křivka 2 – 1,17 $\mu\text{mol/l}$; křivka 3 – 0,58 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj].....	36
Obrázek 12 – Závislost agregace na čase po přidání nízkých koncentrací EPI, křivka 1 – 1,0 $\mu\text{mol/l}$; křivka 2 – 0,1 $\mu\text{mol/l}$; křivka 3 – 0,05 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj].....	37
Obrázek 13 Ukázka histogramu nespĺňující podmínku normálního rozložení dat [vlastní zdroj].....	38
Obrázek 14 – Ukázka histogramu splňující podmínku normálního rozložení dat [vlastní zdroj].....	38
Obrázek 15 – Kontrola kvality měření: MA v čase [vlastní zdroj].....	41
Obrázek 16 – Kontrola měřicích kanálů [vlastní zdroj]	41
Obrázek 17 – Histogram z ADP o koncentraci 2,34 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]	44
Obrázek 18 – Histogram z ADP o koncentraci 1,17 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]	44
Obrázek 19 – Histogram z ADP o koncentraci 0,58 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]	44
Obrázek 20 – Histogram z EPI o koncentraci 1,0 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]	45
Obrázek 21 – Histogram z EPI o koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]	45
Obrázek 22– Histogram z EPI o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ [vlastní zdroj]	45
Obrázek 23 – Závislost agregace na čase po přidání nízkých koncentrací EPI v roce 2018, křivka 1 – 11,0 $\mu\text{mol/l}$; křivka 2 – 1,1 $\mu\text{mol/l}$; křivka 3 – 0,55 $\mu\text{mol/l}$	47
Obrázek 24 – Grafické znázornění závislosti průměrné agregace na koncentraci EPI	48

Obrázek 25 – Grafické znázornění závislosti průměrné agregace na koncentraci EPI-
2018..... 49

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – Diagnostická kritéria a laboratorní klasifikace SPS dle Mammena a Bicka (upraveno) [22, 25]	24
Tabulka 2– Příprava koncentrací ADP [vlastní zdroj]	36
Tabulka 3 –Příprava koncentrací EPI [vlastní zdroj]	36
Tabulka 4 – Hodnoty MA při kontrole kvality [vlastní zdroj]	40
Tabulka 5 – Naměřené hodnoty MA dárců v různých koncentracích EPI a ADP [vlastní zdroj].....	42
Tabulka 6 – Deskriptivní statistika [vlastní zdroj].....	43
Tabulka 7 – Referenční rozmezí [vlastní zdroj]	46
Tabulka 8 – Deskriptivní statistika pro data z roku 2018 [vlastní zdroj]	46
Tabulka 9 – Referenční rozmezí stanovené v roce 2018 [vlastní zdroj]	46
Tabulka 10 – Deskriptivní statistika pro další koncentrace EPI [vlastní zdroj]	47
Tabulka 11 – Referenční rozmezí pro další koncentrace EPI [vlastní zdroj].....	47
Tabulka 12 – Wilcoxonův párový test [vlastní zdroj]	48