



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Přínos laboratorní diagnostiky
fibrin/fibrinogen degradačních produktů
(FDP LIA) v plazmě**

**The Benefit of Laboratory Determination
of plasma Fibrin/Fibrinogen Degradation
Products (FDP LIA)**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce: Michaela Dvořáková

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Václava Mašková

Kladno 2021



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Dvořáková** Jméno: **Michaela** Osobní číslo: **487474**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Přínos laboratorní diagnostiky fibrin/fibrinogen degradačních produktů (FDP LIA) v plazmě

Název bakalářské práce anglicky:

The Benefit of Laboratory Determination of plasma Fibrin/Fibrinogen Degradation Products (FDP LIA)

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce je laboratorní diagnostika FDP. V teoretické části bude popsán význam a LIA metodika stanovení FDP. Laboratorní nález zvýšené plazmatické koncentrace FDP slouží k potvrzení hyperfibrinolytického stavu provázejícího DIC (diseminovanou intravaskulární koagulopatii) nebo primární hyperfibrinolýzu. Imunoturbidimetrické měření FDP lze využít též ke sledování trombolytické - fibrinolytické léčby (rozpuštění sraženin, trombů). Tyto sraženiny se někdy fibrinolyticky včas a zcela neodbourají, a přetrvávají tak v krevním řečišti, kde mohou způsobit hlubokou žilní trombózu nebo plicní embólii. Zvýšení koncentrace degradačních produktů fibrinu/fibrinogenu tedy koresponduje se zvýšením proteinů akutní fáze jako prokoagulačního a zároveň fibrinolytického procesu. Celkové FDP - fibrin(ogen) degradační produkty zahrnují v sobě skupinu nerozpustných fragmentů, kterou jsou pro stabilizovaný fibrin specifitější - tzv. D-dimery. V praktické části budu hledat hypotetický vztah mezi plazmatickými koncentracemi D-Dimerů (DDim) a FDP změřenými na ACL TOP CTS (LIA diagnostika Instrumentation Laboratory). Tyto vztahy se pokusím zpracovat graficky, příp. odvodit možná pravidla a porovnat získané závěry s dostupnou literaturou.

Seznam doporučené literatury:

- [1] PROCHASKA, Jürgen H., FRANK Bernd a NAGLER Markus, Age related diagnostic value of D-dimer testing and the role of inflammation in patients with suspected deep vein thrombosis, Scientific Reports, číslo 7, 2017, Červenec, 1-10 s., DOI: 10.1038/s41598-017-04843-x.
- [2] LEVI M., Disseminated intravascular coagulation, ed. 7th ed. , Philadelphia, PA: Elsevier, 2018, chap 139 s., In: Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, et al, eds. Hematology: Basic Principles and Practice, ISBN 9780323357623
- [3] LITVINOV Rustem, WEISEL John, What Is the Biological and Clinical Relevance of Fibrin? , Semin Thromb Hemost , ročník 42, číslo 4, 2016, Červen, 333-43 s., DOI: 10.1055 / s-0036-1571342

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

RNDr. Václava Mašková

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **21.9.2020**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2022**

prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Přínos laboratorní diagnostiky fibrin/fibrinogen degradačních produktů (FDP LIA) v plazmě vypracovala samostatně pouze 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 05.05.2021

.....
Michaela Dvořáková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala především vedoucí mé bakalářské práce, paní RNDr. Václavě Maškové, za odborné vedení, cenné rady a poskytnuté materiály, za velkou míru ochoty a trpělivosti, vždy vlídný přístup a v neposlední řadě za čas, který mně a mé práci věnovala. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Ludmile Landové, Ph.D. za pomoc při statistickém vyhodnocování naměřených dat. Mé poděkování patří také panu primáři plk. gšt. MUDr. Miloši Bohoňkovi, Ph.D. za umožnění realizace praktické části mé bakalářské práce na Oddělení hematologie a krevní transfuze Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice Praha.

ABSTRAKT

Předmětem této bakalářské práce je laboratorní stanovení fibrin/fibrinogen degradačních produktů (FDP) a jejich specifické podmnožiny – D-dimerů v plazmě.

Teoretická část pojednává o hemostáze – o primární hemostáze, plazmatickém koagulačním systému a fibrinolytickém systému. Dále je zde zmíněna trombolytická léčba a diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC). Je zde též popsána koagulopatie v souvislosti s onemocněním COVID-19, což je velmi aktuální téma, neboť se ukazuje, že u pacientů s touto nákazou mohou D-dimery sloužit jako významný diagnostický i prognostický marker.

Praktická část se zabývá hledáním vztahu mezi plazmatickými koncentracemi D-dimerů a FDP naměřenými vysoce citlivou LIA metodou. Porovnávali jsme koncentrace D-dimerů a FDP změřené v 70 vzorcích plazmy. Vzhledem k probíhající koronavirové pandemii jsme porovnali i hodnoty naměřené u pacientů COVID-19 negativních a COVID-19 pozitivních. Data jsme graficky zpracovali a snažili se odvodit možná pravidla. Zjistili jsme, že vztah mezi plazmatickými koncentracemi D-dimerů a FDP nepochybně existuje, ale konkrétní pravidla pro tento vztah není možné určit. Potvrdilo se, že koncentrace D-dimerů bývá u pacientů COVID-19 pozitivních většinou zvýšená, často v souvislosti s přítomností mikrotrombotických změn.

Klíčová slova

fibrin/fibrinogen degradační produkty (FDP); D-dimery; hemostáza; fibrinolytický systém; trombolytická léčba; diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC); latexová imunoaglutinační analýza (LIA)

ABSTRACT

The aim of the bachelor thesis is the laboratory determination of fibrin/fibrinogen degradation products (FDP) and their specific subset – D-dimers in plasma.

The theoretical part deals with hemostasis – with primary hemostasis, plasmatic coagulation system and fibrinolytic system. Thrombolytic therapy and disseminated intravascular coagulation (DIC) is here mentioned. Coagulopathy in connection with COVID-19 is also described here. It is very topical issue because D-dimers can help us as an useful and significant marker by COVID-19 patients.

The practical part deals with seeking relation between plasmatic concentrations of D-dimers and FDP measured by highly sensitive LIA method. We were comparing concentrations of D-dimers and FDP measured in 70 plasmatic samples. Considering the fact of ongoing COVID-19 pandemic we compared values of positive and negative COVID-19 patients, too. We put these data into charts and we have been trying to deduce the possible definite rules. We have found out that the relation between the plasmatic concentrations of D-dimers and FDP really exist however the concrete rules cannot be determined. It has been confirmed that the increased concentration of D-dimers have mostly been occurred by the COVID-19 patients, often in context with microthrombosis.

Key words

fibrin/fibrinogen degradation products (FDP); D-dimers; hemostasis; fibrinolytic system; thrombolytic therapy; disseminated intravascular coagulation (DIC); latex immunoagglutination assay (LIA)

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce.....	11
3	Přehled současného stavu.....	12
3.1	Hemostáza	12
3.1.1	Hemostáza v závislosti na věku.....	12
3.1.2	Složky hemostázy.....	13
3.2	Primární hemostáza	15
3.2.1	Trombocyty	15
3.2.2	Tvorba primární hemostatické zátky	16
3.3	Plazmatický koagulační systém.....	18
3.3.1	Vývoj pohledu na koagulační děje	18
3.3.2	Průběh hemokoagulace	19
3.3.3	Koagulační faktory.....	22
3.3.4	Inhibitory koagulace	29
3.4	Fibrinolytický systém.....	33
3.4.1	Plazminogen a plazmin	33
3.4.2	Štěpné produkty fibrinogenu a fibrinu	34
3.4.3	Hyperfibrinolýza a hypofibrinolýza.....	37
3.4.4	Aktivátory fibrinolýzy	38
3.4.5	Inhibitory fibrinolýzy	39
3.5	Trombolytická léčba	41
3.6	Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC).....	43
3.6.1	Rozdělení DIC.....	44

3.6.2	Stádia DIC	45
3.6.3	Diagnostika DIC	46
3.6.4	Léčba DIC	47
3.7	Koagulopatie v souvislosti s onemocněním COVID-19	47
3.8	Význam stanovení FDP a D-dimerů	49
4	Metodika	51
4.1	Definice souboru	51
4.1.1	Kontrolní soubor	51
4.2	Preanalytická fáze	51
4.2.1	Příprava pacienta k odběru a odběr vzorku	51
4.2.2	Transport vzorku	53
4.2.3	Příjem vzorku v laboratoři	53
4.2.4	Zpracování vzorku před vlastní analýzou	53
4.2.5	Uchovávání vzorku	53
4.3	Analytická fáze	54
4.3.1	Analytické vlastnosti laboratorní metody	54
4.3.2	Automatický koagulometr	55
4.3.3	Soupravy HemosIL k měření FDP	57
4.3.4	Princip stanovení	63
4.3.5	Postup měření	63
4.3.6	Mez detekce a možné interference	64
4.3.7	Referenční rozmezí	65
4.4	Postanalytická fáze	65
5	Výsledky	67

5.1	Kalibrátory.....	67
5.2	Kontroly kvality.....	67
5.3	Vzorky celého kontrolní souboru.....	68
5.4	Vzorky pacientů COVID-19 negativních.....	74
5.5	Vzorky pacientů COVID-19 pozitivních.....	79
5.6	Statistické zhodnocení.....	84
6	Diskuze.....	87
7	Závěr.....	93
8	Seznam použitých zkratk.....	95
9	Seznam použité literatury.....	98
10	Seznam použitých obrázků.....	106
11	Seznam použitých tabulek.....	108

1 ÚVOD

„Zástava krvácení je jedním z nejdůležitějších ochranných mechanismů zajišťujících správné fungování organismu“ [1, s. 317]. Jedná se o složitý proces zahrnující několik fází, které jsou souhrnně označovány jako hemostáza.

Nezbytnou součástí tohoto procesu je játry syntetizovaný glykoprotein fibrinogen, bez něhož se neobejde tvorba krevní zátky. Aby však mohlo ke vzniku stabilní zátky dojít, je zapotřebí nejprve přeměnit rozpustný fibrinogen na nerozpustný fibrin pomocí trombinu, což následně vede k vytvoření fibrinové sítě. Tato síť významně napomáhá zástavě krvácení. Jakmile se poškozené místo úspěšně zacelí, fibrinová síť se začne za pomoci enzymu plazminu štěpit na fibrin/fibrinogen degradační produkty (dále jen FDP). A právě laboratorní diagnostika FDP v plazmě a její přínos je pro tuto bakalářskou práci stěžejní.

Zvýšená plazmatická koncentrace FDP je důležitým laboratorním nálezem vyskytujícím se při hyperfibrinolytickém stavu, který doprovází diseminovanou intravaskulární koagulopatii (dále jen DIC) nebo primární hyperfibrinolýzu, dále při žilní trombóze či plicní embolii. Laboratorní stanovení FDP je využíváno též k monitorování rozpouštění sraženin při trombolytické léčbě.

Mezi FDP patří i tzv. D-dimery, které bývají nazývány jako markery trombofilních stavů. Toto označení si získaly díky tomu, že jejich zvýšená koncentrace v plazmě může poukazovat na přítomnost krevní sraženiny. Laboratorní vyšetření D-dimerů s negativním výsledkem má klinický význam zejména pro vyloučení nebezpečných tromboembolických stavů – hluboké žilní trombózy a plicní embolie.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je pokusit se nalézt hypotetický vztah mezi plazmatickými koncentracemi D-dimerů a FDP nově doměřenými na ACL TOP CTS, grafické zpracování tohoto vztahu, případné odvození možných pravidel a porovnání získaných závěrů s dostupnou literaturou.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Hemostáza

Za běžných okolností, kdy není narušena integrita cévy, se u zdravých jedinců krev srážet nemá. Jakmile ale dojde k poranění cévy, začíná se v cévním řečišti odehrávat tzv. hemostáza neboli proces krevního srážení. Jde o komplexní a přísně regulovaný děj, na němž se podílí řada mechanismů a složek, které společně směřují k zástavě krvácení. Hemostatický mechanismus je zcela nezbytný pro existenci živého organismu [2; 3; 4].

Při poškození cévní výstelky dochází k přeměně tekuté krve na krevní sraženinu, jejíž úloha spočívá v uzavření porušeného místa. Zabrání se tak úniku krve z cévy. Po zhojení rány se krevní sraženina rozpouští a cirkulace tekuté krve se obnovuje [2; 4].

Za určitých patologických okolností však může ke srážení krve docházet i v případech, kdy céva není narušena. Takové srážení krve ovšem nebývá žádoucí a může vést ke komplikacím. Děje se tak v souvislosti s některými chorobami, nepříznivými stavy či vrozenými defekty [2].

3.1.1 Hemostáza v závislosti na věku

Hemostáza je flexibilní proces, který se s přibývajícím věkem vyvíjí. Na základě tohoto vývoje rozlišujeme hemostázu fetální a neonatální, hemostázu dětského věku, hemostázu dospělých a hemostázu pozdního věku [2; 4].

Hemostáza plodu a novorozence není vyzrálá. Kolem 10. týdne se ve fetu začínají syntetizovat koagulační proteiny a v průběhu těhotenství jejich koncentrace stoupá. V období mezi 30. až 38. týdnem jejich hladina dosahuje polovičních až tříčtvrtěných hodnot vyskytujících se u novorozence. Zralý

novorozenec má aktivity vitamin K-dependentních faktorů a faktorů kontaktu v porovnání s dospělými pouze třetinové až poloviční. Přibližně po 6. měsíci života se jejich aktivity již přibližují hodnotám dospělých. Koncentrace fetálního fibrinogenu je stejná jako koncentrace fibrinogenu dospělých, ovšem jeho polymerační schopnost je snížena [2].

V dětském věku jsou aktivity faktorů vitamin K-dependentních a faktorů kontaktní fáze asi o 20 % nižší než u dospělých, ale aktivity faktorů V, VIII, XIII a von Willebrandova faktoru (dále jen vWF) jsou skoro srovnatelné. U dětí se téměř nevyskytují trombózy a trombotické příhody. Pokud dojde k porušení hemostatické rovnováhy, která je v tomto období velmi křehká, objevují se především krvácivé komplikace [2].

Jako hemostáza pozdního věku se označuje hemostáza člověka staršího 50 let. V tomto věku stoupá hladina fibrinogenu, F VIII a F VIIa a naopak klesá hladina protrombinu, F X a antitrombinu. S přibývajícím věkem se též podstatně zvyšuje koncentrace molekulárních markerů aktivace koagulace a fibrinolýzy, kterými jsou F IX, F X, F I, F II, F IIa a F III (tzv. trombin-antitrombin komplex, dále jen TAT) a také D-dimery [2].

3.1.2 Složky hemostázy

Hlavními složkami hemostázy jsou: cévní stěna, tkáňová složka, trombocyty a plazmatický koagulační systém. Nelze však opomenout, že se na tomto procesu podílí všechny látky nacházející se v krvi a na vnitřní straně cévy včetně erytrocytů, leukocytů, lipidů, bílkovin, minerálů a dalších [2; 3; 4].

- **Cévní stěna**

Funkce cév nespočívá pouze v zajištění oběhu krve tělem, mají také nesmírný význam pro hemostázu. Cévní stěna má schopnost vazokonstrikce, je místem

interakce a zároveň zdrojem a zásobárnou. Svou roli v hemostatických dějích hraje zejména endotel a subendotelové struktury [2; 3; 4].

Endotelové buňky pokrývají vnitřní stranu cév a představují aktivní povrch mezi krví a cévní stěnou. Jejich úkolem je dohlížet na látkovou výměnu mezi krví a tkáněmi, čímž se podílí na udržení cévní homeostázy. V endoteliích se také odehrává cyklus kyseliny arachidonové, v jehož důsledku je produkována celá řada látek důležitých pro hemostázu. Těmito látkami jsou prostacyklin, oxid dusnatý, endonukleázy, trombomodulin, tkáňový aktivátor plazminogenu (dále jen t-PA), urokináza (dále jen u-PA), inhibitor aktivátoru plazminogenu (dále jen PAI-1) a heparan sulfát. Prostacyklin a oxid dusnatý stojí za změnou průsvitu cévy. Prostacyklin a endonukleázy brání agregaci trombocytů. Trombomodulin aktivuje protein C (dále jen PC). Aktivaci či inhibici fibrinolýzy zapříčiňují t-PA, u-PA a PAI-1. Heparansulfát zesiluje účinek antitrombinu a trombomodulinu. Bylo zjištěno, že nesprávné fungování endotelových buněk má souvislost s celou řadou chorobných stavů, např. s aterosklerózou, hypertenzí a diabetem [2; 3; 4; 5].

Subendotelové struktury se za přirozených podmínek setkávají s krví pouze v případě poranění. Jsou charakteristické tím, že podporují srážlivost krve a aktivují současně všechny hemostatické systémy [2; 3; 4; 5].

- **Tkáňová složka**

Poraněná tkáň a buňky v jejím okolí uvolňují adenosindifosfát (dále jen ADP) a tkáňový faktor (dále jen TF). ADP indukuje primární agregaci a díky TF probíhá přeměna protrombinu na trombin [2].

- **Trombocyty**

Trombocyty nacházejí hlavní uplatnění v primární hemostáze. Zajišťují interakce mezi krví a cévní stěnou a mají tzv. prokoagulační funkci, neboť poskytují fosfolipidový povrch pro navázání koagulačních faktorů. Na hemostáze se podílejí také tím, že váží F VIII a F V a aktivují F XII a F XI [2; 5].

- **Plazmatický koagulační systém**

Plazmatický koagulační systém v sobě zahrnuje koagulační faktory, inhibitory a složky fibrinolýzy. Cílem tohoto systému je vytvořit stabilní fibrinové koagulum. Děje se tak v enzymatické kaskádě a celý proces je pečlivě regulován a kontrolován [4; 5].

3.2 Primární hemostáza

V případě, že se poruší cévní stěna, dochází nejprve k vazokonstrikci, následně k adhezi, aktivaci a agregaci trombocytů, až se vytvoří tzv. primární hemostatická zátka. Destičkový agregát uzavře narušené místo, čímž se krvácení zastaví. Primární hemostáza je tedy definována jako proces tvorby primární hemostatické zátky, na kterém se podílí zejména krevní destičky, cévní složka a adhezivní proteiny [2; 3; 4].

3.2.1 Trombocyty

Trombocyty jsou bezjaderná tělíska oválného diskoidního tvaru. Jejich vznik probíhá v kostní dřeni odštěpením z megakaryocytů (fragmentací jejich cytoplazmy) [3; 5].

Za normálních podmínek cirkulují v krevním oběhu asi 2/3 destiček. Zbývající 1/3 je uchovávána ve slezině jako tzv. slezinný pool a je využívána např. při

větších ztrátách krve. Fyziologické rozmezí počtu trombocytů v krvi je $150\text{--}400 \times 10^9/l$ [5; 6].

Vzhledem k tomu, že trombocyty nemají jádro, nemají ani schopnost se dělit. Jejich životnost je 7 až 10 dní, poté zanikají ve slezině, játrech nebo ještě v kostní dřeni [3; 7].

Pro správný průběh procesu primární hemostázy je zapotřebí nejen normální počet a normální funkce trombocytů, ale také to, aby se v trombocytech nacházely určité komponenty – především granula [3].

Trombocyty zastávají v organismu důležitou funkci – vytvářejí primární hemostatickou zátku nezbytnou pro zástavu krvácení. Jejich celkový prokoagulační efekt zajišťuje provázanost primární hemostázy a plazmatické koagulace [3].

3.2.2 Tvorba primární hemostatické zátky

Primární hemostáza je proces probíhající několik minut. Za běžné situace by krvácení mělo být zastaveno do 5 minut [3].

Dojde-li k poranění cévy, přichází ve zlomcích sekund odpověď v podobě vazokonstrikce a céva se zužuje. V důsledku narušení endotelové výstelky se obnažuje pojivová tkáň nacházející se pod endotelem. V subendoteliálním prostoru je tak vystaven kolagen [2; 4; 5; 8].

Trombocyty se připojují k odhaleným receptorům kolagenních vláken prostřednictvím dvou hlavních glykoproteinových destičkových receptorů (GP Ia/IIa/IIb a GP Ib/V/IX). Tento proces se nazývá adheze, je nepostradatelnou součástí tvorby krevní zátky a probíhá za účasti adhezivních proteinů – vWF a fibronektinu [3; 4; 8].

Po adhezi trombocytů, aktivaci receptorů glykoproteinové povahy a spuštění kaskády biochemických a metabolických pochodů nastává aktivace krevních destiček. Ta vede ke změnám jejich tvaru, kdy se trombocyty formují do podoby připomínající dendritickou buňku. Granula se centralizují, trombocyt se zakulacuje a objevují se pseudopodia. V průběhu aktivace krevních destiček se uvolňují tzv. proagregační působky, především PF4, PDGF, pTGFβ, fibrinogen, ADP a TXA2 a také se aktivují receptory GP IIb/IIIa. Aktivace trombocytů je mimo jiné doprovázena tzv. flip flop fenoménem. Jde o to, že v klidovém stavu sestávají vnější membrány krevních destiček z fosfatidylcholinu a sfingomyelinu, zatímco na vnitřní straně membrány se nachází negativní fosfatidylserin a fosfatidylinositol. Po aktivaci trombocytů však dochází k přesmyku, kdy se negativně nabitě fosfolipidy z vnitřních membránových struktur přesouvají do struktur vnějších, což je také spojeno se změnou náboje. Vzniká tím povrch důležitý pro pozdější koagulační reakce, neboť fosfolipidy slouží jako kotvení body a aktivátory koagulačních faktorů, a napomáhají tak zesilování hemostatického procesu v místě vaskulárního poranění [2; 3; 4; 5; 8].

ADP, který se vyplavuje z granul aktivovaných trombocytů, a TXA2, který vzniká metabolismem kyseliny arachidonové, výrazně podněcují agregaci trombocytů – váží se na receptory okolních neaktivních destiček a způsobují jejich aktivaci. Shlukování trombocytů souvisí s tzv. lepivostí. Ta je zprostředkována tím, že se obnažují destičkové membránové receptory GP IIb/IIIa, na ně se navazují bivalentní proteiny (fibrinogen, vFW a vitronektin) a trombocyty se vzájemně spojují – dochází k agregaci. Rozlišujeme agregaci primární (tzv. reverzibilní) a sekundární (tzv. ireverzibilní). Primární agregace je vyvolána ADP uvolňujícím se z okolní perivaskulární tkáně a jejím výsledkem je vznik nestabilního seskupení destiček. Sekundární agregace se již účastní proagregační působky (ADP a TXA2) a trombospodin, díky němuž mezi destičkami vznikají můstky a tím se jejich seskupení zpevňuje. Postupně se

aktivují další a další destičky, celý děj zesiluje (probíhá tzv. amplifikace), a primární hemostáza tak vrcholí tvorbou rozpustného bílého trombu – primární hemostatické zátky [2; 3; 4; 5; 9].

V závěru primární hemostázy se uplatňuje proces tzv. retrakce, při němž dochází ke smrštění vzniklé krevní zátky. V důsledku toho se z koagula vypuzuje sérum, které následně funguje jako podpůrný mechanismus k zacelení rány. Trombocyty se pomocí svých výběžků přichytí k fibrinovým vláknům. Poté dojde k retrakci kontraktilních bílkovin krevních destiček, což zapříčiní smrštění koagula. Retraktibilita je jednou z důležitých schopností trombocytů a své uplatnění nalézá zejména při reparativních pochodech. V případě, že fibrinová síť vznikající v procesu koagulace nezafixuje destičkový agregát, nastane retrakce, tj. agregát se smrští a odplaví se [3; 5].

3.3 Plazmatický koagulační systém

Hlavním cílem plazmatického koagulačního systému je vytvoření nerozpustného fibrinu, jehož pevná vlákna slouží jako fibrinová síť, do níž se zachytávají krevní buňky. Vzniká tak stabilní fibrinová zátka a bílý trombus se mění na trombus červený. Krevní srážení je tímto zakončeno [2; 5; 9].

Hemokoagulace se účastní nejen celá řada koagulačních faktorů, ale také inhibitorů. Jedná se o plazmatické proteiny, které se přímo zapojují do procesu krevního srážení [3].

3.3.1 Vývoj pohledu na koagulační děje

V 60. letech byla publikována teorie rozdělující koagulační kaskádu podle způsobu, jakým je aktivována, na systém vnitřní a vnější. Tato teorie se zakládala na tom, že vnitřní systém se aktivuje po kontaktu F XII a F XI s obnaženým kolagenem, který představuje aktivní povrch, a aktivaci vnějšího systému

zajišťuje TF uvolňující se např. při poranění. Vnitřní systém byl považován za důležitější [3; 5].

90. léta přinesla teorii novou, neboť bylo prokázáno, že oba koagulační systémy jsou vzájemně provázané a není možné, aby v organismu působily odděleně. Oproti původní teorii se zjistilo, že primární roli při koagulačních dějích probíhajících v organismu (*in vivo*) má vnější systém. Vnitřní systém pak podněcuje koagulaci především v uměle vytvořených podmínkách (*in vitro*). Nová teorie se zakládá na rozdělení koagulačního procesu do tří fází – iniciace, amplifikace a propagace. Pro rozběhnutí koagulace je nepostradatelný tzv. systém vnější tenázy a pro zesílení a urychlení koagulačních dějů je velmi důležitý tzv. systém vnitřní tenázy. Nezbytnou součástí celého procesu jsou také povrchy buněk, na nichž se tvoří koagulační komplexy. Iniciační fáze probíhá především na povrchu monocytů, amplifikační a propagační fáze je soustředěna na povrch trombocytů [2; 3; 4; 5]. Také se ukázalo, že „průběh koagulačních reakcí není přísně kaskádovitý, dochází k celé řadě zpětných vazeb“ [4, s. 99].

3.3.2 Průběh hemokoagulace

- **Iniciace**

Iniciační fázi procesu koagulace spouští TF a F VIIa. Jedná se o tzv. primární cestu koagulace (dříve označovanou jako vnější). TF se za normálních podmínek na endoteliích cév, krevních elementech ani v plazmě nevyskytuje, jeho uvolňování nastává např. při narušení cévní stěny, při zánětu, ale i v dalších jiných případech. U F VIIa je tomu naopak – je v krvi v malém množství přítomen stále. Uvolněný TF a volně cirkulující F VIIa se spolu váží a vzniká dimerní komplex (TF, F VIIa) [2; 3; 4].

Následně se za účasti destičkových fosfolipidů (dále jen PL) a vápenatých iontů (dále jen Ca^{2+}) vytváří tetramerní komplex označovaný jako vnější tenáza (TF, F VIIa, PL, Ca^{2+}). Komplex vnější tenázy poté aktivuje F X na F Xa [4].

F Xa aktivuje F V na F Va a společně s ním, PL a Ca^{2+} tvoří komplex protrombinázu (F Xa, F Va, PL, Ca^{2+}). Tento komplex přeměňuje protrombin na jeho aktivní formu – trombin. Trombinu ovšem vzniká malé množství, které není dostačující pro rozštěpení takového množství fibrinogenu, aby mohlo vzniknout fibrinové koagulum, ale postačuje ke zpětnému aktivování F XI, F IX, kofaktorů F VIII, F V a trombocytů nacházejících se v místě poškození tkáně. Tímto trombin přebírá vedení koagulace a přichází fáze amplifikace [4; 8; 9].

Paralelně s tvorbou komplexu vnější tenázy a komplexu protrombinázy dochází také k aktivaci inhibitoru tkáňového faktoru (dále jen TFPI). Vzhledem k tomu, že působení komplexu vnější tenázy je vymezené pouze na povrchy buněk, na nichž je přítomen TF, nastává po navázání TFPI na TF blokáce této aktivační cesty. V důsledku toho se koagulace poté uskutečňuje pouze prostřednictvím tzv. přídatné cesty koagulace (dříve označované jako vnitřní) v amplifikační a propagační fázi [2; 4].

- **Amplifikace**

V amplifikační fázi koagulačního procesu se pomocí zpětných mechanismů rozbíhá tzv. přídatná cesta koagulace (dříve označovaná jako vnitřní). Působením malého množství trombinu, jenž vznikl v iniciační fázi díky komplexům vnější tenázy a protrombinázy, dochází k aktivaci F XI, F IX a kofaktorů F VIII a F V. Tento krok výrazně napomáhá katalýze (amplifikaci) koagulačních dějů [4; 10].

F XIa následně aktivuje F IX na F IXa. Za účasti F IX, kofaktoru F VIIIa, PL a Ca^{2+} vzniká tetramerní komplex zvaný vnitřní tenáza (F IXa, F VIIIa, PL, Ca^{2+}), který je důležitý pro aktivaci F X [4; 9].

Působením trombinu se aktivují trombocyty a leukocyty, což vede k přemístění negativně nabitých fosfolipidů (fosfatidylserinu a fosfatidylinositolu) na vnější membránu destiček. Tyto exprimované fosfolipidy umožňují vázání koagulačních faktorů na povrch aktivovaných destiček, které se v procesu adheze a agregace nashromáždily v oblasti poranění. Účinkem trombinu se aktivují také endotelie, čímž se dostávají do prokoagulačního stavu [2; 9].

- **Propagace**

Ve fázi propagace se aktivuje F X na F Xa, který společně s F Va, PL a Ca^{2+} vytvoří komplex protrombinázy (F Xa, F Va, PL, Ca^{2+}). Za působení tohoto komplexu se již přeměňuje protrombin na trombin. [4; 9].

Trombinu je produkováno velké množství, proto se tento děj někdy označuje jako tzv. trombin burst. Takové množství trombinu je již dostačující pro účinnou přeměnu glykoproteinu fibrinogenu na fibrin. Vznikají monomery fibrinu, jež samovolně polymerují. Stabilizaci nestabilních fibrinových polymerů zajišťuje F XIIIa. Zesíťování fibrinu je velmi důležitým krokem v koagulační kaskádě, protože umožňuje vytvoření základny pro zralou sraženinu a zformování koagula do ustálenější struktury. Výsledným produktem je stabilní fibrinové koagulum [2; 4; 8; 9].

3.3.3 Koagulační faktory

Hemokoagulace je velmi komplexní děj, jenž se neobejde bez celé řady látek přítomných v plazmě – tzv. plazmatických faktorů. Mezi plazmatické faktory se řadí koagulační faktory, inhibitory koagulace a faktory fibrinolýzy [3; 5].

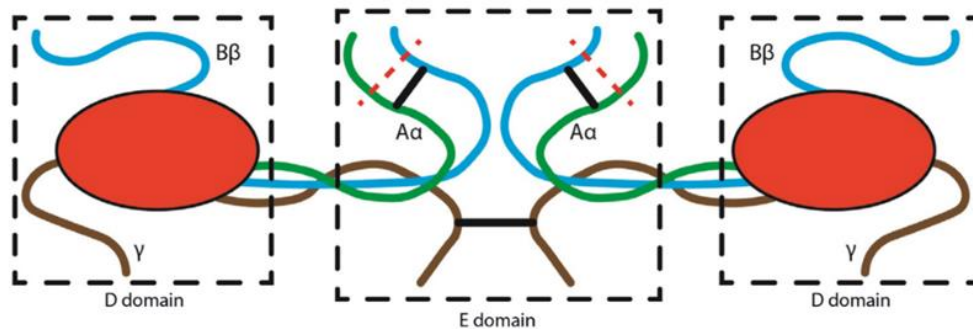
„Koagulační faktory jsou označovány římskými číslicemi v posloupnosti, v níž byly objeveny“ [4, s. 98]. Připojení písmene „a“ slouží k označení jejich aktivované formy [4].

Syntéza většiny koagulačních faktorů probíhá v játrech. Všechny koagulační faktory, vyjma TF, se nacházejí v plazmě ve formě proenzymů. Aby však mohly správně fungovat, potřebují proteolytické štěpení, které umožní přeměnu prvotního proenzymu na koagulačně aktivní enzym. F VII se v tomto ohledu od ostatních faktorů do jisté míry vymyká, protože jako jediný z nich se v plazmě vyskytuje stále v aktivované formě jako F VIIa, ovšem ve velmi nízkých koncentracích. Z převažující části F VII v plazmě koluje v neaktivní formě jako proenzym [2; 4].

- **Faktor I – fibrinogen**

Fibrinogen je nejvíce zastoupeným koagulačním faktorem v plazmě, kde se jeho koncentrace fyziologicky pohybuje v rozmezí 1,80–4,20 g/l. Jedná se o glykoprotein nacházející se nejen v plazmě, ale i v granulách trombocytů. Je syntetizován v játrech [3; 5; 6].

Má podobu dimeru, který sestává ze tří různých párů polypeptidových řetězců – $A\alpha$, $B\beta$ a γ . Tyto řetězce jsou pospojovány disulfidickými můstky. Řetězce $A\alpha$ pomáhají tvořit střed molekuly známý jako doména E a řetězce $B\beta$ a γ tvoří po obou stranách části nazývané jako domény D [2; 8].



Obrázek 1 – Protein fibrinogen. **D domain** – doména D; **E domain** – doména E [8]

Pro fibrinogen jsou velmi důležité vápenaté ionty, pro něž se na jeho molekule vyskytují tři vazebná místa. Význam Ca^{2+} je u fibrinogenu trojí – jsou podstatné pro zajištění jeho stabilní struktury, podílí se na regulaci polymerace fibrinových vláken a v případě, že obsadí všechna pro ně určená vazebná místa, ochraňují fibrinogen před plazminem, který není schopen za takových okolností fibrinogen štěpit [2; 5].

Fibrinogen podléhá štěpení buď za účasti trombinu, čímž vzniká fibrin, nebo za účasti plazminu, což má za následek vznik FDP. Mimo trombinu a plazminu ho mohou štěpit také hadí jedy (např. reptiláza) [2; 5].

Aktivní forma fibrinogenu, fibrin, napomáhá vzájemné vazbě krevních destiček a podporuje jejich vazbu na stěnu cév. Fibrinogen se řadí mezi proteiny akutní fáze. Jeho koncentrace se zvyšuje v situacích jako je cévní poškození, akutní infekce, zánět, chirurgický zákrok či infarkt myokardu. V důsledku těchto stavů dochází ke zvýšení produkce fibrinogenu v játrech, a jeho hladina tak během následujících 3–5 dnů stoupá, poté se navrácí k normálu. Zvýšená hladina fibrinogenu se objevuje také v těhotenství [2; 3; 5].

- **Faktor II – protrombin**

Protrombin je faktorem patřícím do skupiny serinových proteáz. Je syntetizován v játrech [5].

Účinkem protrombinázy je štěpen do své aktivní podoby – trombinu. Děje se tak po jeho navázání na negativně nabitě fosfolipidy pomocí Ca^{2+} [2].

Pro koagulaci má trombin nesmírný význam díky své schopnosti působit jak prokoagulačně, tak antikoagulačně. Uplatňuje se nejen při štěpení fibrinogenu na fibrin, ale slouží také jako podpůrný mechanismus pro řadu dalších reakcí. Jde o aktivaci buněk, jejichž povrchy jsou důležité pro průběh koagulačních reakcí (např. trombocyty), dále o aktivaci F V, F VIII, F XIII a F XI, čímž napomáhá amplifikaci probíhající koagulace a stabilizaci vznikající zátky, ale zároveň o inhibici F Va a F VIIIa cestou aktivovaného proteinu C (dále jen APC) a přímé štěpení kofaktorů vyšším množstvím trombinu. Inhibice F Va a F VIIIa a štěpení kofaktorů jsou reakce směřující k inaktivaci kofaktorů krevního srážení a jsou velmi potřebné pro zamezení nadměrnému srážení krve. Trombin též podněcuje vznik a vyměšování t-PA, vWF a dalších jiných látek na endotelu [2; 3; 5].

Mimo koagulačního systému hraje roli i ve fibrinolytickém systému. Má zásadní význam nejen pro hemostázu, ale i pro zánětlivé a proliferační procesy [3; 5].

- **Faktor III – tkáňový faktor (TF)**

Tkáňový faktor se od ostatních faktorů odlišuje tím, že je syntetizován již zcela funkční a pro svou činnost nevyžaduje proteolytické štěpení. Je to integrální membránový glykoprotein nacházející se na strukturách, které se za fyziologických podmínek nedostávají do styku s krví – zejména na subendoteliálních buňkách, svalových buňkách a fibroblastech [2; 3].

S krví se TF setkává ve chvíli, kdy se poruší cévní stěna. Uplatňuje se ale i v případech, kdy celistvost cévy zůstává zachována – např. při stimulaci endotoxiny, cytokiny a trombinem. Za účasti těchto stimulů vzrůstá produkce

TF buňkami, které ho fyziologicky syntetizují, a zároveň ho exprimují buňky, které tak běžně nečiní. Mezi ně se řadí endotelové buňky a monocyty [2; 3].

Jeho význam tkví v tom, že funguje jako receptor pro F VIIa, s nímž vytváří komplex, a společně tak zahajují iniciační fázi koagulačního procesu [5].

- **Faktor IV – vápenaté ionty (Ca^{2+})**

Ionty vápníku jsou nepostradatelnou součástí řady reakcí napříč celou hemostázou. Účastní se např. vzniku komplexů vnitřní a vnější tenázy a protrombinázy [2].

- **Faktor V – proakcelerin**

F V je jednořetězcový glykoprotein, který se syntetizuje v játrech a v megakaryocytech. Nachází se jak v plazmě, tak v granulách trombocytů. K jeho aktivaci jsou využívány Ca^{2+} , ale může být aktivován i pomocí plazminu, neutrofilní elastázy, destičkového kalpainu či jedu Russelovy zmiže. Na inhibici F Va se podílí APC a možné je i jeho štěpení plazminem [2; 3].

Je součástí komplexu protrombinázy a společně s F Xa, Ca^{2+} a fosfolipidy značně zvyšuje rychlost aktivace faktorů [2].

- **Faktor VI**

Tento termín se v současnosti již nepoužívá. Jedná se o starší označení pro F Va [9].

- **Faktor VII – prokonvertin**

F VII se řadí mezi serinové proteázy. Jeho syntéza probíhá v játrech, ovšem jeho významným lokálním zdrojem jsou také aktivované monocyty/makrofágy [5].

F VII může být aktivován F IXa, F Xa, F XIa či F XIIa a je jediným faktorem, který ve své aktivované formě volně cirkuluje v oběhu. Převážně se však v plazmě nachází v neaktivní podobě. Aktivita F VII vzrůstá s přibývajícím věkem a také u těhotných [2; 4; 5].

V komplexu s TF tvoří F VIIa komplex startující iniciační fázi koagulačního procesu. Zároveň vytváří s TF, Ca^{2+} a PL komplex vnější tenáza, který aktivuje F X na F Xa [2].

- **Faktor VIII – antihemofilický faktor A**

F VIII je plazmatický glykoprotein syntetizující se zejména v játrech, ale také ve slezině, slinivce břišní, uzlinách a ledvinách. Rozlišuje se jeho koagulační aktivita (F VIII: C) a antigen (F VIII: Ag) [2; 3].

V plazmě se nachází vázaný v komplexu s vWF, z něhož se uvolňuje po setkání s fosfolipidy či trombinem. Tato vazba je významná tím, že F VIII brání před štěpením APC a F Xa. Štěpení probíhá pomocí trombinu, ale za účasti fosfolipidů může být F VIII aktivován také F Xa [5].

F VIIIa je součástí komplexu vnitřní tenáza společně s F IXa, PL a Ca^{2+} , který je důležitý pro aktivaci F X. F VIII je pro hemostázu nepostradatelný a s ním spojený defekt, ať už v jeho tvorbě či funkčnosti, vede k závažnému krvácivému onemocnění – hemofilii A. Vzhledem k tomu, že F VIII patří mezi proteiny akutní fáze, bývá jeho aktivita zvýšená při zánětech, v těhotenství, při chronických infekcích i v důsledku stresu [2; 3].

- **Faktor IX – Christmasův faktor**

F IX je jednořetězcový glykoprotein produkováný játry a nacházející se též v séru. Aktivuje ho F XIa a FVIIa. Společně s F VIIIa, PL a Ca^{2+} tvoří komplex

vnitřní tenáza potřebný pro aktivaci F X na F Xa. Má také schopnost za účasti Ca^{2+} a PL zpětně aktivovat F VII na F VIIa [2; 5].

- **Faktor X – Stuart-Prowerové faktor**

F X je dvouřetězcový glykoprotein syntetizovaný játry a nacházející se i v séru. Jeho aktivaci obstarává komplex vnitřní tenáza (F IXa, F VIIIa, PL, Ca^{2+}) nebo komplex F VIIa a TF. Jako součást komplexu protrombinázy (F Xa, F Va, PL, Ca^{2+}) se podílí na aktivaci protrombinu na trombin [2; 5].

- **Faktor XI – plasma thromboplastin antecedent (PTA)**

F XI je jednořetězcový glykoprotein tvořený játry a v plazmě se vyskytující jako monodimer vázaný v komplexu s vysokomolekulárním kininogenem (dále jen HK). Může být aktivován F XIIa, trypsinem, F VIIa a také trombinem. F XI se nachází i na povrchu trombocytů, ale takový F XI není shodný s F XI cirkulujícím v plazmě [2; 5].

Význam F XIa spočívá v jeho schopnosti štěpit HK, plazminogen, α řetězec fibrinogenu a aktivovat F XII [5].

- **Faktor XII – Hagemanův faktor**

F XII je glykoprotein vytvářející se v játrech a nacházející se jak v plazmě, tak v séru. Za běžných okolností s cévní stěnou neinteraguje, k jeho aktivaci dochází až v případě, kdy je cévní stěna porušena a setkává se se subendoteliálními strukturami. Jeho aktivaci zprostředkovává F XI, kalikrein a HK. Hladina F XII vzrůstá u těhotných žen a u žen po menopauze [2; 5].

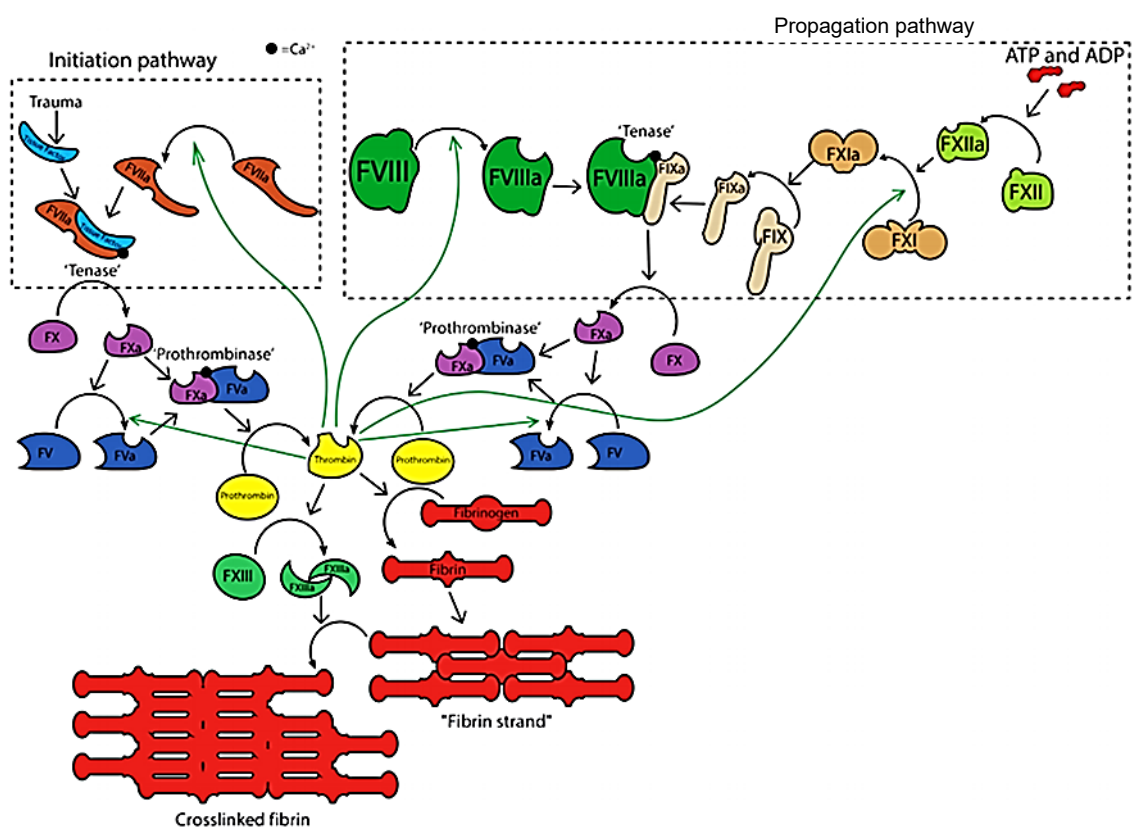
- **Faktor XIII – fibrin stabilizující faktor**

F XIII je přítomen v plazmě, kde je vázán na fibrinogen, ale nachází se také v trombocytech, megakaryocytech a monocytech. F XIII má v plazmě podobu

tetrameru. Jeho molekula je tedy tvořena čtyřmi řetězci – jedním párem řetězců A a jedním párem řetězců B. Řetězce A a B se v plazmě vyskytují i jako individuální jednotky. V buňkách je F XIII přítomen jako dimer skládající se ze dvou řetězců A [2; 5].

Je aktivován pomocí trombinu. Na aktivaci se podílí také fibrin, čímž je zabezpečena kontrola nad tím, aby nedocházelo k tvorbě velkého množství F XIIIa, dokud nevznikne fibrin. Jakmile se vytvoří fibrin, B řetězec dále koluje v séru na rozdíl od řetězce A, který se navazuje do fibrinového koagula [2; 5].

Hlavním úkolem F XIIIa v koagulačním procesu je zajistit zpevnění fibrinové sraženiny. Uplatňuje se také při hojení ran a v těhotenství [2].



Obrázek 2 – Schéma koagulační kaskády. *Tenase* – tenáza;

prothrombinase – protrombináza; *thrombin* – trombin; *prothrombin* – protrombin;

fibrin strand – fibrinová vlákna; *crosslinked fibrin* – zesíťovaný fibrin [8]

3.3.4 Inhibitory koagulace

Velmi důležitou součástí koagulačního systému jsou tzv. inhibitory koagulace, jejichž cílem je regulovat krevní srážení. Starají se o to, aby nedocházelo k nekontrolované aktivaci koagulace a aby se koagulační proces uskutečnil pouze v místě poranění cévy [10].

Jejich deficit má souvislost se zvýšenou predispozicí k tvorbě krevních sraženin, tzv. trombofilií [10]. „Někdy se trombofilie označuje také jako hyperkoagulační stav“ [10, s. 15].

- **Inhibitor tkáňového faktoru (TFPI)**

TFPI je produkován endoteliálními buňkami po nárůstu hladiny F Xa. Dochází k vazbě TFPI s F Xa za vzniku komplexu (F Xa, TFPI), který následně inhibuje aktivitu komplexu vnější tenázy (TF, F VIIa, PL, Ca²⁺), čímž brání aktivitě TF. Syntézu TFPI ve zvýšeném množství vyvolává také heparin, především nízkomolekulární [4; 10].

TFPI má schopnost inhibovat i velmi malé množství TF. Bývá mu však přisuzován také patologický význam, a to při vzniku aterosklerotických plátů v důsledku jeho navázání na LDL cholesterol [4].

- **Systém proteinu C**

Neporušený endotel disponuje dvěma důležitými receptory – jedním z nich je trombomodulin (dále jen TM) a druhým je endotelový receptor pro protein C (dále jen EPCR) [11].

Trombin (F IIa) se navazuje na TM za vzniku komplexu (F IIa, TM). Jakmile se trombin naváže na TM, ztrácí sice svou koagulační aktivitu, ale má schopnost aktivovat PC, a vzniká tak aktivovaný protein C (dále jen APC). APC následně

inhibuje F Va a F VIIIa, tím se inhibuje systém vnitřní tenázy a protrombinázy společně s produkcí trombinu. V konečném důsledku se zastavuje hemokoagulace [4; 10].

Do systému PC se řadí také protein S. Jedná se o jednořetězcový protein, který funguje jako kofaktor pro PC [10].

V případě, že se v molekule F V nachází bodová mutace R506Q známá jako Leidenská mutace, nemůže se F V vázat s APC, což se označuje jako APC rezistence. Leidenská mutace neboli vrozená rezistence na APC je nejčastějším vrozeným hyperkoagulačním stavem [10; 11].

- **Antitrombin (AT)**

Antitrombin je nesmírně důležitým koagulačním inhibitorem. Tento fakt je potvrzen tím, že jakékoli defekty týkající se AT mají spojitost s nejvyšším rizikem hyperkoagulačních stavů. Je to glykoprotein produkováný zejména játry [10; 11]. *„Jedná se o antikoagulačně nejúčinnější látku, která je schopna neutralizovat účinek trombinu“* [2, s. 100].

Jeho funkcí je inhibice trombinu (F IIa) i jiných serinových proteáz, jež vyvazuje za vzniku inaktivního komplexu v poměru 1 : 1. Odbourávání vzniklých komplexů poté zajišťuje monocyto-makrofágový systém [4; 10].

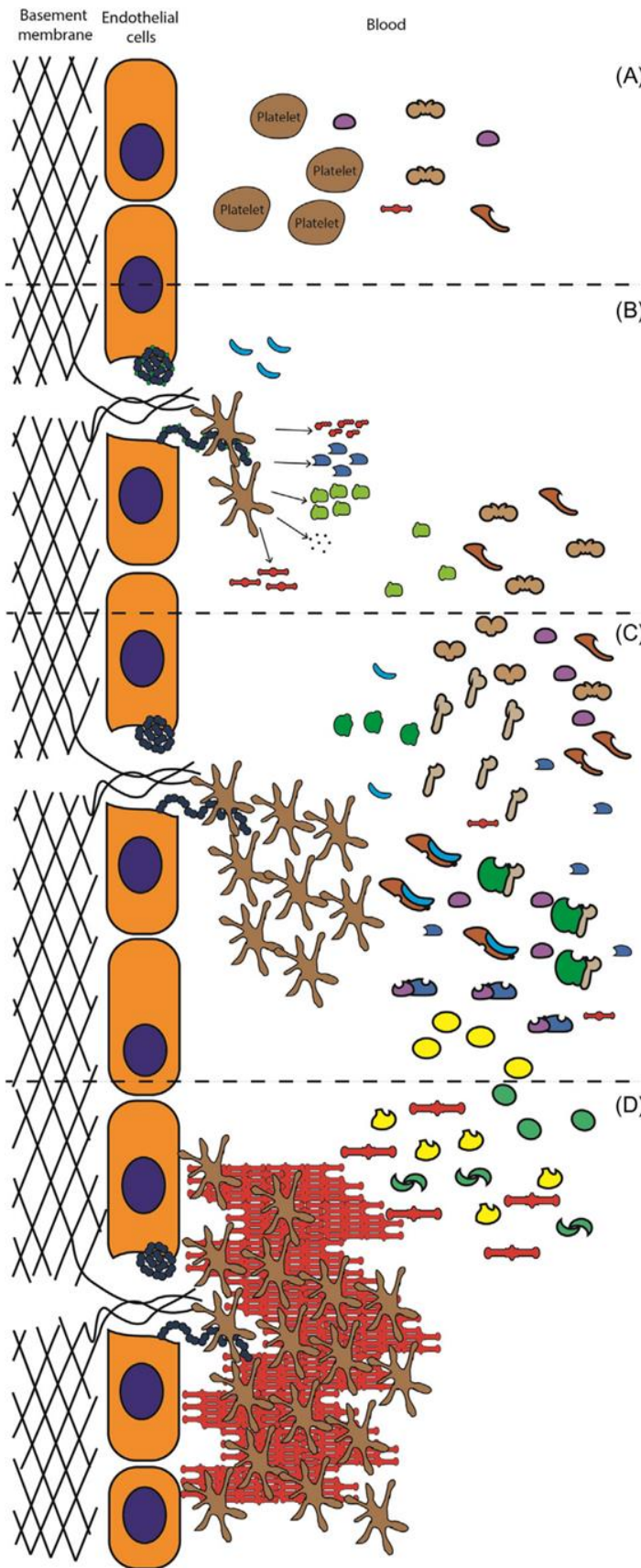
Důležitou vlastností AT je jeho afinita k heparinu. Pro inaktivaci trombinu je zapotřebí, aby se na molekulu heparinu navázal současně trombin i antitrombin. Zároveň se AT musí vázat s takovým heparinem, který obsahuje alespoň 18 cukerných jednotek a má sekvenci pentasacharidu. Pouze za splnění těchto podmínek dochází ke konformační změně molekuly AT a k urychlení inhibice trombinu. Vazba mezi heparinem a AT je reverzibilní, což znamená, že po jejím rozvolnění se heparin může vázat s další látkou. Heparin tvořený menším

počtem monosacharidových jednotek nemá schopnost inhibovat trombin, nachází však uplatnění díky své anti-Xa aktivitě, na níž je založen i princip nízkomolekulárních heparinů. Bez přítomnosti AT je heparin *in vivo* téměř neúčinný. Pro účinný antikoagulační efekt při léčbě hepariny (UFH i LMWH), který je pomocí AT zprostředkován, je důležitá potřebná aktivita AT v plazmě nad 30 % [4; 10; 11].

Pokud je přítomen volný trombin, váže se s AT za vzniku tzv. TAT komplexu (F IIa, AT) [4]. „*Tento komplex postrádá jak koagulační aktivitu trombinu, tak inhibiční aktivitu antitrombinu. Svědčí však o hyperkoagulačním stavu systému*“ [4, s. 100].

- **Heparinový kofaktor II (HC II)**

Heparinový kofaktor II se řadí mezi inhibitory serinových proteáz. Je produkován endotelovými buňkami a játry a vyskytuje se zejména v cévním endotelu. Svou aktivitu zaměřuje výlučně proti trombinu a jeho uplatnění je pouze lokálního charakteru [2; 4].



(A) Fyziologický stav, trombocyty a jednotlivé faktory se vyskytují ve svých neaktivních formách [8].

(B) Dochází k poškození endoteliální stěny, uvolnění kolagenu, vWF a TF z bazální membrány a endoteliálních buněk. Aktivují se krevní destičky a ulpívají v místě poranění. Uvolňují se koagulační faktory včetně vápenatých iontů, ATP, fibrinogenu a dalších [8].

(C) Probíhá agregace trombocytů, začíná aktivace jednotlivých faktorů, vytváří se komplexy tenázy a protrombinázy [8].

(D) Aktivace trombinu a následně F XIIIa vede k tvorbě zesítěného fibrinu, který stabilizuje vznikající sraženinu [8].

Obrázek 3 – Průběh koagulace. *Basement membrane* – bazální membrána; *endothelial cells* – endoteliální buňky; *blood* – krev; *platelet* – krevní destička [8]

3.4 Fibrinolytický systém

Fibrinolytický systémem je „pojistkou“ organismu, která zodpovídá za to, aby vytvořené fibrinové koagulum neuzavřelo cévu, a nezpůsobilo tak závažné komplikace. Cílem tohoto systému je rozpuštění fibrinové zátky s následným zprůchodněním cévy a obnovením krevního toku, který je za přítomnosti krevní sraženiny omezen [4; 5].

„Fibrinolýza je poslední regulační mechanismus systému hemostázy, který jednak limituje tvorbu koagula, jednak představuje reparační mechanismus spolu se schopností endotelu „dorůst“ a cévní rekanalizací“ [5, s. 44].

Rozsah jeho působení je ovšem mnohem širší a sahá za hranice hemostázy. Uplatňuje se totiž i v procesu angiogeneze, degradace kolagenu, remodelace tkání, metastazování tumorů či nidace oplodněného vajíčka [2; 4; 10].

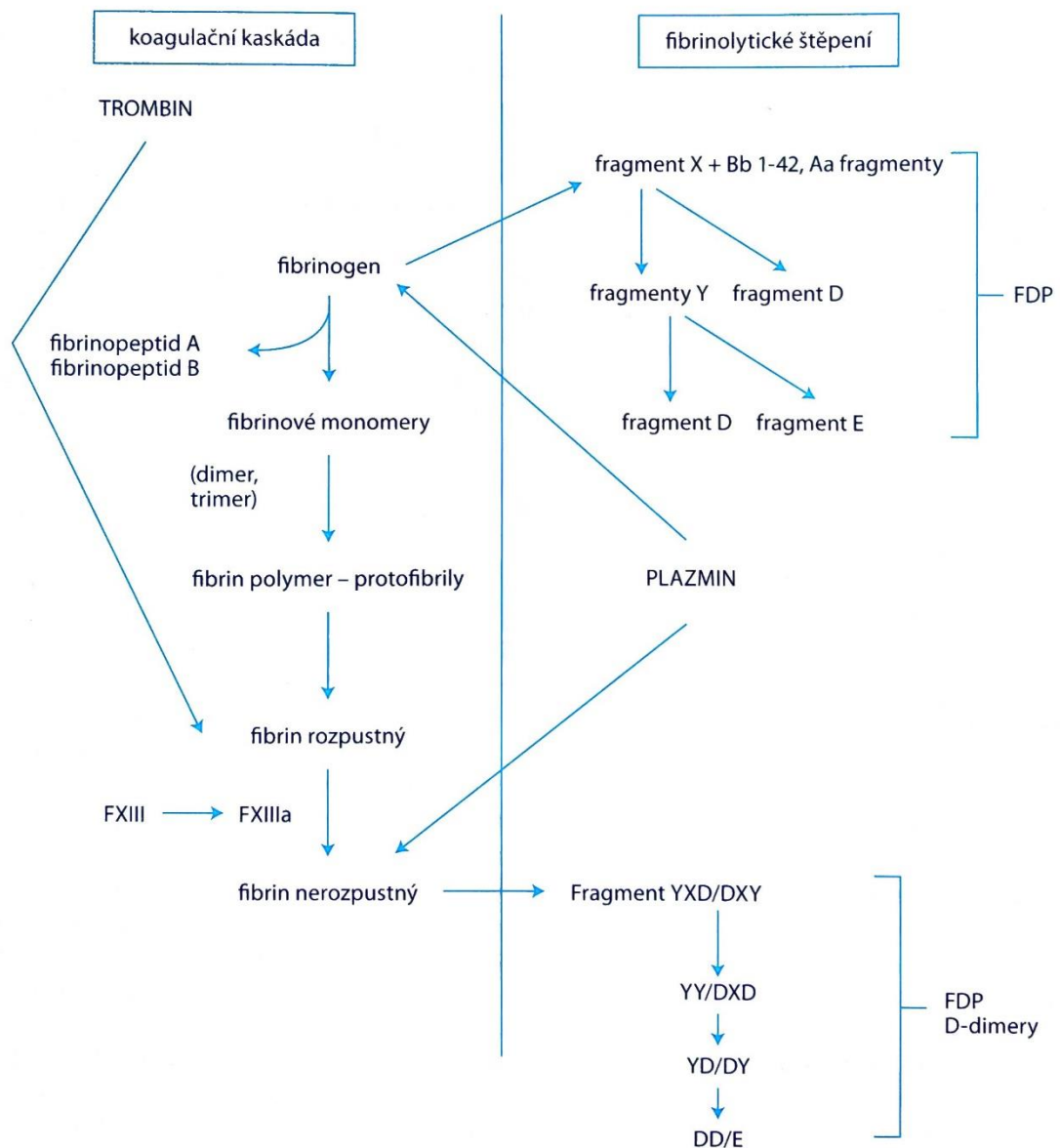
3.4.1 Plazminogen a plazmin

Klíčovou složkou fibrinolytického systému je plazminogen. Jedná se o prekurzor aktivního enzymu plazminu. Je produkován játry, a to ve dvou formách – jako Glu-plazminogen a Lys-plazminogen [2; 4].

Za nejvýznamnější aktivátory plazminogenu jsou považovány tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) a urokináza (u-PA), přičemž oba tyto aktivátory uvolňuje endotel. Aktivace plazminogenu nastává po jeho navázání na fibrinovou zátku. Vazba je umožněna díky vazebným místům jak pro samotný plazminogen, tak i pro jeho aktivátory, díky nimž se plazminogen přeměňuje na aktivní plazmin [2; 4].

Úkolem plazminu je štěpit fibrin a fibrinogen na stále menší fragmenty, a rozpouštět tak krevní koagulum. Výsledkem tohoto štěpení je vznik tzv. fibrin/fibrinogen degradačních produktů (FDP) [2; 4].

3.4.2 Štěpné produkty fibrinogenu a fibrinu



Obrázek 4 – Schéma štěpení fibrinogenu a fibrinu trombinem a plazminem [11]

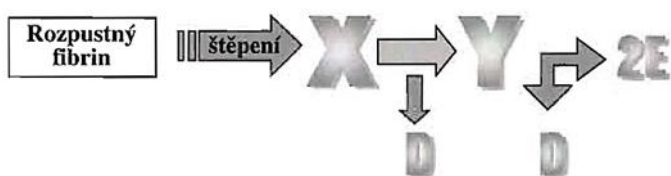
- **Fibrin/fibrinogen degradační produkty (FDP)**

FDP jsou látky, které po sobě zanechává rozpouštějící se fibrinové koagulum a štěpící se fibrinogen. Jejich přítomnost v krvi je možné prokázat laboratorními testy [12].

Působením plazminu se fibrinogen a rozpustný fibrin rozpadají na vysokomolekulární fragmenty X a Y (označované též jako přechodné meziprodukty) a nízkomolekulární fragmenty D a E (označované též jako konečné produkty). Vzhledem k tomu, že fibrin plazminu poměrně odolává, štěpí se déle než fibrinogen [2; 3].

Fragmenty X a Y mají antikoagulační účinek, neboť zabraňují vzniku nerozpustné fibrinové sítě. Dosahují toho tím, že společně s fibrinovými monomery vytvářejí rozpustné komplexy, čímž znemožňují polymeraci těchto monomerů a v konečném důsledku i vznik zmiňované fibrinové sítě. Významná je také jejich schopnost inhibovat agregaci trombocytů navázáním na glykoproteinové receptory GP IIb/IIIa [2; 3; 4].

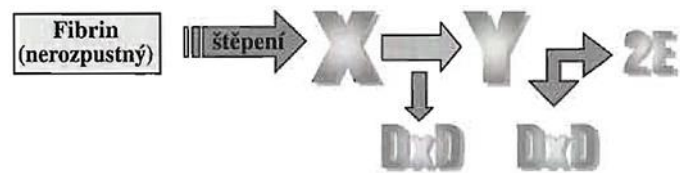
Odbourávání nízkomolekulárních fragmentů D a E pak zajišťuje monocyto-makrofágový systém [4].



Obrázek 5 – Schéma štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu [2]

Působením plazminu na nerozpustný fibrin dochází k jeho štěpení na fragmenty X a Y. Ty se však od fragmentů vzniklých rozpadem fibrinogenu a rozpustného fibrinu odlišují tím, že se od sebe neoddělují. Je to dáno

přítomností kovalentních vazeb v nerozpustném fibrinovém koagulu, jejichž vznik je zapříčiněn stabilizací fibrinu F XIIIa. Konečným specifickým produktem degradace fibrinu jsou fragmenty o MW 182 kDa známé jako tzv. D-dimery [2; 3].



Obrázek 6 – Schéma štěpení nerozpustného fibrinu [2]

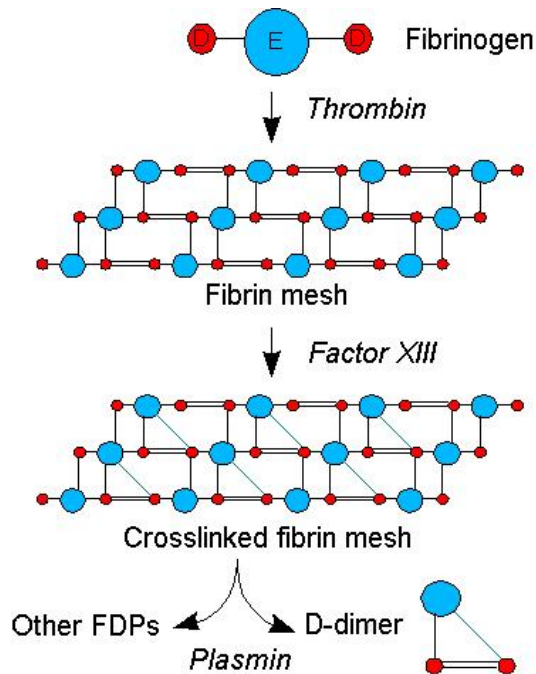
- **D-dimery**

„Molekula D-dimeru se skládá ze dvou D-domén vzniklých z přilehlých fibrinových jednotek, spojených kovalentní Glu-Lys vazbou mezi jejich γ řetězci. Tato kovalentní vazba zajišťuje jeho odolnost proti štěpení plazminem a laboratorní průkaz D-dimeru je přímým důkazem štěpení nerozpustného fibrinu“ [2, s. 94].

D-dimery jsou specifickou podmnožinou FDP. Rozdíl ve struktuře D-dimerů a ostatních FDP je takový, že D-dimery obsahují jednu vazbu navíc. Je to způsobeno tím, že poté, co fibrin zpevní sraženinu, nastává v tvorbě koagula poslední krok, ve kterém F XIIIa vytváří příčné vazby mezi molekulami fibrinu. Jakmile se sraženina štěpí, uvolňují se fragmenty, z nichž některé obsahují právě tyto příčné vazby – jedná se o D-dimery [8; 13].

D-dimery jsou uvolňovány pouze při rozpadu skutečných sraženin (nikoli při rozpadu fibrinogenu), zatímco FDP se vyskytují při jakékoli fibrinolytické příhodě a jejich zvýšená koncentrace může být pozorována u mnoha reaktivních stavů včetně onemocnění jater, cirhózy, nádorů, těhotenské eklampsie a akutních trombotických příhod. D-dimery jsou obecně specifitějším markerem pro vyloučení trombotické příhody, plicní embolie nebo DIC. Pro svoji rychlost

a dostupnost jsou preferovaným laboratorním vyšetřením při podezření na trombotickou příhodu [8; 13].



Obrázek 7 – Vznik D-dimerů. **Thrombin** – trombin; **fibrin mesh** – fibrinová síť; **factor XIII** – faktor XIII; **crosslinked fibrin mesh** – fibrinová síť s příčnými vazbami; **other FDPs** – ostatní FDP; **plasmin** – plazmin [13]

3.4.3 Hyperfibrinolýza a hypofibrinolýza

V případě, že je nadměrně produkován plazmin, dochází k rozvoji tzv. hyperfibrinolýzy. Tato velmi nebezpečná situace má spojitost jak s těžkými krvácivými stavy (u polytraumat, sepsí či DIC), tak s predispozicí ke stavům trombotickým [2; 4]. „*Hyperfibrinolytický stav lze velmi těžce běžnými laboratorními testy prokázat. Jediným spolehlivým laboratorním testem k průkazu hyperfibrinolýzy je trombelastografie – TEG*“ [4, s. 101].

Pokud je některá ze složek fibrinolytického systému poškozena nebo její funkce není dostačující, rozvíjí se naopak tzv. hypofibrinolýza. Ta má mnohdy souvislost s tromboembolickou nemocí [2; 4].

3.4.4 Aktivátory fibrinolýzy

Fibrinolytický systém je aktivován paralelně s procesem hemokoagulace. Celý fibrinolytický proces však ve srovnání s procesem hemokoagulačním trvá mnohem déle – fyziologicky 48 až 72 hodin [2].

- **Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA)**

Tkáňový aktivátor plazminogenu je produkován zejména endotelem, aktivovanými monocyty a megakaryocyty. Nachází se především ve vydatně cévně zásobených orgánech jako jsou děloha, ledviny a plíce. Koncentrace t-PA se zvyšuje následkem žilní okluze, po svalové námaze či vlivem stresu. Jeho jednořetězcovou molekulu proteolyticky štěpí plazmin, tkáňový kalikrein nebo F Xa, čímž se vytváří aktivnější dvouřetězcová molekula. Metabolizují ho játra [2; 3; 5].

Hraje významnou roli v mimocévní fibrinolýze, s čímž souvisí jeho uplatnění při hojení ran a v zánětlivých procesech. Jako fibrin specifický aktivátor plazminogenu je důležitý pro specifickou fibrinolýzu [2; 5]. *„Toho se využívá při trombolytické léčbě cévních uzávěrů zejména při trombotizaci koronárních tepen. t-PA má příznivý efekt při redukci trombofilie a obnovy recirkulace po trombolýze“* [2, s. 90].

- **Urokináza (u-PA)**

Urokináza je produkována buňkami jako jednořetězcová molekula a za účasti plazminu přechází na molekulu dvouřetězcovou. Buňky ji neuvolňují fyziologicky, ale pouze za účasti endotoxinu nebo tumor nekrotizujícího faktoru (dále jen TNF). Vyskytuje se v pojivové tkáni a v řadě buněk – epiteliálních, monocyttech, makrofázích a také v buňkách podobných fibroblastům [2; 5].

Je významná pro štěpení extracelulární matrix ve tkáních, díky němuž mohou migrovat buňky, což je klíčové např. při hojení ran, embryogenezi, u zánětu, ale také při invazi nádorových buněk a metastazování [5].

3.4.5 Inhibitory fibrinolýzy

„Fibrinolýza je omezena jako všechny reakce v procesu srážení jen na místo endoteliální léze. Fyziologicky probíhá jen tam, kde vznikl fibrin. Systém přirozených inhibitorů plazminu spolu s krevním proudem zamezuje rozšíření této reakce do dalších částí organismu“ [2, s. 97].

- **Inhibitory aktivátoru plazminogenu (PAI)**

Inhibitory aktivátoru plazminogenu jsou serinové proteázy a řadí se mezi ně PAI-1, PAI-2 a PAI-3 [4].

PAI-1 je produkován endoteliálními buňkami, megakaryocyty a za účasti cytokinů také hepatocyty. Nachází se především v krvi v α -granulách trombocytů, ale vyskytuje se i v endotelu a v plazmě. Na regulaci jeho syntézy se podílí trombin, glukokortikoidy a inzulin. Funkcí PAI-1 je inhibice jak t-PA, tak u-PA. Aktivita PAI-1 stoupá při horečce, v těhotenství, u zánětů, po infarktu myokardu, u obezity, diabetu, ale také s přibývajícím věkem a dává informaci o poškození endotelu. Patří mezi proteiny akutní fáze [2; 3; 5].

Syntéza PAI-2 probíhá v placentě, histiocytech, monocytech/makrofázích a polymorfonukleárech. Funguje jako inhibitor u-PA. Fyziologicky se v plazmě nachází ve velmi nízkých koncentracích, jeho hladina se zvyšuje u těhotných a nemocných s leukémií [3; 5].

PAI-3 se vyskytuje v plazmě a v moči. Inhibuje t-PA, u-PA i trombin [5].

- **α 2-antiplazmin**

α 2-antiplazmin je produkován játry. Jedná se o velmi významný inhibitor fibrinolytického systému. Váže volný plazmin nacházející se v plazmě za vzniku komplexu. Pokud je však plazmin vázaný na fibrin, tak ho α 2-antiplazmin téměř neváže. Další funkcí tohoto inhibitoru je inhibice vazby plazminogenu na fibrin, štěpení F XIIa, F XIa, F Xa, kalikreinu, trombinu, t-PA a u-PA [2; 5].

- **Trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI)**

Trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy je produkován játry a řadí se mezi metalokarboxypeptidázy. Důležité je jeho působení mezi prokoagulačními, inhibičními a fibrinolytickými systémy. V plazmě se vyskytuje v neaktivní formě, na jeho aktivaci se podílí komplex trombinu a trombomodulinu, případně plazmin nebo trypsin. K aktivaci TAFI však dochází pouze při nízké koncentraci trombomodulinu, pokud je jeho koncentrace vyšší, tak se aktivace naopak snižuje, což je zřejmě zapříčiněno zvýšenou koncentrací PC [2; 3; 4].

TAFI má schopnost hydrolyticky štěpit koncové oblasti fibrinového řetězce, čímž redukuje počet vazebných míst pro plazminogen a t-PA na molekule fibrinu. V důsledku toho je omezena možnost vazby plazminogenu a plazminu na fibrinovou molekulu, produkce plazminu klesá a s ní i vliv fibrinolytického systému. Inaktivace TAFIa může probíhat buď spontánně za vzniku TAFIai a jeho rozštěpení trombinem, nebo pomocí plazminu. TAFIai následně koluje v plazmě v komplexu s α 2-makroglobulinem. Tento komplex je pak schopen podporovat uvolňování PAI-1 z trombocytů, a to má za následek další inhibici fibrinolýzy [2; 3; 4].

Z narušení tohoto systému plynou závažné komplikace. V případě nadměrné aktivity TAFI hrozí hyperkoagulační stavy, v případě snížené aktivity TAFI naopak stavy krvácivé [3].

- **α 2-makroglobulin**

α 2-makroglobulin je syntetizován jaterními buňkami (hepatocyty), makrofágy a dalšími buňkami. Nachází se v plazmě i mimo cévní systém (extravaskulárně). Disponuje výjimečnou schopností – dokáže inhibovat proteázy všech tříd. Interaguje s proteolytickými enzymy plazmy, leukocytů, bakterií a také s hadími jedy za vzniku komplexů. Mechanismus účinku α 2-makroglobulinu je takový, že jeho molekula změní své prostorové uspořádání, obstoupí enzym, a zamezí tak přístupu substrátu do aktivního místa enzymu [2; 3].

Je nesmírně důležitý zvláště v případech, kdy dochází k vyčerpání ostatních inhibitorů – např. při DIC. Uplatňuje se i jako imunologický regulátor. Jeho hladina v séru je 2,5krát vyšší u dětí než u dospělých a stoupá též u těhotných žen [3].

- **α 1-antitrypsin**

α 1-antitrypsin je produkován játry. Inhibuje F Xa, APC a především proteázy pankreatu a leukocytů [2].

3.5 Trombolytická léčba

„Trombolytická léčba je vedle chirurgické léčby jedinou aktivní metodou léčby trombózy“ [2, s. 220]. Cílem je rozpustit vytvořený trombus a obnovit krevní průtok v postižené oblasti. Princip léčby spočívá ve schopnosti přeměnit plazminogen na plazmin, protože právě ten je pro depolymerizaci vláken fibrinu na degradační produkty klíčový. Za tímto účelem se používají tzv. fibrinolytika, která se aplikují zpravidla intravenózně [10; 14].

Starším druhem fibrinolytik jsou tzv. nespecifická fibrinolytika, mezi které se řadí streptokináza, urokináza či anistrepláza. Výsledkem jejich působení je však to, že na plazmin se přeměňuje nejen plazminogen vázaný v trombu, ale také

volný, v plazmě cirkulující plazminogen. Působením plazminu dochází k degradaci fibrinogenu, F V, F VII, F XII a vWF. Systémová fibrinolýza následně vede k poklesu hladiny cirkulujícího fibrinogenu až na 20 % a naopak k vzestupu hladiny cirkulujících FDP. Úskalím používání nesespecifických fibrinolytik je tedy jednak jejich neselektivnost k fibrinu, větší systémový efekt i to, že jejich působením ubývá fibrinogen a plazminogen. „Úbytek plazminogenu v místě trombu (tzv. plazminogenový „steal efekt“) má za důsledek snížení lytického účinku“ [15, s. 46]. Další nevýhodou (v případě použití streptokinázy či anistreplázy) je tvorba protilátek, případně snížený účinek fibrinolytik kvůli protilátkám, jež si organismus vytvořil po prodělané streptokokové infekci [14; 15].

Novější generací trombolitik jsou tzv. fibrin specifická fibrinolytika zahrnující alteplázu, reteplázu, tenekteplázu, lanoteplázu, stafylokinázu či pro-urokinázu. Jejich značnou výhodou je schopnost aktivovat pouze plazminogen vázaný v trombu. Díky tomu fibrinolýza probíhá zejména na povrchu krevní sraženiny a je méně soustředěna na volně cirkulující fibrinogen. Nedochozí tedy k tak masivnímu poklesu hladiny fibrinogenu jako tomu je u nesespecifických fibrinolytik. Nejpoužívanějším fibrinolytikem je rekombinantní tkáňový aktivátor plazminogenu (dále jen r-tPA) neboli altepláza. Aktivace r-tPA probíhá až po jeho navázání na fibrinová vlákna, čímž se spouští přeměna plazminogenu na plazmin s následnou degradací fibrinové sítě a rozpouštěním trombu. Výhodou tohoto fibrinolytika je jeho vysoká selektivita k fibrinu, minimální systémový efekt a také nízká antigenicita. Nevýhodou je poměrně krátký plazmatický poločas, což vysvětluje nutnost podávání r-tPA ve formě infuzí. Daní za veškeré benefity je ovšem také vysoká nákladnost [10; 14; 15].

Indikací k podání fibrinolytik bývají závažné život ohrožující stavy jako jsou plicní embolie, hluboké žilní trombózy nebo akutní infarkt myokardu. Účinnost trombolytické léčby je možné kontrolovat laboratorními vyšetřeními, a to

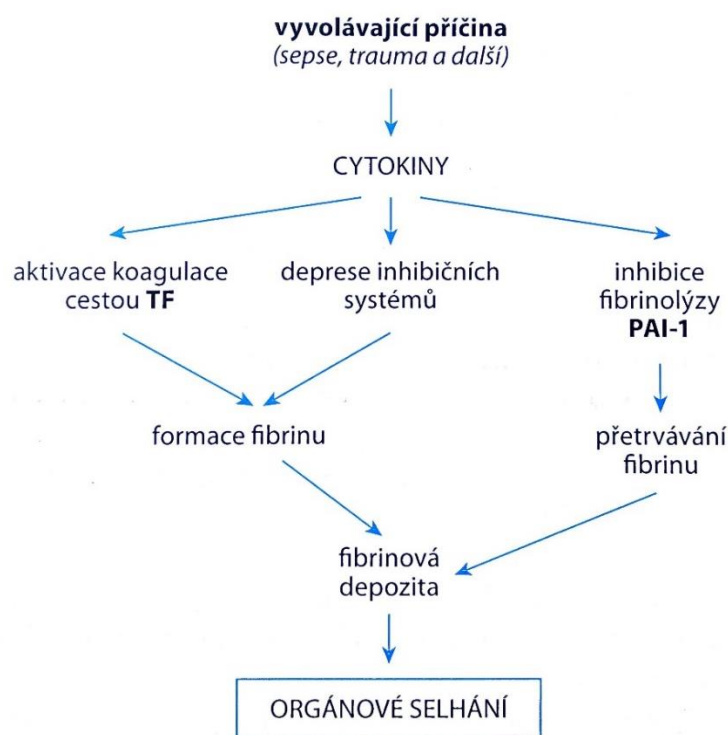
měřením trombinového času, hladiny fibrinogenu či FDP. Jako každá léčba s sebou i tato nese mnohá rizika – zejména v podobě výskytu krvácivých komplikací a alergických reakcí [2; 11].

3.6 Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC)

„Diseminovaná intravaskulární koagulace je získaným syndromem komplexní poruchy krevního srážení provázejícím vždy druhotně jiné základní onemocnění či jiný patologický stav“ [16, s. 21]. Tento extrémní stav, v němž hrají klíčovou roli fibrinové sraženiny, je výsledkem nekontrolované masivní aktivace kaskády krevního srážení, která vede k rozsáhlé tvorbě trombů zejména v cévních kapilárách. *„Jde o důsledek dysbalance v prokoagulační aktivitě trombinu a fibrinolytické aktivitě plazminu“* [17, s. 144]. S tímto stavem je spojeno omezené krevní zásobování tkání, jež může vyústit až v orgánové selhání. Vyčerpání koagulačních faktorů, jejich inhibitorů a trombocytů poté naopak vede k hojnému nekontrolovatelnému krvácení a často vrcholí úmrtím [10; 18].

DIC se může spustit u septických stavů, závažných infekcí, velkých traumat (popálenin, pooperačních stavů), gynekologických a porodnických komplikací, vaskulopatií, intravaskulární hemolýzy, šokových stavů a oběhových selhání, orgánových nekróz, alergických reakcí, otrav, těžkých metabolických rozvratů a ve více či méně závažné formě může doprovázet i mnohá onemocnění, především nádorová (včetně leukémií) či jaterní [18; 19].

Obecně lze říct, že na rozvoji DIC se může podílet celá řada faktorů mezi něž patří aktivace endotelu, aktivace a adheze destiček, aktivace monocytů, exprese a sekrece TF a dalších prokoagulačních působků, tromboplastin z plodové vody, masivní poškození tkání, cévní malformace, hadí jedy a intravaskulární hemolýza [20].



Obrázek 8 – Schéma patogeneze DIC [11]

3.6.1 Rozdělení DIC

Podle klinických projevů a stavů, u nichž se DIC vyskytuje, je možné rozlišovat akutní, subakutní a chronickou formu DIC [19].

S akutní formou DIC se setkáváme především u sepsí, velkých traumat, porodnických komplikací a závažných imunologických reakcí. Klinické projevy akutní DIC se mnohdy překrývají se symptomy základního onemocnění. Obvykle se mezi ně řadí porucha mikrocirkulace, tromboembolické a krvácivé projevy. Mezi běžné nálezy patří multiorgánová selhání, hemoragická nekróza, mikrotromby v malých cévách i tromby ve středních a velkých cévách. Nejčastěji postiženými orgány jsou plíce a ledviny, dále mozek, srdce, játra, slezina, nadledviny, slinivka břišní a střevo [20; 21].

Subakutní a chronická forma DIC se obvykle vyskytuje u pacientů s maligními onemocněními (zejména s mucin produkujícím adenokarcinomem či akutní

promyelocytární leukémií). Další stav, při kterém se tato forma DIC může objevit, je u žen v případě zadržetí mrtvého plodu v děloze. Klinické projevy zahrnují nejen projevy tromboembolické, ale také ekchymózy, petechie či epistaxe [20; 21].

3.6.2 Stádia DIC

Akutní DIC lze rozdělit do čtyř stádií – rozeznáváme iniciální stádium, kompenzovanou DIC, manifestní subakutní DIC a dekompenzovanou DIC [22].

- **Iniciální stádium**

Iniciální stádium neboli aktivační stádium bývá označováno též jako triggerstadium. Zahajuje se aktivace koagulace, ale laboratorní hodnoty se prozatím nemění [22].

- **Kompenzovaná DIC**

Ve stádiu kompenzované DIC neboli v hyperkoagulační fázi začíná fibrinolýza a spotřebovává se zvýšené množství koagulačních faktorů. V tomto stádiu není významné krvácení, ovšem zvyšuje se nebezpečí vzniku trombózy. Pozorujeme již změny v laboratorních hodnotách (fibrinogen a trombocyty lehce snížené až zvýšené, D-dimery zvýšené, antitrombin snížený až normální, aPTT a PT normální až hraniční) [22; 23].

- **Manifestní subakutní DIC**

Pro stádium manifestní subakutní DIC neboli pro hyperfibrinolytickou fázi je typické ustávání koagulace, nicméně fibrinolýza se naopak ještě umocňuje. Zvýšená spotřeba koagulačních faktorů přetrvává. Laboratorními testy zjišťujeme patrné změny [22].

- **Dekompenzovaná DIC**

Stádium dekompenzované DIC je charakterizováno značně sníženou koagulací, zatímco fibrinolýza probíhá v plné síle. Objevují se krvácivé stavy (hemoragické diatézy). Selhávají regulační mechanismy. Laboratorní parametry jsou prokazatelně změněny (fibrinogen, trombocyty a antitrombin snižené, D-dimery zvýšené, aPTT a PT prodloužené) [22; 23].

3.6.3 Diagnostika DIC

Vzhledem k tomu, že DIC se buď klinicky neprojevuje vůbec, nebo jsou naopak její symptomy velmi různorodé, a zároveň neexistuje jeden jediný laboratorní test, kterým by bylo možné DIC bezpečně diagnostikovat, je stanovení diagnózy DIC poměrně obtížné. Posuzují se proto nejen laboratorní výsledky, ale také objektivní fyzikální nález a současně je samozřejmě nezbytné řešit základní onemocnění, které bývá vyvolávající příčinou DIC. Důležité je neopomínat, že laboratorní vyšetření s negativním výsledkem DIC nevylučuje [5; 17; 19].

Fyzikální nález bývá „*velmi pestrý, mnohem nápadnější a častější jsou krvácivé projevy – krvácení z vpichů, kožně-slizniční krvácení, hluboké hematomy, krvácení z operačních ran, vysoké odpady z drénů po chirurgických výkonech, při trombotickém postižení nález odpovídající anatomické lokalitě – akrální ischemie, oligurie, dyspnoe, kardiální dysfunkce, poruchy vědomí*“ [17, s. 144].

Co se týče laboratorních výsledků, shledáváme „*variabilní, vyvíjející se nález, zpočátku pozitivita D-dimerů/FDP, fibrinových monomerů, snížení antitrombinu, později prodloužení aPTT, protrombinového času (Quick), pokles fibrinogenu, pokles trombocytů, nález schistocytů, mohou být přítomny známky MAHA, při postižení mikrocirkulace funkční známky postižení renálních a hepatálních funkcí, u chronické*

formy mírné prodloužení základních testů, zvýšení D-dimerů, pokles fibrinogenu“ [17, s. 144].

3.6.4 Léčba DIC

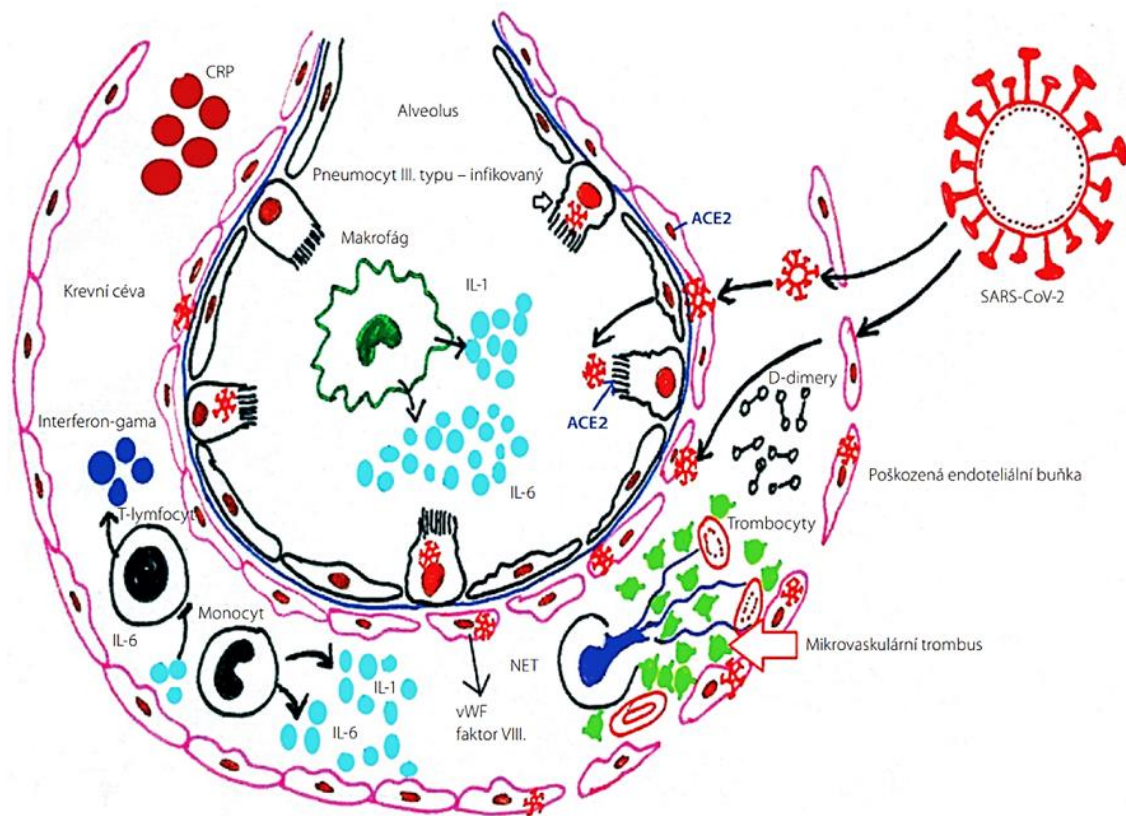
Základem léčby pacientů s DIC je intenzivní léčba základního onemocnění, aby se dosáhlo zmírnění či úplného odstranění vyvolávající příčiny. V závislosti na rozsáhlém výčtu stavů a chorob, které může DIC doprovázet, je léčebný postup vždy přísně individuální [5; 21].

3.7 Koagulopatie v souvislosti s onemocněním COVID-19

U pacientů s těžkým průběhem onemocnění COVID-19 je (mimo jiných závažných komplikací) velkou hrozbou hyperkoagulační stav a s ním spojené nebezpečí vzniku trombotických komplikací, neboť *„koagulopatie následně výrazně zhoršuje prognózu nemocných a zvyšuje celkovou mortalitu“* [24, s. 402]. Nově zavedeným termínem souvisejícím s touto nákazou je tzv. koagulopatie asociovaná s onemocněním COVID-19 (dále jen CAC). Vzhledem k tomu, že na rozvoj hyperkoagulace poukazují zvýšené hodnoty FDP včetně D-dimerů, stalo se jejich laboratorní stanovení důležitou součástí sledování zdravotního stavu nemocných s COVID-19 [24].

„Žilní tromboembolická nemoc (TEN) při infekci COVID-19 je přítomná u čtvrtiny až třetiny hospitalizovaných osob, s výraznou převahou plicní embolie (PE)“ [24, s. 403]. Ostatní tromboembolické příhody jsou zaznamenávány mnohem méně. Na vznik trombotických stavů má vliv působení zánětlivých mediátorů, aktivace krevních destiček, narušení endotelu cév, invazivní cévní přístupy i dlouhodobé upoutání pacienta na lůžko. Častěji se objevují žilní tromboembolické příhody než arteriální [24].

Mechanismus vzniku PE je zřejmě takový, že se nejprve následkem infekce rozpoutá tzv. cytokinová bouře a působením prozánětlivých mediátorů se spustí koagulační kaskáda, poškodí se cévní endotel, působící PAI-1 potlačí fibrinolýzu a hromadí se trombin ještě podpoří nebezpečí vzniku trombu. Proces vrcholí v plicích, které jsou ohniskem poškození. V nich se v důsledku porušení epitelu alveol a endotelu aktivují makrofágy a zároveň zde apoptózou zanikají neutrofilové a lymfocyty. Nastupuje generalizovaná vaskulitida malých cév včetně tvorby mikrotrombů, zintenzivňuje se propustnost plicních kapilár a vznikají i tromby zánětlivé [24].



Obrázek 9 – Interakce endotelu a koagulačního systému indukovaná onemocněním SARS-CoV-2. **CRP** – C-reaktivní protein; **IL-6** – interleukin 6; **IL-1** – interleukin 1; **vWF** – von Willebrandův faktor; **NET** – neutrofilní extracelulární past; **ACE2** – angiotenzin-konvertující enzym 2; **SARS-CoV-2** – novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 – nový typ koronaviru 2
(překreslila MUDr. Simona Bílková) [24]

Hyperkoagulace se u onemocnění COVID-19 projevuje zvýšením hladiny vWF, F VIII, fibrinogenu (F I) a aktivací TF [24].

CAC a klasická DIC (např. sepsí navozená koagulopatie) se od sebe v určitých parametrech liší. Pro CAC jsou charakteristické především trombotické komplikace, v laboratorních výsledcích je typický vzestup aktivity F VIII a koncentrace fibrinogenu, ale trombocytopenie je mírnější než u DIC [24].

„Během nynější koronavirové pandemie byla celosvětová snaha najít efektivní a dobře dostupné prediktory klinického průběhu u nemocných a objasnit jejich vliv na mortalitu. D-dimery, jakožto degradační produkty zesíťovaného fibrinogenu, vypovídají o aktivaci koagulace a fibrinolýze. Z klinického hlediska mohou tedy dobře posloužit k predikci klinického průběhu a mortality u nemocných s infekcí COVID-19“ [24, s. 404].

3.8 Význam stanovení FDP a D-dimerů

Vezmeme-li v úvahu, jak významnou roli hraje fibrinolytický systém v procesu hemostázy, je zřejmé, že laboratorní stanovení poskytující informace o fungování tohoto systému jsou neméně důležitá. Přestože existují laboratorní testy na měření celkových FDP, většina laboratoří dnes dává přednost měření jejich specifické podmnožiny – D-dimerů [8].

FDP jsou označovány jako markery degradace fibrinu/fibrinogenu plazminem. Podnětem pro jejich laboratorní stanovení je podezření na probíhající hemokoagulační rozvrat. Jejich zvýšená hladina mnohdy bývá projevem probíhající DIC. Je však důležité si uvědomit, že vzestup hladiny FDP nemusí nutně znamenat přítomnost DIC, protože jejich zvýšení může doprovázet celou řadu jiných stavů – tromboembolickou nemoc, primární hyperfibrinolýzu, poranění, pooperační stavy, záněty, trombolytickou léčbu nebo odvržení transplantovaných štěpů. Hodnoty FDP ovšem stoupají

i fyziologicky, a to např. při menstruaci, v těhotenství, po porodu či po dlouhotrvajícím fyzickém výkonu [11; 17; 25].

D-dimery svědčí o štěpení nerozpustného fibrinu a jsou důkazem aktivně probíhajícího krevního srážení a následné reaktivní fibrinolýzy. Bývají označovány jako markery trombofilních stavů. Jejich stanovení se provádí při podezření na tromboembolickou nemoc (zejména plicní embolii a hlubokou žilní trombózu). Pro vyloučení těchto stavů využívají lékaři a klinici negativní prediktivní hodnoty D-dimerů naměřené vysoce senzitivní metodou, tj. validovaným testem s certifikací na PE a DVT (HŽT). D-dimery bývají zvýšeny též u DIC, při poranění, trombolytické léčbě, hepatopatiích, po operacích nebo při zánětlivých onemocněních a sepsi. Fyziologický vzestup pozorujeme při menstruaci, v těhotenství, po porodu a po dlouhotrvající námaze [8; 11; 17].

„Jak proces tvorby fibrinové sítě, tak i fibrinolýza dosud neodhalily všechna svá tajemství. Porozumění těmto procesům a jejich patofyziologii může zachránit mnoho životů a zajisté si zaslouží pozornost odborné veřejnosti“ [1, s. 317].

4 METODIKA

4.1 Definice souboru

Vzorky, které jsme podrobili měření za účelem získání dat pro mou bakalářskou práci, pocházely z Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice Praha (ÚVN). Analýza těchto vzorků probíhala v laboratoři klinické hematologie na Oddělení hematologie a krevní transfuze (OHKT) ÚVN.

4.1.1 Kontrolní soubor

Kontrolní soubor zahrnoval celkem 70 vzorků krevní plazmy. Byly použity vzorky dospělých probandů s rutinním indikovaným vyšetřením D-dimerů. Vzorky byly zaslepeny, soubor nebyl randomizován na ženy a muže a jednalo se pouze o standardní vzorky plazmy bez viditelných známek sraženiny, lipémie, hemolýzy a ikterity. Převážnou část tvořily mražené patientské vzorky a pouze malou část vzorky nemražené. 34 vzorků náleželo pacientům COVID-19 negativním a 36 vzorků pacientům s pozitivním nálezem COVID-19.

4.2 Preanalytická fáze

Preanalytická fáze představuje nejdelší fázi laboratorního procesu a z velké části se odehrává mimo laboratoř. Je ovšem zapotřebí jí věnovat náležitou pozornost, neboť se uvádí, že až 60 % chyb pramení právě z této etapy. Spadá pod ni příprava pacienta k odběru a odběr vzorku, transport vzorku, příjem vzorku v laboratoři i zpracování a uchovávání vzorku před vlastní analýzou [26; 27].

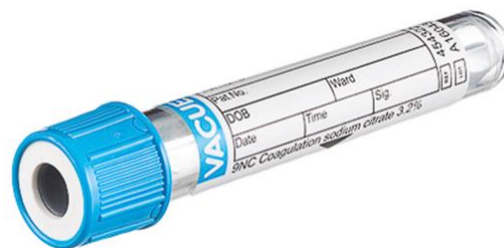
4.2.1 Příprava pacienta k odběru a odběr vzorku

Při indikaci ke stanovení koncentrace FDP v plazmě se provádí odběr venózní krve z loketní žíly. Před odběrem není nutné lačnění, pacient by se však měl

vyhnout tučným jídlům (aby plazma nebyla chylózní) a zároveň by měl dbát na hydrataci nejlépe neslazenými tekutinami (aby krev nebyla příliš zahuštěná) [26].

Odběr plné krve se provádí s uvolněným turniketem venepunkcí pomocí uzavřeného vakuového odběrového systému, nikoli za použití stříkačky. Kontraindikací je předchozí aplikace intramuskulární injekce. Též by se neměl používat odběr z intravenózního katetru či kanyly [27].

Odebírá se do koagulační zkumavky s modrým víčkem. Ta obsahuje antikoagulant citrát sodný o koncentraci 0,109 mol/l (tj. 3,2%), který zabrání srážení odebrané krve tím, že vyváže vápenaté ionty. V ÚVN se používá odběrový systém Vacuette od výrobce Greiner Bio-One. Před samotným odběrem se zkumavka v přítomnosti pacienta označí a jméno se zkontroluje, čímž se minimalizuje riziko záměny vzorku [27].



Obrázek 10 – Koagulační zkumavka Vacuette [28]

Zkumavku na hemokoagulační vyšetření se většinou doporučuje nabírat jako druhou v pořadí, a to z důvodu zabránění kontaminaci vzorku tkáňovými složkami z místa odběru. Je velmi důležité nabrat krev až po rysku na zkumavce, aby byl dodržen správný poměr mezi objemem krve a množstvím protisrážlivého činidla – 1 : 9 (1 objemový díl citrátu sodného ku 9 objemovým dílům krve). Případné nedodržení této zásady vede ke zkreslení výsledků

měření. Ihned po odběru musí být zkumavka s krví v dlani jemně promíchána [26; 27; 29].

4.2.2 Transport vzorku

Odebraný vzorek je potřeba co nejdříve po odběru dopravit do laboratoře. Během transportu není žádoucí třepání vzorku, které by mohlo zapříčinit hemolýzu. Je také podstatné dbát na ochranu vzorku před extrémními teplotami, přičemž teplotní optimum je shodné s teplotou místnosti (15–25 °C) [27].

4.2.3 Příjem vzorku v laboratoři

Při příjmu vzorku v laboratoři je nejprve kontrolována správnost údajů na přiložené žádance a poté se vzorku přiděluje štítek s čárovým kódem, který se nalepí na zkumavku. Pokud je shledán nedostatek např. v podobě chybně vyplněné žádanky či nedostatečně označeného příchozího materiálu, má laboratoř právo vzorek odmítnout.

4.2.4 Zpracování vzorku před vlastní analýzou

Stanovení koncentrace FDP se provádí v plazmě, proto se musí plná krev před vlastní analýzou nejprve centrifugovat a to 15 minut při 2500 g, což představuje přibližně 4000 otáček za minutu. Získá se tak plazma chudá na destičky, která je vhodná k hemokoagulačním měřením [27].

4.2.5 Uchovávání vzorku

Separovaná plazma má pro stanovení celkových FDP i D-dimerů stabilitu minimálně 5 hodin (za předpokladu uchovávání při teplotě 15–25 °C). Vzorky separované plazmy je též možné zamrazit (nejméně při –30 °C). V takovém případě jsou stabilní po dobu 2 měsíců. Následné měření vyžaduje jejich rozmrazení, které se provádí 10 minut ve vodní lázni při teplotě 37 °C. Stanovení

je poté nutné provést do 2 hodin. Platí pravidlo, že vzorky se nikdy nezamrazují opakovaně [27].

4.3 Analytická fáze

Analytická fáze je poměrně krátkým úsekem celého laboratorního procesu. Jedná se již o vlastní stanovení za použití analytických metod s cílem získat výsledek [26].

4.3.1 Analytické vlastnosti laboratorní metody

Každá laboratorní metoda má své analytické vlastnosti, které jsou pravidelně kontrolovány. Jsou jimi preciznost, pravdivost, nejistota měření, senzitivita a specifičnost [26].

- **Preciznost**

Preciznost je mírou shody mezi výsledky získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek. Je statistickým zhodnocením náhodných chyb.

- **Náhodné chyby** jsou takové chyby, které způsobují odchýlení výsledků od průměrné hodnoty na obě strany.
- **Směrodatná odchylka** (*SD*) je mírou rozptylu výsledků a uvádí se v jednotkách, v jakých je měřen daný analyt.
- **Variační koeficient** (*CV*) bývá též označován jako relativní směrodatná odchylka a vyjadřuje se v %.
- **Opakovatelnost** (též preciznost v sérii) znamená, že jsou všechna měření prováděna najednou, tedy v sérii, v kratším časovém intervalu během 1 dne, a to na stejném analyzátoru stále stejným personálem.
- **Mezilehlá preciznost** či **preciznost v čase** vyjadřuje, že se měření provádí postupně, nejčastěji během 20 dní, opět na stejném analyzátoru, ale personál již může být různý.

- O **reprodukovatelnosti** hovoříme, pokud porovnávané měření probíhá na více analyzátoch (možné i různými metodami stanovení), provádí ho různý personál a odehrává se případně i na různých místech [26].

- **Pravdivost**

Pravdivost je těsnost shody mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření a dohodnutou referenční hodnotou. Je určena velikostí systematické chyby.

- **Systematická chyba** je taková chyba, která odchyluje výsledky od průměrné hodnoty pouze na jednu stranu.
- **Velikost odchylky** (*bias*) udává míru pravdivosti [26].

- **Nejistota měření**

Nejistota měření (*u*) je interval obklopující skutečnou hodnotu, v němž se s určitou pravděpodobností vyskytuje výsledek měření [26].

- **Senzitivita (citlivost)**

Senzitivita (citlivost) vyjadřuje nejmenší rozdíl koncentrací, který je ještě možné s určitou přijatelnou nejistotou rozlišit. Je dána závislostí měřené veličiny na koncentraci (tedy kalibrační závislostí) [26].

- **Specifičnost**

Specifičnost vyjadřuje vliv jiných (interferujících) látek nacházejících se v biologickém materiálu na stanovení určitého analytu [26].

4.3.2 Automatický koagulometr

Koncentrace D-dimerů a FDP v plazmě byla měřena automatickým koagulometrem s optickou detekcí ACL TOP family 500 CTS (výrobce Instrumentation Laboratory, dodavatel Werfen). Tento analyzátor slouží pro koagulační, chromogenní a imunoturbidimetrická měření [27].



Obrázek 11 – Automatický koagulometr s optickou detekcí ACL TOP family 500 CTS
(IL) [vlastní zdroj]

Měření je založeno na latexové imunoaglutinační analýze (LIA – latex immunoagglutination assay). Jde o metodu umožňující stanovení koncentrace analytu v biologickém materiálu na základě imunochemické reakce, kdy latexové částice s navázanou protilátkou proti stanovovanému analytu (FDP) aglutinují, a v důsledku toho kyvetou se vzorkem prochází méně světla. Pokles intenzity procházejícího světla je sledován optickým systémem koagulometru [2; 30].

Analyzátor ACL TOP family 500 CTS (IL) má SW validovaný pipetovací protokol, jehož parametry jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 – Pipetovací protokol ACL TOP family 500 CTS (IL) [vlastní zdroj]

	FDP	DD
Vzorek	10 μ l	18 μ l
Latex	100 μ l	45 μ l
Pufr	100 μ l	150 μ l

Alespoň jednou denně se provádí krátká intenzivní údržba analyzátoru, kdy probíhá intenzivní promytí pipetovacích jehel neředěným roztokem Cleanu B. Mezi jednotlivými měřeními vzorků jsou pak obě jehly automaticky proplachovány, aby nedošlo mezi měřeními vzorky k nežádoucímu přenosu (carryover).

4.3.3 Soupravy HemosIL k měření FDP

Pro stanovení celkové koncentrace FDP je potřeba souprava FDP, pro kalibraci metody při nové šarži (LOT) FDP kalibrátory a pro rutinní měření FDP kontroly na 2 hladinách. (Detailní popis použitých reagensů a kompletní diagnostiky pro stanovení D-dimerů HS (LIA) není cílem této bakalářské práce.)

1) FDP – 0020009900, HemosIL, Instrumentation Laboratory:

- **Latexová reagencie** (kat. č. 0020009930) 3 × 4 ml – suspenze polystyrénových latexových částic pokrytých myší monoklonální protilátkou
- **Reakční pufr** (kat. č. 0020009931) 3 × 4 ml – Tris pufr s konzervační látkou



Obrázek 12 – Souprava FDP [vlastní zdroj]

Tato souprava se používá pro kvantitativní stanovení FDP v lidské citrátové plazmě na analyzátoch ACL TOP family. Jedná se o automatizovaný latexový test založený na imunologickém principu. Latexovou reagencii i reakční pufr

musíme před použitím jemně promíchat, dbáme na to, abychom zabránili tvorbě pěny. Po otevření jsou stabilní 3 dny při 15 °C s tím, že musí být po celou dobu uchovávány v originálních lahvičkách. Neotevřené reagentie se skladují při 2–8 °C a jejich stabilita je zaručena do data expirace (uvedeno vždy na lahvičce) [31].

2) FDP kalibrátory – 0020009910, HemosIL, Instrumentation Laboratory:

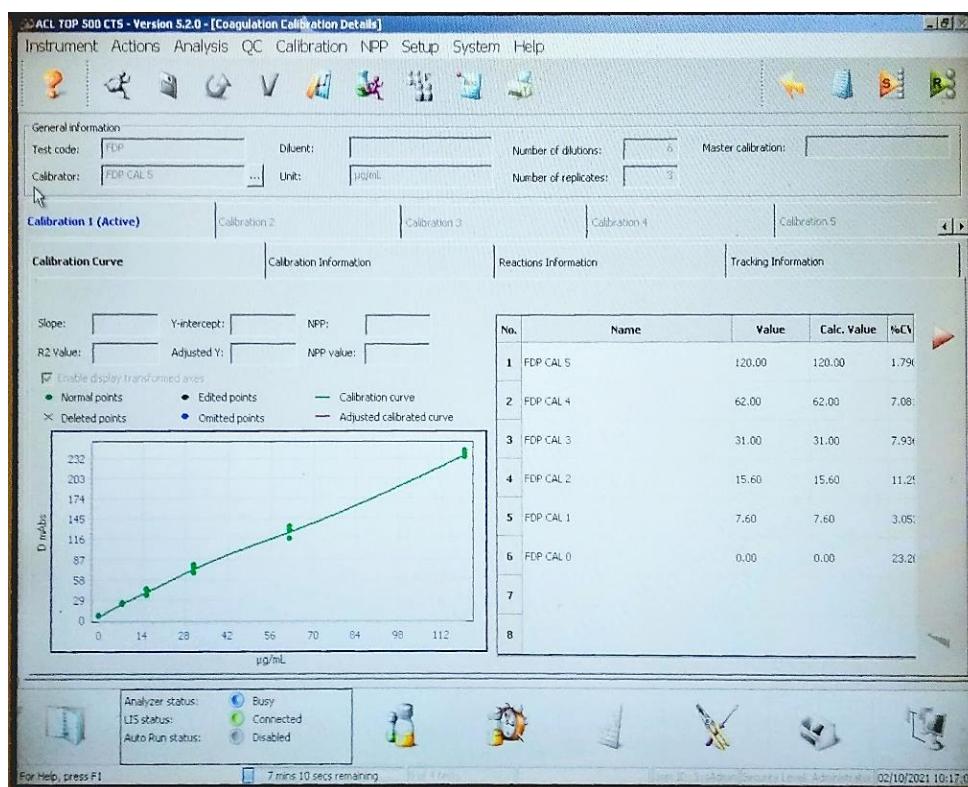
- **FDP kalibrátor 1** (č. produktu 0020009911) 1 × 1 ml – lyofilizovaný roztok lidských FDP s konzervační látkou
- **FDP kalibrátor 2** (č. produktu 0020009912) 1 × 1 ml – lyofilizovaný roztok lidských FDP s konzervační látkou
- **FDP kalibrátor 3** (č. produktu 0020009913) 1 × 1 ml – lyofilizovaný roztok lidských FDP s konzervační látkou
- **FDP kalibrátor 4** (č. produktu 0020009914) 1 × 1 ml – lyofilizovaný roztok lidských FDP s konzervační látkou
- **FDP kalibrátor 5** (č. produktu 0020009915) 1 × 1 ml – lyofilizovaný roztok lidských FDP s konzervační látkou
- **Štítek s čárovým kódem pro označení FDP kalibrátoru 0** – pro nalepení na 4 ml lahvičku (která není součástí soupravy a do níž se nalije 1 ml nulového kalibrátoru – tím je **HemosIL Factor Diluent**)



Obrázek 13 – FDP kalibrátory [vlastní zdroj]

Tato souprava slouží ke kalibraci testu HemosIL FDP. Jednotlivé komerční kalibrátory mají odstupňované koncentrace FDP. Do každé lahvičky ze soupravy napipetujeme 1 ml vody, abychom rozpustili jejich obsah. Lahvičky uzavřeme víčkem, krouživým pohybem jemně promícháme a zkontrolujeme, zda se produkt v nich obsažený náležitě rozpustil. Následně kalibrátory necháváme stát 30 minut při 15–25 °C. Před použitím lahvičky znovu jemně promícháme (převrácením). Stabilita kalibrátorů po otevření je 2 hodiny při 15–25 °C (pokud jsou uchovávány v originálních lahvičkách). Neotevřené kalibrátory se skladují při 2–8 °C a jsou stabilní do data expirace (uvedeno vždy na lahvičce) [32].

Kalibrace se provádí při zavádění nové metody, změně šarže reagensů či v případě nutnosti rekalibrace. Je klíčová pro získání kalibrační křivky, na jejímž základě analyzátor přiřazuje k naměřeným optickým parametrům hledané koncentrace. Kalibrační křivka udává závislost měřeného parametru (absorbance) na hladině vyšetřované složky (koncentrace) [27; 33].



Obrázek 14 – Kalibrační křivka [vlastní zdroj]

3) FDP kontroly – 0020009920, HemosIL, Instrumentation Laboratory:

- FDP nízká kontrola (kat. č. 0020009921) 3 × 1 ml – lyofilizovaný roztok lidských FDP s konzervační látkou
- FDP vysoká kontrola (kat. č. 0020009922) 3 × 1 ml – lyofilizovaný roztok lidských FDP s konzervační látkou



Obrázek 15 – FDP kontroly [vlastní zdroj]

Tato souprava je důležitá pro kontrolu kvality testu HemosIL FDP. Do každé lahvičky napipetujeme 1 ml vody, lahvičky uzavřeme a jemným kroužením promícháme. Zkontrolujeme, zda se jejich obsah rozpustil. Poté kontroly necháváme stát 30 minut při 15–25 °C. Před použitím lahvičky znovu jemně promícháme (převrácením). Stabilita kontrol po otevření je 8 hodin při 15–25 °C (v originálních lahvičkách). Neotevřené kontroly se skladují při 2–8 °C a jsou stabilní do data expirace (uvedeno vždy na lahvičce) [34].

V rámci interního hodnocení kvality se provádí analýza kontrolních vzorků v jedné analytické sérii společně s rutinními vzorky. Měří se na nízké (tzv. low control) a na vysoké hladině (tzv. high control). Naměřené hodnoty jsou automaticky zaznamenávány do regulačních diagramů a vyhodnocovány podle nastavených povolených mezí. Jestliže se výsledek měření kontrolního vzorku

nachází mimo nastavené povolené meze, rozhoduje bioanalytik o tom, zda bude výsledek analytické série přijat či odmítnut. Výsledky měření kontrolních vzorků laborant průběžně posuzuje společně s bioanalytikem. Záznamy o provedených kontrolních měřeních, které bioanalytik zhodnotí, vytiskne a podepíše, musí být uchovávány po dobu 5 let [35].

Externí hodnocení kvality se uskutečňuje formou mezilaboratorního porovnávání a je zajišťováno např. Systémem externí kontroly kvality (SEKK spol. s r. o.) nebo jiným zahraničním systémem externí kontroly kvality (INSTAND aj.) [35].

Aby se ověřila vhodnost metody v podmínkách laboratoře, provádí se tzv. verifikace. Její součástí je stanovení opakovatelnosti (preciznosti) měření v sérii, kdy se měří vzorek ideálně 6krát až 10krát za sebou. Z naměřených hodnot se poté vypočítá průměrná hodnota, směrodatná odchylka a variační koeficient a výsledky se porovnají s parametry deklarovanými výrobcem v příbalovém letáku. V našem případě jsme obě kontroly měřili 8krát. Změřené koncentrace včetně vypočítané průměrné hodnoty, směrodatné odchylky a variačního koeficientu jsou zapsány v tabulkách 2 a 3. Výrobce v příbalovém letáku udává pro nízkou kontrolu střední hodnotu 9,99 mg/l a variační koeficient pro preciznost v sérii 3,3 % a pro vysokou kontrolu střední hodnotu 34,21 mg/l a preciznost v sérii 2,3 % [31; 35].

Tabulka 2 – Preciznost v sérii – low control (nízká hladina) [folastní zdroj]

Low control (nízká hladina)	
Měření č.	Naměřená hodnota (mg/l)
1	10,54
2	11,08
3	10,76
4	11,47
5	11,17
6	11,33
7	10,81
8	10,71
Průměrná hodnota \bar{x} (mg/l)	10,98
Směrodatná odchylka SD (mg/l)	0,33
Variační koeficient CV (%)	3,00

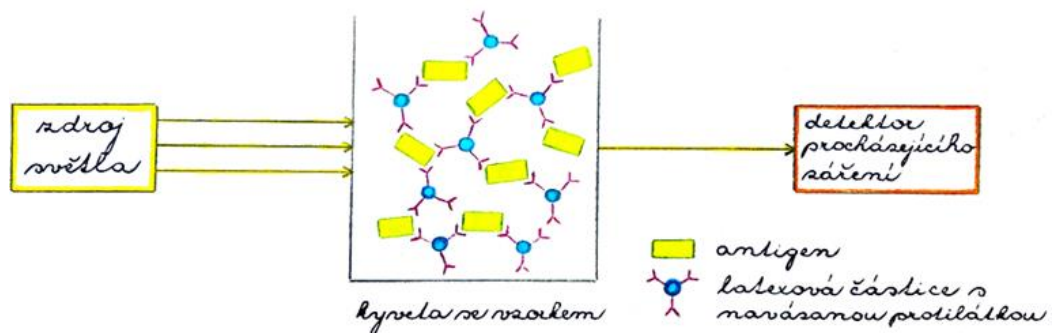
Tabulka 3 – Preciznost v sérii – high control (vysoká hladina) [folastní zdroj]

High control (vysoká hladina)	
Měření č.	Naměřená hodnota (mg/l)
1	29,92
2	29,52
3	29,02
4	30,01
5	29,75
6	30,69
7	31,04
8	31,41
Průměrná hodnota \bar{x} (mg/l)	30,17
Směrodatná odchylka SD (mg/l)	0,81
Variační koeficient CV (%)	2,68

4.3.4 Princip stanovení

HemosIL FDP test je automatizovaný imunoturbidimetrický test určený pro kvantitativní stanovení FDP v lidské citrátové plazmě. Vyznačuje se latexovými částicemi potaženými monoklonálními protilátkami vysoce specifickými pro fragmenty D, které se vyskytují v rozpustných derivátech fibrinu a fibrinogenu.

Jakmile je plazma obsahující FDP smíchána s latexovou reagencií a reakčním pufrům, latexové částice s navázanými protilátkami aglutinují s FDP a vzniká zákal. Tím se průchod světla kyvetou se vzorkem omezuje. Míra aglutinace je přímo úměrná koncentraci FDP ve vzorku. Princip stanovení tedy spočívá v měření poklesu procházejícího světla při 671 nm způsobeného agregáty, přičemž se jedná o turbidimetrickou immunoanalýzu [36].



Obrázek 16 – Princip imunoturbidimetrie [vlastní zdroj]

4.3.5 Postup měření

Před zahájením vlastního měření patientských vzorků je potřeba:

- do analyzátoru se systémovými promývacími roztoky vložit příslušné reagentie (latexovou reagentii, reakční pufr, Factor Diluent);
- provést kalibraci, abychom získali kalibrační křivku;
- proměřit komerční kontroly na nízké a vysoké hladině.

Po provedení těchto úkonů je analyzátor již připraven k měření a můžeme měřit vlastní soubor vzorků.

Mikrozkumavky typu Eppendorf s rozmraženými vzorky plazmy (10 minut v lázni 37 °C) převrácením jemně promícháme a posléze vkládáme do redukční stojánku k měření. Čerstvé zcentrifugované vzorky plazmy získané z citrátové krve v primárních koagulačních zkumavkách Vacuette taktéž vložíme do dalšího stojánku. Všechny nádobky se vzorky plazmy odzátkujeme, vložíme do analyzátoru ACL TOP 500 CTS a stiskneme ikonu domečku pro urychlení načtení vzorků.

Následně zkontrolujeme, zda analyzátor zaznamenal a načtl všechny vložené vzorky. Pokud je vše v pořádku, přidělíme v počítači vzorkům čísla a zvolíme požadovanou metodu (FDP). Posledním krokem je spuštění samotného měření, které zahájíme kliknutím na ikonu běžícího panáčka „running“.

Tímto způsobem získáme hodnoty koncentrací FDP v 70 vybraných vzorcích plazmy. Výsledky měření si vytiskneme a uchováme pro další zpracování, tj. porovnání s již známými koncentracemi D-dimerů v týchž vzorcích a pro statistické zhodnocení.

4.3.6 Mez detekce a možné interference

Výrobce IL uvádí po validaci obou metod data uvedená v tabulce 4: nejnižší koncentrace FDP, jakou jsme schopni stanovit, je 1 mg/l. U D-dimerů je tato hodnota nižší a to 0,021 mg/l. Obě imunoturbidimetrická stanovení jsou odečítána fotometricky v infračervené oblasti při 671 nm, kdy při této vlnové délce jsou potlačeny běžné interference na minimum [37].

Tabulka 4 – Mez detekce a možné interference [37]

Metoda	Mez detekce (spodní mez stanovení)	Hemolýza HGB neovlivní do:	Lipémie TRIGLYCERIDY neovlivní do:		Ikterita BILIRUBIN total neovlivní do:		RF neovlivní do:
	mg/l	g/l	g/l	mmol/l	g/l	μmol/l	kIU/l
	DD	0,021	5	13,3	15	0,180	308
FDP	1	5	12,5	14	0,190	0,323	1000

4.3.7 Referenční rozmezí

V tabulce 5 jsou uvedena referenční rozmezí koncentrace D-dimerů a FDP v plazmě dospělých pacientů. Referenční rozmezí pro koncentraci D-dimerů je 0–0,230 mg/l a je dáno doporučením výrobce IL v souladu s doporučením České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (dále jen ČHS ČLS JEP). Referenční rozmezí pro koncentraci FDP je 0,1–5 mg/l dle ČHS ČLS JEP, přičemž výrobce IL uvádí v příbalovém letáku jako častý cut-off zdravé populace již koncentraci 2,01 mg/l [31; 38; 39].

Tabulka 5 – Referenční rozmezí [38; 39]

Měřené parametry	Referenční rozmezí (mg/l)
DD	0–0,230
FDP	0,1–5

4.4 Postanalytická fáze

Postanalytická fáze je obdobím nastupujícím po získání výsledků, v němž je zapotřebí zhodnotit správnost naměřených výsledků a poté je předat a interpretovat lékaři, který si laboratorní vyšetření vyžádal. Následující dění je již na úrovni oboustranné komunikace mezi laboratoří a lékařem. O dalším postupu včetně využití dalších diagnostických metod a případné terapii

rozhoduje lékař [27; 40]. „Cílem postanalytické fáze musí být maximální využití informace získané z provedených laboratorních testů“ [40, s. 82].

5 VÝSLEDKY

Výsledky této práce vycházejí z koncentrací FDP a D-dimerů změřených na analyzátoru ACL TOP family 500 CTS (IL) u 70 vzorků plazmy. Získaná data byla zpracována pomocí tabulkového procesoru Microsoft Excel.

5.1 Kalibrátory

Ke kalibraci testu HemosIL FDP slouží kalibrátory č. 0 až 5. Koncentrace naměřené u jednotlivých kalibrátorů jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6 – Koncentrace naměřené u kalibrátorů [vlastní zdroj]

Kalibrátor č.	Analyzátor ACL TOP 500	
	DD (mg/l)	FDP (mg/l)
0	0,000	0,00
1	0,600	7,60
2	1,161	15,60
3	2,135	31,00
4	3,383	62,00
5	10,373	120,00

5.2 Kontroly kvality

Interní kontrola kvality se zakládá na měření koncentrace nízkých a vysokých kontrol v rámci měření samotných kontrol. V tabulce 7 jsou zapsány naměřené hodnoty. Obě změřené kontroly splňují stanovené meze.

Tabulka 7 – Koncentrace naměřené u kontrol [vlastní zdroj]

Kontrola	Analyzátor ACL TOP 500	
	DD (mg/l)	FDP (mg/l)
Low	0,68	10,29
High	1,737	28,71

5.3 Vzorky celého kontrolního souboru

V tabulce 8 jsou uvedeny naměřené koncentrace D-dimerů a FDP všech 70 vzorků. Ze získaných dat lze vyčíst, že u všech vzorků kontrolního souboru koncentrace FDP správně (a to i v nejnižších koncentracích) převyšuje koncentraci D-dimerů. Koncentrace byly měřeny za účelem jejich vzájemného porovnání, proto jsou v této tabulce uvedeny též vypočítané násobky, které udávají, koliknásobně je koncentrace FDP ve vzorcích vyšší než koncentrace D-dimerů. Vzorky č. 11, 18 a 51 vykazují extrémní hodnoty a z tohoto důvodu nebyly zahrnuty do grafu lineární regrese.

Tabulka 8 – Data celého kontrolního souboru [ostatní zdroj]

Vzorek č.	Analyzátor ACL TOP 500		Vypočítaný násobek	Diagnóza
	DD (mg/l)	FDP (mg/l)		
1	0,522	2,77	5,31	COVID-19
2	0,355	2,19	6,17	Dušnost – dyspnoe
3	1,025	7,74	7,55	COVID-19
4	0,485	3,12	6,43	S neurčenými komplikacemi
5	3,727	24,51	6,58	Podezření na COVID-19, COVID-19
6	0,877	5,42	6,18	Porucha vestibulární funkce NS
7	7,970	51,21	6,43	Jiná virová pneumonie, COVID-19
8	1,154	6,58	5,70	Akutní respirační selhání, COVID-19
9	9,777	52,58	5,38	Mozkový infarkt způsobený neurčenou okluzí nebo stenózou mozkových tepen
10	0,918	7,22	7,86	Mdloba – synkopa a kolaps
11	49,902	329,72	6,61	Akutní respirační selhání, COVID-19
12	1,971	31,61	16,04	Mozkový infarkt způsobený trombózou mozkových tepen
13	0,635	5,75	9,06	COVID-19
14	6,069	43,39	7,15	Jiná virová pneumonie, COVID-19

Vzorek č.	Analyzátor ACL TOP 500		Vypočítaný násobek	Diagnóza
	DD (mg/l)	FDP (mg/l)		
15	0,778	6,08	7,81	Jiná virová pneumonie, COVID-19
16	3,270	27,81	8,50	Bolest hrudi NS
17	1,909	11,81	6,19	COVID-19
18	35,706	192,61	5,39	Akutní respirační selhání, COVID-19
19	0,843	5,52	6,55	Akutní respirační selhání, COVID-19
20	1,845	8,54	4,63	Akutní respirační selhání
21	0,704	5,61	7,97	Jiná virová pneumonie, COVID-19
22	3,298	30,23	9,17	Dušnost – dyspnoe
23	0,836	7,31	8,74	Jiná virová pneumonie, COVID-19
24	0,347	3,56	10,26	COVID-19
25	0,480	2,81	5,85	Jiná virová pneumonie, COVID-19
26	1,390	14,37	10,34	Bolest hrudi NS
27	3,395	17,26	5,08	Podezření na COVID-19, COVID-19
28	0,208	2,07	9,95	COVID-19
29	0,424	4,78	11,27	Jiná virová pneumonie, COVID-19
30	2,452	27,13	11,06	Jiná virová pneumonie, COVID-19
31	0,095	0,74	7,79	COVID-19
32	0,522	0,82	1,57	COVID-19
33	1,012	8,37	8,27	Jiná virová pneumonie, COVID-19
34	0,465	2,68	5,76	Akutní respirační selhání
35	0,268	2,25	8,40	COVID-19
36	0,283	2,08	7,35	Jiná virová pneumonie
37	7,474	51,41	6,88	Jiná virová pneumonie, COVID-19
38	0,306	0,93	3,04	Primární trombofilie
39	0,365	2,56	7,01	Podezření na COVID-19, COVID-19
40	0,196	0,93	4,74	Jiná virová pneumonie
41	8,730	58,39	6,69	COVID-19
42	1,667	9,66	5,79	COVID-19

Vzorek č.	Analyzátor ACL TOP 500		Vypočítaný násobek	Diagnóza
	DD (mg/l)	FDP (mg/l)		
43	0,282	1,25	4,43	COVID-19
44	0,248	1,09	4,40	COVID-19
45	0,849	6,81	8,02	Mozkový infarkt způsobený embolií mozkových tepen
46	1,267	18,13	14,31	Abnormální hladina jiných drog, léků a biologických látek
47	0,259	2,08	8,03	COVID-19
48	0,121	0,48	3,97	Dušnost – dyspnoe
49	0,098	0,15	1,53	Abnormality bílých krvinek
50	0,171	0,67	3,92	Sekundární trombocytopenie
51	18,818	138,41	7,36	Zhmoždění (kontuze) očního víčka a periokulární krajiny, COVID-19
52	0,712	4,94	6,94	Sekundární zhoubný novotvar jater a intrahepatálních žlučovodů
53	0,327	2,00	6,12	Jiná virová pneumonie
54	4,394	26,45	6,02	Akutní respirační selhání
55	5,508	18,13	3,29	Dušnost – dyspnoe
56	0,311	2,93	9,42	Diabetes mellitus 2. typu
57	1,419	2,50	1,76	Virová pneumonie NS
58	0,361	2,18	6,04	Akutní respirační selhání
59	0,315	1,07	3,40	COVID-19
60	0,320	2,46	7,69	Podezření na COVID-19
61	0,830	6,68	8,05	COVID-19
62	0,542	3,79	6,99	COVID-19
63	0,171	0,63	3,68	Primární trombofilie
64	0,060	0,16	2,67	Esenciální (primární) hypertenze
65	0,056	0,06	1,07	Anemie NS
66	0,025	0,05	2,00	Monoklonální gamapatie neurčeného významu
67	3,193	18,57	5,82	Zhoubný novotvar – dolní třetina jícnu
68	0,239	1,81	7,57	Akutní respirační selhání
69	0,412	1,84	4,47	Astma převážně alergické
70	0,275	1,33	4,84	COVID-19

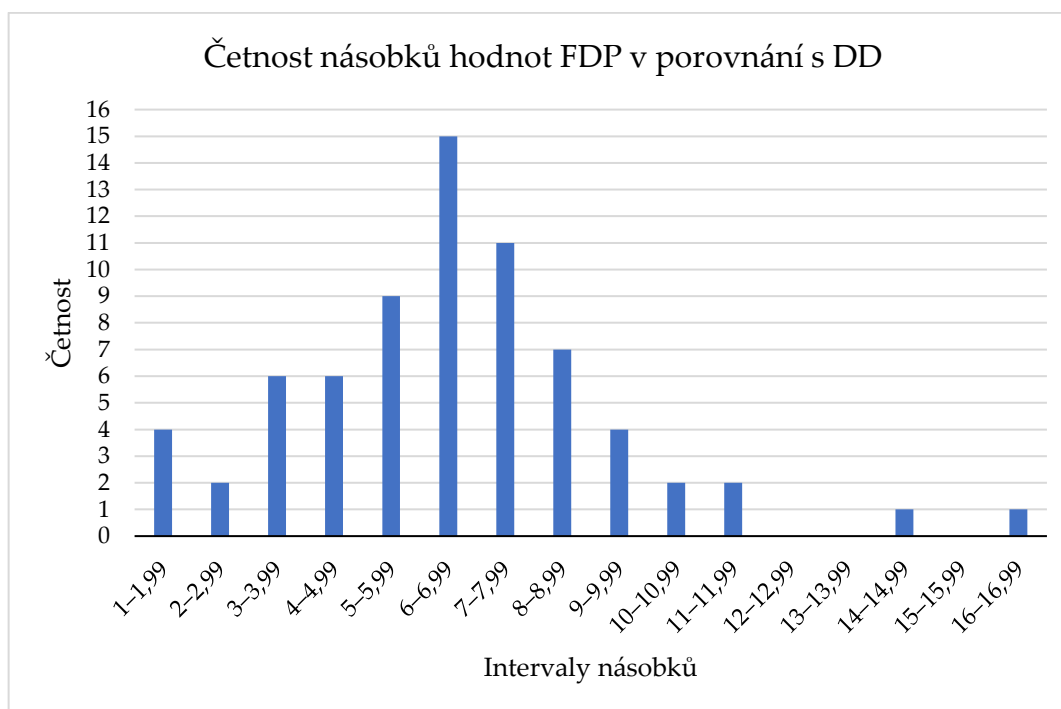
V rámci porovnávání, kdy jsme zjišťovali, kolikrát je naměřená koncentrace FDP vyšší ve srovnání s koncentrací D-dimerů, jsme stanovili intervaly násobků v rozsahu 1–16,99. Do tabulky 9 jsme zaznamenali tyto intervaly násobků a jejich četnost a data jsme následně graficky zpracovali.

Tabulka 9 – Četnost intervalů násobků u vzorků celého kontrolního souboru

[vlastní zdroj]

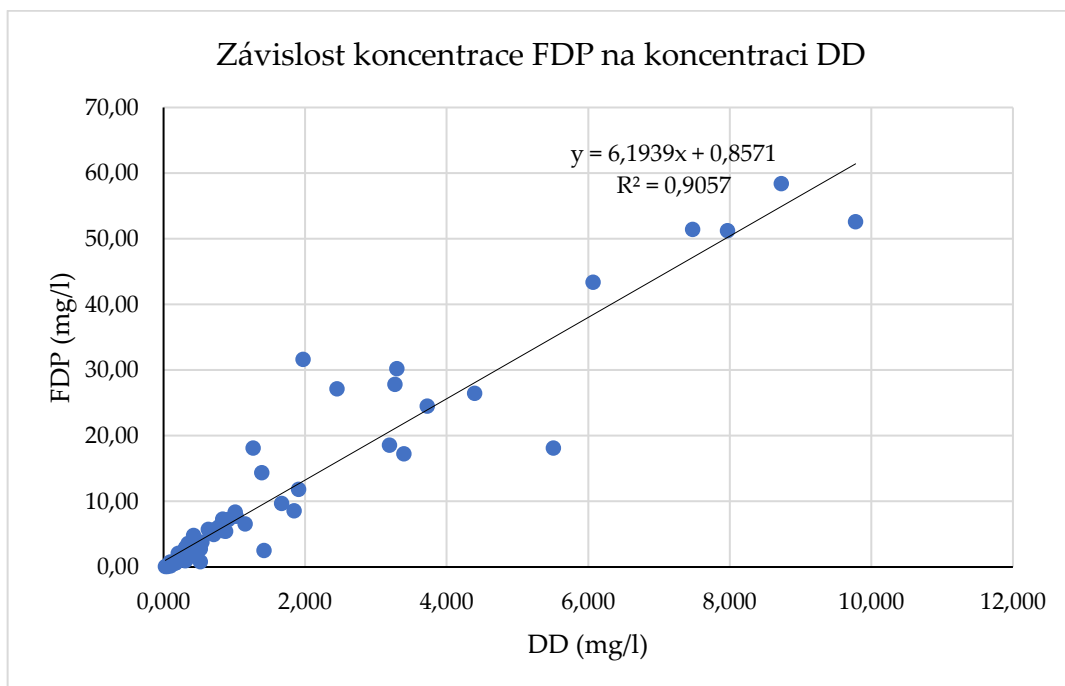
Interval násobků	Četnost
1–1,99	4
2–2,99	2
3–3,99	6
4–4,99	6
5–5,99	9
6–6,99	15
7–7,99	11
8–8,99	7
9–9,99	4
10–10,99	2
11–11,99	2
12–12,99	0
13–13,99	0
14–14,99	1
15–15,99	0
16–16,99	1

Graf na obrázku 17 ukazuje, že nejzastoupenějším intervalem je interval 6–6,99. Znamená to, že u 15 vzorků je koncentrace FDP 6–6,99krát vyšší než koncentrace D-dimerů. Druhým nejzastoupenějším intervalem je interval 7–7,99, do něhož spadají násobky 11 vzorků. U 2 vzorků je koncentrace FDP v porovnání s D-dimery vyšší mnohonásobně a to přesně 14,31krát a 16,04krát.



Obrázek 17 – Graf četnosti násobků hodnot FDP v porovnání s DD u vzorků celého kontrolního souboru [vlastní zdroj]

Závislost koncentrace FDP na koncentraci D-dimerů znázorňuje graf lineární regrese na obrázku 18. Vzhledem k tomu, že vzorky č. 11, 18 a 51 vykazují extrémní výsledky a převyšují i lineární rozsah měření uvedený v příbalovém letáku (120 mg/l), nebyly tyto 3 výsledky do tohoto grafu zařazeny. Z grafu je patrný rozptyl naměřených hodnot, který naznačují body odchýlené od přímky. Zároveň je zřejmé poměrně široké rozpětí naměřených hodnot, kdy převážná část vzorků má koncentraci FDP mezi 0 a 10 mg/l a současně koncentraci D-dimerů mezi 0 a 2 mg/l, ale pak jsou zde i vzorky, u nichž koncentrace FDP dosahuje hodnot mezi 50 a 60 mg/l a koncentrace D-dimerů u těchto vzorků se nachází v rozmezí 8 až 10 mg/l.



Obrázek 18 – Graf závislosti koncentrace FDP na koncentraci DD u vzorků celého kontrolního souboru [vlastní zdroj]

5.4 Vzorky pacientů COVID-19 negativních

V tabulce 10 jsou uvedeny pouze hodnoty náležící 34 vzorkům pacientů COVID-19 negativních. Jedná se o naměřené koncentrace D-dimerů a FDP a vypočítané násobky udávající kolikrát je koncentrace FDP vyšší než koncentrace D-dimerů. Do grafického zpracování byly zahrnuty všechny hodnoty, neboť ani jeden z výsledků těchto vzorků nebyl vyhodnocen jako extrémní.

Tabulka 10 – Data vzorků pacientů COVID-19 negativních [vlastní zdroj]

Vzorek č.	Analyzátor ACL TOP 500		Vypočítaný násobek	Diagnóza
	DD (mg/l)	FDP (mg/l)		
2	0,355	2,19	6,17	Dušnost – dyspnoe
4	0,485	3,12	6,43	S neurčenými komplikacemi
6	0,877	5,42	6,18	Porucha vestibulární funkce NS
9	9,777	52,58	5,38	Mozkový infarkt způsobený neurčenou okluzí nebo stenózou mozkových tepen
10	0,918	7,22	7,86	Mdloba – synkopa a kolaps
12	1,971	31,61	16,04	Mozkový infarkt způsobený trombózou mozkových tepen
16	3,270	27,81	8,50	Bolest hrudi NS
20	1,845	8,54	4,63	Akutní respirační selhání
22	3,298	30,23	9,17	Dušnost – dyspnoe
26	1,390	14,37	10,34	Bolest hrudi NS
34	0,465	2,68	5,76	Akutní respirační selhání
36	0,283	2,08	7,35	Jiná virová pneumonie
38	0,306	0,93	3,04	Primární trombofilie
40	0,196	0,93	4,74	Jiná virová pneumonie
45	0,849	6,81	8,02	Mozkový infarkt způsobený embolií mozkových tepen
46	1,267	18,13	14,31	Abnormální hladina jiných drog, léků a biologických látek
48	0,121	0,48	3,97	Dušnost – dyspnoe
49	0,098	0,15	1,53	Abnormality bílých krvinek
50	0,171	0,67	3,92	Sekundární trombocytopenie

Vzorek č.	Analyzátor ACL TOP 500		Vypočítaný násobek	Diagnóza
	DD (mg/l)	FDP (mg/l)		
52	0,712	4,94	6,94	Sekundární zhoubný novotvar jater a intrahepatálních žlučovodů
53	0,327	2,00	6,12	Jiná virová pneumonie
54	4,394	26,45	6,02	Akutní respirační selhání
55	5,508	18,13	3,29	Dušnost – dyspnoe
56	0,311	2,93	9,42	Diabetes mellitus 2. typu
57	1,419	2,50	1,76	Virová pneumonie NS
58	0,361	2,18	6,04	Akutní respirační selhání
60	0,320	2,46	7,69	Podezření na COVID-19
63	0,171	0,63	3,68	Primární trombofilie
64	0,060	0,16	2,67	Esenciální (primární) hypertenze
65	0,056	0,06	1,07	Anemie NS
66	0,025	0,05	2,00	Monoklonální gamapatie neurčeného významu
67	3,193	18,57	5,82	Zhoubný novotvar – dolní třetina jícnu
68	0,239	1,81	7,57	Akutní respirační selhání
69	0,412	1,84	4,47	Astma převážně alergické

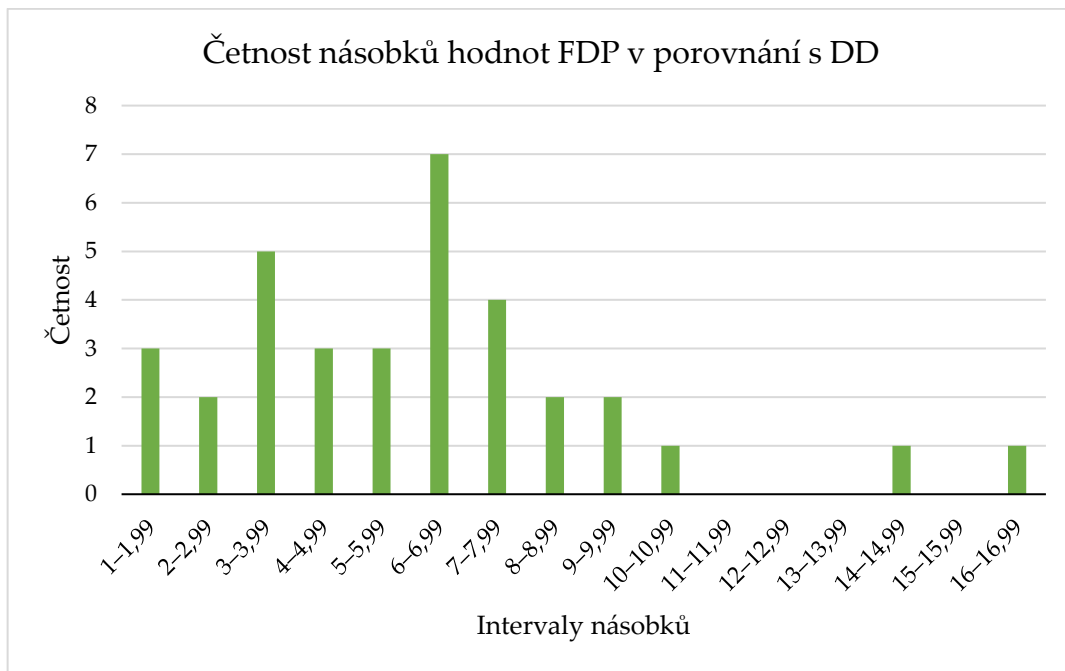
Do tabulky 11 jsme zaznamenali intervaly násobků a jejich četnost a data jsme následně graficky zpracovali.

Tabulka 11 – Četnost intervalů násobků u vzorků pacientů COVID-19 negativních

[vlastní zdroj]

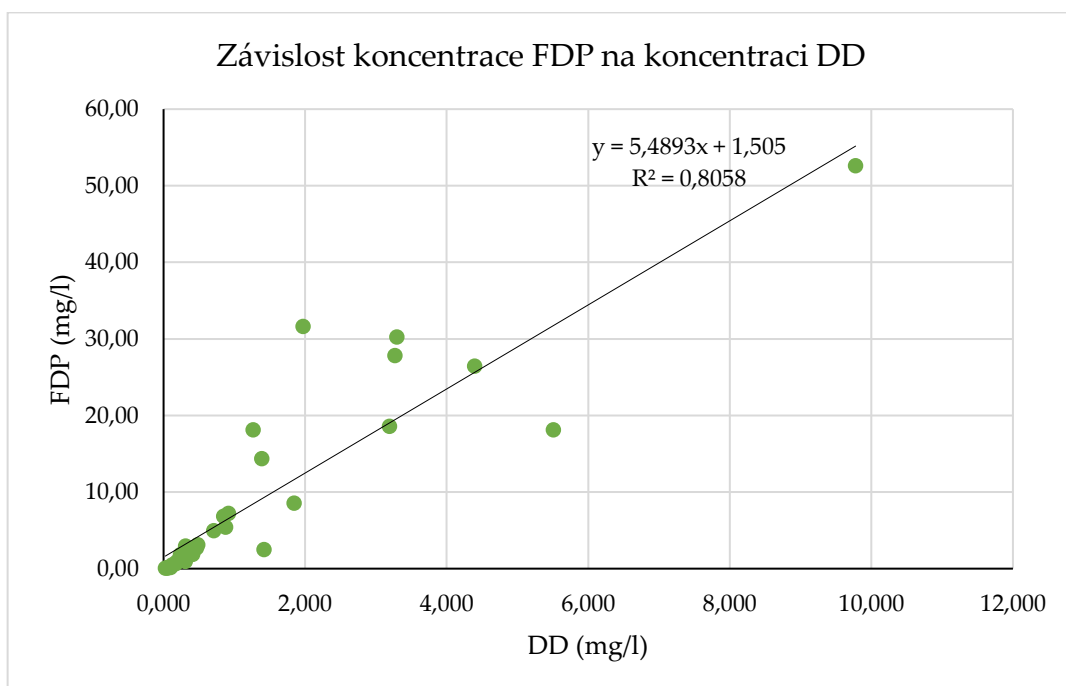
Interval násobků	Četnost
1–1,99	3
2–2,99	2
3–3,99	5
4–4,99	3
5–5,99	3
6–6,99	7
7–7,99	4
8–8,99	2
9–9,99	2
10–10,99	1
11–11,99	0
12–12,99	0
13–13,99	0
14–14,99	1
15–15,99	0
16–16,99	1

Graf na obrázku 19 ukazuje, že nejzastoupenějším intervalem je interval 6–6,99. Znamená to, že u 7 vzorků je koncentrace FDP 6–6,99krát vyšší než koncentrace D-dimerů. Druhým nejzastoupenějším intervalem je interval 3–3,99, do něhož spadají násobky 5 vzorků. U 2 vzorků je koncentrace FDP v porovnání s D-dimery vyšší mnohonásobně a to přesně 14,31krát a 16,04krát.



Obrázek 19 – Graf četnosti násobků hodnot FDP v porovnání s DD vzorků pacientů COVID-19 negativních [vlastní zdroj]

Závislost koncentrace FDP na koncentraci D-dimerů znázorňuje graf lineární regrese na obrázku 20. Z grafu je patrný rozptyl naměřených hodnot, který naznačují body odchýlené od přímky. Zároveň je zřejmé poměrně široké rozpětí naměřených hodnot, kdy převážná část vzorků má koncentraci FDP mezi 0 a 10 mg/l a současně koncentraci D-dimerů mezi 0 a 2 mg/l, ale pak je zde i vzorek, jehož koncentrace FDP dosahuje 52,58 mg/l a koncentrace D-dimerů 9,777 mg/l.



Obrázek 20 – Graf závislosti koncentrace FDP na koncentraci DD u vzorků pacientů COVID-19 negativních [vlastní zdroj]

5.5 Vzorky pacientů COVID-19 pozitivních

V tabulce 12 jsou uvedeny pouze hodnoty náležící 36 vzorkům pacientů COVID-19 pozitivních. Jedná se o naměřené koncentrace D-dimerů a FDP a vypočítané násobky udávající kolikrát je koncentrace FDP vyšší než koncentrace D-dimerů. Vzorky č. 11, 18 a 51 vykazují extrémní hodnoty a z tohoto důvodu nebyly zahrnuty do grafu lineární regrese.

Tabulka 12 – Data vzorků pacientů COVID-19 pozitivních [vlastní zdroj]

Vzorek č.	Analyzátor ACL TOP 500		Vypočítaný násobek	Diagnóza
	DD (mg/l)	FDP (mg/l)		
1	0,522	2,77	5,31	COVID-19
3	1,025	7,74	7,55	COVID-19
5	3,727	24,51	6,58	Podezření na COVID-19, COVID-19
7	7,970	51,21	6,43	Jiná virová pneumonie, COVID-19
8	1,154	6,58	5,70	Akutní respirační selhání, COVID-19
11	49,902	329,72	6,61	Akutní respirační selhání, COVID-19
13	0,635	5,75	9,06	COVID-19
14	6,069	43,39	7,15	Jiná virová pneumonie, COVID-19
15	0,778	6,08	7,81	Jiná virová pneumonie, COVID-19
17	1,909	11,81	6,19	COVID-19
18	35,706	192,61	5,39	Akutní respirační selhání, COVID-19
19	0,843	5,52	6,55	Akutní respirační selhání, COVID-19
21	0,704	5,61	7,97	Jiná virová pneumonie, COVID-19
23	0,836	7,31	8,74	Jiná virová pneumonie, COVID-19
24	0,347	3,56	10,26	COVID-19
25	0,480	2,81	5,85	Jiná virová pneumonie, COVID-19
27	3,395	17,26	5,08	Podezření na COVID-19, COVID-19

Vzorek č.	Analyzátor ACL TOP 500		Vypočítaný násobek	Diagnóza
	DD (mg/l)	FDP (mg/l)		
28	0,208	2,07	9,95	COVID-19
29	0,424	4,78	11,27	Jiná virová pneumonie, COVID-19
30	2,452	27,13	11,06	Jiná virová pneumonie, COVID-19
31	0,095	0,74	7,79	COVID-19
32	0,522	0,82	1,57	COVID-19
33	1,012	8,37	8,27	Jiná virová pneumonie, COVID-19
35	0,268	2,25	8,40	COVID-19
37	7,474	51,41	6,88	Jiná virová pneumonie, COVID-19
39	0,365	2,56	7,01	Podezření na COVID-19, COVID-19
41	8,730	58,39	6,69	COVID-19
42	1,667	9,66	5,79	COVID-19
43	0,282	1,25	4,43	COVID-19
44	0,248	1,09	4,40	COVID-19
47	0,259	2,08	8,03	COVID-19
51	18,818	138,41	7,36	Zhmoždění (kontuze) očního víčka a periokulární krajiny, COVID-19
59	0,315	1,07	3,40	COVID-19
61	0,830	6,68	8,05	COVID-19
62	0,542	3,79	6,99	COVID-19
70	0,275	1,33	4,84	COVID-19

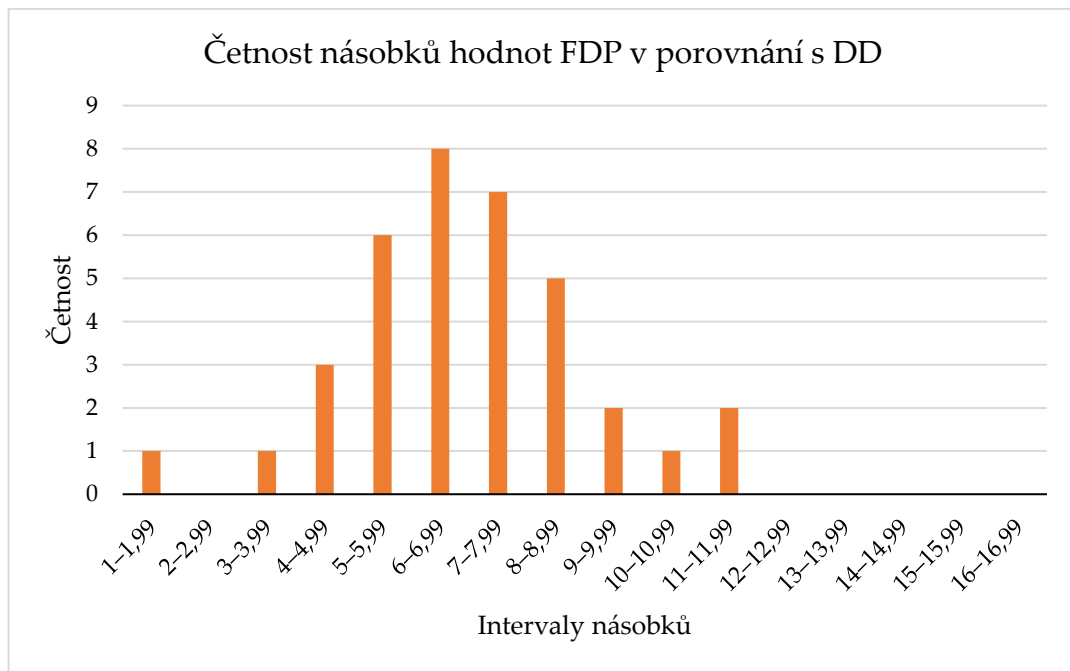
Do tabulky 13 jsme zaznamenali intervaly násobků a jejich četnost a data jsme následně graficky zpracovali.

Tabulka 13 – Četnost intervalů násobků u vzorků pacientů COVID-19 pozitivních

[vlastní zdroj]

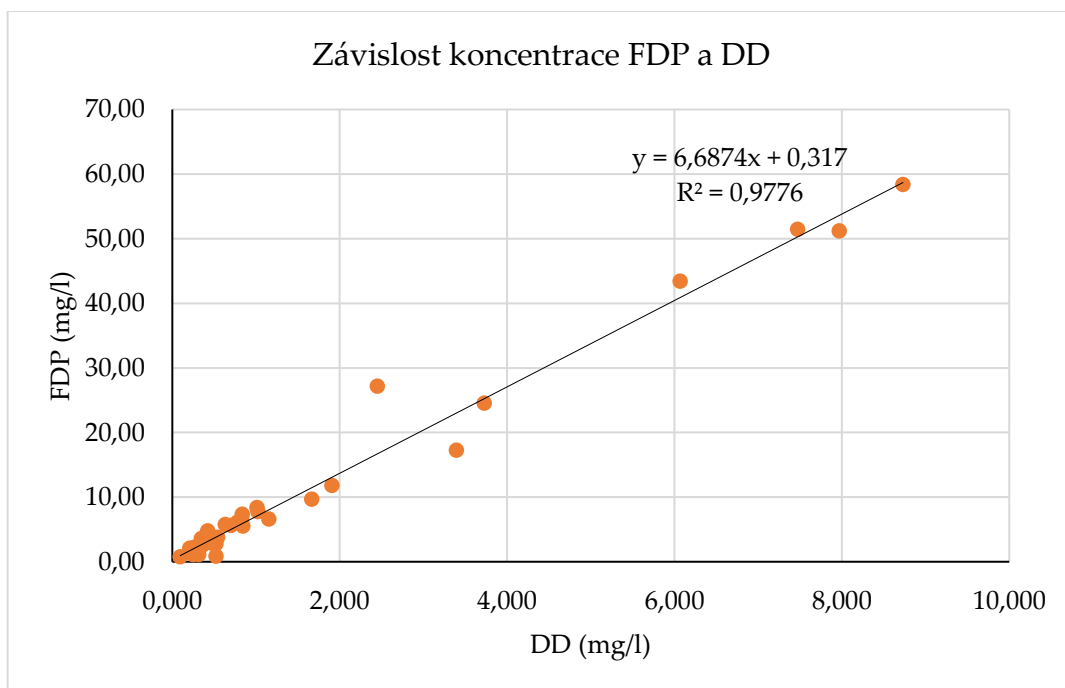
Interval násobků	Četnost
1–1,99	1
2–2,99	0
3–3,99	1
4–4,99	3
5–5,99	6
6–6,99	8
7–7,99	7
8–8,99	5
9–9,99	2
10–10,99	1
11–11,99	2
12–12,99	0
13–13,99	0
14–14,99	0
15–15,99	0
16–16,99	0

Graf na obrázku 21 ukazuje, že nejzastoupenějším intervalem je interval 6–6,99. Znamená to, že u 8 vzorků je koncentrace FDP 6–6,99krát vyšší než koncentrace D-dimerů. Druhým nejzastoupenějším intervalem je interval 7–7,99, do něhož spadají násobky 7 vzorků. Nejvyšším dosaženým intervalem násobků je interval 11–11,99, do kterého spadají násobky 2 vzorků.



Obrázek 21 – Graf četnosti násobků hodnot FDP v porovnání s DD u vzorků pacientů COVID-19 pozitivních [vlastní zdroj]

Závislost koncentrace FDP na koncentraci D-dimerů znázorňuje graf lineární regrese na obrázku 22. Vzhledem k tomu, že vzorky č. 11, 18 a 51 vykazují extrémní výsledky a převyšují i lineární rozsah měření uvedený v příbalovém letáku (120 mg/l), nebyly do tohoto grafu zařazeny. Z grafu je patrný pouze mírný rozptyl naměřených hodnot, který naznačují body odchýlené od přímky. Zároveň je zřejmé poměrně široké rozpětí naměřených hodnot, kdy převážná část vzorků má koncentraci FDP mezi 0 a 10 mg/l a současně koncentraci D-dimerů mezi 0 a 2 mg/l, ale pak je zde i vzorek, jehož koncentrace FDP dosahuje 58,39 mg/l a koncentrace D-dimerů 8,730 mg/l.



Obrázek 22 – Graf závislosti koncentrace FDP na koncentraci DD u vzorků pacientů COVID-19 pozitivních [vlastní zdroj]

5.6 Statistické zhodnocení

Pro naměřené hodnoty jsme vypočítali směrodatnou odchylku, medián, průměrnou hodnotu a korelační koeficient. Výsledky těchto výpočtů jsou uvedeny v následujících tabulkách. Ze souboru dat ke statistickému zhodnocení byly vyřazeny koncentrace změřené u vzorků č. 11, 18 a 51, protože se jedná o extrémní hodnoty.

V tabulce 14 je uvedena směrodatná odchylka, medián a průměrná hodnota pro koncentrace D-dimerů a FDP změřené u vzorků celého kontrolního souboru. Průměrná koncentrace D-dimerů ve vzorcích má hodnotu 1,520 mg/l a průměrná koncentrace FDP 10,27 mg/l. Obě průměrné hodnoty tak překračují referenční rozmezí.

Tabulka 14 – Statistické hodnoty vzorků celého kontrolního souboru [vlastní zdroj]

Statistické hodnoty:	DD	FDP
Směrodatná odchylka SD (mg/l)	2,198	14,30
Medián \tilde{x} (mg/l)	0,542	3,79
Průměrná hodnota \bar{x} (mg/l)	1,520	10,27

V tabulce 15 je uvedena směrodatná odchylka, medián a průměrná hodnota pro koncentrace D-dimerů a FDP změřené u vzorků pacientů COVID-19 negativních. Průměrná koncentrace D-dimerů ve vzorcích má hodnotu 1,337 mg/l a průměrná koncentrace FDP 8,84 mg/l. Obě průměrné hodnoty překračují referenční rozmezí, jedná se ovšem o hodnoty nižší, než byly vypočítány pro vzorky celého kontrolního souboru.

*Tabulka 15 – Statistické hodnoty vzorků pacientů COVID-19 negativních
[vlastní zdroj]*

Statistické hodnoty:	DD	FDP
Směrodatná odchylka SD (mg/l)	2,011	12,30
Medián \tilde{x} (mg/l)	0,439	2,59
Průměrná hodnota \bar{x} (mg/l)	1,337	8,84

V tabulce 16 je uvedena směrodatná odchylka, medián a průměrná hodnota pro koncentrace D-dimerů a FDP změřené u vzorků pacientů COVID-19 pozitivních. Průměrná koncentrace D-dimerů ve vzorcích má hodnotu 1,708 mg/l a průměrná koncentrace FDP 11,74 mg/l. Obě průměrné hodnoty překračují referenční rozmezí a jedná se o hodnoty vyšší, než byly vypočítány pro vzorky celého kontrolního souboru. Je očividné, že nejvyšší koncentrace D-dimerů a FDP byly změřeny právě ve vzorcích pacientů COVID-19 pozitivních, a to včetně všech extrémních hodnot, které nebyly do statistického zhodnocení zařazeny.

Tabulka 16 – Statistické hodnoty vzorků pacientů COVID-19 pozitivních [vlastní zdroj]

Statistické hodnoty:	DD	FDP
Směrodatná odchylka SD (mg/l)	2,392	16,18
Medián \tilde{x} (mg/l)	0,704	5,61
Průměrná hodnota \bar{x} (mg/l)	1,708	11,74

V tabulce 17 jsou zapsány korelační koeficienty pro koncentrace D-dimerů a FDP ve vzorcích celého kontrolního souboru, vzorcích pacientů COVID-19 negativních i vzorcích pacientů COVID-19 pozitivních. Korelační koeficient vyjadřuje míru korelace neboli lineární závislost mezi 2 veličinami. Čím více se jeho hodnota blíží 1, tím je vztah mezi těmito veličinami silnější. Nejbližší k 1 má korelační koeficient vypočítaný pro koncentrace D-dimerů a FDP ve vzorcích pacientů COVID-19 pozitivních, který má hodnotu 0,989.

Tabulka 17 – Korelační koeficienty [vlastní zdroj]

Koncentrace DD a FDP ve:	Korelační koeficient k
Vzorcích celého kontrolního souboru	0,952
Vzorcích pacientů COVID-19 negativních	0,898
Vzorcích pacientů COVID-19 pozitivních	0,989

6 DISKUZE

Stanovení D-dimerů je v současné době rutinním laboratorním vyšetřením požadovaným především při diagnostice tromboembolických stavů. Měření D-dimerů slouží jako významný negativní prediktor, neboť negativní výsledek (jejich koncentrace splňující referenční rozmezí) vypovídá o tom, že v těle s vysokou pravděpodobností neprobíhá žilní trombóza ani plicní embolie. Naopak stanovení FDP se dnes ve většině rutinních (nevýzkumných) laboratoří již běžně neprovádí, protože je méně specifické.

Cílem této práce bylo pokusit se nalézt hypotetický vztah mezi plazmatickými koncentracemi D-dimerů a FDP. Za tímto účelem byly změřeny koncentrace D-dimerů a FDP v 70 zaslepených vzorcích plazmy pocházejících od dospělých pacientů. Kontrolní soubor nebyl randomizován na ženy a muže.

Nejnižší naměřená koncentrace ve vzorcích kontrolního souboru je u D-dimerů 0,025 mg/l a u FDP 0,05 mg/l. Nejvyšší naměřená koncentrace má u D-dimerů hodnotu 49,902 mg/l a u FDP 329,72 mg/l. Průměrná koncentrace u D-dimerů je 1,520 mg/l a u FDP 10,27 mg/l. D-dimery byly shledány zvýšené ($> 0,230$ mg/l) celkem u 60 vzorků a zvýšené FDP (> 5 mg/l) pouze u 34 vzorků. Vypočítaný korelační koeficient 0,952 svědčí pro lineární závislost mezi oběma veličinami.

Porovnání koncentrací D-dimerů a FDP ověřilo, že ve vzorcích je koncentrace FDP vždy vyšší než koncentrace D-dimerů. Nejčastěji (u 15 vzorků) jsou FDP 6–6,99krát vyšší než D-dimery a u 11 vzorků jsou FDP vyšší 7–7,99krát. Průměrně je koncentrace FDP vyšší 6,55krát.

V literatuře, která se zabývá vztahem mezi plazmatickými koncentracemi D-dimerů a FDP, bývají vzorky rozdělovány do 3 kategorií podle naměřené

koncentrace FDP: 1) FDP < 5 mg/l; 2) FDP 5–20 mg/l; 3) FDP > 20 mg/l. Současně se pro vzorky v těchto kategoriích sleduje rozmezí koncentrace D-dimerů. V kontrolním souboru se nachází 36 vzorků, u nichž je koncentrace FDP < 5 mg/l a současně se u nich koncentrace D-dimerů pohybuje v rozmezí 0,025–1,419 mg/l. 20 vzorků spadá do kategorie FDP 5–20 mg/l, přičemž koncentrace D-dimerů se u nich pohybuje v rozmezí 0,635–5,508 mg/l a u 14 vzorků je koncentrace FDP > 20 mg/l a koncentrace D-dimerů v rozmezí 1,971–49,902 mg/l. V početním zastoupení jednotlivých kategorií ani v rozmezích koncentrací D-dimerů u těchto kategorií se s literaturou neshodujeme. Je však nutno zmínit, že koncentrace D-dimerů jsou v literatuře uvedeny v ng/ml FEU nikoliv v mg/l DDim, které jsou uváděny v této práci. Aby bylo možné hodnoty vzájemně porovnat, musely by se alespoň orientačně převést, a to podle vztahu 1 mg/l FEU je více než dvojnásobek koncentrace v mg/l DDim. Platí ovšem pravidlo, že nelze měřit D-dimery v mg/l FEU a následně výsledek přepočítávat na mg/l DDim, takže tento převodní vztah nelze považovat za přesný. Dále je potřeba vzít v úvahu, že v této práci bylo hodnoceno pouze 70 vzorků, zatímco v jedné ze studií 144 vzorků a ve druhé dokonce 217 vzorků. Důležitou roli hraje také odlišná metodika stanovení. Absorbance při stanovení koncentrace D-dimerů byla totiž ve zmiňovaných studiích měřena při 540 nm, což je vlnová délka poměrně nízká a více interferovaná než vlnová délka 671 nm, při které byla absorbance měřena v rámci této práce. Stanovení koncentrace FDP pak bylo v obou studiích semikvantitativní za použití testovacích karet, kdežto my jsme provedli kvantitativní, vysoce senzitivní stanovení pomocí automatizovaného imunoturbidimetrického testu. Z těchto důvodů není možné zcela relevantně vzájemně porovnávat výsledky této práce s výsledky uvedenými v literatuře [41; 42].

V kontrolním souboru byla nalezena cut-off hodnota – koncentrace D-dimerů 0,836 mg/l. Jedná se o nejnižší koncentraci D-dimerů, se kterou se pojí

pozitivní FDP. Znamená to, že jakmile je v našich změřených datech koncentrace D-dimerů $\geq 0,836$ mg/l, pak má koncentrace FDP hodnotu > 5 mg/l. Tato cut-off hodnota (0,836 mg/l) je tedy téměř v souladu s cut-off hodnotou 1420 ng/ml FEU (odpovídá asi 0,710 mg/l DDim) předkládanou v literatuře [41; 42]. Opět je zapotřebí brát v potaz rozdíly mezi naším stanovením a stanovením popisovaným ve studiích.

V souvislosti s probíhající koronavirovou pandemií se začaly objevovat informace o spojitosti onemocnění COVID-19 se zvýšenými D-dimery, proto jsou v této práci porovnány též hodnoty naměřené v „necovidových“ a „covidových“ vzorcích. Kontrolní soubor zahrnoval celkem 34 vzorků pacientů COVID-19 negativních a 36 vzorků pacientů COVID-19 pozitivních.

Nejnižší koncentrace naměřená v necovidových vzorcích je u D-dimerů 0,025 mg/l a u FDP 0,05 mg/l. Nejvyšší naměřená koncentrace má u D-dimerů hodnotu 9,777 mg/l a u FDP 52,58 mg/l. Průměrná koncentrace v necovidových vzorcích je u D-dimerů 1,337 mg/l a u FDP 8,84 mg/l. D-dimery byly shledány zvýšené (při cut-off 0,230 mg/l) celkem u 26 vzorků a zvýšené FDP (> 5 mg/l) u 13 vzorků. Vypočítaný korelační koeficient 0,898 svědčí pro lineární závislost mezi oběma veličinami. Nejčastěji (u 7 vzorků) jsou FDP 6–6,99krát vyšší než D-dimery. Průměrně je koncentrace FDP vyšší 6,11krát.

Nejnižší koncentrace naměřená v covidových vzorcích je u D-dimerů 0,095 mg/l a u FDP 0,74 mg/l. Nejvyšší naměřená koncentrace má u D-dimerů hodnotu 49,902 mg/l a u FDP 329,72 mg/l, což jsou opravdu enormní hodnoty. Průměrná koncentrace v covidových vzorcích je u D-dimerů 1,708 mg/l a u FDP 11,74 mg/l. Je však zapotřebí podotknout, že do výpočtů průměrných hodnot nebyly zahrnuty extrémní koncentrace změřené u 3 vzorků, jinak by průměrné hodnoty byly mnohem vyšší. D-dimery byly shledány

zvýšené (> 0,230 mg/l) celkem u 34 vzorků a zvýšené FDP (> 5 mg/l) u 21 vzorků. Vypočítaný korelační koeficient 0,989 svědčí pro lineární závislost mezi oběma veličinami. Nejčastěji (u 8 vzorků) jsou FDP 6–6,99krát vyšší než D-dimery. Průměrně je koncentrace FDP vyšší 6,96krát.

COVID-19 je označení pro nové infekční onemocnění způsobené koronavirem SARS-CoV-2. Jedná se o příliš mladou diagnózu, o níž panuje stále řada nejasností. Každým dnem se objevují nové poznatky, ale ještě potrvá, než budeme znát odpovědi na všechny vyvstávající otázky. Přesto však již mnohé o tomto onemocnění víme, neboť se jedná o globální problém, který na sebe poutá pozornost odborníků po celém světě. Ti se jím intenzivně zabývají v rámci výzkumů a postupně odhalují jeho skryté mechanismy [43].

Časopis Nature zveřejnil článek s názvem „Coronavirus blood-clot mystery intensifies“ (v překladu „Koronavirus a krevní sraženiny – záhada zesiluje“), který, jak název napovídá, pojednává o souvislosti onemocnění COVID-19 s krevními sraženinami. Krevní sraženiny jsou častým průvodním projevem této nemoci. Behnood Bikdeli, kardiolog z Kolumbijské univerzity v New Yorku, popisuje, že je to občas jako „bouře krevních sraženin“. Každý pacient se závažným onemocněním je vystaven riziku vzniku krevních sraženin, ale pacienti hospitalizovaní s COVID-19 se zdají být ještě náchylnější [43].

Studie z Nizozemska a Francie naznačují, že krevní sraženiny vznikají u 20–30 % pacientů s těžkým průběhem onemocnění COVID-19. Důvod této skutečnosti zatím nebyl zcela objasněn a je předmětem bádání. Někteří vědci považují vliv tohoto onemocnění na srážení krve za klíčový rizikový prvek. Nad přítomností krevních sraženin i nad mechanismem jejich vzniku se však stále vznášejí mnoho otazníků [43].

Jednou z možností, proč ke vzniku sraženin dochází, je, že virus SARS-CoV-2 přímo útočí na endotelové buňky lemující krevní cévy. ACE2 receptor těchto buněk je shodný s receptorem, který virus používá pro vstup do plicních buněk. Je tedy pravděpodobné, že napadá též buňky endoteliální, poškozují je a nutí je, aby uvolnily proteiny, které následně spouští proces krevního srážení. Další možnou příčinou je účinek viru na imunitní systém. Podle této teorie virus vybízí buňky imunitního systému k uvolnění chemických signálů podporujících zánět, což má opět spojitost s krevní srážlivostí. Vypadá to, že virus též aktivuje komplementový systém, a i ten poté spouští koagulaci. Pro tuto hypotézu svědčí nálezy proteinů komplementu na plicní a kožní tkáni pacientů infikovaných onemocněním COVID-19. Difúzní bilaterální plicní zánět pozorovaný u těchto pacientů je tak zřejmě spojen s novou plicní specifickou vaskulopatií, která byla nedávno označena jako plicní intravaskulární koagulopatie (dále jen PIC) [43; 44].

Mimo jiné se zdá, že protisrážlivé léky u pacientů s onemocněním COVID-19 při standardních profylaktických dávkách nefungují vždy spolehlivě. Následkem toho i mladí lidé umírají např. na cévní mozkové příhody [43; 44].

Jeffrey Laurence, hematolog z Weill Cornell Medicine v New Yorku, zkoumal se svými kolegy vzorky plic a kůže tří pacientů infikovaných COVID-19, přičemž našli kapiláry ucpané krevními sraženinami. Podobné nálezy hlásily i další skupiny, včetně týmu vedeného Jamesem O'Donnellem, ředitelem irského Centra cévní biologie na Royal College of Surgeons v Dublinu. Podle něho by nálezy mohly vysvětlovat, proč někteří lidé mají kriticky nízkou hladinu kyslíku v krvi a proč umělá plicní ventilace někdy nepomáhá. V důsledku pneumonie se totiž drobné plicní váčky ucpávají tekutinou nebo hnisem a mikrokoagula omezují pohyb okysličené krve [43].

Zajímavé je pro nás však především zjištění, že u pacientů s onemocněním COVID-19 jsou běžně zvýšené koncentrace D-dimerů a jejich výše často koreluje se závažností onemocnění. To potvrzují i naše výsledky. U pacientů s těžkým průběhem nemoci se koncentrace D-dimerů zvyšuje mnohdy dramaticky, zvláště pak, je-li přítomna současně i cytokinová bouře [43; 45].

D-dimery se tak u pacientů hospitalizovaných pro COVID-19 stávají spolehlivým prognostickým ukazatelem jejich zdravotního stavu, na čemž se shoduje hned několik publikovaných studií [45; 46; 47]. Vysoké koncentrace D-dimerů (nad 2 mg/l DDim) jsou označovány také jako silné prediktory mortality u nakažených pacientů [46].

Stanovení D-dimerů pomocí kvalitního testu s certifikací na PE a DVT (včetně DIC) v dnešní pandemické době proto nabývá nesmírného významu. Jedná se o rychlý vysoce senzitivní test, který ještě před potvrzením diagnózy COVID-19 slouží jako důležitý marker mikrotrombotických a trombotických změn. Informuje lékaře o vhodných kandidátech na intenzivní péči a včasnou intervenci a pomáhá zavčas nasadit a zahájit účinnou medikamentózní léčbu [45].

7 ZÁVĚR

Závěry této práce prokázaly, že vztah mezi plazmatickými koncentracemi D-dimerů a FDP existuje. Poukazuje na to již skutečnost, že D-dimery jsou specifickou podmnožinou FDP. Obě veličiny projevují vzájemnou lineární závislost.

Bylo ověřeno, že koncentrace FDP vždy převyšuje koncentraci D-dimerů. Z výsledků vyplývá, že koncentrace FDP je v porovnání s koncentrací D-dimerů vyšší v průměru přibližně 6,5krát. Koncentrace FDP je však 6–6,99krát vyšší pouze u 15 vzorků ze 70, takže není možné hovořit o pravidlu. U koncentrace D-dimerů byla zjištěna cut-off hodnota 0,836 mg/l. Vzorky kontrolního souboru, v nichž byla změřena tato a vyšší koncentrace D-dimerů, vykazují současně pozitivní FDP (> 5 mg/l). Podobnou cut-off hodnotu (1420 ng/ml FEU, tj. asi 0,710 mg/l DDim) předkládá i literatura [41; 42].

Byla též porovnána koncentrace D-dimerů a FDP ve vzorcích pocházejících od pacientů COVID-19 negativních a COVID-19 pozitivních. Potvrdilo se, že u pacientů s onemocněním COVID-19 jsou koncentrace D-dimerů a FDP vyšší.

Výsledky práce naznačují, že pro vztah mezi plazmatickými koncentracemi D-dimerů a FDP nelze odvodit konkrétní pravidla, která by platila vždy a podle nichž by bylo možné určit koncentraci FDP, je-li známa koncentrace D-dimerů, a naopak. Nicméně je zřejmé, že koncentrace FDP by měla převyšovat koncentraci D-dimerů. Cíl bakalářské práce byl tímto splněn.

V posledních řádcích bych chtěla zmínit, že jsem svou práci uvedla a teoretickou část zakončila slovy z článku, na němž se podílel pan prof. Ing. Jan Evangelista Dyr, DrSc. – muž, který se problematice hemostázy, koagulace a trombózy věnoval celý svůj život. Jeho nedávným odchodem ztratil (nejen)

hematologický svět výjimečného člověka a mezinárodně uznávaného odborníka. Avšak „*věda zjistila, že nic nemůže zmizet beze stopy...*“ [48]. A o významné stopě zanechané prof. Dyrem není sebemenších pochyb.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACE2	angiotenzin-konvertující enzym 2
ADP	adenosindifosfát
APC	aktivovaný protein C
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
AT	antitrombin
ATP	adenosintrifosfát
Ca ²⁺	vápenaté ionty
CAC	koagulopatie asociovaná s onemocněním COVID-19
CRP	C-reaktivní protein
ČHS ČLS JEP	Česká hematologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně
DD	D-dimery
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace (koagulopatie)
DVT	hluboká žilní trombóza (deep vein thrombosis)
EPCR	endotelový receptor pro protein C
F I	koagulační faktor I (fibrinogen)
F II	koagulační faktor II (protrombin)
F III	koagulační faktor III (tkáňový faktor)
F IV	koagulační faktor IV (vápenaté ionty)
F IX	koagulační faktor IX (Christmasův faktor)
F IXa	aktivovaný koagulační faktor F IX
F V	koagulační faktor V (proakcelerin)
F Va	aktivovaný koagulační faktor V
F VI	koagulační faktor VI
F VII	koagulační faktor VII (prokonvertin)
F VIIa	aktivovaný koagulační faktor VII
F VIII	koagulační faktor F VIII (antihemofilický faktor)

F VIIIa	aktivovaný koagulační faktor VIII
F X	koagulační faktor X (Stuart-Prowerové faktor)
F Xa	aktivovaný koagulační faktor X
F XI	koagulační faktor XI (plasma thromblastin antecedent)
F XII	koagulační faktor XII (Hagemanův faktor)
F XIII	koagulační faktor XIII (fibrin stabilizující faktor)
F XIIIa	aktivovaný koagulační faktor XIII
FDP	fibrin/fibrinogen degradační produkty
GP	glykoprotein
HC II	heparinový kofaktor II
HK	vysokomolekulární kininogen
HŽT	hluboká žilní trombóza
IL	Instrumentation Laboratory
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
LIA	latexová imunoaglutinační analýza
LMWH	nízkomolekulární heparin
MAHA	mikroangiopatická hemolytická anémie
NET	neutrofilní extracelulární past
OHKT	Oddělení hematologie a krevní transfuze
PAI	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PC	protein C
PDGF	destičkový růstový faktor
PE	plicní embolie
PF4	destičkový faktor 4
PIC	plicní intravaskulární koagulopatie
PL	fosfolipidy
PT	protrombinový čas
pTGFβ	destičky transformující růstový faktor β

r-tPA	rekombinantní tkáňový aktivátor plazminogenu
SARS-CoV-2	nový typ koronaviru 2 (novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)
SEKK	System externí kontroly kvality
TAFI	trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TAT	trombin-antitrombin komplex
TEG	trombelastografie
TEN	žilní tromboembolická nemoc
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TM	trombomodulin
TNF	tumor nekrotizující faktor
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TXA2	tromboxan A2
UFH	nefrakciovaný heparin
u-PA	urokináza
ÚVN	Ústřední vojenská nemocnice
vWF	von Willebrandův faktor

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOTLÍN, Roman a Jan DYR. Tvorba fibrinu a jeho degradace. *Chemické listy* [online]. 2008, (102), 314–318 [cit. 2020-09-28].
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_05_314-318.pdf
- [2] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie hemostázy*. 1. Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN 80-866-8203-X.
- [3] PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [4] ŠLECHTOVÁ, Jitka. Hemostáza – jak ji možná neznáme. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2007, (15), 97–101 [cit. 2020-10-10].
Dostupné z: http://stara.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/2-07/KBM0702_Slechtova_97.pdf
- [5] MATÝŠKOVÁ, Miloslava a Ingrid HRACHOVINOVÁ. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999. ISBN 80-701-3278-7.
- [6] MAŠKOVÁ, Václava. Referenční rozmezí hematologických laboratorních měření. In: *Laboratorní příručka OHKT a OKB ÚVN Praha* [online]. [cit. 2020-11-09].
Dostupné z: <https://www.uvn.cz/cs/laboratorni-prirucky-a-referencni-rozmezi-laboratori>
- [7] PECKA, Miroslav. *Přehled laboratorní hematologie II: Bílá krevní řada, Krevní destička*. 1. vydání. Praha: Galén, 1996. ISBN 80-858-2443-4.

- [8] CAMPBELL, Sean. Hemostasis. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* [online]. Elsevier, 2020, 445–467 [cit. 2020-11-08]. ISBN 978-0-12-815499-1.
Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815499-1.00026-0
- [9] LANDOVÁ, Ludmila. *Koagulace – plasmatický koagulační systém, koagulační kaskáda: Přednáška k předmětu 17 PBLHTS1 na FBMI (2019–2020)*.
- [10] KVASNIČKA, Jan. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. 1. vydání. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-716-9993-4.
- [11] PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.
- [12] Fibrin degradation products blood test. *UCSF Health* [online]. [cit. 2021-01-28].
Dostupné z: <https://www.ucsfhealth.org/medical-tests/fibrin-degradation-products-blood-test>
- [13] What's the difference between FDPs and D-dimers?. *Pathology Student* [online]. [cit. 2021-01-28].
Dostupné z: <https://www.pathologystudent.com/whats-the-difference-between-fdps-and-d-dimers/>
- [14] KARETOVÁ, Debora a Jan BULTAS. *Farmakoterapie tromboembolických stavů*. 3. rozšířené a aktualizované vydání. Praha: Maxdorf, 2015. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 978-80-7345-459-3.

- [15] JANOŮŠEK, Stanislav. Tenektepláza v současné klinické praxi. *Kardiologická revue – Interní medicína* [online]. 2010, (1), 46–53 [cit. 2021-01-31].
Dostupné z:
<https://www.kardiologickarevue.cz/casopisy/kardiologicka-revue/2010-1/tenekteplaza-v-soucasne-klinicke-praxi-32089>
- [16] PENKA, Miroslav. *Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC)*. Praha: Grada, 2003. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-0341-6.
- [17] FABER, Edgar. *Základy hematologické diagnostiky*. Druhé přepracované vydání. Praha: Mladá fronta, 2015. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-3742-6.
- [18] LITVINOV, Rustem a John WEISEL. What Is the Biological and Clinical Relevance of Fibrin? *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [online]. 2016, 42(4), 333–343 [cit. 2021-01-31]. ISSN 0094-6176.
Dostupné z: doi:10.1055/s-0036-1571342
- [19] Syndrom DIC. *Farmakoterapeutické informace: Měsíčník pro lékaře a farmaceuty* [online]. 2016, 1–4 [cit. 2021-01-31].
Dostupné z: <https://www.sukl.cz/sukl/fi-rijen-2016>
- [20] VYDRA, Jan a Petr CETKOVSKÝ. *Hematologie v kostce*. Praha: Mladá fronta, 2015. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3698-6.
- [21] LEVI, Marcel. Disseminated Intravascular Coagulation. *Hematology* [online]. Elsevier, 2018, 2064–2075 [cit. 2021-01-31]. ISBN 9780323357623.
Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-35762-3.00139-6
- [22] MAŇÁSKOVÁ, Dana. DIC – Diseminovaná intravaskulární koagulace. *Medicinman.cz* [online]. [cit. 2021-02-05].
Dostupné z: <http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt/dic>

- [23] KESSLER, Petr. *Jak v ambulantní péči neprošvihnout rozvíjející se kritické poruchy hemostázy?: Význam spolupráce kliniky s laboratoří pro včasnou diagnostiku kritických poruch hemostázy* [online]. s. 33–44 [cit. 2021-02-08]. Dostupné z: https://www.sysmex-mea.com/fileadmin/media/f105/Documents/Vyznam_spoluprace_kliniky_s_laboratori_pro_vcasnou_diagnostiku_kritickykh_poruch_hemostazy.pdf
- [24] BÍLKOVÁ, Simona a Jana HIRMEROVÁ. Koagulopatie asociovaná s onemocněním COVID-19. *Vnitřní lékařství* [online]. 2020, 66(7), 402–408 [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: <https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2020/07/01.pdf>
- [25] ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2013. ISBN 978-80-7492-062-2.
- [26] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-726-2324-9.
- [27] MAŠKOVÁ, Václava. *Koagulační měření: Přednáška k předmětu 17 PBLHTS1 na FBMI (2019–2020)*.
- [28] VACUETTE® TUBE 2 ml 9NC Coagulation sodium citrate 3.2% 13x75 blue cap-white ring, sandwich tube, non-ridged. In: *Greiner Bio-One* [online]. [cit. 2021-02-15]. Dostupné z: <https://shop.gbo.com/en/usa/products/preanalytics/venous-blood-collection/vacurette-tube/coagulation-sodium-citrate/9nc-32/454322.html>

- [29] HRACHOVINOVÁ, Ingrid a Dana MIKULENKOVÁ. *Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP: Pořadí zkumavek při odběru krve* [online]. Česká hematologická společnost ČLS JEP [cit. 2021-02-18].
Dostupné z:
https://www.hematology.cz/doporuzeni/laboratorni_sekce/files/obecna/Doporuzeni_LS_CHS_CLS_JEP-Poradi_odberu_v01.pdf
- [30] ZAVŘELOVÁ, Jiřina. *Principy vyšetření hemostázy, preanalýza* [online]. 2017 [cit. 2021-02-17].
Dostupné z:
https://is.muni.cz/el/med/jaro2017/MBKH081c/um/Principy__preanaliza-a-koagulace2017.pdf?lang=en
- [31] *Příbalový leták HemosIL FDP*. Instrumentation Laboratory, 2016.
- [32] *Příbalový leták HemosIL FDP kalibrátory*. Instrumentation Laboratory, 2016.
- [33] ZAVŘELOVÁ, Jiřina. *Kalibrace, kontroly kvality v koagulační laboratoři* [online]. 2017 [cit. 2021-02-18].
Dostupné z:
https://is.muni.cz/el/med/jaro2017/MBKH081c/um/Kalibrace__kontroly_koagulace2017.pdf
- [34] *Příbalový leták HemosIL FDP kontroly*. Instrumentation Laboratory, 2016.
- [35] MAŠKOVÁ, Václava. *Kvalita v hematologické laboratoři: Přednáška k předmětu 17 PBLHTS1 na FBMI (2019–2020)*.

- [36] Instrumentation Laboratory Launches HemosIL® FDP Assay In Europe, Asia And Other International Regions: Augments Fully Automated Assay Menu for the Detection of Fibrinolytic Disorders. *Cision PR Newswire* [online]. [cit. 2021-02-18].
Dostupné z: <https://www.prnewswire.com/news-releases/instrumentation-laboratory-launches-hemosil-fdp-assay-in-europe-asia-and-other-international-regions-216570691.html>
- [37] *Koagulace – možné interference (ovlivnění) a mez detekce testů (LIS)*. Ústřední vojenská nemocnice Praha – Vojenská fakultní nemocnice Praha.
- [38] *Laboratorní příručka ÚVN: D-dimery* [online]. [cit. 2021-02-27].
Dostupné z: <http://lavys.uvn.cz/index.php/laboratorni-prirucka/f-laboratorni-vysetreni-poskytovana-laboratori/f-2-hematologicka-vysetreni/154-d-dimery>
- [39] *Doporučená referenční rozmezí pro koagulační stanovení u dětí a dospělých* [online]. Česká hematologická společnost ČLS JEP [cit. 2021-02-27].
Dostupné z:
https://www.hematology.cz/doporuzeni/laboratorni_sekce/files/referencni_meze/Doporuzeni_LS_CHS_CLS_JEP-Referencni_meze-koagulace_v7.pdf
- [40] ŠÁLEK, Tomáš, Janka FRANEKOVÁ, Antonín JABOR a Bedřich FRIEDECKÝ. Postanalytická fáze a interpretace laboratorního testu (post-postanalytická fáze). *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2016, (2), 82–87 [cit. 2021-02-19].
Dostupné z: <http://www.stara.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2016/2016-2/KBM-2-2016-Salek-82.pdf>

- [41] MORESCO, Rafael Noal, Luis Cláudio Rosa VARGAS, Carlos Franco VOEGELI a Roberto Christ Vianna SANTOS. D-dimer and its relationship to fibrinogen/fibrin degradation products (FDPs) in disorders associated with activation of coagulation or fibrinolytic systems. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 17(3), 77–79 [cit. 2021-03-24]. ISSN 08878013.
Dostupné z: doi:10.1002/jcla.10072
- [42] MORESCO, Rafael, Ronald JÚNIOR, Luis VARGAS a Lúcia SILLA. Association between plasma levels of D-dimer and fibrinogen/fibrin degradation products (FDP) for exclusion of thromboembolic disorders. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* [online]. 2006, 21(2), 199–202 [cit. 2021-03-24]. ISSN 0929-5305.
Dostupné z: doi:10.1007/s11239-006-4837-9
- [43] WILLYARD, Cassandra. Coronavirus blood-clot mystery intensifies. *Nature* [online]. 2020, 581(7808), 250–250 [cit. 2021-03-22]. ISSN 0028-0836.
Dostupné z: doi:10.1038/d41586-020-01403-8
- [44] FOGARTY, Helen, Liam TOWNSEND, Cliona NI CHEALLAIGH et al. COVID19 coagulopathy in Caucasian patients. *British Journal of Haematology* [online]. 2020, 189(6), 1044–1049 [cit. 2021-03-25]. ISSN 0007-1048.
Dostupné z: doi:10.1111/bjh.16749
- [45] YAO, Yumeng, Jiatian CAO, Qingqing WANG et al. D-dimer as a biomarker for disease severity and mortality in COVID-19 patients: a case control study. *Journal of Intensive Care* [online]. 2020, 8(1) [cit. 2021-03-23]. ISSN 2052-0492.
Dostupné z: doi:10.1186/s40560-020-00466-z

- [46] HE, Xiaokang, Fei YAO, Jie CHEN et al. The poor prognosis and influencing factors of high D-dimer levels for COVID-19 patients. *Scientific Reports* [online]. 2021, 11(1) [cit. 2021-03-23]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-81300-w
- [47] ZHANG, Litao, Xinsheng YAN, Qingkun FAN, Haiyan LIU, Xintian LIU, Zejin LIU a Zhenlu ZHANG. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2020, 18(6), 1324–1329 [cit. 2021-03-23]. ISSN 1538-7933. Dostupné z: doi:10.1111/jth.14859
- [48] VON BRAUN, Wernher. In: *Citáty slavných osobností* [online]. [cit. 2021-03-24]. Dostupné z: <https://citaty.net/citaty/13839-wernher-von-braun-veda-zjistila-ze-nic-nemuze-zmizet-beze-stopy-pr/>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Protein fibrinogen.....	23
Obrázek 2 – Schéma koagulační kaskády	28
Obrázek 3 – Průběh koagulace	32
Obrázek 4 – Schéma štěpení fibrinogenu a fibrinu trombinem a plazminem	34
Obrázek 5 – Schéma štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu.....	35
Obrázek 6 – Schéma štěpení nerozpustného fibrinu	36
Obrázek 7 – Vznik D-dimerů	37
Obrázek 8 – Schéma patogeneze DIC	44
Obrázek 9 – Interakce endotelu a koagulačního systému indukovaná onemocněním SARS-CoV-2.....	48
Obrázek 10 – Koagulační zkumavka Vacuette.....	52
Obrázek 11 – Automatický koagulometr s optickou detekcí ACL TOP family 500 CTS (IL).....	56
Obrázek 12 – Souprava FDP	57
Obrázek 13 – FDP kalibrátory	58
Obrázek 14 – Kalibrační křivka	59
Obrázek 15 – FDP kontroly	60
Obrázek 16 – Princip imunoturbidimetrie.....	63
Obrázek 17 – Graf četnosti násobků hodnot FDP v porovnání s DD u vzorků celého kontrolního souboru	72
Obrázek 18 – Graf závislosti koncentrace FDP na koncentraci DD u vzorků celého kontrolního souboru	73
Obrázek 19 – Graf četnosti násobků hodnot FDP v porovnání s DD vzorků pacientů COVID-19 negativních	77
Obrázek 20 – Graf závislosti koncentrace FDP na koncentraci DD u vzorků pacientů COVID-19 negativních	78

Obrázek 21 – Graf četnosti násobků hodnot FDP v porovnání s DD u vzorků pacientů COVID-19 pozitivních.....	82
Obrázek 22 – Graf závislosti koncentrace FDP na koncentraci DD u vzorků pacientů COVID-19 pozitivních.....	83

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – Pipetovací protokol ACL TOP family 500 CTS (IL).....	56
Tabulka 2 – Preciznost v sérii – low control (nízká hladina).....	62
Tabulka 3 – Preciznost v sérii – high control (vysoká hladina)	62
Tabulka 4 – Mez detekce a možné interference	65
Tabulka 5 – Referenční rozmezí	65
Tabulka 6 – Koncentrace naměřené u kalibrátorů.....	67
Tabulka 7 – Koncentrace naměřené u kontrol.....	67
Tabulka 8 – Data celého kontrolního souboru	68
Tabulka 9 – Četnost intervalů násobků u vzorků celého kontrolního souboru...71	
Tabulka 10 – Data vzorků pacientů COVID-19 negativních.....	74
Tabulka 11 – Četnost intervalů násobků u vzorků pacientů COVID-19 negativních.....	76
Tabulka 12 – Data vzorků pacientů COVID-19 pozitivních	79
Tabulka 13 – Četnost intervalů násobků u vzorků pacientů COVID-19 pozitivních	81
Tabulka 14 – Statistické hodnoty vzorků celého kontrolního souboru	84
Tabulka 15 – Statistické hodnoty vzorků pacientů COVID-19 negativních.....	85
Tabulka 16 – Statistické hodnoty vzorků pacientů COVID-19 pozitivních.....	85
Tabulka 17 – Korelační koeficienty.....	86