



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
**Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Hodnocení kvality trombocytárních transfuzních  
přípravků pomocí tromboelastografie**

**Bakalářská práce**

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor práce: Lucie Davidová

Vedoucí bakalářské práce: pplk. MUDr. Miloš Bohoněk, Ph.D.

---

**Kladno 2016**



**CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE**

---

**FACULTY OF BIOMEDICAL ENGINEERING**

**Department of Health Care Disciplines and Population Protection**

**The evaluation of quality of the platelet transfusion  
units by tromboelastography**

**Bachelor Thesis**

Study Programme: Specialization in Health Care

Branch of study: Medical Laboratory

Author: Lucie Davidová

Thesis advisor: pplk. MUDr. Miloš Bohoněk, Ph.D.

---

**Kladno 2016**

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Akademický rok: 2015/2016

## Z a d á n í   b a k a l á ř s k é   p r á c e

Student: **Lucie Davidová**  
Obor: Zdravotní laborant  
Téma: **Hodnocení kvality trombocytárních transfúzních přípravků pomocí tromboelastografie**  
Téma anglicky: The evaluation of quality of the platelet transfusion units by thromboelastography

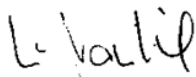
### Zásady pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude přiblížení metody tromboelastografie a její využití při kontrole kvality trombocytárních transfúzních přípravků včetně ověření jejich prokoagulačních vlastností. Teoretická část bakalářské práce bude zaměřena na proces hemostázy včetně plazmatického koagulačního systému a fibrinolýzy, rovněž na kontrolu kvality trombocytárních transfúzních přípravků. V praktické části bakalářské práce bude stanoveno referenční rozmezí výsledků tromboelastografie pro účely kontroly kvality včetně sledování krevních elementů u těchto transfúzních přípravků. Pro vyhodnocení bude použito základních statistických metod včetně komparace mezi laboratorními hodnotami ihned po výrobě transfúzního přípravku a před jeho klinickým použitím.

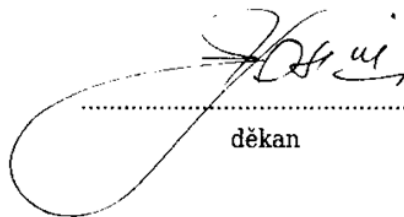
### Seznam odborné literatury:

- [1] Ågren A. , Thromboelastography (TEG®) compared to conventional coagulation tests in surgical patients--a laboratory evaluation, ed. Scand J Clin Lab Invest, 2013 Apr, 73(3)
- [2] Penka, Miroslav, Hematologie a transfúzní lékařství I., ed. 1., Praha, Grada Publishing a.s., 2011, ISBN 978-80-247-3459-0
- [3] Pecka, Miroslav, Laboratorní hematologie v přehledu, Český Těšín, Finidr, 2002, ISBN 80-86682-01-3

zadání platné do: 30.09.2017  
Vedoucí: pplk. MUDr. Miloš Bohoněk, Ph.D.  
Konzultant: Ing. Ludmila Landová, Ph.D.



vedoucí katedry / pracoviště



děkan

V Kladně dne 18.12.2015

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Hodnocení kvality trombocytárních transfuzních přípravků pomocí tromboelastografie vypracovala samostatně a použila jsem k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

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).

V Kladně dne 18. května 2016

.....

## **Poděkování**

Děkuji svému vedoucímu panu pplk. MUDr. Miloši Bohoňkovi, PhD. za odborný dohled a ochotu vést moji práci, dále paní Ing. Ludmile Landové, PhD. za cenné rady, konzultaci a pomoc při zpracovávání bakalářské práce. Také děkuji pracovníkům Oddělení hematologie a krevní transfuze v Ústřední vojenské nemocnici v Praze za vytvoření příjemného prostředí.

## **Abstrakt**

Bakalářská práce Hodnocení kvality trombocytárních transfuzních přípravků pomocí tromboelastografie se zabývá procesem srážení krve s důrazem na funkci krevních destiček, které hrají v hemostáze důležitou a nenahraditelnou roli. Pozornost je také věnována kontrole kvality těchto TP .

Teoretická část bakalářské práce popisuje jednotlivé modely koagulace, plazmatický koagulační systém, inhibitory krevního srážení, tvorbu fibrinu včetně fibrinolytického systému. Dále se zabývá detailnějším popisem trombocytů, jejich vznikem, vývojem, funkcí v organismu a morfologií. V práci je také zachycen postup hodnocení kvality trombocytárních transfuzních přípravků a současně jsou zde zmíněny i požadavky na ně kladené. Kryokonzervované trombocyty a hodnocení jejich kvality jako transfuzního přípravku jsou popsány v dalších kapitolách. V neposlední řadě teoretická část popisuje využití tromboelastografie. Bylo zjištěno, že tato metoda má velké využití v mnoha lékařských oborech (sledování pacientů s antiagregační terapií, kardiochirurgie a další chirurgické obory). Tromboelastografie také usnadňuje diagnostiku hemokoagulačních poruch.

Praktická část detailně popisuje tuto metodu, včetně principu měření, přípravy vzorku, postupu kryokonzervace i rekonstituce trombocytů a vysvětlení výstupních tromboelastografických parametrů (hodnot). Jsou zde zpracovány a stanoveny referenční hodnoty pro účely kontroly kvality trombocytárních transfuzních přípravků na přístroji TEG® Analyzer 5000 series (Haemoscope, USA). Součástí praktické části je také základní komparace mezi čerstvými trombocyty z aferézy a kryokonzervovanými trombocyty.

**Klíčová slova:** trombocyty, koagulace, tromboelastografie, trombocytární transfuzní přípravek, hemostáza

## **Abstract**

The Bachelor's thesis "The evaluation of quality of the platelet transfusion units using the thromboelastography" deals with the process of blood coagulation with an emphasis laid on the blood platelets, which play an important and irreplaceable role in haemostasis. Attention is also paid to the thrombocyte transfusion units and especially to their quality control.

The theoretical part of the bachelor's thesis describes various models of coagulation, the plasma coagulation system, inhibitors of blood coagulation, and formation of fibrin, including the fibrinolytic system. It also provides a detailed description of platelets, their genesis, development, morphology and their function in the whole body. The thesis has also captured the procedure of quality evaluation of the platelet transfusion units, mentioning at the same time specifications or requirements placed on them. The next chapters describe cryopreserved platelets and evaluation of their quality as a transfusion unit. Finally, the theoretical part describes the use of thromboelastography. It has been found out that this method has a great potential for application in a number of medical fields (monitoring of patients with antiplatelet therapy, cardiac surgery and other surgical applications). Thromboelastography also facilitates the diagnosis of blood coagulation disorders. It can equally well be used for quality control of the platelet transfusion units.

The practical part of the bachelor's thesis describes this method in detail, including the principles of measurement, the sample preparation procedure, the process of platelet cryopreservation and reconstitution, and the explanation of output thromboelastographic parameters (values). It also provides the processed and determined reference values for the purpose of quality control of the platelet transfusion units using the TEG® Analyser 5000 series (Haemoscope, USA). The practical part also includes a basic comparison of fresh platelets obtained via apheresis and cryopreserved platelets.

**Key words:** platelets, coagulation, thromboelastography, platelet transfusion unit, hemostasis

## Seznam zkratek a symbolů

μm	Mikrometr (jednotka délky)
μl	Mikrolitr (jednotka objemu)
ADP	Adenosindifosfát
APC	Aktivovaný protein C
ARA	Kyselina arachidonová
AT	Antitrombin
ATP	Adenosintrifosfát
Ca <sup>2+</sup>	Vápenaté ionty
CaCl <sub>2</sub>	Chlorid vápenatý
CFU-GEMM	Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Macrofage, Megakaryocyte, buňka tvořící kolonie
CFU-Meg	Colony Forming Unit-Megakaryocyte
DMSO	Dimetylsulfoxid
DTS	Denzní tubulární systém
F	Faktor
FDP	Fibrin-degradační produkty
GIT	Gastrointestinální trakt
GP	Glykoprotein
GMP	Granule Membrane Protein
HES	Hydroxyetylenškrob
HLA	Human Leukocyte Antigen
IL	Interleukin – cytokin
ml	Mililitr (jednotka objemu)
OKS	Otevřený kanikulární systém
PAI	Plasminogen activator inhibitor – inhibitor aktivátorů plasminogenu
PC	Protein C
PF4	Platelet Factor 4 – destičkový faktor
PGC <sub>2</sub>	Prostaglandin C <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PL	Fosfolipidy
PRC	Prostacyklin
PS	Protein S
PTA	Plazmatický předchůdce tromboplastinu



TAD	Trombocyty z aferézy deleukotizované
TADK	Trombocyty z aferézy deleukotizované kryokonzervované
TAFI	Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor – inhibitor fibrinolýzy
TF	Tkáňový faktor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor – inhibitor tkáňového faktoru
TM	Trombomodulin
TP	Transfuzní přípravek
t-PA	Tkáňový aktivátor plazminogenu
TPO	Trombopoetin
TTP	Trombocytární transfuzní přípravky
TU	Transfusion unit – transfuzní jednotka
TXA <sub>2</sub>	Tromboxan 2
u-PA	Urokinázový aktivátor plazminogenu (urokináza)
vWF	Von Willebrandův faktor

# Obsah

1	Úvod.....	12
2	Současný stav .....	13
2.1	Krev.....	13
2.2	Složení krve .....	13
2.3	Krvetvorba .....	14
2.3.1	Vývoj krvetvorby .....	14
2.3.2	Vývoj krevních buněk .....	15
2.4	Krevní destičky .....	16
2.4.1	Vznik a vývoj .....	16
2.4.2	Morfologie.....	17
2.4.3	Metabolismus .....	19
2.4.4	Funkce v organismu .....	21
2.5	Hemostáza.....	21
2.5.1	Cévní stěna .....	21
2.5.2	Trombocyty .....	22
2.5.3	Plasmatický koagulační systém.....	23
2.6	Modely koagulace .....	26
2.6.1	Starý model .....	26
2.6.2	Nový model .....	28
2.6.3	Tvorba fibrinu .....	29
2.7	Fibrinolytický systém.....	29
2.8	Přirozené inhibitory krevního srážení .....	31
2.9	Trombocytární transfuzní přípravky .....	32
2.9.1	Výroba.....	32
2.9.2	Množství a skladování.....	33
2.9.3	Indikace k podání .....	34
2.10	Kryokonzervace trombocytů.....	34
2.11	Kontrola kvality trombocytárních transfuzních přípravků .....	35
2.12	Využití tromboelastografie .....	37
3	Cíl práce .....	39
4	Metodika práce.....	40
4.1	Tromboelastografie .....	40

4.1.1	Princip měření .....	40
4.1.2	Parametry .....	41
4.2	Definice souboru .....	42
4.3	Kontrola kvality TAD – postup .....	42
4.4	Kryokonzervace trombocytů – postup .....	44
4.5	Rozmrazení a rekonstituce trombocytů – postup .....	46
4.6	Kontrola kvality TADK – postup .....	47
5	Výsledky .....	49
5.1	Statistické zpracování a určení referenčního rozmezí .....	49
5.2	Porovnání parametrů u TAD a TADK .....	53
6	Diskuze .....	59
7	Závěr .....	63
	Seznam informačních zdrojů .....	64
	Seznam obrázků .....	70
	Seznam tabulek .....	71
	Seznam grafů .....	72
	Seznam příloh .....	73
8	Přílohy .....	74

# 1 Úvod

Krevní transfuze je v dnešní době již běžně dostupný způsob léčby. Její podání musí být cílené a je třeba, aby toto podání splňovalo velmi přísné podmínky, bylo správně připraveno a všechny postupy s ním spojené probíhaly bez chyb. Při nesprávném nebo chybném podání může transfuzní přípravek způsobit vážné zdravotní komplikace či smrt. Se správnou aplikací transfuzního přípravku souvisí také laboratorní vyšetření všech dárců krve, aby se například zamezilo přenosu infekčních onemocnění krevní transfuzí. Vyšetření je velmi důkladné a zachycuje řadu rizik spojených s podáním transfuze. Ovšem jen samotné vyšetření dárců nezaručí úspěšné a správné podání krevní transfuze. Bývá to ovlivněno mnoha faktory, některé jsou ovlivnitelné a jiné neovlivnitelné.

Dle vyhlášky č. 143/2008 o lidské krvi je důležitou složkou vyšetření transfuzních přípravků stanovení krevní skupiny, kontrola kvality transfuzních přípravků a další. Právě kontrola kvality zajišťuje, že transfuzní přípravky splňují požadavky na ně kladené a obsahují i předepsané množství krevních buněk či krevních elementů. Při kontrole kvality je hodnocen velký počet parametrů. Tyto parametry jsou pro každý transfuzní přípravek specifické, sledují se a hodnotí pomocí přístrojů a ověřených metod.

Novou metodou pro kontrolu kvality transfuzních přípravků (konkrétně trombocytárních) je tromboelastografie. Tato metoda společně s dalšími (například stanovení počtu trombocytů, impedanční agregometrie) hodnotí, zda je trombocytární transfuzní přípravek funkční a může být podán pacientovi. Je potřeba, aby transfuzní přípravek obsahoval určité množství trombocytů, které ještě nebyly aktivovány a budou aktivní až v těle pacienta. Výhodou této metody je, že sleduje celý proces koagulace. Těmito metodami je zajištěno, že pacient dostane kvalitní a především účinný transfuzní přípravek.

## 2 Současný stav

### 2.1 Krev

Krev je červená vazká tekutina, která proudí uzavřeným cévním systémem a má řadu funkcí. Je to důležitý transportní systém, který zprostředkovává výměnu plynů. Tkáním přivádí kyslík a živiny. Z buněk odvádí oxid uhličitý a odpadní produkty metabolismu. Dále krev zajišťuje stálé vnitřní prostředí organismu neboli homeostázu a podílí se na udržování tělesné teploty. Krví jsou transportovány také hormony, enzymy, vitamíny a minerály (Penka, 2011).

Celkový objem krve v těle je poměrně stálý. Dospělý člověk má 5 až 6 litrů krve. Ženy mají průměrně o 10 procent krve méně než muži. Z celkové hmotnosti těla krev zaujímá asi 8 %, což je asi 1/13 hmotnosti. Lidský organismus snese bez větších potíží ztrátu 550 ml. Životu nebezpečná je rychlá ztráta krve přesahující objem 1500 ml (Dylevský, 2011).

### 2.2 Složení krve

*„Ve čtvrtém století př. Kristem zpozoroval řecký lékař Hippokrates, že necháme-li krev po přidání soli stát v klidu, rozdělí se po chvíli na vrstvy.“* (Pecka, 2002)

Krev obsahuje část buněčnou, která je tvořena krevními elementy. Druhá část krve je plazma a zaujímá asi 50 až 55 % objemu krve. Je to mírně nažloutlá, průhledná tekutina obsahující anorganické i organické látky. Získává se centrifugací nesrážlivé krve. V plazmě je nejvíce zastoupena voda, která tvoří přibližně 80 %. Mezi anorganické látky patří kationty – především sodík a draslík, které udržují rovnovážný stav mezi extracelulární a intracelulární tekutinou, a anionty – chloridy, fosfáty a uhličitany. Organické látky v plazmě jsou nejvíce zastoupeny bílkovinami, mezi které patří albumin (udržuje osmotický tlak krve), globuliny a fibrinogen, což je základní bílkovina krevního srážení. V plazmě se ve formě neaktivních zymogenů nachází také faktory krevního srážení. Kromě bílkovin jsou organickou součástí plazmy cukry, vitamíny, hormony, žlučová barviva a tuky (Pecka, 2002; Silbermagl, 2004, s. 88).

Mezi buněčné krevní elementy rozptýlené v plazmě se řadí červené krvinky (erytrocyty), bílé krvinky (leukocyty) a krevní destičky (trombocyty). Erytrocyty jsou bezjaderné buňky, které obsahují červené krevní barvivo hemoglobin. Jejich životnost

je přibližně 120 dní. V dospělosti vznikají červené krvinky pouze v kostní dřeni. Nejdůležitější funkcí erytrocytů je transport dýchacích plynů (Dylevský, 2009, s. 389-393).

Leukocyty pochází z tkáně mezenchymu. Jsou to bezbarvé kulovité buňky, obsahují jádro a řadí se k základním složkám imunitního systému. Podílí se na obraně organismu proti choroboplodným zárodkům a cizorodým buňkám. Podle velikosti, tvaru jádra a barvitelnosti se leukocyty dělí na granulocyty a agranulocyty. Granulocyty obsahují v plazmě specificky se barvicí granula a mají polymorfní jádro. Podle barvitelnosti rozlišujeme: neutrofil, bazofil a eozinofil. Agranulocyty v cytoplazmě nemají specifická granula ani segmentované jádro. Řadí se mezi ně lymfocyty a monocyty (Lexová, 2000; Pecka, 2006; Čihák, 2002, s. 4-7).

## **2.3 Krvetvorba**

Krvetvorba neboli hematopoéza představuje proces tvorby buněčných součástí krve v krvetvorných orgánech a zajišťuje jejich neustálou obnovu. Rozlišujeme 2 fáze krvetvorby – prenatální a postnatální. Tato období se liší místem vzniku krevních elementů a svým složením (Navrátil, 2008, s. 202-204).

### **2.3.1 Vývoj krvetvorby**

Zárodečná (prenatální) krvetvorba začíná během nitroděložního vývoje. Nejprve probíhá v oblasti žloutkového vaku, od 6. týdne těhotenství i v játrech a od 12. týdne ve slezině zárodku. Rozlišujeme 3 periody prenatální krvetvorby, které se vzájemně překrývají. Jedná se o periodu mezoblastovou, hepatolienální a medulární (Penka, 2011).

V mezoblastovém období tvorba vychází z embryonálních kmenových buněk odvozených z mezotelu. Tyto embryonální buňky se diferencují v kmenové buňky krvetvorby. Mezoblastová perioda začíná 14. až 20. den embryonálního vývoje. Vytváří se ostrůvky primitivních hematopoetických buněk a vznikají primitivní erytrocyty (megablasty), které syntetizují embryonální hemoglobin. Toto období trvá asi do 10. týdne nitroděložního vývoje. Zároveň během 6. týdne těhotenství začíná probíhat hematopoéza v játrech a ve slezině, nastává tzv. hepatolienální období. Ve 4. měsíci těhotenství jsou játra hlavním zdrojem krvetvorby. Od 20. týdne prenatálního vývoje se krvetvorba přesunuje do kostní dřeni. Období se nazývá

medulární neboli dřevňové. Dřevňová krvetvorba je hlavním zdrojem erytrocytů a granulocytů. Mimodřevňová hematopoéza fyziologicky zcela zaniká až ve 3. týdnu po narození (Pecka, 2002; Lexová, 2000).

Postnatální hematopoéza probíhá v krvetvorných orgánech, mezi které patří aktivní kostní dřevň, thymus (brzlík), dále slezina a lymfatické uzliny. Aktivní červená kostní dřevň se nachází ve většině kostí a postupně s přibývajícím věkem je nahrazována inaktivní (na tuk bohatou) lymfoidní dřevňí. U dospělých se červená kostní dřevň nachází ve sternu, žebrech, kyčelní kosti a v obratlích. Úkolem brzlika je diferenciacie progenitorů T-lymfocytů na zralé T-lymfocyty. Pokud v dospělosti proces krvetvorby pokračuje v játrech či slezině, je tento stav označován jako extramedulární hematopoéza a může být příznakem závažných onemocnění (Lexová, 2000; Pecka, 2000).

### **2.3.2 Vývoj krevních buněk**

Vývoj krevních buněk probíhá v kostní dřevňí. Začíná kmenovými buňkami, pokračuje přes buňky progenitorové a končí velmi diferenciovanými a specializovanými buňkami – erytrocyty, trombocyty, lymfocyty a dalšími.

Kmenová buňka je obecné označení pro buňku, ze které se tvoří buněčný klon neboli skupina buněk odvozená od jediné kmenové buňky. Vlastní kmenová buňka krvetvorby vzniká z retikulární buňky, která se diferencuje z buňky mezenchymu. Tato buňka je výchozí buňkou všech krvinek. Zastoupení hematopoetické buňky v kostní dřevňí je velmi malé (přibližně jedna buňka na 1000 jaderných elementů). Jejich morfolgie připomíná lymfocyt s jemnou strukturou chromatinu a jadérky. Cytoplazma je bez granulace. Hematopoetická kmenová buňka má vlastnosti, díky kterým je schopna dlouhodobé obnovy krvetvorby. Jedná se o schopnost diferenciacie což je možnost přeměny v jeden nebo více buněčných typů, které se liší funkcí i morfolgií. Další vlastností je schopnost sebeobnovy – po buněčném dělení vznikají dvě buňky identické s mateřskou buňkou (Penka, 2011; Pecka, 2002).

Dále rozeznáváme pluripotentní progenitorové buňky, které jsou schopny diferenciacie do více krvetvorných řad. Mezi ně se řadí smíšený myeloidní progenitor CFU-GEMM, což je buňka, která dává vznik granulocytům, erytrocytům, megakaryocytům a makrofágům. Lymfoidní progenitor dává vznik oběma liniím lymfocytů. Další stádia jsou zralejší kmenové buňky v podobě prekurzorů. Primitivnější a zralejší stádia kmenových buněk podléhají asymetrickému dělení. To znamená,

že jedna z dceřiných buněk je identická s buňkou mateřskou a druhá buňka se dále diferencuje (Penka, 2011, 15-17).

## 2.4 Krevní destičky

Krevní destičky neboli trombocyty jsou nejmenší formované elementy krve. V krvi cirkulují asi dvě třetiny destiček, jedna třetina se nachází v cévách sleziny a představuje tzv. slezinný pool. Mimo jiné se trombocyty účastní procesu krevního srážení (Matýšková, 1999, s. 14).

### 2.4.1 Vznik a vývoj

Trombocyty vznikají v kostní dřeni odštěpováním cytoplazmy megakaryocytů. Megakaryocyty se tvoří z pluripotentní kmenové buňky. Za působení růstových faktorů se pluripotentní buňka mění na CFU-GEMM a dále na CFU-Meg, která je specifická pro megakaryocytární vývojovou řadu. První morfologicky rozlišitelnou buňkou této řady je megakaryoblast. Bývá označován jako nezralý megakaryocyt I, tvoří přibližně 20 % megakaryocytární populace. Je to buňka s průměrem asi 20  $\mu\text{m}$ , která má centrálně uložené kulaté jádro s více jadérky. Cytoplazma je bazofilní, neobsahuje granula a vytváří úzký lem kolem jádra. Megakaryoblasty se dále diferencují v promegakaryocyty. Jejich průměr je přibližně 30  $\mu\text{m}$ , jádro je rozděleno na několik laloků a nejsou přítomna jadérka. Cytoplazma je větší množství, barví se intenzivně bazofilně a neobsahuje granula. Další stádia jsou zralé a vyztalé megakaryocyty. Jejich jádro je vícelaločnaté, obrys je členitý a nepravidelný. Cytoplazma má růžovou barvu a jemná azurofilní granula. Zralé megakaryocyty jsou největší buňky z celé vývojové řady, jejich průměr je přibližně 70  $\mu\text{m}$  (ale i více) a za normálních okolností se nachází pouze v kostní dřeni, v periferní krvi nikoli. Megakaryocyty se již nedělí, ale jen zrají. Postupně dochází k vrásčitému zřasení okrajů cytoplazmy, jedná se o přípravu k vypuzení trombocytů. Na obvodě zralých megakaryocytů se pak tvoří shluky oddělujících se trombocytů (Pecka, 2002; Penka, 2011, s. 27-29).

Proces megakaryopoézy probíhá asi 8 až 10 dní. Tvorba krevních destiček z vyztalého megakaryocytu trvá přibližně 5 hodin. Trombocyty vznikají z megakaryocytů dvěma způsoby – tvoří se výběžky, které se následně fragmentují, nebo dochází k přímému rozpadu megakaryocytu. Po uvolnění z megakaryocytů podléhají krevní destičky procesu stárnutí. V krevním oběhu přežívají 8 až 14 dní. Staré



a nefunkční trombocyty jsou odbourány ve slezině, kostní dřeni a játrech (Pecka, 2002, s. 152-154).

Počet krevních destiček v periferní krvi je regulován humorálně. Na regulaci se podílí především trombopoetin, což je specifický růstový hormon pro trombopoézu. TPO se specificky váže na receptory, které jsou umístěny na trombocytech, megakaryocytech, ale také na kmenových buňkách. Po vazbě TPO na receptory se zvyšuje počet i diferenciace buněk megakaryocytární vývojové řady a zvyšuje se produkce krevních destiček v krvi. Trombocytopoézu ovlivňují i další regulační proteiny například IL-6, IL-3 a IL-11 (Penka, 2011, s. 27-28).



**Obrázek 1 – Vývojová řada trombocytu**

## 2.4.2 Morfologie

Krevní destičky jsou nejmenší částice kolující v krvi. Jedná se o světlolomná okrouhlá nebo protáhlá bezjaderná tělíska. Jejich průměr je 2 až 4  $\mu\text{m}$ . 1 litr krve obsahuje  $150-300 \cdot 10^9$  destiček. Tvar krevní destičky se mění. Záleží, zda je trombocyt aktivovaný nebo se nachází v inaktivovaném stavu. Při pozorování ultrastruktury trombocytu lze rozlišit 4 zóny – periferní, strukturní, organelovou a membránový systém (Nosál, 1990, s. 21-23).

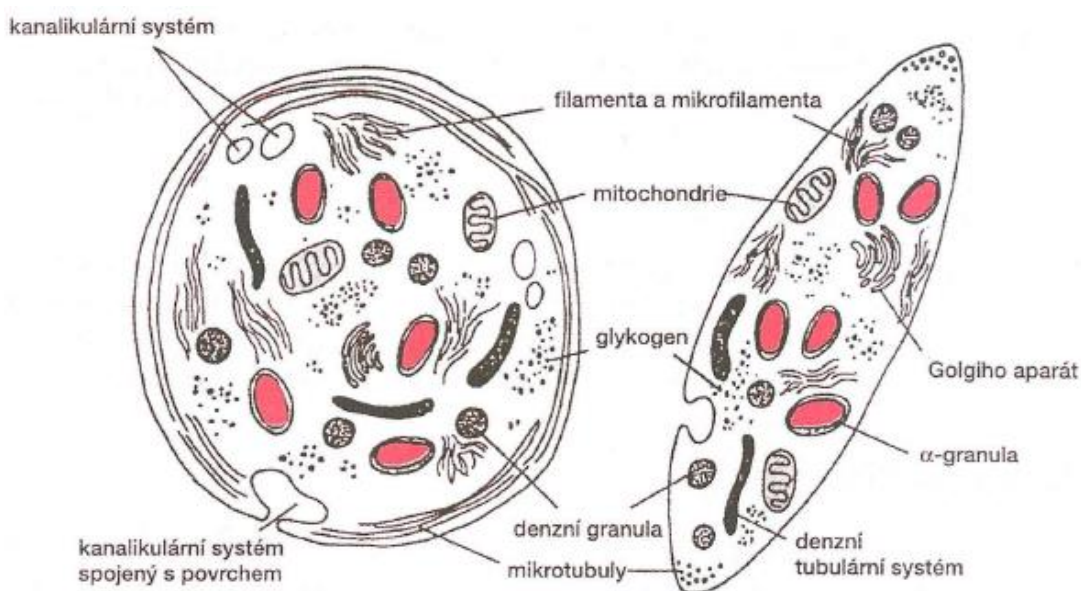
Periferní zóna je tvořena plazmatickou membránou, submembránovými oblastmi a zevním pláštěm. Představuje bariéru, která odděluje cytoplazmu od okolního prostředí. Membránu tvoří fosfolipidová dvojvrstva, kde je důležitou složkou cholesterol nerovnoměrně rozložený mezi membránové listy a má za úkol společně s fosfolipidy udržovat pružnost a fluiditu membrány. Také se podílí na transportu přes membránu a ovlivňuje její permeabilitu (propustnost). V klidovém stavu je na povrchu destiček fosfatidylcholin a sfingomyelin. Membránu obklopuje zevní sacharidový plášť (glykokalyx) tvořený glykolipidy, glykoproteiny a mukopolysacharidy. Submembránová oblast je tvořena vlákny, která působí s mikrotubuly a udržují tak diskoidní tvar krevní destičky. Povrch trombocytů je také pokryt velkým množstvím receptorů a antigenů. Nejpočetnější skupinu receptorů tvoří interginginy – GP IIb/IIIa, komplex GP Ia/IIa. Adhezi trombocytů na vWF způsobuje komplex GP Ib/IX. Po aktivaci se na povrchu objevuje receptor GMP-140 (P-selektin),

který se řadí do skupiny selektinů, a díky němu dochází k interakci trombocytů s leukocyty. Pokud je krevní destička v inaktivním stavu, je GMP-140 obsažen v  $\alpha$ -granulích. Antigeny trombocytů se dělí na dvě skupiny – společné s jinými buňkami a specifické pouze pro trombocyty. Krevní destičky mají antigeny systému HLA I. třídy a nejsou nositeli HLA antigenů II. třídy (Gawaz, 2001, s. 4-6; Matýšková, 1999, s. 14-15; [www.physiome.cz](http://www.physiome.cz)).

Strukturní zóna (nazývaná též zóna rozpustného gelu: sol-gel) se skládá z vláknitých struktur v různém stupni polymerizace. Mezi ně se řadí fibrily, mikrotubuly a mikrofilamenta. Dohromady tyto struktury tvoří cytoskelet. Ten se podílí na udržování a změně tvaru krevní destičky, také drží organely na určitém místě. Nejvíce filament je tvořeno aktinem, který po aktivaci polymeruje. Základní hybnou a kontraktlní jednotkou je aktinmyozinový komplex, což je základní stavební jednotka mikrofilament. Ta odpovídají za změnu tvaru trombocytu. Stavební jednotkou mikrotubulů je bílkovina tubulin. V inaktivované krevní destičce jsou mikrotubuly uloženy přímo pod plazmatickou membránou. Při aktivaci trombocytu je tvorba mikrotubulů potlačena (Nosál, 1990, s. 27-29; Pecka, 2006, s. 21-23).

Metabolické pochody krevních destiček zajišťuje organelová zóna, kterou tvoří granula, mitochondrie, glykogen, lysozomy a ojedinele peroxizomy. V cytoplazmě trombocytu se nachází několik typů granulí, které jsou ohraničeny membránou. V inaktivované krevní destičce jsou granula volně rozptýlená v cytoplazmě. Při aktivaci krevní destičky se granula seskupují do centra trombocytu. V granulích jsou uskladněny různé látky, které jsou uvolňovány do prostředí. Rozlišujeme denzní granula (6-8 v jednom trombocytu). Ty obsahují ADP, ATP, serotonin a  $\text{Ca}^{2+}$ . V elektronovém mikroskopu jsou výrazná – mají vysokou hustotu.  $\alpha$ -granula se v krevní destičce vyskytují v počtu 10 až 15 granulí, obsahují proteiny tvořené při vývoji megakaryocytu – vWF, PF4 a další proteiny (fibrinogen, albumin a imunoglobuliny). V  $\alpha$ -granulích se také vyskytují složené bílkoviny, které se při aktivaci trombocytu objevují na povrchu – například GP IIb/IIIa, osteonektin. Další struktury v cytoplazmě trombocytů jsou lysozomy, které obsahují hydrolytické enzymy, a peroxizomy obsahující glutathionperoxidázu. V krevní destičce se také vyskytují granula glykogenu a mitochondrie – jsou energetickým zdrojem buňky. Energie se získává oxidativní fosforylací (Matýšková, 1999; s. 17-18, Pecka, 2006, s. 23-24).

Poslední morfologicky odlišitelnou částí je membránový systém. V trombocytech rozlišujeme 2 systémy – otevřený kanalikulární (OKS) a denzní tubulární (DTS). OKS je tvořen vchlípením plazmatické membrány do nitra trombocytu. Jedná se o složitou síť kanálků, které jsou navzájem propojeny. Má řadu funkcí a vlastností – zvětšuje povrch trombocytu, tím je usnadněna látková výměna mezi vnějším a vnitřním prostředím. Dále umožňuje proniknutí obsahu granul na povrch krevní destičky. Také je napojen na membránu a dává trombocytu spongiózní vzhled. Denzní tubulární systém je síť uzavřených kanálků uvnitř krevní destičky a jedná se o pozůstatek endoplazmatického retikula megakaryocyty. Slouží jako zásobárna  $Ca^{2+}$ , vznikají a skladují se zde enzymy (adenylátcykláza, cyklooxygenáza). DTS nekomunikuje s vnějším prostředím (Matýšková, 1999, s. 19; Kubisz, 1987, s. 22-23; Nosál, 1990, s. 33-34; Pecka, 2006, s. 24).



**Obrázek 2 – Ultrastruktura krevní destičky na příčném řezu**

*Podle obrazu v elektronovém mikroskopu (zvětšeno 30 000 krát)*

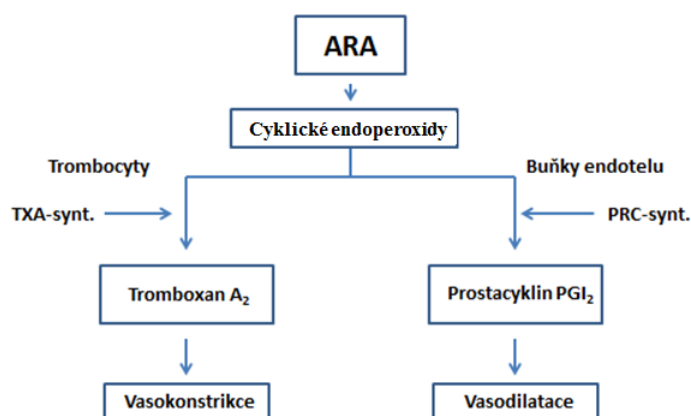
(Zdroj: Trojan, 2003, s. 139)

### 2.4.3 Metabolismus

U trombocytů neprobíhá buněčné dělení, protože krevní destička neobsahuje jádro a nemůže tvořit DNA. Pro všechny metabolické pochody je potřeba velké množství energie. Tu krevní destička získává štěpením glukózy (glykolýzou) a oxidativní fosforylací mastných kyselin. Hlavním energetickým zdrojem trombocytů je glykogen, který je přítomný v cytoplasmě. Jeho štěpením v procesu glykogenolýzy

vzniká glukosa-1-fosfát, která je za katalýzy glukosa-6-fosfatasy přeměněna na glukosa-6-fosfát. Jedná se o složité reakce, meziproduktem je glukosa-1,6-bisfosfát. Glukosa-6-fosfát vstupuje do procesu glykolýzy. Jedná se o metabolickou dráhu, při které dochází k oxidaci glukosy a uvolňuje se energie ve formě ATP (Ledvina, 2009a, s. 110-154; Ledvina, 2009b, s. 361).

Pro správnou funkci trombocytů je důležitý správný chod metabolismu mastných kyselin, především kyseliny arachidonové. ARA je nenasycená mastná kyselina, v neaktivovaných destičkách se nachází pouze v esterifikované podobě a asi 90 % z celkového množství je vázáno na vnitřní stranu membrány trombocytu. Při aktivaci krevních destiček se kyselina arachidonová uvolňuje z fosfolipidů účinkem fosfolipázy  $A_2$  nebo z 1,2-diacylglycerolu za přítomnosti diacylglycerol-lipázy. Uvolnění ARA je prvním krokem v procesu tvorby biologicky aktivních metabolitů této kyseliny. Obrázek 3 popisuje dráhu volné kyseliny arachidonové, která se v aktivovaných trombocytech metabolizuje (účinkem cyklooxygenázy) na cyklické endoperoxidy –  $PGC_2$  a  $PGH_2$ , což jsou prekurzory pro tromboxan 2.  $TXA_2$  je hlavní metabolit kyseliny arachidonové ve stimulovaných krevních destičkách a má destičky-stimulující a vazokonstrikční účinky. Z destičkového  $PGH_2$  se v buňkách endotelu cév může syntetizovat další biologicky aktivní metabolit ARA – prostacyklin, který má opačné účinky jako tromboxan. To znamená, že se jedná o inhibitor destičkových reakcí a působí vasodilatačně (Nosál, 1990, s. 94-97).



**Obrázek 3 – Dráha volné kyseliny arachidonové**

*Trombocyty obsahují tromboxan-syntetázu (TXA-synt.), která má vliv na syntézu tromboxanu  $A_2$  a ten způsobuje vasokonstrikci cév. Buňky endotelu obsahují prostacyklin-syntetázu (PRC-synt.), která se podílí na vzniku prostacyklinu  $PGI_2$ .*

*Ten na cévy působí vasodilatačně.*

(Zdroj: [www.clinchem.org](http://www.clinchem.org)) – upraveno

## **2.4.4 Funkce v organismu**

Krevní destičky mají řadu funkcí. Ovlivňují správnou funkci endotelových buněk, patří mezi velmi důležitou složku zástavy krvácení a zároveň produkují substance, které jsou důležité pro stimulaci a kontrolu hemostázy. Dále trombocyty interagují s poraněnou cévní stěnou a vytváří primární hemostatickou zátku. Krevní destičky vykazují také fagocytární aktivitu. Funkce trombocytů při hemostáze zahrnuje adhezi, aktivaci a agregaci – viz níže (Pecka, 2006, s. 131; Návrátil, 2008, s. 225).

Významná je také retrakce (smrštění vytvořené krevní zátky). Jedná se o funkci trombocytů, která odpovídá svalové kontrakci, a je to poslední krok primární hemostázy (Matýšková, 1999, s. 21-22).

## **2.5 Hemostáza**

Hemostáza je proces nezbytný pro život. Jedná se o mechanismus, který chrání organismus před vykrvácením a velkou ztrátou krve při poranění. Hemostáza je přesně regulovaný děj, který dokáže zastavit krvácení v místě poškození. Pokud není cévní stěna porušena, udržuje hemostáza krev v tekutém stavu. Při poranění cévní výstelky se uplatňuje hemostatický systém. Ten vede k zástavě krvácení a jedná se o první stupeň děje, který končí zahojením poraněné tkáně. Tím se obnoví cirkulace krve. Hemostáza je komplexní proces, při kterém se uplatňují tyto složky: cévní stěna, tkáňová složka, trombocyty a plasmatický koagulační systém. Stupeň uplatnění jednotlivých složek závisí na druhu, místě a rozsahu poranění (Trojan, 2012, s. 140; Pecka 2004).

### **2.5.1 Cévní stěna**

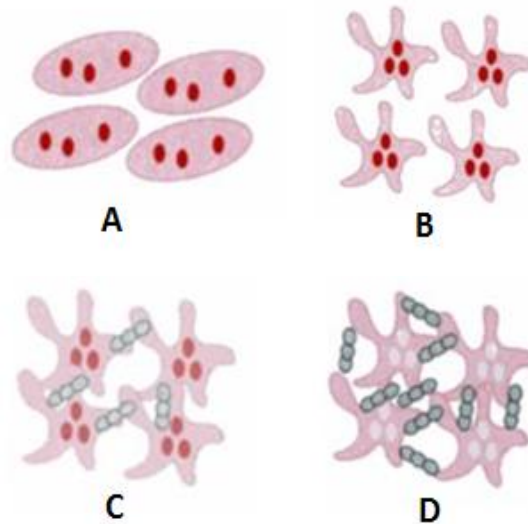
Cévní stěna se skládá ze tří vrstev. Vnitřní vrstva (tunica intima) je tvořena endotelovými buňkami, které jsou ploché a polygonální s centrálně uloženým jádrem, a subendotelovými strukturami. Endotelové buňky zajišťují hladký a nesmáčivý vnitřní povrch cév a produkují látky, které mají přímý účinek na hladkou svalovinu cévní stěny. Hlavní strukturální elementy střední vrstvy (tunica media) jsou hladké svalové buňky, elastická a retikulární vlákna. Střední vrstva je mnohem silnější u arterií. Zevní obal cév (tunica adventitia) je tvořen kolagenním vazivem (Konrádová, 2000, s. 115-123; Penka, 2011, s. 31-32).

Integrita cévního systému je důležitým faktorem hemostázy. Endotelové buňky udržují trombocyty v inaktivním stavu a brání tak adhezi na cévní stěnu. Za fyziologických podmínek tvoří endotel bariéru mezi krví a tkáněmi. Tím udržuje trombogenní struktury mimo kontakt s krví. Při poranění dochází během několika sekund k reflexní vasokonstrikci cév. Na ní se podílí různé mechanismy: nervový reflex a kontrakce způsobená uvolněním látek, které mají vasokonstrikční účinek, z krevních destiček. Jedná se o deriváty kyseliny arachidonové – TXA<sub>2</sub> a serotonin z denzních granul. Největší podíl na vazokonstrikci má však střední vrstva cévní stěny. Cílem vazokonstrikce je snížení průtoku krve cévou, a tím pádem snížení krevních ztrát způsobené zúžením průsvitu cévy. Současně se do kontaktu s krví dostává subendotel a společně s TXA<sub>2</sub> se uvolňuje ADP a tkáňový faktor. Tyto faktory zastupují tkáňovou složku hemostázy, kdy ADP vyvolává primární agregaci krevních destiček a tkáňový faktor (za účasti koagulačních faktorů) přeměňuje protrombin na trombin (Pecka, 2004; Penka, 2014).

## 2.5.2 Trombocyty

Činnost krevních destiček v průběhu hemostázy spočívá v jejich adhezi, změně tvaru a uvolňovací reakci, při které dochází k sekreci obsahu granul. Na obnažená subendotelová vlákna kolagenu přilnou neboli adherují krevní destičky. Přilnutí je umožněno díky specifickým receptorům kolagenních vláken a glykoproteinového receptoru I b, který je přítomný na membráně trombocytů. Adhezi způsobuje také samotný kolagen, který stimuluje trombocyty, a von Willebrandův faktor. Ten je produkován cévním endotelem, dostává se do plazmy a k subendotelu váže krevní destičky. Adhezivita je lineárně závislá na počtu trombocytů. V průběhu adheze dochází k aktivaci trombocytů, kdy během několika sekund změni svůj tvar, vytvoří se výběžky neboli pseudopodia a dochází také ke změně jejich metabolismu. Aktivace trombocytů a jejich sekrece je realizována vzájemně spojenými systémy. Většina reakcí je zprostředkována vzestupem Ca<sup>2+</sup> iontů, kdy se jejich množství v trombocytu zvyšuje při aktivaci až padesátkrát. Vlivem trombinu (aktivátoru krevních destiček) a účinkem dalších látek se trombocyty začínají shlukovat a zachycují se navzájem. Tento proces se nazývá agregace. Rozlišujeme primární agregaci, která je reverzibilní a bývá vyvolána především ADP uvolněným z porušených buněk a tkání. Při sekundární agregaci se uvolňuje trombospondin, který vytváří mezi krevními destičkami

stabilizující můstky. Tento proces je již nevratný. Ireverzibilní agregace je základem hemostatické funkce krevních destiček (Pecka, 2004; Trojan, 2012, s. 141-134; Silbernagl, 2004, s. 102; Penka, 2011, s. 33-36).



**Obrázek 4 – Změny krevních destiček**

*A – Trombocyty v klidovém stavu, B – Aktivované trombocyty, C – Reverzibilní (primární) agregace trombocytů, D – Ireverzibilní (sekundární) agregace*

(Zdroj: Gawaz, 2001, s. 46 – upraveno)

Postupně dochází k další aktivaci trombocytů a zesiluje se celkový účinek procesu. Vzniká bílý trombus neboli primární hemostatická zátka. Jedná se o zacelení porušené cévy. Vrcholem primární hemostázy (tvorby bílého trombu) je přesun fosfolipidů z vnitřní membránové dvojvrstvy do vnější membránové struktury trombocytů. Jedná se o tzv. flip-flop mechanismus. Fosfolipidy, které se uvolňují, způsobují polymeraci rozpustného fibrinu na nerozpustný fibrin. Vytvořená jemná fibrinová síť vycytává erytrocyty a leukocyty, bílý trombus se mění na červený (Pecka, 2004, s. 35-36).

### **2.5.3 Plasmatický koagulační systém**

Plasmatický koagulační systém je systém vnitřních faktorů, které vedou k přeměně fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Ten tvoří stabilní fibrinovou zátku. Koagulační systém je aktivován při agregaci trombocytů a také stykem s tkáňovým

faktorem a kontaktem se subendotelovými strukturami (vWF, fibrinogen). (Pecka, 2004).

Srážení krve (hemokoagulace) je soubor kaskádovitých reakcí, kterých se účastní plazmatické koagulační faktory, buňky endotelu, trombocyty, leukocyty a ionty. Cílem koagulace je zástava krvácení (Penka, 2011).

### 2.5.3.1 Koagulační faktory

Koagulační faktory jsou proteiny plazmy, které se přímo účastní krevního srážení. Většina faktorů je tvořena v játrech. V plazmě se nachází ve formě proenzymu, což je neaktivní forma. Aktivace jednotlivých proenzymů na koagulačně aktivní enzym probíhá při proteolytickém štěpení enzymem, který byl aktivován v předchozí reakci. Sled jednotlivých aktivací a dalších dějů probíhá kaskádovitě. Podle místa hlavního účinku se faktory dělí na: koagulační faktory, inhibitory krevního srážení a faktory fibrinolýzy. Z biochemického hlediska se jedná o enzymy, kofaktory, adhezivní plazmatické proteiny, regulační proteiny, fosfolipidy a ionty minerálů (především  $\text{Ca}^{2+}$  ionty). Během procesu krevního srážení dané faktory prodělávají strukturální změny (Penka, 2011, s. 36-43).

Koagulační faktory mají svůj název a označení. Značí se písmenem „F“ a římskou číslicí. Aktivované formy se označují „a“. Například *F IX* se aktivuje na *F IXa* (Trojan, 2012; Penka, 2011, s. 43).

#### Přehled plazmatických koagulačních faktorů

**Faktor I** (fibrinogen) je glykoprotein, který se tvoří v játrech. Nachází se v plazmě i v granulích trombocytů. Fibrinogen může být štěpen trombinem (vzniká fibrin), plazminem, ale také hadím jedem (reptilázou), který se podobá trombinu. Faktor I je také bílkovina akutní fáze.

**Faktor II** (protrombin) se za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  váže na negativně nabitě fosfolipidy a je štěpen protrombinázou na aktivní formu a trombin. K jeho správné funkci je důležitý vitamín K. Faktor II štěpí fibrinogen na fibrin. Je to také významný aktivátor trombocytů a faktorů IX a XIII.

**Faktor III** (tkáňový faktor) je glykoprotein přítomný v cytoplazmatických membránách buněk subendotelu. Za fyziologických podmínek se nedostává do kontaktu



s krví. S tou přichází do styku při poškození cévní stěny. Tkáňový faktor působí jako buněčný receptor. Spolu s F VII a  $\text{Ca}^{2+}$  tvoří komplex, který zahajuje koagulaci.

**Faktor IV** ( $\text{Ca}^{2+}$ ) je nezbytný pro většinu interakcí v koagulační kaskádě a také pro správné funkční uspořádání koagulačních komplexů - vnitřní tenázy a protrombinázy.

**Faktor V** (proakcelerin) se nachází v  $\alpha$ -granulích trombocytů i v plazmě. K jeho aktivaci dochází pomocí F Xa za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ , které F V také stabilizují. Společně s fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$  se vyskytuje v komplexu protrombinázy, kde urychluje štěpení protrombinu. Původně byl F Va označován jako F VI. Nyní se faktor VI neuvádí.

**Faktor VII** (prokonvertin) je syntetizován játry. Jedná se o stabilní faktor, který má proteolytickou aktivitu. Při procesu hemokoagulace F VIIa aktivuje faktor X.

**Faktor VIII** (antihemofilický faktor A) koluje v plazmě navázaný na vWF. Z této vazby je uvolňován při kontaktu s trombinem nebo s fosfolipidovým povrchem. Je to také protein akutní fáze. Chybění tohoto faktoru způsobuje poruchu koagulace, která se nazývá hemofilie A.

**Faktor IX** (Christmasův faktor) vzniká v játrech za přítomnosti vitamínu K. V aktivní formě se vyskytuje v komplexu vnitřní tenázy, který přeměňuje faktor X na F Xa. Aktivovaný F IX dokáže za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  a fosfolipidů aktivovat F VII.

**Faktor X** (Stuart-Prowerové faktor) v aktivované formě (Xa) je součástí komplexu protrombinázy, který se účastní přeměny protrombinu na trombin.

**Faktor XI** (PTA) cirkuluje v krvi v neaktivní formě. Aktivuje se limitovanou proteolýzou F XIIa a trombinem v přítomnosti negativně nabitých částic. Pokud je přítomný  $\text{Ca}^{2+}$ , aktivace probíhá rychleji.

**Faktor XII** (Hagemanův faktor) se aktivuje při kontaktu se subendotelovými strukturami nebo pomocí proteáz. Proto bývá označován jako kontaktní faktor. Aktivačním povrchem může být také kaolin či sklo.

**Faktor XIII** (fibrin stabilizující faktor) cirkuluje společně s fibrinogenem v plazmě a je aktivován působením trombinu za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ . F VIII je důležitý při stabilizaci fibrinu, kdy mění nekovalentní vazby koagula na kovalentní a pevné (Trojan, 2003, s. 143-145; Penka, 2011, s. 36-43; Pecka, 2004).

## 2.6 Modely koagulace

V současné době je možné se setkat se dvěma modely koagulace. Rozlišuje se tzv. starý a nový model. Jedná se o dva různé pohledy na proces koagulace a vlastnosti koagulačních faktorů.

### 2.6.1 Starý model

Starý model hemokoagulace lze rozdělit na 2 fáze. První fáze zahrnuje aktivaci protrombinu (faktoru II) na trombin. Druhá fáze bývá označována jako společná část, která spočívá v tvorbě nerozpustného fibrinu a stabilizaci fibrinové sítě. První fázi lze ještě rozdělit na dvě cesty: vnitřní a vnější. Vnitřní cesty se účastní faktory, které jsou všechny obsaženy v plazmě. Vnější cesta začíná uvolněním tkáňového tromboplastinu. Obě cesty vedou k aktivaci faktoru X ([www.fblt.cz](http://www.fblt.cz)).

#### Vnitřní cesta

Vnitřní cesty se účastní koagulační faktory VIII, IX a XII. K aktivaci této cesty dochází při kontaktu F XII s aktivním negativně nabitým povrchem (obnaženým kolagenem, povrchem krevních destiček). F XII se aktivuje a spolu s  $\text{Ca}^{2+}$  se účastní přeměny F XI na F XIa, který společně s F VIIa (aktivuje se při vnější cestě) přeměňuje F IX na F IXa. Faktor IXa, VIIIa,  $\text{Ca}^{2+}$  a destičkové fosfolipidy tvoří tenázový komplex. Ten aktivuje faktor X na F Xa, který se účastní přeměny F II (protrombinu) na F IIa (trombin). (Penka, 2014; Trojan, 2003; [www.fblt.cz](http://www.fblt.cz); [www.physiome.cz](http://www.physiome.cz)).

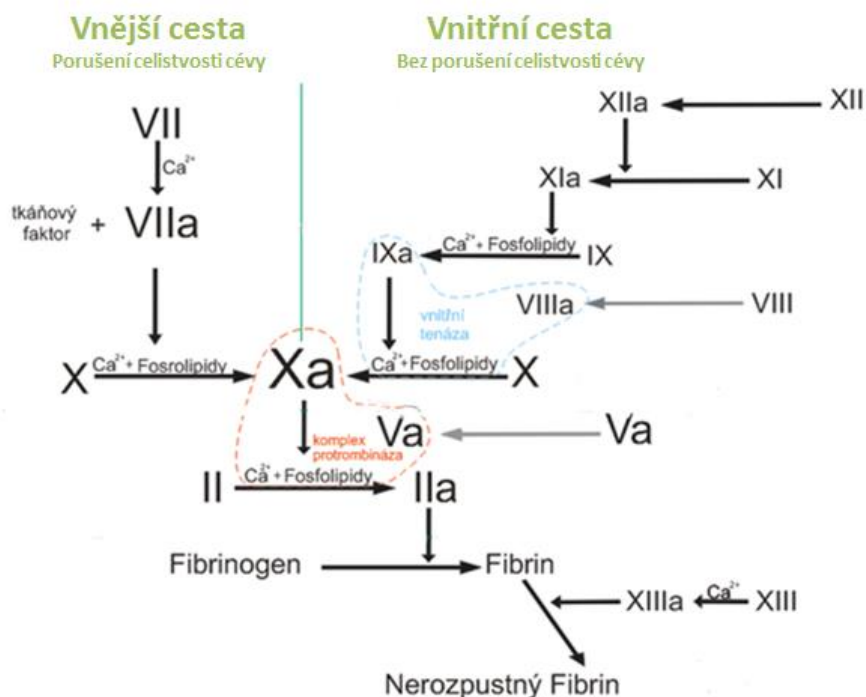
#### Vnější cesta

Vnější cesta hemokoagulace vyžaduje ke svému spuštění tkáňový faktor. Systém tvoří faktor III, F VII a vápenaté ionty. Koagulace je zahájena vazbou faktoru VII na tkáňový faktor, který se do kontaktu s F VII dostává při poškození cévní stěny. Vytvořený komplex TF/F VIIa aktivuje F X, který se společně s aktivovaným F V a  $\text{Ca}^{2+}$  účastní přeměny protrombinu (faktoru II) na trombin (Penka, 2014, s. 20-22; Trojan, 2003, s. 146-147; [www.fblt.cz](http://www.fblt.cz), [www.physiome.cz](http://www.physiome.cz)).

## Společná cesta

K přeměně protrombinu na trombin tedy dochází vnitřní i vnější cestou (viz Obrázek 5). Při vnější cestě je porušena integrita (celistvost) cév a proces je zahájen tkáňovým faktorem, který tuto cestu aktivuje. Při vnitřní cestě většinou není porušena celistvost cévy. A k aktivaci dochází při kontaktu se subendotelovými strukturami. Jedná se o velmi složitý a komplexní proces, který probíhá velmi rychle (Pecka, 2004, s. 65).

Společná cesta spočívá v tom, že aktivovaný faktor X, F Va (aktivován krevními destičkami nebo uvolněn přímo z  $\alpha$ -granul trombocytů), fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$  tvoří protrombinázový komplex, který štěpí protrombin (F II) na trombin (F IIa). Trombin se volně pohybuje v plazmě a jedná se o klíčový a terminální enzym koagulačního mechanismu. Jeho hlavní funkce je štěpení fibrinogenu na fibrin a dále aktivace F VIII, F V a F XIII (Trojan, 2003, s. 147; www.fblt.cz; www.physiome.cz).



**Obrázek 5 – Koagulační kaskáda – starý model**

Vnitřní i vnější cesta koagulace vede ke vzniku faktoru Xa. Obrázek také znázorňuje 2 vznikající komplexy – protrombináza (červeně), vnitřní tenáza (modře). Faktor Xa přeměňuje F II na F IIa, který působí na vznik fibrinu. Ten je stabilizován F XIIIa.

Výsledkem celé koagulace je nerozpustný stabilní fibrin.

## 2.6.2 Nový model

*„Výsledky zkoumání různých modelů hemostázy in vitro a objasnění úlohy inhibitorů potvrdily, že vnitřní a vnější systém nemohou v organismu působit odděleně a že existují vzájemné interakce mezi řadou koagulačních faktorů a tím i mezi oběma systémy koagulace. Nové poznatky vedly k revizi do této doby používaných modelů a k vytvoření nové koncepce srážení krve.“ (Pecka, 2004, s. 74).*

Nový model částečně vychází ze starého modelu, ale liší se v popisu jednotlivých fází koagulace. Podle nejnovější teorie srážení krve lze hemostatické pochody rozdělit do tří fází. Rozlišuje se iniciace, amplifikace a propagace.

Iniace probíhá především na povrchu monocytů. První fáze je zahájena tkáňovým faktorem, který se uvolňuje při poškození cévní stěny, zánětu, ale také při ruptuře aterosklerotického plátu. V krvi koluje malé množství aktivovaného faktoru VII, které může autoaktivovat další molekuly F VII. Tkáňový faktor s F VIIa vytváří komplex TF/VIIa, který aktivuje F X na F Xa a F IX na F IXa. Faktor Xa aktivuje další molekuly F VII a generuje vznik malého množství trombinu, které není dostatečné k přeměně fibrinogenu na fibrin. Trombin je důležitý v amplifikaci, což je další fáze hemostázy.

Ve fázi amplifikace trombin aktivuje faktor V, F VIII a další množství F XI. F XIa se stává součástí vnitřního tenázového komplexu. Trombin se dále účastní aktivace trombocytů a leukocytů, tím dochází na povrchu trombocytárních membrán k exprimování negativně nabitých molekul fosfolipidů, na které se váže F IXa, F VIIIa a F Va. Trombin také aktivuje endotelie v okolí poranění a způsobí tak jejich přechod do prokoagulačního stavu. Výsledkem amplifikace je vznik trombinu a vytvoření reakčních povrchů, které na sobě mají navázány aktivované faktory. Tyto faktory hrají důležitou roli při komplementaci komplexů protrombinázy a vnitřní tenázy.

Ve fázi propagace se F X váže na komplex vnitřní tenázy, který je tvořen F IXa, F VIIIa,  $Ca^{2+}$  a destičkovými fosfolipidy, a dochází k jeho aktivaci. Následně F Xa vytváří s F Va komplex protrombinázy, který se účastní velké produkce trombinu. Proces bývá označován jako trombin burst. Vzniklé množství trombinu ve fázi propagace je již dostatečné k přeměně fibrinogenu na fibrin (Penka, 2014, s. 22-24; www.fb.lt.cz; Pecka, 2004, s. 74-83).

### 2.6.3 Tvorba fibrinu

Fibrinogen je tvořen třemi doménami – D, E, D. Jeho molekula se skládá ze dvou sad řetězců  $A\alpha$ ,  $B\beta$  a  $\gamma$ , které jsou k sobě vázány pomocí disulfidových můstků. Trombin štěpí aminokonce části  $\alpha$  a  $\beta$  řetězců. Dochází k uvolnění malých fibrinopeptidů A a B.  $\gamma$  řetězec se štěpení neúčastní. Při štěpení se obnaží vazebná místa v centrální doméně trombinu a vznikají fibrinové monomery. Ty spontánně polymerují na nerozpustný fibrin. Polymerizace probíhá postupně. Nejprve se na sebe napojují fibrinová vlákna svými konci, dále E domény reagují s vazebnými místy na  $\gamma$  řetězci D domény fibrinových monomerů. Jedná se o nekovalentní interakce. Vzniká tzv. rozpustný fibrin a jeho vlákna se označují jako protofibrily. Za přítomnosti  $Ca^{2+}$  a faktoru XIIIa dochází ke vzniku kovalentních dvojných vazeb mezi vlákny v místě D domén a vytváří se trojrozměrná fibrinová síť, která je stabilní a nerozpustná (Pecka, 2004; Penka, 2011).

## 2.7 Fibrinolytický systém

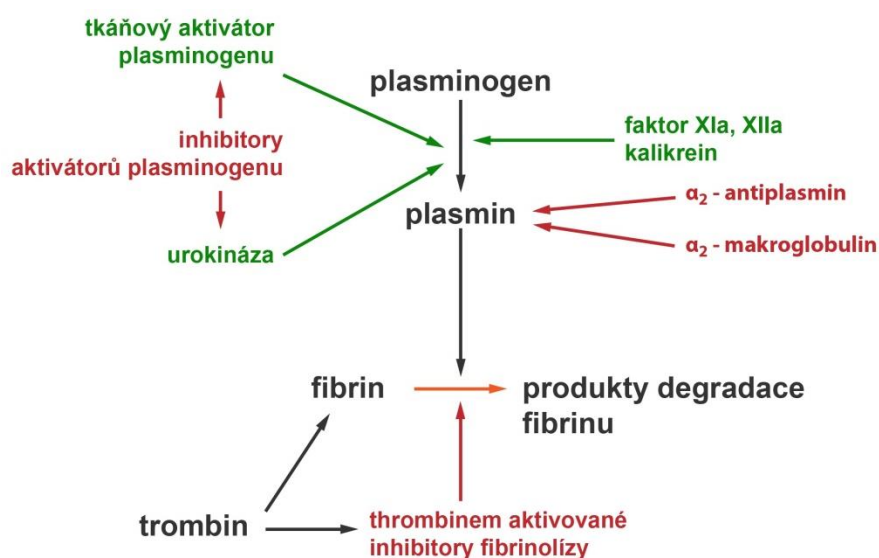
Fibrinolytický systém je odpovědný za rozklad a odstranění fibrinové sítě. Je také významný při degradaci kolagenu. Rozklad fibrinového koagula neboli fibrinolýza nastává po určité době, kdy již krevní sraženina splnila svoji hemostatickou funkci a je potřeba ji odstranit. Jedná se o enzymatický proces, který zprůchodňuje cévy a vrací je do původního stavu. Při fibrinolýze dochází k rozpuštění fibrinu, což je základní strukturální součást koagula. Fibrinolytický systém zahrnuje čtyři složky: plazminogen, plazmin, aktivátory plazminogenu a inhibitory (Sirbenagl, 2004, s. 104; Pecka, 2004, s. 87-97).

Hlavní složkou fibrinolytického systému je jednořetězcový glykoprotein plazminogen, což je prekurzor plazminu. Plazminogen vzniká v játrech, ale nachází se i v eozinofilech nebo ledvinách. Vyskytuje se také v plazmě, kde se váže na glykoproteiny, povrch buněk či na membrány trombocytů. Aktivace plazminogenu (přeměna na plazmin) probíhá současně s aktivací procesu koagulace. Aktivátory plazminogenu lze rozdělit na vnitřní a vnější. Mezi vnitřní aktivátory se řadí například F XII. K aktivaci dochází při kontaktu porušené cévní stěny s F XII. Vnější aktivátory pocházejí z míst mimo krevní oběh a patří mezi ně urokináza (u-PA) a tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA). Oba aktivátory mají vyšší afinitu k plazminogenu, který je vázán

k fibrinu. Proto nedochází k aktivaci volně se vyskytujícího plasminogenu v plazmě (Pecka, 2004; Penka, 2011, s. 51-56; Vokurka, 2008, s. 122).

Na fibrinový povrch se naváže plasminogen i t-PA a vytvoří se formace s lysinem na C řetězci fibrinu. Plasminogen s t-PA navázaným na fibrin je přeměněn na plazmin, který štěpí fibrinové koagulum, a vznikají FDP (fibrin degradační produkty). Nerozpustný fibrin je štěpen na X a Y fragment a dále se štěpí na 2 E podjednotky a 2 D podjednotky (D-dimery). D-dimery slouží jako marker trombofilních stavů. Při procesu štěpení fibrinu se uvolňuje degradovaný fibrin, na který se váže další plasminogen společně s t-PA. To zvyšuje produkci plazminu a účinnost celé fibrinolýzy (Penka, 2011, 51-56; Pecka, 2004).

Z důvodu potencionální nebezpečnosti plazminu se v plazmě nachází serinová proteáza PAI 1, která inhibuje aktivátory plasminogenu (konkrétně u-PA a t-PA). Dalším inhibítoem je TAFI (inhibitor fibrinolýzy aktivovaný trombinem), který je syntetizován v játrech. Jeho inhibiční funkce spočívá v odštěpení C-terminálních molekul lysinu z fibrinových vláken. Tím je blokována vazba plasminogenu a t-PA na fibrin a dochází ke zpomalení aktivace plasminogenu na plazmin (Penka, 2011, s. 52-53).



**Obrázek 5 – Schéma fibrinolýzy**

(Zdroj: fb.lt.cz)

## 2.8 Přirozené inhibitory krevního srážení

*„Inhibitory krevního srážení jsou přirozené složky krve, které antikoagulačními mechanismy tlumí proces jejího srážení vyvolaný plazmatickým koagulačním systémem a fibrinolýzou.“* (Pecka, 2004, s. 98).

Inhibitory jsou součástí regulačního mechanismu při procesu srážení krve. Pokud by nebyl systém inhibitorů funkční, docházelo by k rozsáhlému srážení krve až k ucpání cév. Tento stav je pro organismus nežádoucí. Proto je udržována hemokoagulace a systém inhibitorů v dynamickém a rovnovážném stavu. Mezi inhibitory plasmatického koagulačního systému se řadí především antitrombin, dále pak systém proteinu C a inhibitor tkáňového faktoru (Trojan, 2013; Pecka, 2004; Penka, 2011).

Antitrombin je primárním inhibitorem trombinu, se kterým vytváří ireverzibilní komplex. Jedná se o protein akutní fáze s velkou antiproteázovou aktivitou. Samotný AT je schopný pomalu inhibovat F Xa. Za přítomnosti heparinu nebo dalších proteoglykanů je účinnost inhibice výraznější. Principem inhibice je vyvázání koagulačních faktorů antitrombinem a vytvoření komplexů, které už nejsou schopny aktivovat další faktory či umožnit koagulaci a jsou odbourávány v játrech. Antitrombin inhibuje také urokinázu a další proteázy, se kterými však netvoří inaktivní komplexy tak rychle jako s trombinem (Rokyta, 2015, s. 117; Penka, 2011).

Další složku přirozených inhibitorů tvoří systém proteinu C. Cílem je regulace tvorby sraženiny pomocí štěpení faktoru Va a F VIIIa. Tento systém tvoří protein C, protein S a trombomodulin. Protein C vzniká v hepatocytech za přítomnosti vitamínu K. K jeho aktivaci dochází na cévním endotelu. Protein S je K dependentní protein, který se nachází v endotelu a v  $\alpha$ -granulích krevních destiček. Protein S podporuje vazbu aktivovaného proteinu C na fosfolipidy a také specificky inhibuje aktivitu tkáňového faktoru. Poslední složkou systému je membránový protein trombomodulin, který váže trombin a ten ztrácí schopnost aktivovat F XIII, F VIII, F V a další. Na povrchu endotelových buněk dochází za přítomnosti trombomodulinu (specifického receptoru) k aktivaci systému proteinu C. Trombin navázaný na TM není koagulačně aktivní a vzniká komplex (trombin/trombomodulin), který aktivuje protein C za přítomnosti  $Ca^{2+}$ . Aktivovaný protein C (APC) již dokáže proteolyticky štěpit F Va a F VIIIa, kofaktorem procesu štěpení je protein S. Tím

je zablokován vznik koagulačních komplexů (vnitřní tenázy a protrombinázy). (www.ceva-edu.cz; Penka, 2011, s. 49)

Jako nejsilnější inhibitor zevní koagulační cesty bývá označován TFPI, který inhibuje F Xa a také komplex TF/F VIIa. K inhibici tohoto komplexu je nutná nejprve reakce TFPI s F Xa. TFPI se uvolňuje z cévní stěny také při léčbě heparinem, při které se jeho koncentrace mnohonásobně zvýší a posílí především účinek nízkomolekulárního heparinu (www.ceva-edu.cz).

## 2.9 Trombocytární transfuzní přípravky

Jako transfuzní přípravky se označují léčivé přípravky vyrobené jednoduchými postupy z lidské krve v zařízeních transfuzní služby. Jedná se o koncentráty erytrocytů, trombocytů a o plazmu pro klinické použití. Krevní deriváty jsou léčiva vyrobená z krve farmaceutickými postupy. Patří sem albumin a koagulační faktory (<http://zdravi.e15.cz>).

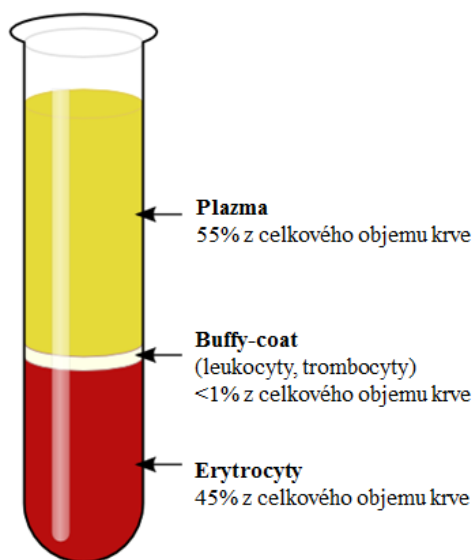
Trombocytární transfuzní přípravky se připravují za účelem získání suspenze trombocytů. Stejně jako všechny ostatní transfuzní přípravky mají pevně stanovené požadavky na jejich přípravu, kvalitu, skladování a transport (Penka, 2012, s. 119).

### 2.9.1 Výroba

Transfuzní přípravky trombocytů lze vyrobit a získat dvěma způsoby. První možností je odběr plné krve a následná centrifugace. Druhý způsob spočívá v odběru krve dárce na separátoru - trombocytaferéza. Z plné krve jsou vyráběny směsné transfuzní přípravky trombocytů. Vyrábí se zpravidla od čtyř až šesti dárců tzv. poolováním. To zaručí získání dostatečné dávky trombocytů pro jednu transfuzní jednotku. Směsné trombocytární přípravky se získávají z plazmy bohaté na krevní destičky nebo z buffycoatu. Vzniká směsný koncentrát trombocytů, který obsahuje většinu původního obsahu trombocytů. V těchto transfuzních přípravcích je obvykle počet trombocytů vyšší než  $60 \times 10^9$  v 1 TU a může být sníženo množství leukocytů. V takovém případě se jedná o deleukotizované trombocyty, které obsahují méně než  $1 \times 10^6$  leukocytů v jedné TU. Trombocyty z aferézy jsou charakterizovány jako transfuzní přípravky, které se získávají od jednoho dárce separační technikou - trombocytaferézou. Opět lze filtrací přes deleukotizační filtr snížit počet leukocytů. Tím vznikají deleukotizované trombocyty z aferézy a jsou považovány



za nejčastěji připravovaný trombocytární přípravek v České republice (Penka, 2012, s. 119; Řeháček, 2013, s. 40 - 44).



**Obrázek 7 – Rozložení složek po centrifugaci plné krve**

(Zdroj: www.boundless.com) – upraveno

## 2.9.2 Množství a skladování

Objemy trombocytárních transfuzních přípravků a množství trombocytů v jedné transfuzní jednotce se mohou lišit z důvodu různého způsobu jejich přípravy. Obvykle se objem TP pohybuje mezi 250 až 400 ml. Trombocyty jsou v transfuzních přípravcích resuspendovány v plazmě dárce, ale také v náhradním roztoku v poměru 1 ml plazmy (náhradního roztoku) na  $1,5 \times 10^9$  trombocytů. Trombocyty (mimo kryokonzervovaných) se skladují v nativním stavu při teplotě 20 až 24 °C za neustálého promíchávání na validovaných horizontálních třepačkách (agitátorech) 5 až 7 dnů. Poté končí doba jejich použitelnosti. Trombocytární transfuzní přípravky jsou uchovávány ve speciálních vacích, které umožňují dostatečný prostup kyslíku a celkově výměnu plynů. Tato vlastnost je důležitá pro zachování funkce krevních destiček. Pro TTP je také stanovena hodnota pH, která by na konci doby použitelnosti neměla být menší než 6,4 (Pacasová, 2005; Penka, 2012, s. 115-119; Řeháček, 2013, s. 41-43).

### 2.9.3 Indikace k podání

Transfuze trombocytů se používají k substituční léčbě u pacientů s krvácivými projevy, s výskytem těžké trombocytopenie, ale také k profylaxi krvácení u pacientů s trombocytopenií nebo trombocytopatií. Podání transfuze trombocytů se indikuje před plánovanými invazivními (například operačními) výkony, kdy má pacient před zákrokem pokles hladiny trombocytů pod  $50 \times 10^9 / l$  krve. Další indikace k podání transfuzních přípravků trombocytů popisuje Tabulka 1. O indikaci k podání transfuze trombocytů rozhoduje výhradně hematolog (Pacasová, 2005; Indrák, 2014, s. 533-539).

**Tabulka 1 – Indikace k podání trombocytární transfuze**

Tabulka vyjadřuje, při jakých případech se trombocytární transfuze podává. A dále jaká hodnota trombocytů je v daném případě indikací k podání této transfuze.

Případy	Hodnota trombocytů
Plánovaný operační výkon	méně než $50 \times 10^9 / l$
Vysoce rizikový výkon (nebezpečí masivního krvácení)	méně než $80 \times 10^9 / l$
Krvácení ohrožující život	méně než $75 \times 10^9 / l$
Krvácení z GIT nebo urogenitálního traktu	$30 - 75 \times 10^9 / l$
Krvácení do kůže nebo svalů	méně než $30 \times 10^9 / l$

### 2.10 Kryokonzervace trombocytů

Kryokonzervace je metoda, která umožní skladování krevních buněk a elementů ve zmrazeném stavu. Díky ní je možno výrazně prodloužit dobu použití transfuzních přípravků. Konkrétně trombocyty ve zmrazeném stavu mají prodlouženou expiraci na 2 až 4 roky. Při kryokonzervaci dochází ke snižování teploty a tím se zpomalují metabolické procesy uvnitř krevních buněk a elementů. Zcela se pochody zastavují při teplotě  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ . Při skladování se využívají páry tekutého dusíku nebo mrazicí zařízení. Trombocyty pro kryokonzervaci se musí zpracovat do 24 hodin od separace. Důležité je, aby při procesu mražení byly zajištěny specifické podmínky a nedošlo k poškození krevních destiček. Je třeba zabránit tvorbě ledových krystalků v průběhu zmrazování, které mohou způsobit destrukci membrán. Z důvodu ochrany před mrazem se k trombocytům (ale také k erytrocytům) přidávají kryoprotektivní látky. Ty prochází přes buněčnou membránu a jsou schopny vázat nebo nahradit molekuly vody a tím zabraňují poškození (Penka, 2012; Bohoněk, 2013).

Dle mechanismu účinku lze kryoprotektivní látky rozdělit na dvě skupiny. Intracelulární (penetrující) kryoprotektiva v nízké koncentraci nepředstavují pro trombocyty toxicitu a mají poměrně jednoduchou chemickou strukturu. Ta jim umožní proniknout přes membránu. Jejich účinek je založen na zvyšování výstupu vody z buněk do extracelulárního prostoru během mrazicího procesu. Pro trombocyty se z této skupiny využívá především dimetylsulfoxid (DMSO). Druhou skupinu tvoří extracelulární (nepenetrující) kryoprotektiva, která neprochází přes buněčnou membránu, a používají se pro rychlé zmrazování. Princip účinku je založen na stabilizaci buněčné membrány. Ve vztahu k trombocytům se mezi nepenetrující kryoprotektivní látky řadí HES a dextran (Bohoněk, 2013).

Postup kryokonzervace trombocytů je poměrně snadný stejně jako skladování kryokonzervovaných trombocytárních transfuzních přípravků. Nejrozšířenější metodou je kryokonzervace trombocytů v 5 až 10% DMSO. Následuje mražení při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a poté skladování při teplotě  $-65$  až  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vždy před použitím se kryokonzervované trombocyty musí rozmrazit a promýt z důvodu odstranění kryoprotektiva a dále se přidává resuspenzní roztok. Celkový čas procesu rozmražení trombocytů a jejich rekonstituce v rozmražené plazmě je 30 minut. Rozmražené krevní destičky se skladují při  $20-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  a měly by být použity co nejdříve (maximální doba použitelnosti po rozmražení je 6 hodin). U rozmražených trombocytů se také provádí kontrola, která hodnotí jejich kvalitu. I když jsou trombocyty již částečně aktivované a mohou mít různé defekty (vzniklé působením mrazu), stále zůstávají efektivní při léčbě krvácení (Kořánová a kol., 2014; Bohoněk 2013; Řeháček, 2013).

## **2.11 Kontrola kvality trombocytárních transfuzních přípravků**

Kontrolou kvality TP se rozumí kontrola splnění požadavků na jakost a bezpečnost v průběhu procesu výroby transfuzních přípravků, ale také po dobu skladování i při vydávání TP. Celkový souhrn všech opatření, která vedou k zajištění toho, aby TP splňoval jakostní požadavky pro zamýšlené použití, se označuje jako zabezpečení (jištění) jakosti. V souladu s vyhláškou č. 143/2008 Sb. o lidské krvi provádí zařízení transfuzní služby kontrolu konečných produktů ([www.transfuznispolecnost.cz](http://www.transfuznispolecnost.cz); Matýšková, 2002, s. 16-20).

Existuje velké množství způsobů, jak provádět kontrolu transfuzních přípravků. Je možno sledovat celý proces výroby, který musí odpovídat zákonům, normám a požadavkům. Výroba transfuzních přípravků je v České republice považována za výrobu léčiv a její proces je stanoven Zákonem č. 378/2007 s. o léčivech. Výroba musí splňovat předepsané postupy a musí být veden systém zabezpečení jakosti. Součástí tohoto systému je také dodržování zásad správné výrobní praxe. Stejně tak je možné kontrolovat přímo daný přípravek, zda vyhovuje předepsaným parametrům (Řeháček, 2013, s. 21-31; [www.transfuznispolecnost.cz](http://www.transfuznispolecnost.cz)).

Dle typu transfuzního přípravku se prováděná kontrola kvality liší. Je to tím, že mezi TP jsou rozdíly v objemu, hmotnosti, stabilitě, ukazatelích účinku či bezpečnosti. Odlišnosti jsou také v přítomnosti nežádoucích složek. Kontrola kvality trombocytárních transfuzních přípravků probíhá v několika krocích. První kontrola probíhá po dokončení odběru TAD. Druhá kontrola kvality probíhá po smísení TAD se 75 ml DMSO. Po rozmrazení trombocytů a jejich rekonstituci v plazmě se provádí třetí kontrola kvality (Penka, 2012, s. 126-127).

Ve všech případech se stanovuje pH a krevní obraz. U vzorků se také provádí kontrola sterility – zaslání vzorků do mikrobiologické laboratoře. Další kontrolovanou položkou je vzhled. Při vizuální kontrole se hodnotí zbarvení přípravku, zákal způsobený vyšším obsahem lipidů (tzv. chylozita), poškození vaku a v neposlední řadě také swirling neboli fenomén víření. Ten se v čerstvých trombocytárních transfuzních přípravcích nacházet musí, není přítomen pouze u kryokonzervovaných trombocytů, které byly rozmrazeny. Fenomén je způsoben schopností diskovitého tvaru krevní destičky rozptylovat světlo. Pokud je trombocyt z nějakého důvodu poškozen (například chyba při skladování) ke swirling fenoménu nedochází, protože má krevní destička změněný tvar a světlo není rozptylováno (Penka, 2012, s. 126-127). Požadavky na deleukotizované trombocyty z aferézy pro kryokonzervaci a požadavky na kryokonzervované trombocyty z aferézy popisuje Tabulka 2 a Tabulka 3.

**Tabulka 2 – Specifikace trombocytů z aferézy de leukotizovaných pro kryokonzervaci**

<b>Parametr</b>	<b>Výsledek</b>
Množství trombocytů	více než $280 \times 10^9$ / TU
Reziduální leukocyty	méně než $1 \times 10^6$ / TU
Množství erytrocytů	méně než $5 \times 10^6$ / TU
Objem	280-330 ml
Swirling	přítomen
Agregáty	nepřítomny
pH	větší než 6,4

**Tabulka 3 – Specifikace trombocytů z aferézy kryokonzervovaných**

<b>Parametr</b>	<b>Výsledek</b>
Množství trombocytů	200-420 $\times 10^9$ / TU
Reziduální leukocyty	méně než $1 \times 10^6$ / TU
Množství erytrocytů	méně než $6,8 \times 10^6$ / TU
Objem	180-312 ml
Swirling	nepřítomen
Agregáty	nepřítomny
pH	větší než 6,4

## 2.12 Využití tromboelastografie

Tromboelastografie je metoda, která jako jediná dává globální informace o dynamice hemokoagulačního procesu v reálném čase včetně zpráv o rozpadu koagula i celé fibrinolýzy. V polovině 20. století se používala pouze ve výzkumných laboratořích jako experimentální metoda. V 80. letech téhož století díky technologickým pokrokům a možnosti práce na počítači se tromboelastografie začala rozšiřovat nejprve v oblasti transplantací (především jaterních), později v kardiochirurgii, ale také ve sféře gynekologicko-porodnické (David a kol., 1999; Hájek a kol., 2005).

V současné době se jedná o jedinečnou metodu monitorace hemokoagulace, která je automatizovaná s počítačovým rozhraním a umožňuje sledování a automatické zpracování tromboelastografických parametrů. Díky nové technice analýzy (přidávání

křemeliny) lze měření urychlit a vyšetření je tak možno provést přímo u lůžka pacienta (tzv. point-of-care testing) nebo na operačním sále během operace. Tromboelastografie je využívána v různých chirurgických oborech. Uspadňuje diagnostiku hemokoagulačních poruch, odhaluje úroveň heparinizace (včetně odhalení reziduální heparinizace po chirurgickém výkonu), dále je vhodná k monitorování koagulačního stavu a pomáhá také v procesu prevence rozvoje krvácení či při diferenciální diagnostice jeho příčiny. Tromboelastografie také zjednodušuje rozhodování o provedení operační revize a o podání antifibrinolytik. Díky ní je také dosahováno racionální indikace podání transfuzních přípravků, které vede k minimalizaci rizik spojených právě s podáním transfuze a ke snížení spotřeby transfuzních přípravků a finančních nákladů. Metoda má také uplatnění v predikci krvácivých komplikací před plánovaným chirurgickým výkonem a tím pomáhá poskytovat cílenější léčbu. V neposlední řadě má časné provedení TEG informovat kardiochirurga o příčině pooperačního krvácení – pokud není na tromboelastografu přítomna porucha koagulace, je s největší pravděpodobností příčina krvácení chirurgická. Výhodou tromboelastografie je možnost provedení analýzy u plně heparinizovaného pacienta – například v průběhu mimotělního oběhu. Metodu TEG lze také využít se sledování hyperkoagulačních a krvácivých poruch hemostázy v těhotenství (Hájek a kol., 2005; Duraj a kol., 2012; Durila a kol., 2014; Ågren, 2013).

### **3 Cíl práce**

Cílem bakalářské práce je stanovení referenčních rozmezí výsledků trombelastografie pro účely kontroly kvality trombocytárních přípravků na přístroji TEG® Analyzer 5000 series (Haemoscope, USA).

Dílčím cílem je porovnání jednotlivých TEG parametrů mezi trombocyty z aferézy a trombocyty kryokonzervovanými.

## 4 Metodika práce

### 4.1 Tromboelastografie

Tromboelastografie je metoda, kterou jsou měřeny fyzikální viskoelastické vlastnosti koagula v procesu jeho tvorby. Je také schopna zaznamenat fibrinolýzu. Lze tedy říct, že tromboelastografie monitoruje proces krevního srážení včetně rozkladu fibrinové sítě a poskytuje tak celkový i kontinuální pohled na průběh tvorby a rozpadu koagula. Přístroj pro měření těchto vlastností se nazývá tromboelastograf. Je dvoukanálový (Obrázek 6), což umožňuje měření dvou vzorků současně. Zároveň je možné nastavit teplotu, při které měření bude probíhat. To umožňuje simulovat situaci, která nastane v organismu po podání trombocytárního přípravku. Přístroj měří vzorek trombokoncentrátu, který je aktivovaný kaolinem za přítomnosti chloridu vápenatého.



**Obrázek 6 – Tromboelastograf**

*1, 2 – kanály, ve kterých je možno kontinuálně měřit 2 vzorky*

*1 – držák kyvety je nahoře – probíhá měření jednoho vzorku*

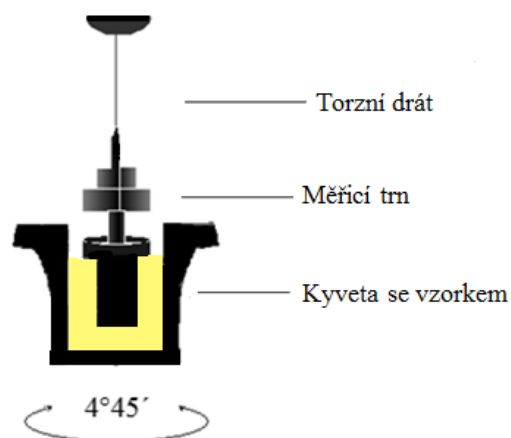
*2 – držák kyvety je dole – přístroj je připraven na vložení druhého vzorku*

#### 4.1.1 Princip měření

Přesně definované množství vzorku (360  $\mu$ l) je umístěno v kyvetě vyhřívané na teplotu 37°C. Kyveta koná každých 10 sekund rotační kývavý pohyb kolem svislé osy s úhlovou amplitudou 4° 45'. Poté následuje 1 sekundu pauza a pohyb kyvety

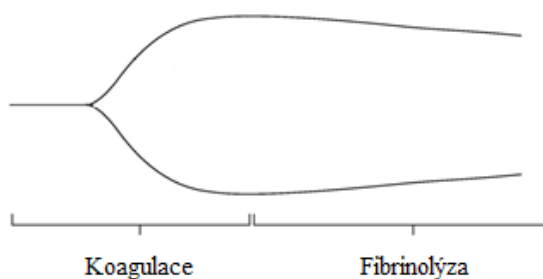


se opakuje. Do vzorku je spuštěn měřicí trn zavěšený na torzním vlákně (Obrázek 7). Měřicí trn zůstává nehybný. Při tvorbě prvních fibrinových vláken se pohyb kyvety přenáší na měřicí trn. Pohyb trnu je snímán a pomocí mechanicko-elektrického převodníku je převeden na elektrický signál, který se počítačově zpracovává a výsledkem je grafický záznam v podobě tromboelastografické křivky – Obrázek 8 (David a kol., 1999; Hájek a kol., 2005).



**Obrázek 7 – Princip metody**

(Zdroj: [www.gototema.com](http://www.gototema.com)) - upraveno

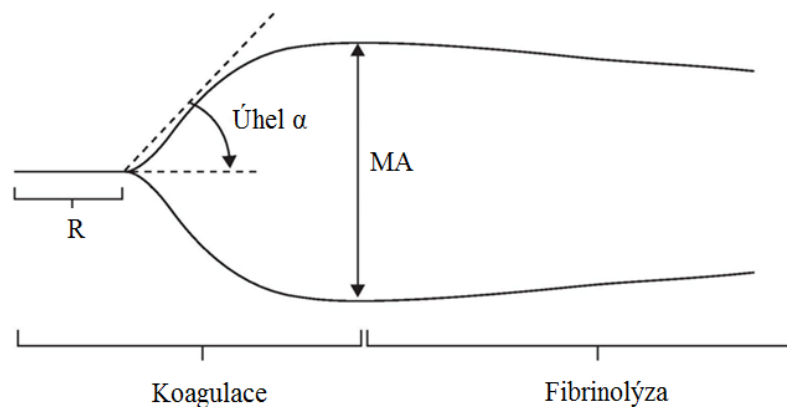


**Obrázek 8 – Křivka tromboelastografie**

#### 4.1.2 Parametry

Tromboelastografická křivka má charakteristický tvar a definuje ji 5 parametrů – R, K, úhel  $\alpha$ , MA, LY30. Pro hodnocení kvality trombocytárních transfuzních přípravků jsme použili 3 vypovídající parametry – R, úhel  $\alpha$ , MA (Obrázek 9).

- **R** (reakční čas) znázorňuje dobu od zahájení měření do momentu vytvoření prvního koagula. Charakterizuje počáteční formování fibrinu.
- **Úhel  $\alpha$**  ( $\alpha$ -angle) udává rychlost tvorby koagula a jeho zpevňování. Vyjadřuje rychlost výstavby fibrinové sítě.
- **MA** (maximální amplituda) představuje maximální dosaženou pevnost koagula. Reprezentuje funkčnost krevních destiček a jejich agregaci.



**Obrázek 9 – Parametry tromboelastografické křivky pro účely kontroly kvality**

*R – reakční čas – formování fibrinu. Úhel  $\alpha$  – rychlost tvorby koagula.*

*MA – maximální amplituda – maximální pevnost koagula.*

(Zdroj: [www.revcolanest.com.co](http://www.revcolanest.com.co)) - upraveno

## 4.2 Definice souboru

Všechny stanovované vzorky krve byly odebrány v Ústřední vojenské nemocnici v Praze dle standardních operačních postupů. Jedná se o vzorky trombocytů od dárců krve. Všichni dárce byli propuštěni k odběru jako zdraví, podepsali informovaný souhlas dárce krve. Vyšetřovaný soubor tvoří 151 vzorků TAD a 31 vzorků TADK.

## 4.3 Kontrola kvality TAD – postup

Kontrola probíhá po dokončení odběru TAD. TAD jsou čerstvé trombocyty z aferézy, které jsou deleukotizované a určené pro kryokonzervaci.

### **Pracovní pomůcky**

- Vzorkovací vak (je součástí odběrového setu)
- Peán, nůžky
- Zkumavka s bílým uzávěrem
- Zkumavky se žlutým nebo zeleným uzávěrem
- Stojan na zkumavky
- Pipety, špičky
- Kyvety TEG 5000, Pin TEG 5000

### **Zařízení**

- Nesterilní svářečka hadiček
- Váha
- Rozmrazovač Tool PR 50-300
- Trombelastograf TEG 5000

### **Reagencie**

- 0,2 M CaCl<sub>2</sub>
- TEG 5000 Kaolin

### **Příprava vzorku**

- Po dokončení aferetického odběru sejmeme odběrový set a oddělíme nesterilní svářečkou vak s TAD a vzorkovací vak.
- Vak s TAD zvážíme a hodnotu zaznamenáme.
- Hmotnost vaku s TAD přepočítáme na objem za použití koeficientu 1,031 g/ml.
- Do vzorkovacího vaku odebereme asi 4 ml vzorku a oddělíme jej od setu.
- Dále odebereme asi 20 ml TAD do většího vzorkovacího vaku. Tento vzorek je určen pro kontrolu sterility TAD.
- Vak s 4 ml vzorku pomocí peánu a nůžek otevřeme a jeho obsah přepustíme do zkumavky s bílým uzávěrem.

### **Analýza vzorku pomocí tromboelastografie**

- V hluboko mrazicím boxu jsou připraveny v 5 ml zkumavkách vzorky AB plazem.

- Jednu zkumavku s vzorkem plazmy vyjmeme z boxu a necháme ji rozmrazit při 37 °C v rozmrazovači.
- Do připravené a označené zkumavky se žlutým nebo zeleným uzávěrem přepipetujeme celý objem AB plazmy.
- Do zkumavky se žlutým nebo zeleným uzávěrem (obsahuje již AB plazmu) napipetujeme 1 ml důkladně promíchaného vzorku TAD (ze zkumavky s bílým uzávěrem). Poměr ředění je 5:1 (5 dílů plazmy a 1 díl TAD)
- Do kaolinizované zkumavky napipetujeme 1 ml naředěného vzorku TAD a šetrně promícháme.
- Takto naředěný vzorek je připraven k analýze na TEG 5000.
- Do měřicí kyvety napipetujeme 20 µl 0,2 M CaCl<sub>2</sub> a 340 µl naředěného kaolinizovaného vzorku TAD.
- S držákem kyvety vyjedeme nahoru, otočíme páčku do polohy *Test* a stiskneme *Start*.
- Test je spuštěn.

## 4.4 Kryokonzervace trombocytů - postup

Po dokončení kontroly kvality jsou trombocyty skladovány. Díky kryokonzervaci můžeme expiraci trombocytárních transfuzních přípravků výrazně prodloužit.

### Materiál

- trombocyty z aferézy (280-320 ml) minimální obsah trombocytů:  $300 \cdot 10^9$ / TU)
- infuzní souprava, vzorkovací vak, transportní vak
- roztok 75 ml 27% DMSO

### Zařízení a pomůcky

- sterilní svářečka hadiček
- velkoobjemová centrifuga
- laboratorní třepačka
- infuzní stojan
- plastové svorky nebo peán

## Pracovní postup

- Vak s trombocyty z aferetického odběru vizuálně zkontrolujeme (sledujeme barvu, pohyb trombocytů a výskyt případných agregátů).
- Zvážíme vak s trombocyty, hmotnost napíšeme na vak s trombocyty.
- Sterilní svářečkou na vak s trombocyty napojíme infuzní soupravu, na které jsme pomocí svářečky zkrátili jeden port o jednu polovinu délky od rozdvojky na 13,5 cm. Tlačku soupravy necháme zavřenou.
- Vak s trombocyty umístíme na třepačku. Třepačku nastavíme na hodnotu 180 otáček/min.
- 27% roztok DMSO umístíme na infuzní stojan.
- Povolíme sterilní svár i tlačku a necháme přetéct DMSO do vaku rychlostí cca 8-10 ml/min. Sledujeme hladinu roztoku, aby se do vaku nedostal přebytečný vzduch.
- Po přemístění roztoku pomocí svářečky odstraníme transfuzní soupravu.
- Sterilní svářečkou napojíme na vak s trombocyty vak určený ke kryokonzervaci, který jsme zkrátili o jednu polovinu původní délky na 39,5 cm a označili čárovým kódem dárce.
- Svár povolíme a obsah původního aferetického vaku necháme přetéct do vaku určeného k zamrazení. Vaky neoddělujeme.
- Na hadičku mezi oba vaky umístíme svorku, svorku zavřeme.
- Vak vložíme do kyvety, vyvážíme a vložíme do centrifugy.
- Centrifugujeme při 1940 G po dobu 15 minut (teplota 22 °C).
- Po centrifugaci opatrně vyjmeme vaky. Vak s trombocyty vložíme do ručního lisu, povolíme svorku i svár, do prázdného vaku necháme přetéct supernatant. Sledujeme hranici supernatant-trombocyty.
- Lisování ukončíme ve chvíli, kdy se v původním vaku nachází minimum supernatantu a nedochází ještě k úniku trombocytů.
- Spojovací hadičku mezi vaky přerušíme svářečkou a vaky oddělíme.
- Trombocyty ve vaku pomocí buničiny promícháme. Míchání musí být jemné, aby nedošlo k poškození krevních destiček.
- Finální produkt zvážíme, hodnotu zapíšeme.
- Vak s trombocyty umístíme do mrazicí skříně s nastavenou teplotou -80 °C.
- Kryokonzervované trombocyty skladujeme při teplotě -65 °C.

## 4.5 Rozmrazení a rekonstituce trombocytů – postup

Rozmrazení trombocytů provádíme v případě, kdy je požadováno vydání daného kryokonzervovaného trombocytárního TP. Rekonstitucí rozumíme smísení trombocytů s plazmou.

### Materiál

- kryokonzervované trombocyty
- čerstvě mražená plazma (KS AB)

### Zařízení

- rozmrazovač plazmy
- bezkontaktní teploměr
- sterilní svářečka hadiček

### Pracovní postup

- Z mrazicího boxu vybereme čerstvě mraženou plazmu pro klinické použití.
- Zkontrolujeme teplotu na rozmrazovači, teplota vody musí být 36-38 °C.
- Vak s plazmou ponoříme do vodní lázně na 15 minut.
- Po 15 minutách rozmrazování zkontrolujeme teplotu plazmy teploměrem.
- Dosáhne-li plazma teplotu 28 °C, vložíme do rozmrazovače kryokonzervované trombocyty současně s plazmou.
- Po uplynutí 5 minut změříme teplotu obou přípravků. Teplota přípravků musí být v rozmezí 30-35 °C.
- Nedosáhne-li teplota obou přípravků (plazmy i trombocytů) teploty 30-35 °C, vložíme oba přípravky do rozmrazovače ještě na 1 minutu.
- Po dosažení správné teploty obou přípravků pohledem zkontrolujeme jejich vzhled.
- Trombocyty na buničité podložce pomoci gázy jemným třením promícháme po dobu 30 sekund. Míchání musí být jemné, aby nedošlo k poškození krevních destiček.
- Vak s trombocyty sterilní svářečkou napojíme na vak s plazmou.
- Svár povolíme a necháme plazmu přetékat do napojeného vaku s trombocyty.

- Vak s trombocyty držíme v ruce a krouživým způsobem promícháváme trombocyty s přitékající plazmou.
- Po přemístění plazmy postup opakujeme. Tentokrát necháváme přetéct trombocyty i s plazmou do prázdného vaku od plazmy. Poté vrátíme trombocyty s plazmou do vaku od trombocytů.
- Svářečkou vaky oddělíme a odstraníme prázdný vak.
- Pro kontrolu kvality si ponecháme co nejdelší segment naplněný vzniklým trombocytárním přípravkem.
- Expirace čerstvě rozmražených trombocytů je 6 hodin.
- Rozmražené trombocyty se skladují na tromboagitátoru při teplotě 20 až 24 °C.

## **4.6 Kontrola kvality TADK – postup**

Po rozmrazení trombocytů a jejich rekonstituci v plazmě provádíme opět kontrolu kvality. V odebraném vzorku stanovujeme počet trombocytů, reziduální leukocyty i reziduální erytrocyty. Vzorek také měříme pomocí tromboelastografie.

### **Pracovní pomůcky**

- Peán, nůžky
- Pipety, špičky
- Kyvety TEG 5000, Pin TEG 5000

### **Zařízení**

- Nesterilní svářečka hadiček
- Trombelastograf TEG 5000

### **Reagencie**

- 0,2 M CaCl<sub>2</sub>
- TEG 5000 Kaolin

### **Příprava vzorku**

- Transfuzní hadičku s vzniklým trombocytárním přípravkem pomocí peánu a nůžek rozstříhneme. Obsah hadičky přepustíme do zkumavky, která je označená číslem transfuzního přípravku.
- Do kaolinizované zkumavky napipetujeme 1 ml vzorku TADK a šetrně promícháme.
- Takto naředěný vzorek je připraven k analýze na TEG 5000.

### **Analýza vzorku pomocí tromboelastografie**

- Do měřicí kyvety napipetujeme 20  $\mu$ l 0,2 M  $\text{CaCl}_2$  a 340  $\mu$ l kaolinizovaného vzorku TADK.
- S držákem kyvety vyjedeme nahoru, otočíme páčku do polohy *Test* a stiskneme *Start*.
- Test je spuštěn.

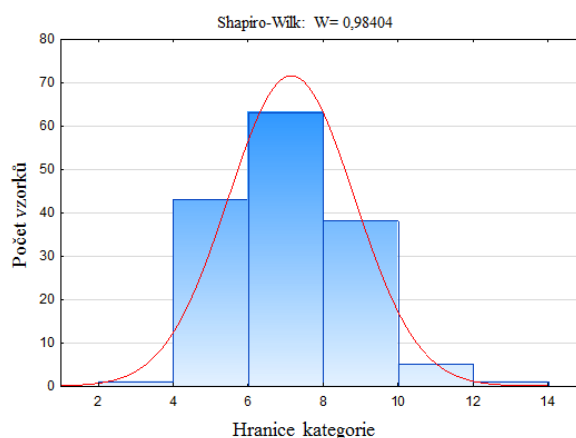
Při kontrolách kvality také stanovujeme pH a krevní obraz. Reziduální zbytky erytrocytů počítáme v Bürkerově komůrce a reziduální zbytky leukocytů počítáme v Nageottově komůrce. Vzorky posíláme na kontrolu sterility do mikrobiologické laboratoře. Další položku, kterou kontrolujeme, je vzhled. Při vizuální kontrole hodnotíme zbarvení přípravku, zákal, poškození vaku a swirling.



## 5 Výsledky

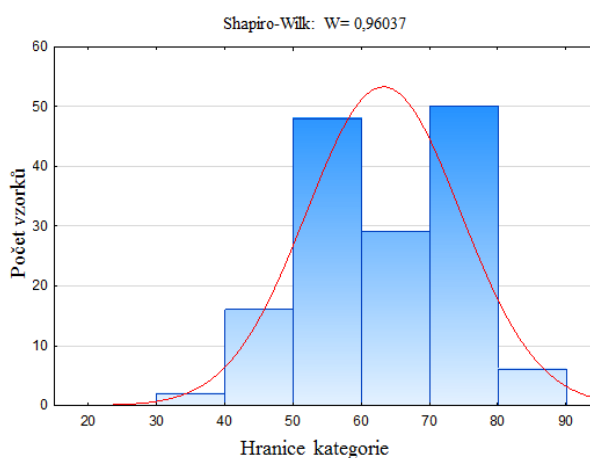
### 5.1 Statistické zpracování a určení referenčního rozmezí

Naměřené hodnoty jsme statisticky zpracovali a určili jsme referenční rozmezí pro TAD (Tabulka 4, Tabulka 6) i pro TADK (Tabulka 5, Tabulka 7). K porovnání a sledování distribuce dat jsme využili Shapiro-Wilkův test, normalitu dat jsme graficky znázornili histogramy (Graf 1-6). Tyto výpočty a grafy byly vytvořeny statistických softwarem Statistica 11 společnosti StatSoft (verze 10, Dell, USA) určenému k biostatistickým výpočtům klinických studií.



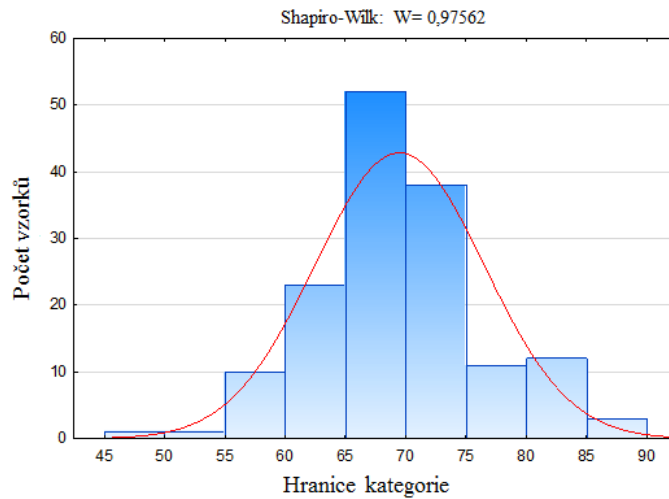
**Graf 1 – Histogram parametru R (TAD)**

*Z hodnoty Shapiro-Wilk, která je větší než 0,05 lze říci, že hodnoty pro parametr R u TAD jsou normálně rozloženy a lze použít parametrické statistické testy.*



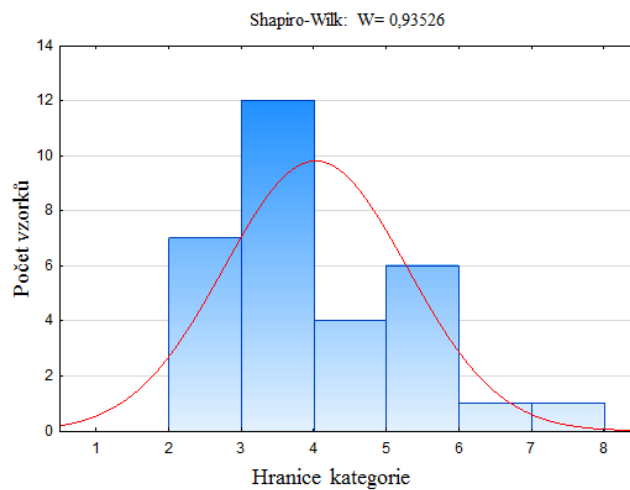
**Graf 2 – Histogram parametru Angle (TAD)**

*Z hodnoty Shapiro-Wilk, která je větší než 0,05 lze říci, že hodnoty pro parametr Angle u TAD jsou normálně rozloženy a lze použít parametrické statistické testy.*



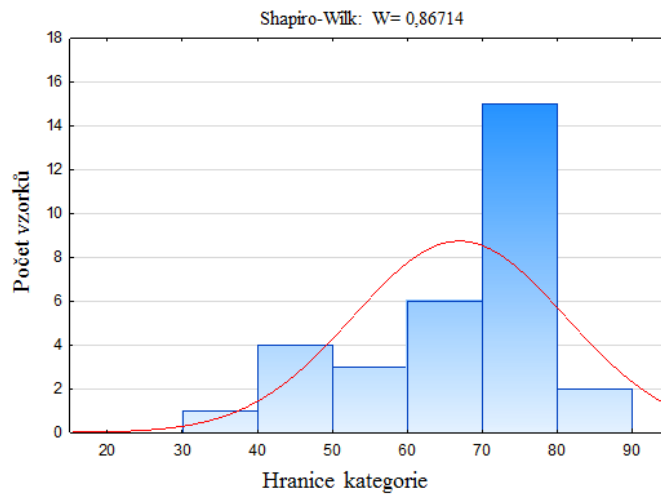
**Graf 3 – Histogram parametru MA (TAD)**

*Z hodnoty Shapiro-Wilk, která je větší než 0,05 lze říci, že hodnoty pro parametr MA u TAD jsou normálně rozloženy a lze použít parametrické statistické testy.*



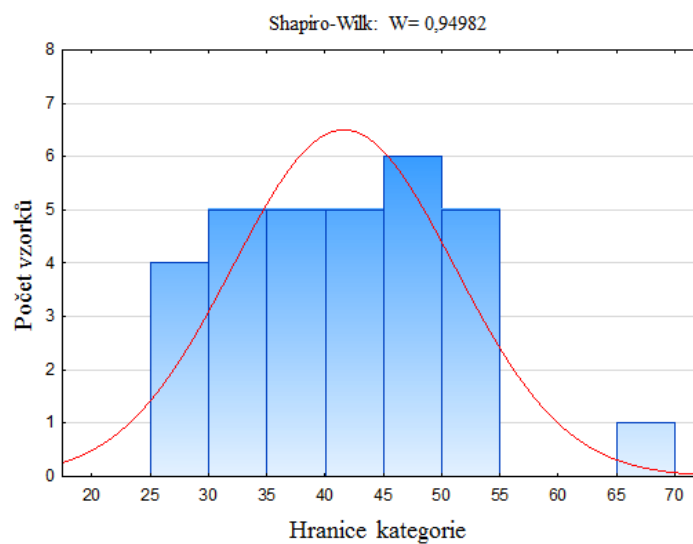
**Graf 4 – Histogram parametru R (TADK)**

*Z hodnoty Shapiro-Wilk, která je větší než 0,05 lze říci, že hodnoty pro parametr R u TADK jsou normálně rozloženy a lze použít parametrické statistické testy.*



**Graf 5 – Histogram parametru Angle (TADK)**

*Z hodnoty Shapiro-Wilk, která je větší než 0,05 lze říci, že hodnoty pro parametr Angle u TADK jsou normálně rozloženy a lze použít parametrické statistické testy.*



**Graf 6 – Histogram parametru MA (TADK)**

*Z hodnoty Shapiro-Wilk, která je větší než 0,05 lze říci, že hodnoty pro parametr MA u TAD jsou normálně rozloženy a lze použít parametrické statistické testy.*

#### Tabulka 4 – Deskriptivní statistika pro TAD

V tabulce je uvedena deskriptivní statistika pro námi měřené parametry. Pro každý sledovaný parametr bylo stanoveno referenční rozmezí, průměr (zvýrazněno) a další statistické veličiny.

Vyhodnocení	R (min)	Úhel (°)	MA (mm)
<b>Medián</b>	7,10	64,00	68,70
<b>Průměr</b>	7,15	63,26	69,49
<b>Maximální hodnota</b>	12,80	82,80	89,00
<b>Minimální hodnota</b>	3,70	32,80	49,80
<b>Směrodatná odchylka</b>	1,68	11,30	7,03
<b>Variační koeficient</b>	0,24	0,18	0,10
<b>1,96 SD</b>	3,30	22,14	13,79
<b>Horní mez referenčního rozmezí</b>	10,45	85,40	83,28
<b>Dolní mez referenčního rozmezí</b>	3,85	41,12	55,71
<b>Stanovené referenční rozmezí</b>	3,85-10,45	41,12-85,40	55,71-83,28
<b>Rozmezí dle Noorman *</b>	6,60-8,00	67,00-71,00	62,00-68,00

\* Referenční rozmezí dle Dr. Femke Noorman, ISBT 2012

#### Tabulka 5 – Deskriptivní statistika pro TADK

V tabulce je uvedena deskriptivní statistika pro námi měřené parametry. Pro každý sledovaný parametr bylo stanoveno referenční rozmezí, průměr (zvýrazněno) a další statistické veličiny.

Vyhodnocení	R (min)	Úhel (°)	MA (mm)
<b>Medián</b>	3,70	74,30	42,50
<b>Průměr</b>	4,03	66,96	41,61
<b>Maximální hodnota</b>	7,20	83,60	67,80
<b>Minimální hodnota</b>	2,40	30,20	26,30
<b>Směrodatná odchylka</b>	1,26	14,15	9,51
<b>Variační koeficient</b>	31,30	21,13	22,86
<b>1,96 SD</b>	2,47	27,73	18,64
<b>Horní mez referenčního rozmezí</b>	6,50	94,69	60,25
<b>Dolní mez referenčního rozmezí</b>	1,56	39,23	22,97
<b>Stanovené referenční rozmezí</b>	1,56-6,50	39,23-94,69	22,97-60,25

**Tabulka 6 – Referenční rozmezí jednotlivých parametrů pro TAD**

Parametry	R (min)	Úhel (°)	MA (mm)
TAD	3,85-10,45	41,12-85,40	55,71-83,28

**Tabulka 7 – Referenční rozmezí jednotlivých parametrů pro TADK**

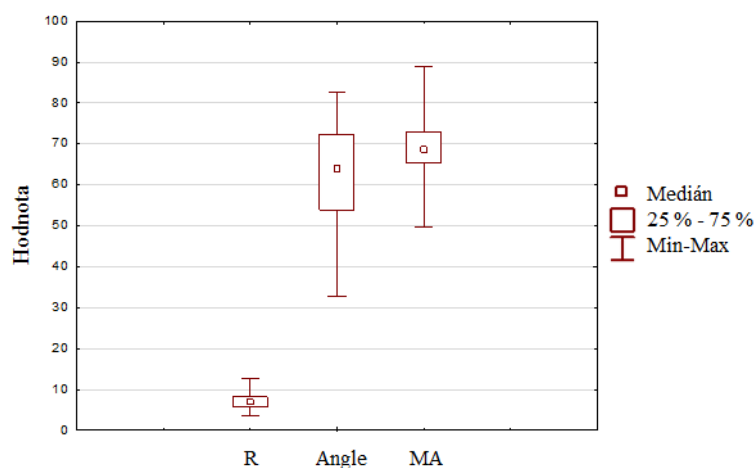
Parametry	R (min)	Úhel (°)	MA (mm)
TADK	1,56-6,50	39,23-94,69	22,97-60,25

## 5.2 Porovnání parametrů u TAD a TADK

Porovnávali jsme naměřené parametry u čerstvých trombocytů (TAD) a u kryokonzervovaných trombocytů po rozmražení. Pro srovnávání všech sledovaných primárních i sekundárních veličin mezi skupinami (i uvnitř skupin) byly použity párové t-testy (studentův t-test) s  $p < 0,05$  při dvoustranném intervalu spolehlivosti. Naměřené výsledky jsme hodnotili pomocí grafů (Graf 9-11), t-testu (Tabulka 8-10) a pomocí tromboelastografických křivek (Obrázek 13).

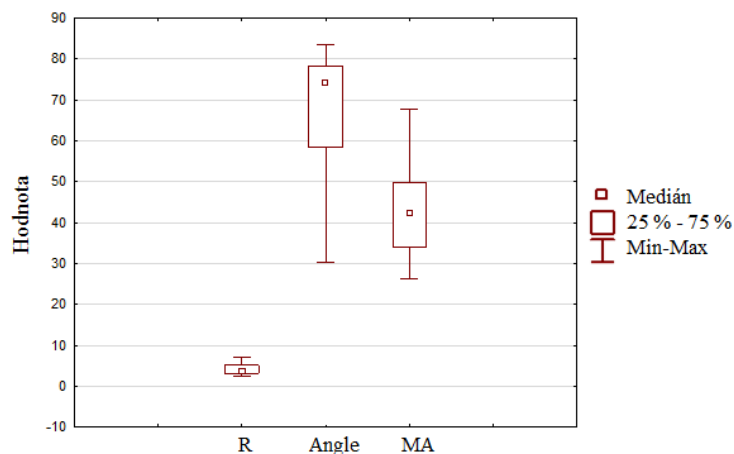
### Grafy

Zhotovili jsme souhrnné grafy naměřených parametrů pro TAD a TADK (Graf 7-8). Také jsme porovnali hodnoty jednotlivých parametrů u TAD a TADK (Graf 9-11).



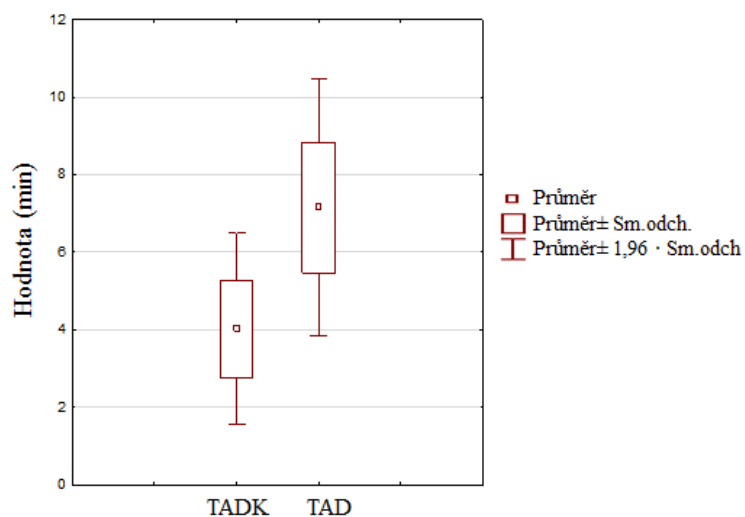
**Graf 7 – Krábicevý graf – souhrnný (TAD)**

*V grafu jsou znázorněny změřené parametry u TAD a jejich medián.*



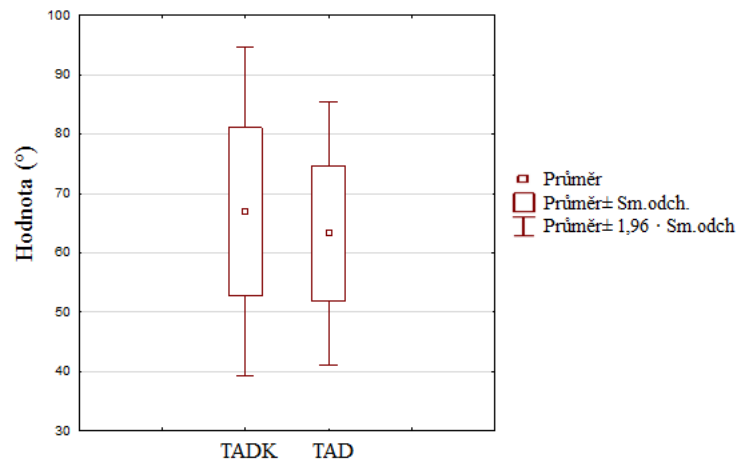
**Graf 8 – Krabicový graf – souhrnný (TADK)**

*V grafu jsou znázorněny změřené parametry u TADK a jejich medián.*



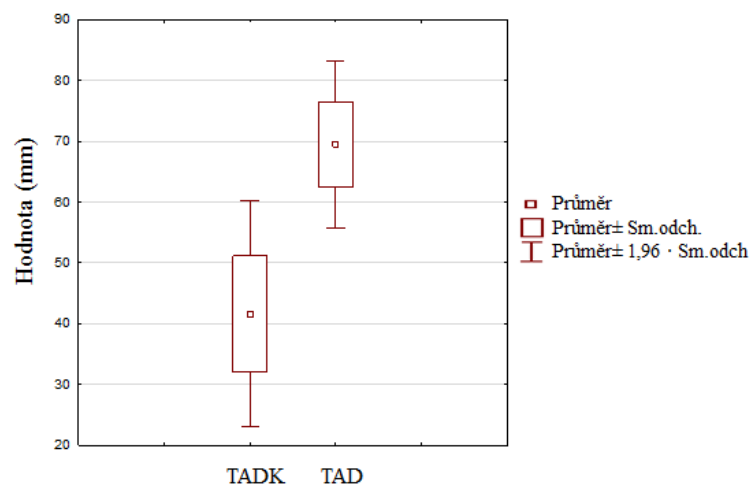
**Graf 9 – Porovnání parametru R**

*Z grafu je patrné, že průměr naměřených hodnot parametru R je rozdílný. Lze tedy odvodit, že zahájení tvorby koagula začíná u TADK dříve.*



**Graf 10 – Porovnání parametru Angle**

*Průměry naměřených hodnot u parametru Angle jsou téměř stejné a není mezi nimi výrazný rozdíl.*



**Graf 11 – Porovnání parametru MA**

*Z grafu je patrné, že průměr naměřených hodnot parametru MA se liší. Lze tedy odvodit, že pevnost vzniklého koagula u TADK je výrazně nižší.*

### **T-test**

Údaje uvedené v tabulkách (Tabulka 8-10) jsme získali statistickým zpracováním naměřených hodnot a vyhodnocením pomocí Studentova t-testu v programu Statistica 11 (Dell, Tulsa, USA). Pro všechny použita hladina významnosti  $p < 0,05$  při dvoustranném intervalu spolehlivosti.

**Tabulka 8 – Porovnání parametru R**

V tabulce je zvýrazněna hodnota p. Pokud je tato hodnota nižší než 0,05, jedná se o významný statistický výsledek. V tomto případě tomu tak je. Znamená to, že rozdíl mezi TADK a TAD je výrazný. Srovnávali jsme parametr R. Z tabulky vyplývá dřívější zahájení tvorby koagula u TADK.

Skup. 1 vs. skup. 2	Průměr (skup. 1)	Průměr (skup. 2)	Hodnota t	sv	p	Poč.plat. (skup. 1)	Poč.plat. (skup. 2)	Sm.odch. (skup. 1)	Sm.odch. (skup. 2)	F-poměr (Rozptyly)	p
R - TADK vs. R - TAD	4,0258	7,1536	-9,7858	180	0,0000	31	151	1,2602	1,6839	1,7856	0,0644

**Tabulka 9 – Porovnání parametru Angle**

V tabulce je zvýrazněna hodnota p. Pokud je tato hodnota nižší než 0,05, jedná se o významný statistický výsledek. V tomto případě tomu tak není. Znamená to, že rozdíl mezi TADK a TAD není výrazný. Srovnávali jsme parametr Angle.

Skup. 1 vs. skup. 2	Průměr (skup. 1)	Průměr (skup. 2)	Hodnota t	sv	p	Poč.plat. (skup. 1)	Poč.plat. (skup. 2)	Sm.odch. (skup. 1)	Sm.odch. (skup. 2)	F-poměr (Rozptyly)	p
Angle - TADK vs. Angle - TAD	66,9613	63,2623	1,5871	180	0,1142	31	151	14,1464	11,2972	1,5680	0,0843

**Tabulka 10 – Porovnání parametru MA**

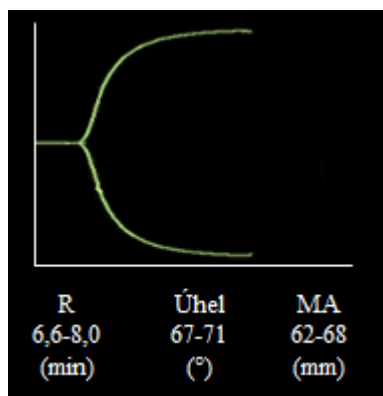
V tabulce je zvýrazněna hodnota p. Pokud je tato hodnota nižší než 0,05, jedná se o významný statistický výsledek. V tomto případě tomu tak je. Znamená to, že rozdíl mezi TADK a TAD je výrazný. Srovnávali jsme parametr MA. Z tabulky vyplývá, že u TADK je redukována pevnost koagula.

Skup. 1 vs. skup. 2	Průměr (skup. 1)	Průměr (skup. 2)	Hodnota t	sv	p	Poč.plat. (skup. 1)	Poč.plat. (skup. 2)	Sm.odch. (skup. 1)	Sm.odch. (skup. 2)	F-poměr (Rozptyly)	p
MA - TADK vs. MA - TAD	41,6065	69,4940	-18,8494	180	0,0000	31	151	9,5095	7,0336	1,8279	0,0199



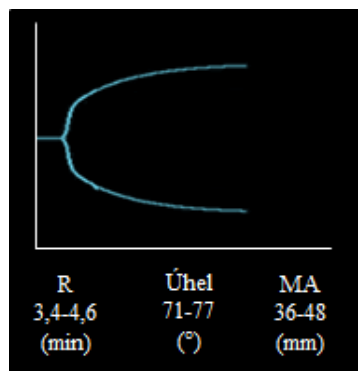
## TEG křivky

Porovnávali jsme tromboelastografické křivky TAD, TADK a plné krve. Každou křivku jsme hodnotili samostatně (Obrázek 10-12) a provedli jsme také souhrnné porovnání (Obrázek 13).



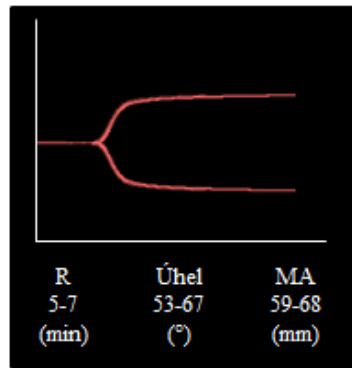
**Obrázek 10 – Tromboelastografická křivka TAD**

*Hodnoceny 3 parametry – R, Úhel, MA. Pod každým parametrem je uvedeno referenční rozmezí (včetně jednotek), které je převzato od Dr. Noorman, 2012.*



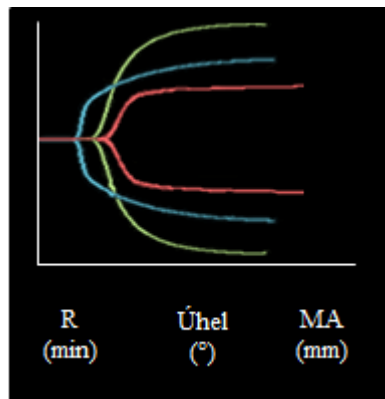
**Obrázek 11 – Tromboelastografická křivka TADK**

*Hodnoceny 3 parametry – R, Úhel, MA. Pod každým parametrem je uvedeno referenční rozmezí (včetně jednotek), které je převzato od Dr. Noorman, 2012.*



**Obrázek 12 – Tromboelastografická křivka plné krve**

*Hodnoceny 3 parametry – R, Úhel, MA. Pod každým parametrem je uvedeno referenční rozmezí (včetně jednotek), které je převzato od Hájek a kol., 2005.*



**Obrázek 13 – Tromboelastografické křivky – porovnání**

*TAD – zelená křivka, TADK – modrá křivka, plná krev – červená křivka*

*Z grafického znázornění je patrné, že vzorek TADK má zkrácenou hodnotu R, zároveň má širší úhel  $\alpha$ , ve srovnání se vzorkem TAD má úzkou maximální amplitudu (MA).*

*Vzorek plné krve má nejdelší hodnotu R a nejužší MA. Nejširší maximální amplitudu má jednoznačně vzorek TAD.*

## 6 Diskuze

Transfuzní přípravky se často používají v situacích, které přímo ohrožují život pacienta. Proto je důležité, aby byla zajištěna vysoká úroveň kvality transfuzních přípravků. K posouzení kvality trombocytárních transfuzních přípravků je důležité znát referenční rozmezí pro metodu, pomocí které kvalitu hodnotíme. V některých případech má význam pouze stanovení horní meze. Konkrétně u tromboelastografie je třeba znát horní i dolní referenční mez. Existuje mnoho způsobů, jak určit referenční rozmezí. Pro náš případ byla použita metoda parametrická, která patří do metod přímých (induktivních). Racek, 2006 uvádí, že tato metoda může být použita pouze v případě, kdy má stanovovaná veličina normální rozložení četnosti. Z toho důvodu jsme sestrojili histogramy a proložili jsme je Gaussovou křivkou. Na základě výsledků a spočítání hodnoty Shapiro-Wilkova testu bylo zjištěno, že rozložení vzorků je normální a lze tak určit referenční rozmezí.

Tromboelastografie je rozšířená metoda, která monitoruje proces hemostázy. Cvachovec představuje tromboelastografii jako metodu, která poskytuje celkový pohled na proces tvorby koagula včetně jeho rozpadu a popisuje její využití především v chirurgických oborech. Durila, 2014 rozšiřuje užití metody k predikci krvácivých komplikací během operace. Díky výsledkům stanovení je možno vybrat cílenou léčbu a výrazně tak snížit podávání transfuzních přípravků. S tím souvisí také minimalizování rizik, která souvisí s podáním transfuzního přípravku.

Vyšetření pomocí tromboelastografie se většinou provádí z plné krve. Lze ale provést také z trombokoncentrátu, který je naředěn plazmou. Tento poznatek Noorman, 2012 z Nizozemska byl využit při kontrole kvality trombocytárních transfuzních přípravků. Pokud trombokoncentrát naředíme plazmou, můžeme monitorovat proces tvorby fibrinového koagula stejně dobře jako v plné krvi. Dle parametrů, které odečteme z tromboelastografické křivky a samotného tvaru této křivky jsme schopni zhodnotit funkci destiček a tvorbu koagula.

Při komparaci výsledků mezi trombocyty z aferézy a kryokonzervovanými trombocyty byly zjištěny signifikantní rozdíly. Prvním sledovaným parametrem byla doba zahájení tvorby koagula (R). Průměr naměřených hodnot byl rozdílný a lze odvodit, že tvorba koagula začíná dříve u TADK. Tyto výsledky byly potvrzeny i použitím Studentova t-testu. Hodnocení tromboelastografických křivek nám rozdíl ve sledované hodnotě též potvrdilo. U kryokonzervovaných trombocytů

lze tak po rozmrazení očekávat vyšší prokoagulační aktivitu. To je pravděpodobně způsobeno částečnou aktivací trombocytů během procesu krykonzervace a následným rozmrazením. Další hodnocený a srovnávaný parametr byl úhel  $\alpha$  (Angle  $\alpha$ ). Ukázalo se, že průměry naměřených hodnot jsou mezi TADK a TAD téměř stejné a není mezi nimi výrazný rozdíl. Stejně výsledky byly získány i po použití studentova t-testu. Po zhodnocení TEG křivek byl u TADK zjištěn širší úhel  $\alpha$ . Ale ukázalo se, že nejedná o statistický signifikantní rozdíl. Poslední sledovaný parametr v rámci hodnocení kvality trombocytů byl MA. Průměry naměřených hodnot se lišily. Po vyhodnocení studentova t-testu je výsledkem signifikantně redukovaná pevnost koagula. Po komparaci tromboelastografických křivek má TADK úzkou maximální amplitudu (MA). Lze tedy říct, že pevnost koagula u TADK je nižší než u TAD. Trombocytární transfuzní přípravky během procesu krykonzervace a rozmrazení ztrácí některé vlastnosti. Ale i přesto jsou stále účinné v procesu hemostázy. Předběžné klinické studie a laboratorní údaje ve skupině pacientů, kteří přijali transfuzi krykonzervovaných trombocytů, nevykazovaly ve srovnání se skupinou pacientů, kteří přijali transfuzi čerstvých trombocytů z aferézy, žádné významné rozdíly.

Pro kompletní srovnání bylo provedeno měření plné krve u zdravého pacienta (Obrázek 12-13). U vzorku plné krve se začíná koagulum tvořit o něco později (hodnota R je vyšší) než u vzorku trombocytů. V plné krvi je oproti trombocytům z aferézy nižší pevnost koagula. Pravděpodobně jsou rozdíly způsobeny tím, že se v plné krvi nachází krevní buňky, které celý proces ovlivňují, a trombocyty jsou přítomny v nižší koncentraci než u transfuzního přípravku. V případě měření trombocytárního transfuzního přípravku se předpokládá vyšší koncentrace trombocytů než v plné krvi a tím pádem i vyšší pevnost koagula a dřívější zahájení jeho tvorby.

Dle Hájka, 2005 se parametr R v plné krvi prodlužuje při deficitech koagulačních faktorů a vlivem antikoagulační léčby (podávání heparinu). Naopak se zkracuje u hyperkoagulačních stavů. Parametr MA, který udává pevnost koagula, se v plné krvi pohybuje mezi 59 až 68 milimetry. Pevnost koagula je snížena při trombocytopenii. Je to tím, že je koagulum tvořeno převážně fibrinem.

Jak uvádí v jednom ze svých článků Pacasová, 2005 transfuze trombocytů se používají rutinně k substituční léčbě pacientů již přes 50 let. Jedná se především o pacienty, kteří mají krvácivé projevy. Masivní krvácení je většinou přítomno u těžce poraněných pacientů, ale také při silném porodním krvácení, u ruptur jícnových varixů, arteriálních výdutí a v mnoha dalších případech. Časné podání krevní transfuze může

takovým pacientů do jisté míry stabilizovat zdravotní stav a částečně zlepšit výsledky. K tomu je třeba, aby transfuzní přípravky byly co nejdříve k dispozici a byly kvalitní. Vzhledem ke krátké době použitelnosti, kterou mají konkrétně krevní destičky je tento stav často složitý pro krevní banky. Alternativním řešením je zásoba mražených trombocytů. Přesněji se jedná o kryokonzervované krevní destičky, které jsou používány především ve vojenském lékařství, ale dnes už se začínají používat také v civilních krevních bankách.

Dle Bohoňka, 2013 metoda kryokonzervace umožňuje řešení řady problémů v transfuzní službě. Hlavní důvod je především ten, že díky skladování mražených trombocytů může být výrazně prodloužená doba skladování a jejich použití. Zatím ale hlavní uplatnění kryokonzervace stále zůstává ve vojenském lékařství, a to především při válečných konfliktech.

Dále Bohoněk, 2015 uvádí, že při válečném konfliktu je výrazná spotřeba krve. Další problém je zhoršená dostupnost nejen zásobování, ale také dárců krve. V ozbrojeném konfliktu je důležitá zpracovaná a fungující krevní politika státu, která zabezpečuje spolupráci civilní a vojenské zdravotnické služby. Vysoce specializovanou složku vojenského zdravotnictví tvoří vojenská transfuzní služba, která zásobuje krví zahraniční mise Armády České republiky a v době míru také vybraná vojenská nebo civilní zdravotnická zařízení.

Kryokonzervované trombocyty po zhodnocení výsledků tromboelastografie je možné používat, protože nebyly zjištěny významné rozdíly mezi nimi a trombocyty čerstvými (z aferézy). Tyto transfuzní přípravky tak mohou dále zachraňovat lidské životy v místech, kde nejsou k dispozici vybavená zdravotnická zařízení a také v zemích, ve kterých probíhá válečný konflikt. Zásobování krví polních zdravotnických zařízení a zahraničních misí je odkázáno na polní transfuzní sklad kryokonzervovaných transfuzních přípravků. V některých případech může být zásobování zajišťováno i transportem v termoboxech nebo jsou prováděny odběry krve přímo v polních transfuzních pracovištích.

Tromboelastografie se používá od roku 1948. Popsal ji německý hematolog prof. Hartert. Metoda má řadu výhod i nevýhod. Velkou výhodou tromboelastografie oproti jiným testům je měření celého koagulačního procesu (zahájení srážení krve až ukončení fibrinolýzy) a zároveň je citlivá na detekci poruch srážení krve. Většina laboratorních testů končí měření při zahájení tvorby koagula. Další výhodou – velmi často pomáhá při léčbě koagulopatií během transplantace jater. Zuckerman

a kol. porovnávali tromboelastografii se standartními koagulačními testy (hladina fibrinogenu, protrombinový čas, tromboplastinový čas, počet krevních destiček) a zjistili určité podobnosti – výsledky TEG parametru MA jsou srovnatelné s hladinou fibrinogenu a množstvím trombocytů. Také byla objevena souvislost mezi aktivovaným parciálním tromboplastinovým časem (aPTT) a tromboelastografickým parametrem R. Dle Durily, 2014 hlavním nedostatkem je, že pomocí TEG nelze diagnostikovat poruchy primární hemostázy (př. von Willenbrandova nemoc). To lze považovat za důvod, proč tromboelastograf není běžnou součástí laboratoří a laboratorních vyšetření. Pro diagnostiku poruch primární hemostázy je možnost využít analyzátor od firmy Siemens Healthineers: The Platelet Function Analyzer (PFA-100). V průběhu času se metoda tromboelastografie zdokonalovala. Dnes jsou známy i modifikace této metody – př. rotační tromboelastometrie (ROTEM). Jedná se o pokročilejší technologii. ROTEM má 4 kanály a umožňuje tak zpracovávání více vzorku najednou.

Díky moderním technologickým postupům, mezi které patří metoda kryokonzervace i kontrola kvality transfuzních přípravků, je v posledních letech usnadněna manipulace s těmito prostředky a zvyšuje se tak jejich dostupnost v případě potřeby.

## 7 Závěr

Téma bakalářské práce se týkalo hodnocení kvality trombocytárních transfuzních přípravků pomocí speciální metody tromboelastografie.

Cílem bakalářské práce bylo stanovit referenční rozmezí pro účely kontroly kvality trombocytárních transfuzních přípravků pomocí tromboelastografie. Dílčím cílem bylo porovnání jednotlivých tromboelastografických parametrů mezi trombocyty zmraženými a čerstvými (z buffy-coatu nebo z trombocytferézy). Cíle byly splněny. Na základě statistického zpracování naměřených vzorků jsme stanovili referenční rozmezí pro TEG parametry, které odráží kvalitu trombocytárních transfuzních přípravků. Referenční rozmezí daných parametrů bylo stanoveno pro TAD i pro TADK – Tabulka 5 a Tabulka 6.

Z hodnocení křivek (Obrázek 15), t-testu (Tabulka 8-10) a grafů (Graf 9-11) vyplývá, že vzorky TADK mají zkrácenou dobu iniciace koagulace – srážení začíná dříve. Rychlost výstavby fibrinové sítě je téměř shodná. Hodnocení křivek poukazuje na lehce vyšší kinetiku srážení u TADK. U kryokonzervovaných trombocytů lze tak po rozmrazení očekávat vyšší prokoagulační aktivitu. To je pravděpodobně způsobeno částečnou aktivací trombocytů během procesu kryokonzervace a následným rozmrazením. Dalším rozdílem, který vyplývá z výsledků, je snížení pevnosti vzniklého koagula. I když je maximální pevnost koagula snížena, přesto jsou tyto trombocytární transfuzní přípravky i po rozmrazení účinné a lze je použít jako léčebné přípravky.

# Seznam informačních zdrojů

## Literární zdroje

- BOHONĚK, Miloš. Krevní náhrady ve válečném konfliktu a specifika transfuzní terapie. In: HÁJEK, Marcel. *Chirurgie v extrémních podmínkách: odborný přehled pro lékaře a zdravotníky na zahraničních praxích*. Praha: Grada, 2015, s. 174-184. ISBN 978-80-247-4587-9.
- ČIHÁK, Radomír. *Anatomie* 3. 2. vydání. Praha: Grada, 2002. ISBN 80-247-1132-X.
- DAVID, I., CVACHOVEC, K., HORÁČEK M., Tromboelastografie - proč právě ta?. *Anesteziologie a neodkladná péče*. 1999, 99, 5. ISSN 0862-4968.
- DURAJ, L., KUBISZ, STAŠKO, HAŠKO. Monitorovanie zmien hemostázy u zdravých tehotných žien pomocou tromboelastometrie - ROTEM a jeho prínos k lepšej predikci porúch hemostázy. *Vaskulárna medicína*. 2012, 4 (1). ISSN 1338-0214.
- DURILA, Miroslav, PAVEL, Lukáš, PELICHOVSKÁ, Martina, VYMAZAL, Tomáš. Význam tromboelastografie (TEG) a tromboelastometrie (ROTEM) na jednotkej intenzívnej starostlivosti. *Anesteziologie a intenzivní medicína*. 2014, 25 (3), 216-221. ISSN 1214-2158.
- DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. 1. vydání. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
- HÁJEK, Marcel. *Chirurgie v extrémních podmínkách: odborný přehled pro lékaře a zdravotníky na zahraničních praxích*. 1. vydání. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4587-9.
- JÍLKOVÁ, Helena. *Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2009. ISBN 978-80-7395-151-1.



- KLENER, Pavel. *Vnitřní lékařství*. 1. vydání. Praha: Galén, 2003. ISBN 80-246-0672-0.
- KONRÁDOVÁ, Václava. *Funkční histologie*. 2. vydání. Jinočany: H & H, 2000. ISBN 80-86022-80-3.
- KUBISZ, Peter a kolektiv. *Trombocyty a trombocytopenie*. 1. vydání. Martin: Osveta, 1987.
- KUBISZ, Peter, STAŠKO, Ján. *Hematológia a transfuziológia: učebnica*. 1. vydání. Bratislava: Grada Slovakia, 2006. ISBN 80-247-1779-4.
- LEDVINA, Miroslav, STOKLASOVÁ Alena, CERMAN Jaroslav. *Biochemie pro studující medicíny I. díl*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2009a. ISBN 978-80-246-1416-8.
- LEDVINA, Miroslav, STOKLASOVÁ Alena, CERMAN Jaroslav. *Biochemie pro studující medicíny II. díl*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2009b. ISBN 978-80-246-1415-1.
- LEXOVÁ, Stanislava. *Hematologie pro zdravotní laboranty I. díl*. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2000. ISBN 80-7013-304-X.
- MATÝŠKOVÁ, Miloslava a kol. *Systém managementu jakosti: využití v laboratoři*. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2002. ISBN 80-7013-367-8.
- MATÝŠKOVÁ, Miloslava, ZAVŘELOVÁ, Jiřina, HRACHOVINOVÁ, Ingrid. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999. ISBN 80-7013-278-7.

- MERKUNOVÁ, Alena, OREL, Miroslav. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. 1. vydání. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1521-6.
- NAVRÁTIL, Leoš. *Vnitřní lékařství: pro nelékařské zdravotnické obory*. 1. vydání. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2319-8.
- NOORMAN, Femke. *-80°C Frozen platelets, plasma and red blood cells*. Efficient logistics, Available, Compatible, Safe and Effective. AABB annual meeting, 2012.
- NOSÁL, Radomír, JANČINOVÁ, Viera. *Krvné destičky v biológii a medicíne*. 1. vydání. Bratislava: Vydavateľstvo Slovenskej akadémie ved, 1990. ISBN 80-224-0124-2.
- PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba*. 1. vydání. Český Těšín: FINIDR, 2002. ISBN 80-86682-01-3.
- PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. 1. vydání. Český Těšín: FINIDR, 2006. ISBN 80-86682-02-1.
- PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie hemostázy*. 1. vydání. Český Těšín: FINIDR, 2004. ISBN 80-86682-03-X.
- PENKA, Miroslav, Igor, GUMULEC, Jaromír. *Krvácení*. 1. vydání. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-0689-4.
- PENKA, Miroslav, TESAŘOVÁ, E. *Hematologie a transfuzní lékařství II*. 1. vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6.
- PENKA, Miroslav, TESAŘOVÁ, E. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. vydání. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.

- RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
- ROKYTA, Richard. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2.
- ŘEHÁČEK, Vít, MASOPUST, Jiří. *Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4534-3.
- SILBERNAGL, Stefan, DESPOPOULOS, Agamemnon. *Atlas fyziologie člověka*. 6. vydání. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0630-X.
- TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. 4. vydání. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- VOKURKA, Martin. *Patofyziologie pro nelékařské směry*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1561-5.

## Internetové zdroje

- BOHONĚK, Miloš. Kryokonzervace krve - historie, metody, současnost. *Transfuze a hematologie dnes* [online]. 2013, 13/1, 44-50 [cit. 2016-02-01]. ISSN1805-4587.  
Dostupné z: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=4&sid=871ebf21-a6e5-43a5-96fe-0115942aebf4%40sessionmgr4001&hid=4114>
- GALVEZ, K. a kol. Tromboelastografía: nuevos conceptos en la fisiología de la hemostasia y su correlación con la coagulopatía asociada al trauma. *Rev Colomb Anestesia* [online]. 2012, 40 (224-30) [cit. 2016-04-12].  
Dostupné z: <http://www.revcolanest.com.co/en/thromboelastography-new-concepts-in-haemostasis/articulo/S225620871200003X/>

- GAWAZ, Meinrad. *Blood platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet drugs, coronary heart disease, stroke, peripheral arterial disease*. Stuttgart; New York: Thieme 2001. ISBN 1-58890-072-X.
- HÁJEK, Roman, ZEZULA, Radek, FLUGER, Ivo, RŮŽIČKOVÁ, Jana. Význam tromboelastografie pro monitorování hemostázy v kardiochirurgii. *Intervenční a akutní kardiologie* [online]. 2005, 15 (4), 224-228 [cit.2016-02-28]. ISSN 1803-5302.  
Dostupné z:<http://www.iakardiologie.cz/artkey/kar-200504-0009.php>
- Ågren, Anna, et al. Thromboelastography (TEG ®) compared to conventional coagulation tests in surgical patients – a laboratory evaluation. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* [online]. 2013, 73(3), 214-220 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.3109/00365513.2013.765960. ISSN 0036-5513.  
Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00365513.2013.76596>
- KOFRÁNEK, Jiří. *Atlas fyziologie a patofyziologie*. Laboratoř biokybernetiky a počítačové podpory výuky [online]. Praha. [cit. 2016-01-17]. Dostupné z: <http://www.physiome.cz/atlas/hemostaza/01/>
- KOŘÁNOVÁ, Michaela, BOHONĚK Miloš. *Kryokonzervované trombocyty jako dostupná alternativa nativních trombocytárních přípravků* [online]. Brno, 2014 [cit. 2016-02-02]. Dostupné z: [http://www.symma.cz/trombocyty2014/down/trombocyty\\_2014\\_program.pdf](http://www.symma.cz/trombocyty2014/down/trombocyty_2014_program.pdf)
- PACASOVÁ, Rita, TESAŘOVÁ Eva, KUBEŠOVÁ, B. Refrakternita k trombocytovým transfuzním přípravkům. *Vnitřní lékařství* [online]. 2005, 05 (7/8) [cit. 2016-01-24]. ISSN 1801–7592.  
Dostupné z: [http://www.prolekare.cz/pdf?ida=v1\\_05\\_08\\_22.pdf](http://www.prolekare.cz/pdf?ida=v1_05_08_22.pdf)
- TUREK, Petr. Účelná hemoterapie. *E15: Zdravotnictví medicína* [online]. 2010, 10(4) [cit. 2016-01-19]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/ucelna-hemoterapie-449920>

- Funkce buněk a lidského těla. *Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta* [online]. Praha [cit. 2016-01-17]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/v-krev-a-organy-imunitniho-systemu/4-hemostaza/>
- CEVA Education: Vital Application. *CEVA-Edu: Creative Education* [online]. Plzeň, 2016 [cit. 2016-01-17]. Dostupné z: <http://www.ceva-edu.cz/mod/book/view.php?id=1876&chapterid=728>
- Legislativní normy. *Společnost pro transfuzní lékařství ČLS JEP* [online]. [cit. 2016-01]. Dostupné z: [http://www.transfuznispolocnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator\\_kategorie=LELEGISLATIV\\_NORMY](http://www.transfuznispolocnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator_kategorie=LELEGISLATIV_NORMY)
- Blood. *Boundless Anatomy and Physiology* [online]. 2015 [cit. 2016-02-03]. Dostupné z: <https://www.boundless.com/physiology/textbooks/boundless-anatomy-and-physiology-textbook/blood-17/>
- *Clinical Chemistry* [online]. [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/46/8/1260.full>
- Hemologix. *Hemologix* [online]. [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <http://www.gototema.com/?rif=pag3>

## Seznam obrázku

Obrázek 1 – Vývojová řada trombocytu .....	17
Obrázek 2 – Ultrastruktura krevní destičky na příčném řezu .....	19
Obrázek 3 – Dráha volné kyseliny arachidonové .....	20
Obrázek 4 – Změny krevních destiček .....	23
Obrázek 5 – Schéma fibrinolýzy .....	30
Obrázek 6 – Tromboelastograf .....	40
Obrázek 7 – Princip metody .....	41
Obrázek 8 – Křivka tromboelastografie.....	41
Obrázek 9 – Parametry tromboelastografické křivky pro účely kontroly kvality .....	42
Obrázek 10 – Tromboelastografická křivka TAD .....	57
Obrázek 11 – Tromboelastografická křivka TADK .....	57
Obrázek 12 – Tromboelastografická křivka plné krve .....	58
Obrázek 13 – Tromboelastografické křivky – porovnání .....	58
Obrázek 14 – Tromboelastografická křivka TAD (vzorek 16610013).....	74
Obrázek 15 – Tromboelastografická křivka TAD (vzorek 16630007).....	74
Obrázek 16 – Tromboelastografická křivka TADK (vzorek 15620031R).....	74
Obrázek 17 – Tromboelastografická křivka TADK (vzorek 15610127R).....	75

## Seznam tabulek

Tabulka 1 – Indikace k podání trombocytární transfuze .....	34
Tabulka 2 – Specifikace trombocytů z aferézy de leukotizovaných pro kryokonzervaci ....	37
Tabulka 3 – Specifikace trombocytů z aferézy kryokonzervovaných .....	37
Tabulka 4 – Deskriptivní statistika pro TAD.....	52
Tabulka 5 – Deskriptivní statistika pro TADK.....	52
Tabulka 6 – Referenční rozmezí jednotlivých parametrů pro TAD .....	53
Tabulka 7 – Referenční rozmezí jednotlivých parametrů pro TADK .....	53
Tabulka 8 – Porovnání parametru R .....	56
Tabulka 9 – Porovnání parametru Angle .....	56
Tabulka 10 – Porovnání parametru MA .....	56
Tabulka 11 – Hodnoty pro TADK.....	76
Tabulka 12 – Hodnoty pro TAD.....	77

## Seznam grafů

Graf 1 – Histogram parametru R (TAD) .....	49
Graf 2 – Histogram parametru Angle (TAD) .....	49
Graf 3 – Histogram parametru MA (TAD).....	50
Graf 4 – Histogram parametru R (TADK).....	50
Graf 5 – Histogram parametru Angle (TADK) .....	51
Graf 6 – Histogram parametru MA (TADK).....	51
Graf 7 – Krabicový graf – souhrnný (TAD) .....	53
Graf 8 – Krabicový graf – souhrnný (TADK) .....	54
Graf 9 – Porovnání parametru R.....	54
Graf 10 – Porovnání parametru Angle.....	55
Graf 11 – Porovnání parametru MA .....	55

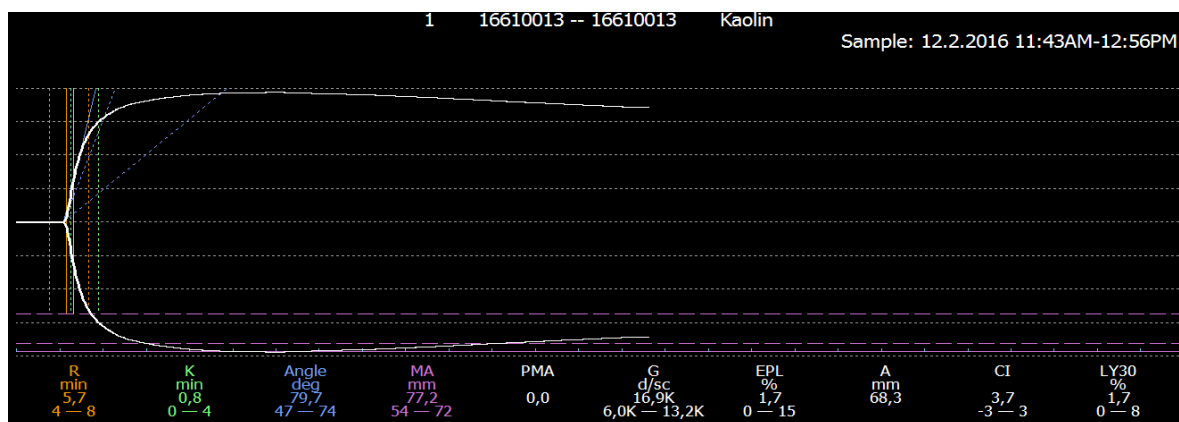


## **Seznam příloh**

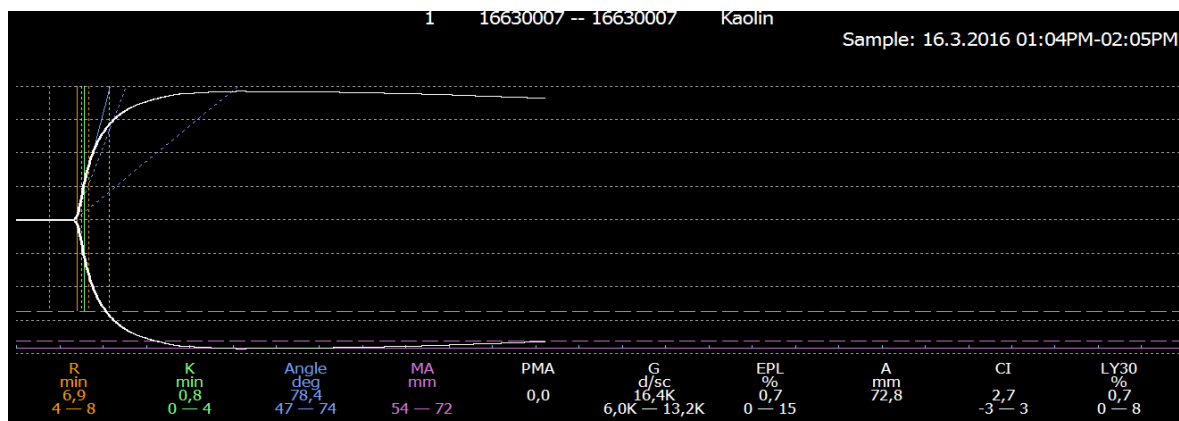
Příloha 1 – Výstupní data z přístroje .....	74
Příloha 2 – Naměřené hodnoty .....	76

## 8 Přílohy

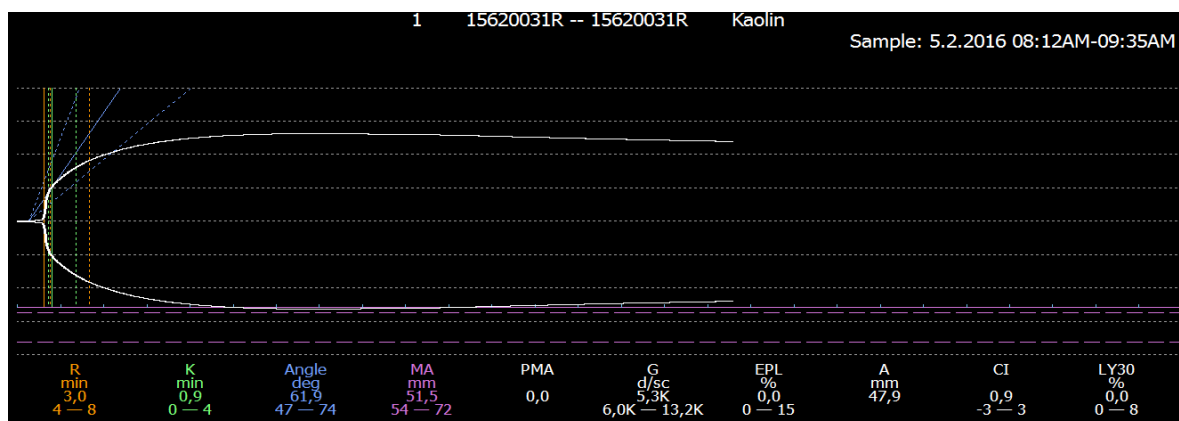
### Příloha 1 – Výstupní data z přístroje



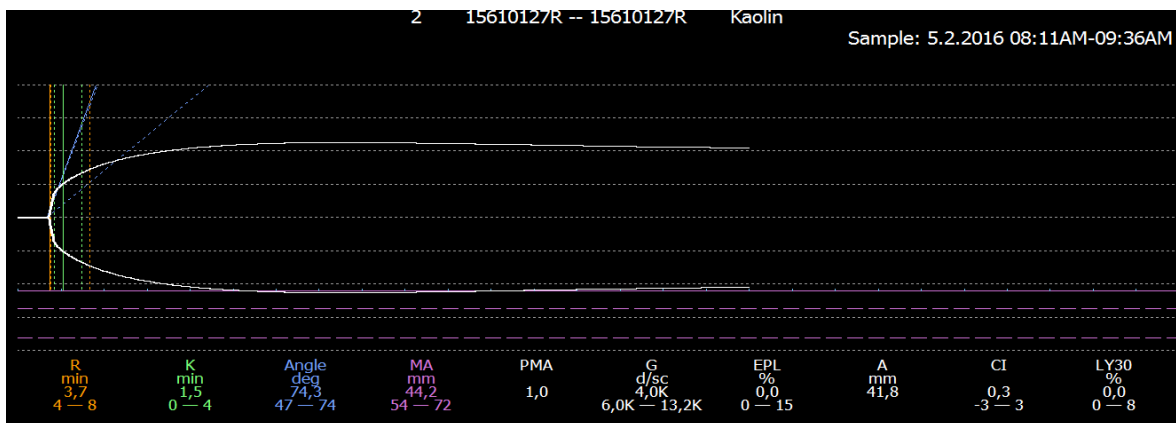
Obrázek 14 – Tromboelastografická křivka TAD (vzorek 16610013)



Obrázek 15 – Tromboelastografická křivka TAD (vzorek 16630007)



Obrázek 16 – Tromboelastografická křivka TADK (vzorek 15620031R)



Obrázek 17 – Tromboelastografická křivka TADK (vzorek 15610127R)

## Příloha 2 – Naměřené hodnoty

Tabulka 11 – Hodnoty pro TADK

<b>Číslo vzorku</b>	<b>R</b>	<b>Angle</b>	<b>MA</b>
1	7,2	30,2	26,3
2	5,7	64,4	32,9
3	2,7	76,8	29,0
4	2,4	78,1	30,6
5	3,3	75,2	42,5
6	3,2	76,3	36,7
7	3,7	75,4	30,6
8	3,2	62,8	42,7
9	3,1	58,5	33,9
10	6,1	66,9	34
11	2,6	78,7	48,7
12	2,4	77,2	40,9
13	3,7	79,5	43,6
14	3,8	61,3	38,5
15	5,9	43,8	46,1
16	5,1	79,2	35,5
17	3,9	47,7	36,5
18	4,6	45,2	29,9
19	4,6	51,8	27,5
20	5,7	78,1	50,3
21	3,8	53,6	51,1
22	5,5	43,3	49,7
23	4,7	78,7	52
24	4,2	78,4	49,9
25	5,1	74,1	39,9
26	3,3	79,4	47,7
27	3,5	83,6	67,8
28	2,7	80,6	51,4
29	2,4	60,8	47,9
30	3	61,9	51,5
31	3,7	74,3	44,2

**Tabulka 12 – Hodnoty pro TAD**

<u>Číslo vzorku</u>	<u>R</u>	<u>Angle</u>	<u>MA</u>	<u>Číslo vzorku</u>	<u>R</u>	<u>Angle</u>	<u>MA</u>
1	6,8	74,0	70,1	41	4,8	58,1	66,7
2	6,8	77,0	68,3	42	7,3	71,3	70,2
3	6,4	73,7	68,4	43	7,7	43,9	64,4
4	7,7	50,8	55,2	44	7,7	43,9	64,4
5	5,6	73,6	59,6	45	7,5	71,2	69
6	6,8	74,9	67,8	46	7,7	71,7	70,2
7	7,8	47,8	71,9	47	7,7	71,4	73,0
8	7,2	52,7	80,8	48	6,8	51,3	70,4
9	8,2	70,6	81,9	49	7,2	69,9	69,5
10	7,6	48,2	72,9	50	7,7	72,4	68,7
11	7,9	59,3	75,4	51	7,3	70,1	66,1
12	8,1	58,3	66,3	52	7,4	51,1	63,1
13	8,1	56,6	66,4	53	6,8	69,2	62,2
14	6,2	59,0	55,8	54	6,6	71,7	63,4
15	7,0	52,3	63,4	55	7,1	67,1	63,7
16	7,4	58,5	65,5	56	6,8	69,6	62,9
17	8,9	46,5	57,0	57	7,0	67,8	64,5
18	8,7	46,3	59,9	58	7,2	52,4	72,5
19	5,3	75,0	66,7	59	7,2	51,8	72,7
20	5,5	76,4	69,5	60	7,2	72,6	67,4
21	6,9	58,5	67,3	61	6,9	76,3	66,8
22	5,1	56,8	70,4	62	7,1	50,3	71,8
23	6,1	57,5	71,3	63	5,8	71,1	68,1
24	5,7	71,4	67,6	64	7,6	71,8	70,2
25	5,4	76,9	69,5	65	6,4	56,6	63,7
26	5,8	77,3	71,3	66	6,8	50,8	54,9
27	5,6	71,5	65,7	67	4,8	78,7	57,6
28	5,0	75,4	67,6	68	6,8	72,0	66,9
29	4,9	77,3	73,5	69	5,9	69,3	67,4
30	6,3	52,6	67,2	70	6,5	60,7	59,3
31	5,9	69,6	70,9	71	9,4	60,8	73,4
32	5,4	54,6	67,9	72	8,1	45,9	73,8
33	6,0	53,0	73,8	73	8,8	47,2	57,3
34	5,7	77,4	70,9	74	7,2	46,5	69,5
35	5,4	77,3	66,2	75	10,2	70,2	69,9
36	5,6	73,8	66,6	76	8,2	57,5	63,2
37	5,8	54,4	72,0	77	8,8	53,0	63,3
38	5,4	77,7	67,8	78	9,4	53,5	66,0
39	7,1	72,9	70,8	79	8,9	56,6	63,6
40	4,3	62,2	69,4	80	7,7	58,5	65,7
				81	8,2	48,1	61,5
				82	7,4	45,2	72,7
				83	8,0	55,4	64,7

<u>Číslo vzorku</u>	<u>R</u>	<u>Angle</u>	<u>MA</u>
84	8,9	57,3	72,7
85	9,3	55,3	68,9
86	7,6	62,2	61,4
87	7,9	61,2	62
88	9,1	33,2	64,6
89	8,3	49	61,6
90	8,8	68,8	65,3
91	9	57,4	66,5
92	12,8	32,8	66,2
93	8	53,9	75,9
94	8,7	54,6	65,2
95	5,2	45,5	73
96	11,2	64,3	68,8
97	9,7	44,7	71,5
98	8,9	71,8	68,3
99	7,3	49,6	72,8
100	10	65,3	72,3
101	8,8	50,8	59,9
102	8,1	53,1	66,2
103	8,8	69,8	61,4
104	8,8	67,7	72,9
105	8,6	72,4	68,3
106	8,8	50,8	56
107	10,4	56,4	66,4
108	10,6	52,2	49,8
109	7,9	71,3	64,6
110	9,2	69,5	65,9
111	8,4	71,8	71
112	9,8	58,8	72,5
113	9,2	75	66,3
114	8,1	75,1	68,1
115	10	65,6	61
116	9,8	67,1	69,3
117	10	55,1	68,3

<u>Číslo vzorku</u>	<u>R</u>	<u>Angle</u>	<u>MA</u>
118	6,6	73,1	68,6
119	5,7	71,7	69,7
120	5,6	73,8	71,5
121	6,2	79,9	75,3
122	7,4	68,9	71,4
123	4,9	53,9	71,7
124	6,2	71,9	65
125	4,4	82,8	82,3
126	5,3	60,7	80
127	5,1	82,6	81,3
128	4,4	61,5	72,5
129	4,2	62	78,4
130	4,8	80,4	83,5
131	4,7	78,7	77,5
132	4,3	82,8	84,9
133	4,6	64,3	87,5
134	4,9	59,8	76,7
135	3,7	82,6	89
136	5,2	64,3	88,2
137	4,3	64	82,2
138	5	62,3	79,6
139	7,1	50,6	68,6
140	6,5	55,5	74,2
141	7	53,7	77,4
142	6,8	55,2	84,2
143	8,3	46,4	66,8
144	5,7	79,7	77,2
145	11,7	69	73,3
146	7	79,5	82,7
147	5,8	78,2	81,3
148	6	74,4	74,6
149	6,1	56,8	82,2
150	7	77	77,8
151	6,7	81,1	84,8