



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Porovnání výsledků měření koncentrace D-dimerů v plazmě kalibrované v jednotkách mg/l DDim ve vztahu ke kalibraci v mg/l FEU - měřené LIA vysoce citlivou metodou na ACL TOP 550 CTS (Werfen).

The comparison of measuring of D-Dimer concentration reported in mg/l DDim units in relation to other calibration in mg/l FEU - with the use of LIA high sensitive test on ACL TOP 550 CTS (Werfen).

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce RNDr. Václava Mašková

Pavína Popovičová

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Akademický rok: 2017/2018

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

Student: **Pavína Popovičová**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Porovnání výsledků měření koncentrace D-dimerů v plazmě kalibrované v jednotkách mg/l DDim ve vztahu ke kalibraci v mgFEU - měřené LIA vysoce citlivou metodou na ACL TOP 550 CTS (Werfen)**
Téma anglicky: The Comparison of Measuring of D-Dimer Concentration Reported in mg/l DDim Units in Relation to Other Calibration in mgFEU - with the Use of LIA High Sensitive Test on ACL TOP 550 CTS (Werfen)

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Předmětem bakalářské práce bude porovnání výsledků měření D-Dimerů vysoce senzitivní LIA metodou nejen s kalibrací v mg/l DDim, ale i s kalibrací v mg/l FEU (fibrinogen ekvivalentní jednotky) pomocí automatického koagulometru s optickou detekcí ACL TOP 550 CTS (Werfen). Práce seznámí s diagnostickým přínosem měření D-Dimerů v plazmě - vyloučení diagnózy plicní embólie (PE), hluboké žilní trombózy (DVT) a diseminované intravaskulární koagulopatie (DIC). U rutinně změřených vzorků pomocí kitu IL (Instrumentation Laboratory) Hemosil D-Dimer HS v mg/l DDim doměřit výsledky pomocí další soupravy IL Hemosil D-Dimer HS 500 ve FEU jednotkách a porovnat výsledky získané oběma testy. Najít a ověřit obecný vztah mezi oběma vyjádřeními výsledku měření plazmatické koncentrace D-Dimerů LIA metodou (latexová imunoturbidimetrie).

Seznam odborné literatury:

- [1] MAVROMATIS, B. H. a C.M. KESSLER, D-Dimer testing: the role of the clinical laboratory in the diagnosis of pulmonary embolism, J Clin Pathol, 2001, ISSN 54:664-668.
- [2] PROCHASKA, Jürgen H., Bernd FRANK a Markus NAGLER, Age-related diagnostic value of D-dimer testing and the role of inflammation in patients with suspected deep vein thrombosis, Scientific Reports, číslo (7), 2017, DOI: 10.1038/s41598-017-04843-x
- [3] PENKA, Miroslav, Hematologie a transfuzní lékařství I. , Praha: Grada, 2011, ISBN 978-80-247-3459-0
- [4] PECKA, Miroslav, Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krevetvorba, Český Těšín: FINIDR, 2002, ISBN 80-86682-01-3

Zadání platné do: 13.09.2019

Vedoucí: RNDr. Václava Mašková



.....
vedoucí katedry / pracoviště


.....
děkan

V Kladně dne 25.10.2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Porovnání výsledků měření koncentrace D-dimerů v plazmě kalibrované v jednotkách mg/l DDim ve vztahu ke kalibraci v mg/l FEU - měřené LIA vysoce citlivou metodou na ACL TOP 550 CTS (Werfen) vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

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

V Kladně dne 15.05.2018

.....
Pavína Popovičová

Poděkování

Ráda bych velmi poděkovala RNDr. Václavě Maškové za odborné vedení při psaní mé bakalářské práce, poskytnuté cenné rady a za trpělivost a čas, který mi věnovala. Také velice děkuji za dodání dalších užitečných materiálů, které mi byly poskytnuty. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Ludmile Landové, Ph.D. za pomoc při statistickém vyhodnocení naměřených dat. Také bych chtěla poděkovat panu primáři plk. MUDr. Miloši Bohoňkovi, Ph.D. za umožnění realizace mé bakalářské práce na oddělení Hematologie a krevní transfuze v Ústřední vojenské nemocnici-Vojenské fakultní nemocnici Praha.

Abstrakt

Předmětem této bakalářské práce je porovnání měření plazmatické koncentrace D-dimerů ve dvou běžně používaných jednotkách: mg/l FEU a mg/l DDim, následně tyto hodnoty mezi sebou porovnat a najít vztah mezi nimi. V odborné literatuře se udává, že výsledek koncentrace D-Dimerů v plazmě vyjádřený v častěji používaných jednotkách mg/l FEU je přibližným dvojnásobek hodnoty v mg/l DDim. V praktické části jsem provedla porovnání výsledků měření koncentrace D-dimerů v plazmě metodou kalibrovanou v jednotkách mg/l DDim s metodou kalibrovanou v mg/l FEU. Obě metody byly měřené soupravami pro D-Dimery LIA vysoce citlivou metodou výrobce Instrumentation Laboratory (Werfen) na optickém koagulometru ACL TOP 550 CTS (Werfen).

Do statistického souboru bylo zahrnuto 65 výsledků měření náhodně vybraných čerstvých vzorků D-Dimerů oběma diagnostickými soupravami. Průměrná koncentrace ze všech měření vyšla 0,524 mg/l DDim. Ve fibrinových ekvivalentních jednotkách vychází průměrná koncentrace všech měření 1,598 mg/l FEU. Ze statistického zpracování pomocí lineární regrese a za použití Studentova T-párového testu jasně vyplývá, že vztah mezi oběma jednotkami je trojnásobný.

V zásadě platí, že by neměly být porovnávány výsledky D-Dimerů získané různými metodikami (výrobci), ale vždy jen jedním systémem – dobře nastavenou validovanou metodou a výrobcem doporučeným rozhodovacím cut-off.

Klíčová slova

D-dimery, diseminovaná intravaskulární koagulopatie (DIC), fibrinolýza a fibrin degradační produkty, hluboká žilní trombóza (DVT), krvetvorba

Abstract

The aim of this bachelor thesis is to compare the measurements of the plasma concentration of D - Dimers in two commonly used units: mg/l FEU and mg/l DDim. The goal is to compare these measurements with one another and find the relation between them. It is reported in the literature that the result of plasma concentration of D-Dimers expressed in more commonly used units of mg/l FEU is approximately twice the value in mg/l DDim. In the practical part, I compared the results of measurement of plasma concentration of D-Dimers by the method calibrated in mg/l DDim with the method calibrated in mg/l FEU. Both methods were measured by the LIA D-Dimer kits with the highly sensitive method by the Instrumentation Laboratory (Werfen) on the ACL TOP 550 CTS optical coagulometer.

The statistical set included 65 results of the D-Dimers measurement done by both diagnostic kits. The average concentration of all measurements was 0.524 mg/l DDim. In fibrin equivalent units, the average concentration is 1.598 FEU. From statistical processing, using linear regression and using the paired Student's T-test, it is clear that the relation between the two units is threefold.

Basically, the results of the D-Dimers obtained by different methodologies (manufacturers) should not be compared. Only results measured by one system with a well-established validated method and the manufacturer's recommended cut-off can be compared.

Keywords

D-dimers, deep venous thrombosis (DVT), disseminated intravascular coagulopathy (DIC), fibrinolysis and fibrin degradation products, hematopoiesis

Obsah

1	Úvod.....	12
2	Současný stav.....	13
2.1	Krev.....	13
2.2	Složení krve.....	13
2.2.1	Krevní plazma.....	14
2.3	Krevní elementy.....	15
2.4	Dusíkaté látky v krvi.....	17
2.4.1	Funkce krve.....	19
2.5	Krvetvorba (Hematopoéza).....	19
2.5.1	Řízení krvetvorby.....	21
2.6	Trombocyt.....	22
2.6.1	Morfologie trombocytu.....	22
2.6.2	Megakaryopoéza.....	24
2.6.3	Trombopoéza.....	24
2.6.4	Regulace trombopoézy.....	24
2.6.5	Aktivace trombocytu.....	25
2.6.6	Adheze.....	25
2.6.7	Agregace.....	26
2.6.8	Retrakce.....	26
2.6.9	Funkce trombocytu.....	26
2.7	Kvalitativní a kvantitativní poruchy trombocytů.....	27
2.7.1	Trombocytopatie.....	27
2.7.2	Trombocytopenie.....	27
2.7.3	Trombocytóza.....	28

2.8	Trombofilie a hyperkoagulace versus krvácení	28
2.8.1	Hyperkoagulační stavy	29
2.8.2	Tromboembolická nemoc	31
2.8.3	Krvácivé stavy.....	32
2.9	Cévní systém	33
2.9.1	Endotel	34
2.10	Hemostáza.....	35
2.10.1	Primární hemostáza	35
2.11	Plazmatický koagulační systém.....	36
2.11.1	Inhibitory plazmatického koagulačního systému	37
2.12	Fibrinolytický systém	38
2.12.1	Aktivátory fibrinolýzy	39
2.12.2	Inhibitory fibrinolýzy.....	40
2.12.3	Fibrin.....	42
2.12.4	Fibrin degradační produkty.....	42
2.12.5	D–dimery	44
2.13	Diseminovaná intravaskulární koagulopatie	46
2.13.1	Stadia DIC syndromu	47
2.14	Plicní embolie	49
2.15	Hluboká žilní trombóza	49
3	Cíl práce.....	51
4	Metodika.....	52
4.1	Definice souboru.....	52
4.2	Preanalytická fáze.....	52

4.2.1	Odběr krve.....	52
4.2.2	Příjem vzorků do laboratoře.....	54
4.2.3	Spolehlivost laboratorní metody.....	55
4.2.4	Automatický koagulometr s optickou detekcí ACL TOP 550 (Werfen) 58	
4.2.5	Měřicí soustavy.....	59
4.2.6	D – dimer HS.....	60
4.2.7	D – dimer HS 500.....	61
4.2.8	Údržba, čištění a kalibrace přístroje	62
4.2.9	Princip	63
4.2.10	Postup měření	63
4.3	Postanalytická fáze	64
5	Výsledky	65
5.1	Naměřené hodnoty.....	65
5.2	Statistické zpracování naměřených dat.....	69
5.2.1	Vzájemné korelace.....	73
6	Diskuze	75
7	Závěr	79
8	Seznam použitých zkratk.....	81
9	Seznam použité literatury.....	83
9.1	Citovaná literatura.....	83
10	Seznam použitých obrázků	87
11	Seznamu použitých tabulek	88

1 ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá laboratorní diagnostikou měření plazmatické koncentrace D–dimerů v mg/l DDim u skupiny dospělých pacientů. Toto vyšetření bylo požadováno u pacientů během rutinního koagulačního vyšetření, my jsme pouze doplnily měření metodikou v jednotkách mg/l FEU. Hlavním úkolem této práce je tedy proměření koncentrační hladiny D-dimerů dvěma metodikami – v různých jednotkách: v mg/l DDim a mg/l FEU měřené dvěma soupravami pro D-Dimery LIA vysoce citlivou metodou výrobce Instrumentation Laboratory (Werfen) na optickém koagulometru ACL TOP 550 CTS (Werfen). Následně porovnat oba soubory získaných výsledků a určit vztah mezi nimi. Doposud bylo v dostupné odborné literatuře uváděno, že výsledná koncentrace D–dimerů v mg/l FEU odpovídá zhruba dvojnásobku výsledku v mg/l DDim. V hematologických zdravotnických laboratořích se rutinně používá většinou měření poskytující výsledek v jedné jednotce. Nikde není předepsáno, zda je vhodnější používat měření v mg/l DDim nebo mg/l FEU. V podstatě nezáleží na tom, zda bude výsledek D–Dimerů změřen kvalitně v mg/l DDim nebo mg/l FEU. Problém, by ale mohl nastat v případě, kdyby se na analyzátoru změřil jeden vzorek v obou jednotkách a vyhodnocení by proběhlo dle cut-off daném výrobcem a doporučeními ČHS ČLS JEP. Výsledek by byl v např. v měření ve FEU jednotkách hodnocen jako pozitivní, ale při měření v mg/l by mohl být negativní. K tomuto jevu může nejčastěji docházet u výsledků ležících poblíž cut-off dané metody.

V této práci se zamyslím a pokusím najít vztah mezi oběma jednotkami, ve kterých může být výsledek měření D–Dimerů vyjádřen.

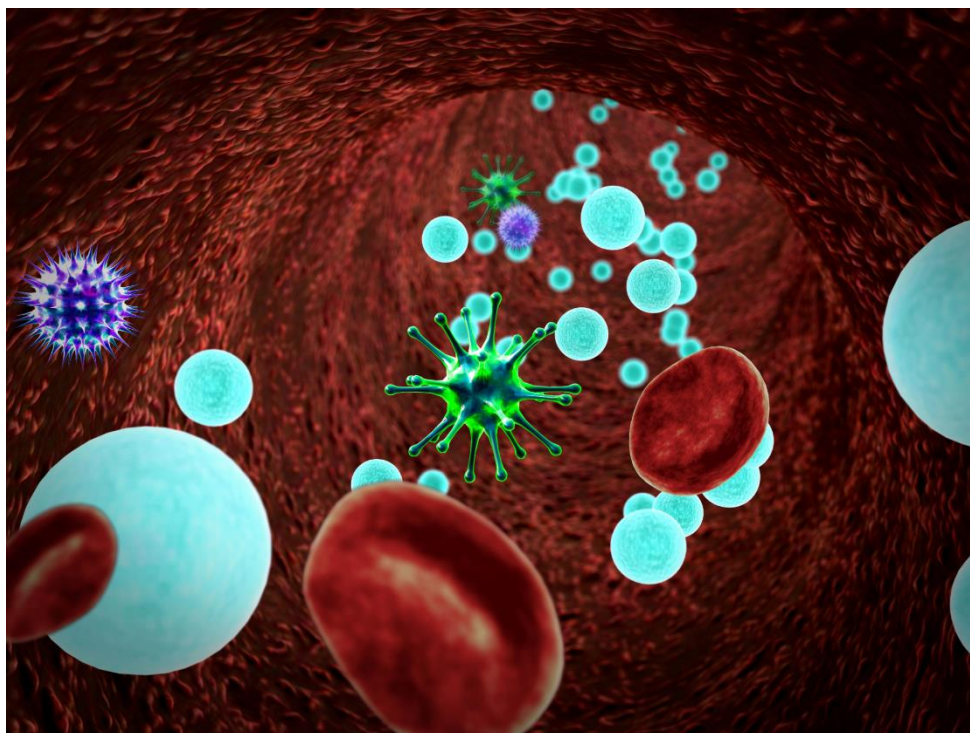
2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Krev

V trávicím systému živých organismů se vstřebávají různé látky, které vznikají v průběhu štěpení potravy. Tyto látky se dostávají do krve a kolují celým krevním oběhem. Následně jsou rozváděny do celého těla k orgánům a tkáním. Krev přenáší i kyslík důležitý pro všechny buňky v organismu. Kyslík se váže na hemoglobin a je transportován přes stěnu plicních sklípků do tkání. Při látkové výměně vznikají rozpadové produkty, které jsou nepotřebné v horším případě toxické pro organismus. Odpadní látky jsou zanášeny do vylučovacích orgánů – ledvin, plic, kůže, kde jsou odpadní látky odstraněny. Můžeme shrnout, že základní procesy metabolismu probíhají především v tekutinách – krevní plazmě, míze či tkáňové tekutině. [1]

2.2 Složení krve

Krev je červená, lehce viskózní kapalina, která nám proudí v těle. Skládá se z plazmy a krevních elementů. Plazma tvoří asi 55 % krve a zbylých 45 % tvoří krevní elementy (erytrocyty, leukocyty a trombocyty). [2]



Obrázek 1 Krevní elementy. Převozato z [3]

2.2.1 Krevní plazma

Krevní plazma je fyziologicky světle žlutá extracelulární tekutina, ve které jsou unášeny krevní buňky. Za patologických podmínek může mít i jinou barvu nebo být zakalená. V případě zakaleného vzorku, kdy lze okem pozorovat tukové kapénky se jedná o chylózní plazmu. Hlavní příčinou může být nadměrné množství lipidů (tuků) v potravě či patologicky zvýšené hodnoty těchto látek v krvi vlivem metabolického onemocnění. Při hyperbilirubinémii může krevní plazma mít sytě žlutou až zelenou barvu, jedná se o tzv. ikterickou plazmu. Pokud dojde k hemolýze erytrocytů, plazma získá různé odstíny červené barvy. Plazmu tvoří z 92 % voda, 7 % bílkoviny a 1 % organické a anorganické látky. Získáme ji centrifugací (stočením) nesrážlivé krve nebo se sama oddělí při delším stání odebrané nesrážlivé krve v nádobce. [2]

Mezi hlavní zastoupené anorganické látky patří kationty Na^+ a K^+ , které udržují rovnovážný stav mezi extracelulární a intracelulární tekutinou. Hlavními anionty jsou Cl^- a I^- . Chloridy se nacházejí především v žaludečních

šťávách a v potu. Organickými látkami, které obsahuje plazma jsou bílkoviny, sacharidy a lipidy. Důležitou bílkovinou je pak albumin, který udržuje stálý osmotický tlak. [2]

2.3 Krevní elementy

Erytrocyty (červené krvinky)

„K plnění svých funkcí je erytrocyt dokonale strukturně vybaven“ [4, s. 15]

Erytrocyty jsou bezjaderné buňky, které mají bikonkávní neboli „piškotovitý“ tvar. Tento tvar zvětšuje povrch celé buňky, tím i její plochu potřebnou pro difuzi kyslíku a zajišťuje snadnější průchodnost cévami. V krvi zaujímají 40–45 % krve. Průměrný počet erytrocytů u zdravého jedince je $4,5 \times 10^{12}/l$ (u žen v průměru $4,3 \times 10^{12}/l$, u mužů $4,8 \times 10^{12}/l$). Životnost erytrocytů se pohybuje kolem 120 dní. [1]

Erytrocyty jsou specializované bezjaderné buňky. Na povrchu mají cytoplazmatickou membránu a uvnitř jsou vyplněny červeným barvivem hemoglobinem. Hlavní funkcí erytrocytů je především přenos kyslíku z plic do tkání a oxidu uhličitého z tkání do plic. Krevní plyny se vážou na červené krevní barvivo hemoglobin, konkrétně na interkorpotované železo a jsou transportovány krevním řečištěm. Erytrocyty plní svou funkci nepřetržitě, proto potřebují čerpat energii v podobě glukózy. [1] [4]

Hemoglobin

Hemoglobin je metaloprotein červených krvinek, který tvoří až 90 % hmotnosti erytrocytu. Skládá se ze čtyř podjednotek, kdy každá podjednotka má bílkovinnou část – globin a nebílkovinnou část – barvivo hem. Dohromady dává tvar tetrameru neboli protoporfyrinu. V každém globinovém řetězci je centrálně uložená molekula dvojmocného železa, která je schopna na sebe navázat a přenášet kyslík. Bílkovina globin je tvořena dvěma páry řetězců, které mají různou skladbu – avšak

97 % hemoglobinu v populaci se skládá z podjednotek $\alpha_2\beta_2$ a tím tvoří tzv. Hemoglobin A. [5]

Leukocyty

Leukocyty neboli bílé krvinky jsou oproti erytrocytům jaderné buňky. Podle přítomnosti granul v cytoplazmě se dělí na granulocyty a agranulocyty. Také se dělí dle počtu jader na polymorfonukleáry a mononukleáry. [1] [2] [6]

Mezi granulocyty (polynukleáry) patří neutrofilní, bazofilní a eosinofilní granulocyty, které mezi sebou rozlišujeme především dle barvitelnosti a velikosti granul. Oproti nim agranulocyty (mononukleáry) neobsahují granula a dělí se na monocyty a lymfocyty. Fyziologický počet leukocytů v periferní krvi je $4-10 \cdot 10^9/l$. Jejich hlavní funkcí je především imunitní obrana organismu. Monocyty a neutrofilny fagocytují bakterie při reaktivních stavech. Eozinofily a nejméně zastoupené bazofily se uplatňují při alergických a antiparazitárních reakcích organismu, také se vyplavují do periferní krve při těžkých hematologických onemocněních. [1] [2] [6]

Trombocyty

Trombocyty jsou nejmenší bezjaderné krevní elementy, které vznikají v kostní dřeni odštěpením cytoplazmy megakaryocyty. Mají oválný tvar s velikostí od 1,5 do 3,5 μm . V periferní krvi se jejich počet pohybuje kolem $150-400 \cdot 10^9/l$. Krevní destičky se v periferní krvi nacházejí v neaktivované formě, v případě poruchy endotelu či působením jiného aktivačního signálu se aktivují. Aktivací se změní se tvar destičky a tím i její metabolismus. Jejich hlavní funkcí je přilnout na endotel a podílet se na tvorbě primární hemostatické zátky spolu s působením ve fibrinolytickém systému. [1] [2] [7]

Viz. uvedeno níže.

2.4 Dusíkaté látky v krvi

Většina dusíkatých látek v krvi je bílkovinné povahy, přesto zde můžeme nalézt i látky, které jsou povahy nebílkovinné. Všechny jsou pro tělo důležité a mají diagnostický význam. [8]

Urea

Patří mezi odpadní produkty a vzniká v játrech jako konečný metabolit dusíku bílkovin. Proces, kterým v játrech vzniká se nazývá cyklus močoviny nebo malý Krebsův cyklus. Močovina se vylučuje glomerulární filtrací, kde asi 40 % filtrátu se vrátí spolu s vodou zpět tubulární resorpcí do organismu. Referenční rozmezí se pohybuje od 2,5 do 8 mmol/l. Hlavní příčinou ve změně koncentrace močoviny může být nedostatečná nebo nadměrná tvorba dusíkatých látek v játrech a změny ve vylučování ledvinami. [8]

Hemolyticko – uremický syndrom vzniká při masivní hemolýze erytrocytů jako následek nedostatečné exkrece ledvinami. Vzniká při systémovém postižení kapilár a bývá provázen často gastrointestinální infekcí. Koncentrace močoviny může růst až na 80 mmol/l i více, ale již hodnota 30 mmol/l je považována za indikaci k hemodialýze. [8]

Kreatinin

Kreatinin vzniká jako konečný metabolit kreatinu a kreatinfosfátu ve svalech. Je vylučován glomerulární filtrací, ale není resorbován v tubulech. Množství kreatininu v primární moči je neměnné. Horní hranice pro normální koncentraci sérového stanovení kreatininu se pohybuje kolem 100 $\mu\text{mol/l}$, pro muže i ženy je referenční rozmezí odlišné, protože koncentrace kreatininu v séru je závislá nejen na množství svalové hmoty, ale i na funkci ledvin a metabolismu přijímaných a zpracovávaných bílkovin. Koncentrace kreatininu se může zvýšit při nedostatečném vylučování močoviny např. při selhání ledvin, kdy se jeho hodnota může vystoupat až nad 1000 $\mu\text{mol/l}$. Za kritickou hodnotu u dospělého

člověka považujeme koncentraci kreatininu kolem 700 $\mu\text{mol/l}$, někdy i dle dalších rozhodovacích kritérií i daleko nižší hodnoty (věk, stav aj.). Při takto zvýšené hladině je často nutná dialýza. Dále může být kreatininémie i snižená následkem zvýšené glomerulární filtrace především u dětí a těhotných žen. [8]

Kyselina močová

Vzniká jako konečný metabolit purinových bazí adeninu a guaninu, které jsou součástí nukleových kyselin. Kyselina močová také vzniká z purinových bazí, které jsou přijímány potravou. Filtrace probíhá v glomerulech, ale 90 % filtrátu se resorbuje v proximálním tubulu. Hlavní funkcí kyseliny močové je antioxidační účinek proti volným radikálům. Stejný antioxidační účinek má v extracelulární tekutině i albumin. [8]

Amoniak

Amoniak vzniká po degradaci dusíku aminokyselin v játrech. Vzhledem k tomu, že se jedná o toxickou látku, tak je v těle přeměňován na netoxickou ureu. Referenční rozmezí amoniaku v plazmě je od 35 do 50 $\mu\text{mol/l}$. Zvýšenou koncentraci pozorujeme při selhání jater, Reyova syndromu a velkém krvácení do trávicího traktu. [8]

Aminokyseliny

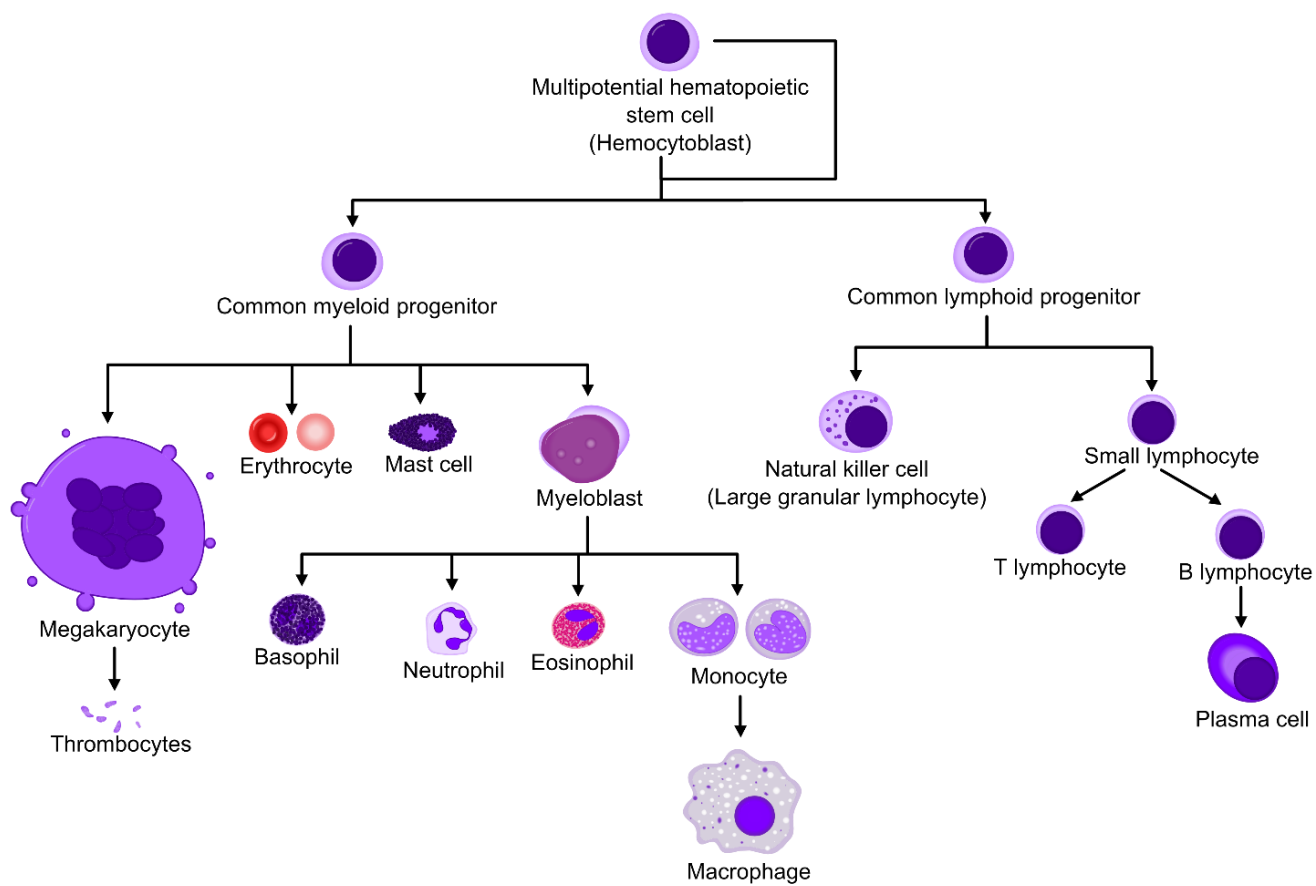
V séru nebo v moči můžeme stanovit i aminokyseliny, a to několika způsoby. Prvním způsobem je stanovení konkrétní aminokyseliny specifickou reakcí na základě rozdělení elektroforézou či chromatograficky a následný výběr spektra několika aminokyselin, které vyhledáváme. Můžeme stanovit také tzv. alfa – aminodusík, který obsahuje všechny aminokyseliny organismu. Tato stanovení využíváme především při screeningu metabolických dědičných poruch. [8]

2.4.1 Funkce krve

- Přivádí tkáním živiny, kyslík, odvádí oxid uhličitý a pomáhá udržet stálé pH vnitřního prostředí.
- Odvádí odpadní produkty metabolismu.
- Přenáší hormony, vitamíny a minerály.
- Zajišťuje obranné mechanismy organismu.
- Podílí se na udržování tělesné teploty.
- Udržuje tekutost krve. [2]

2.5 Krvetvorba (Hematopoéza)

Hematopoéza je složitý proces tvorby krevních elementů v krvetvorných orgánech. Místa tvorby krvetvorných buněk se během vývoje mění. V embryonálním období se buňky tvoří ve žloutkovém vaku. Poté jejich tvorba přestupuje do jaterního mesenchymu, který je v období od 3. do 10. týdne hlavním místem krvetvorby. Ve 20. týdnu se částečně přesouvá do kostní dřene, kde se již tvoří všechny druhy krvinek. Do 3. týdnů po narození zaniká mimodřeňová krvetvorba a je zcela nahrazena krvetvorbou v kostní dřeni. Zásoba hemopoetických buněk se nachází především v krátkých a plochých, velkých kostech – hrudní kost, lopaty kosti kyčelní. Prekurzorem pro všechny typy krevních buněk je pluripotentní kmenová buňka CFU – GEMM (colony forming unit granulocytes, erythrocytes, monocytes/macrophages, megakaryocytes). Krvetvorba v kostní dřeni za normálních (nepatologických) podmínek trvá po narození již celý život. Schopnost sebeobnovy buňkám chybí, a proto se neustále vytváří nové buňky. Každá buňka prochází třemi stádii vývoje, které začíná proliferací, kdy se začnou jednotlivé buňky množit, pokračuje diferenciací ve specializované buňky a celý proces je ukončen zráním neboli maturací. [1] [5]



Obrázek 2 Krvetvorba. Převzato z [43]

2.5.1 Řízení krvetvorby

Jedná se o komplexní systém zajišťující tvorbu a správné dozrání buňky. Tělo má několik možností, jak tento složitý proces regulovat. První z nich – nervová regulace je zajištěna především vegetativním nervovým systémem – sympatikem a parasympatikem. Hormonální regulace se projevuje nejvíce v dětském a dorostovém věku, především hormony štítné žlázy – tyroxinem nebo hormony nadledvin – aldosteronem či kortikoidy až po pohlavní hormony. Pohlaví ovlivňuje tvorbu a objem krve – muži mají více červených krvinek, tím i větší objem krve. [2] [5]

Ve specializovaných buňkách krevního systému se tvoří cytokiny, které se váží na specifické receptory krevních buněk. Zde mají funkci glykoproteinů, které tvoří síť interleukinů, interferonů a tumor-nekrotizujících faktorů. Pomocí výše zmíněných faktorů je hematopoéza regulována. Hlavní roli zde mají tzv. růstové faktory, které jsou specifické pro každou buněčnou řadu. Tyto růstové faktory stimulují jednotlivé krevní řady buněk např. erytrocyty stimuluje erythropoetin (EPO), trombocyty trombopoetin (TPO). Společným faktorem pro tvorbu granulocytů a monocytů je tzv. GM – CSF (granulocyto – monocytární stimulující faktor) a druhým faktorem je G – CSF (granulocytární stimulující faktor). [2] [5]

Důležité látky potřebné pro krvetvorbu:

Bílkoviny a aminokyseliny (hemoglobin)

Minerály:

- Fe – tvorba hemoglobinu
- Cu – vstřebávání Fe
- Co – součást vitamínu B₁₂ [2] [5]

Vitamíny:

- B₆ pyridoxin – zabudování Fe do hemoglobinu
- B₁₂ a kyselina listová – syntéza nukleových kyselin

- C – regulace využití Fe v organismu [2] [5]

2.6 Trombocyt

Denně se do periferní krve vyplaví okolo 2×10^{11} trombocytů. Ze všech trombocytů 2/3 cirkulují v krevním oběhu a zbytek se zadržuje ve slezině jako tzv. slezinný pool, který se uvolní do cirkulace při větších krevních ztrátách. Při patologických stavech může být ve slezině zadržováno až 90 % trombocytů. Za fyziologických podmínek se v periferní krvi nachází $150\text{--}400 \cdot 10^9/l$ trombocytů, jejichž životnost se pohybuje v rozmezí 9–11 dnů. Po této době jsou trombocyty vychytávány ve slezině a následně jsou zde i degradovány. [2]

2.6.1 Morfologie trombocytu

Morfologie krevních destiček se liší během jejich životního cyklu. Mladší destičky jsou větší, mají hutnější cytoplasmu a jejich granula obsahují více serotoninu než starší krvinky. Čím je krvinka starší, tím klesá její denzita, počet vazebných míst a její funkce. [4]

1. *Periferní oblast – obal buňky, glykokalyx*
2. *Oblast solubilního gelu – fibrilové proteiny, které tvoří destičkový kontraktilní systém*
3. *Oblast organel – granula, denzní tělíška, mitochondrie*
4. *Membránové systémy – otevřený kanálkový systém a denzní tubulární systém*

[9, s. 3]

Membrána trombocytu

Membránu trombocytu tvoří glykokalyx a vlastní membrána. Glykokalyx pokrývá zevní stranu trombocytu, která je tvořená glykolipidy a glykoproteiny. Vlastní membránu tvoří systém invaginovaných kanálek z dvojvrstvy fosfolipidů

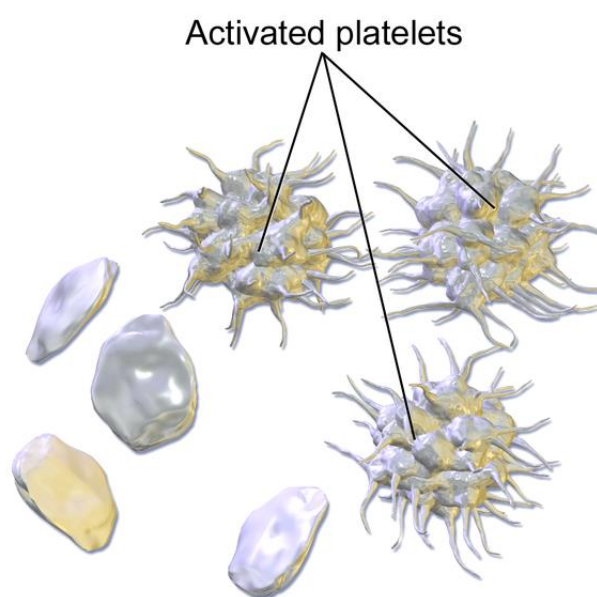
a vklíněnými membránové proteiny. Na povrchu zevní membrány se nachází fosfatidilcholin (PC) a sfingomyelin (SM), na vnitřní straně membrány se nachází fosfatidylserin (PS) a fosfatidyletanolamin (PE). Na membráně jsou destičkové receptory, které se účastní nitrobuněčných a extracelulárních interakcí. [9]

Cytoskelet

Pomocí mikrotubulů a mikrofilament tvoří síť strukturálních proteinů. Základní stavební jednotkou je tubulin, který udržuje klidový tvar trombocytu. Po aktivaci hemostázy některým z faktorů se vytvoří pseudopodie. Na jejich tvorbě se podílí mikrofilamenta, která udržují kulatý tvar trombocytu. Základní jednotkou mikrofilament je aktin a myosin tvořící aktin – myozinový komplex během něhož dochází ke kontrakci. [9]

Tubulární systém, sekreční granula a mitochondrie

V tubulárním systému se nachází zásoby kalcia a syntézy prostaglandinů. Sekreční granula se dělí na α a δ , kde δ granula jsou především syntetizována pro malé molekuly. Mezi hlavní orgány, které buňce zajišťují přísun energie jsou mitochondrie, kde zároveň probíhá i syntéza trombotických proteinů. [9]



Obrázek 3 Aktivované a neaktivované trombocyty. Převzato z [44]

2.6.2 Megakaryopoéza

Celá megakaryocytární linie se vyvíjí z pluripotentní kmenové buňky, která se následně vyvíjí v megakaryoblast. Buňka je diploidní a prochází opakovanou mitózou. Dochází k endomitóze – zmnožení genetické informace. Během megakaryopoézy dozrává cytoplazma, ze které vznikají trombocyty. [2]

2.6.3 Trombopoéza

Schopnost tvořit trombocyty mají megakaryocyty, které obsahují 8 nebo více jader. Z jednoho megakaryocytu může vzniknout až 4 000 krevních destiček. [2]

Megakaryoblasty

Buňka s průměrem 20 μm a centrálně uloženým jádrem s více jadérky. Cytoplazma kolem jádra je středně bazofilní. [2]

Promegakaryocyty

Buňka s průměrem 30 μm . Jádro má zářez naznačující jeho rozčlenění na více laloků. Cytoplazma se barví sytě červenofialově. [2]

Zralý a nezralý megakaryocyt

Megakaryocyt je velká buňka s průměrem 40–70 μm . Jádro je více laločnaté s hutným chromatinem a světle růžovou až fialovou cytoplazmou, která má barvu dle vyžránosti buňky. Čím je buňka starší, tím je cytoplazma světlejší. Megakaryocyty se nachází za normálních okolností pouze v kostní dřeni. [2]

2.6.4 Regulace trombopoézy

Mezi hlavní regulační faktory patří trombopoetin (TPO), který je z 50 % podobný erythropoetinu a několik dalších endogenních faktorů. Z cytokinů reguluje

trombopoézu především IL – 1, IL – 3, IL – 6, IL – 11, GM – CSF, EPO a růstový faktor fibroblastů. [2]

2.6.5 Aktivace trombocytu

Trombocyt může být aktivován dvěma způsoby. Prvním způsobem je porušením cévy a následným obnažením subendoteliárních struktur. Druhým způsobem je aktivace látkami vyplavenými do krevního oběhu, které se nazývají aktivátory. Mezi silné aktivátory patří zejména kolagen a trombin. Celý proces je komplexní a podílí se na něm i mnoho jiných látek. [4]

Po aktivaci se krevní destička deformuje – změní tvar a zvětší se plocha potřebná pro interakci faktorů koagulační kaskády. Na povrch exprimují pseudopodie, což jsou výběžky cytoplazmy trombocytu, které pomáhají lepšímu přilnutí k endotelu. Následně se uvolní prokoagulační faktory a dochází k sekreci dalších aktivátorů krevních destiček. Důležitou roli při hemostáze má i záporně nabitá fosfolipidová membrána, která svým nábojem urychluje interakce koagulačních faktorů. [4]

2.6.6 Adheze

Adheze neboli přilnutí na subendoteliární struktury poraněné cévy vyžaduje přítomnost několika dalších proteinů/faktorů, zejména von Willebrandova faktoru, fibronektinu a fibrinogenu. Von Willebrandův faktor má ve své struktuře vazebná místa pro kolagen I, III a VI, která jsou specifická pro navázání na subendoteliární struktury. Krevní destička po aktivaci změní svůj tvar a pomocí pseudopodie přilne k povrchu poraněné cévy. Během celého procesu se destičky mohou zvětšit až desetinásobně. [4]

2.6.7 Agregace

Tento proces nastává po adhezi krevních destiček. Během agregace dochází ke shlukování krevních destiček. Agregace lze rozdělit na primární agregaci, kdy dochází k částečnému spojování trombocytů pomocí pseudopodií. Při sekundární agregaci k sobě trombocyty přilnou těsněji, obnaží více glykoproteinových struktur a destička projde již nevratnou přeměnou. Postupně dochází k viskózní metamorfóze, kdy se destičky se začnou rozprostírat, rozplývat až splynou úplně. [4]

2.6.8 Retrakce

Jiným slovem ke kontrakci neboli smrštění dochází po krátké době od vzniku destičkového trombu. Během tohoto procesu dochází k obnovení průchodnosti cévy, která byla uzavřena primární hemostatickou zátkou. Retrakce je vysoce energeticky náročná, proto jsou ji schopny jen živé a funkční destičky. V další fázi tohoto procesu dochází k vytažení séra z koagula. Celý tento proces podporuje vazba fibrinogenu trombocytů na destičkový aktin přes receptory Gp IIb/IIIa. [4]

2.6.9 Funkce trombocytu

Krevní destičky jsou důležité pro správnou funkci celého organismu. Při poruše endotelových struktur se účastní tvorby primární hemostatické zátky. Nezanedbatelnou roli hrají i při ucpávání či chorobném uzavírání cévy či orgánu krevní sraženinou. [4]

2.7 Kvalitativní a kvantitativní poruchy trombocytů

2.7.1 Trombocytopatie

Trombocytopatie je stav poruchy funkce trombocytů. Dělíme je na vrozené a získané. Příčinami vrozené trombocytopatie je dědičná porucha funkce trombocytu, především některého důležitých procesů tvorby hemostatické zátky (adheze, agregace, retrakce). Získané trombocytopatie se vyskytují častěji a příčinou jejich vzniku bývají většinou různé léky či patologické změny metabolismu. Mezi léky, které mohou navodit stav trombocytopatie patří peniciliny, cefalosporiny, ibuprofen ale také vyšší dávky heparinu. [9]

2.7.2 Trombocytopenie

Při trombocytopenii dochází ke snížení počtu trombocytů v periferní krvi. Za kritickou hodnotu je považován pokles pod $20 \times 10^9/l$. Při této hodnotě již může docházet ke spontánnímu krvácení, které je velmi nebezpečné, jelikož pacientův koagulační systém není schopen včas reagovat a zastavit krvácení. Trombocytopenie se dělí na vrozené a získané. Vrozené trombocytopenie se dále dělí podle velikosti trombocytů na trombocytopenii s normálními trombocyty a trombocytopenii s velkými trombocyty. Pokud jsou trombocyty normálně velké může se jednat například o familiární trombocytopenii s možností dalšího vývinu v akutní myeloidní leukémii. V druhém případě, kdy jsou trombocyty větší, než obvykle se může jednat např. o Montrealský syndrom či Středomořskou makrotrombocytopenii. Tato onemocnění jsou geneticky podmíněná a mohou se prokázat různými morfologickými změnami v krevním nátěru, kde můžeme nalézt abnormálně velké trombocyty, mikrocytózu či v buňce mohou chybět α – granula. [9] [10]

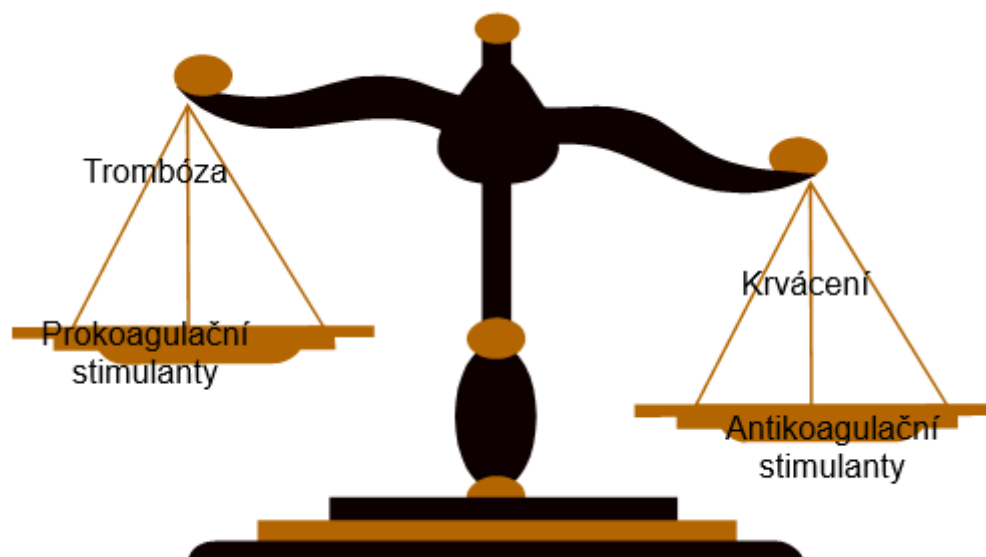
Získané trombocytopenie se dělí na primární (idiopatické) a sekundární. Mohou nastat z několika příčin např. sníženou produkcí trombocytů v kostní dřeni, zvýšenou destrukcí ve slezině nebo se trombocyty mohou hůře transportovat do místa spotřeby. Mezi hlavní onemocnění, které charakterizují získané trombocytopenie patří pseudotrombocytopenie a primární imunitní trombocytopenie. Pro primární imunitní trombocytopenii je charakteristická vazba autoprotilátek proti GP IIb/IIIa a GP Ib/IX/V na trombocyt, což vyvolá jejich předčasnou destrukci ve slezině fagocytujícím systémem. [9] [10]

2.7.3 Trombocytóza

Při trombocytóze dochází ke zvýšení počtu trombocytů v periferní krvi. Za trombocytózu je považovaná hodnota nad $450 \times 10^9/l$. Tento stav může nastat patologicky při různých myeloproliferativních onemocněních, bakteriální infekci nebo při krvácení. Fyziologicky se trombocytóza vyskytuje po splenektomii, zvýšené zátěži, případně při zvýšeném množství stresových situacích. Zvýšenou hladinu trombocytů (trombocytémie) můžeme najít u chronické myeloidní leukémie nebo u polycythemie vera, která je charakterizována nekontrolovatelnou proliferací všech krevních buněk, především myeloidní řady. Ve většině těchto onemocnění se k diagnostice musí odebrat pomocí sternální punkce nebo trepanobiopsie váleček kostní dřene k cytologickému vyšetření. [9]

2.8 Trombofilie a hyperkoagulace versus krvácení

Organismus v případě porušení endotelu má za úkol zastavit krvácení a současně udržet tekutost krve tak, aby se v nadměrné tvorbě netvořily krevní sraženiny. Riziko vzniku hypokoagulace (krvácení) a hyperkoagulace (trombózy) musí být v organismu v rovnováze, pokud se pomyslné váhy přikloní na jednu či druhou stranu, může to mít pro pacienta vážné následky. [11]



Obrázek 4 Váhy trombofilie vs. Koagulace. Převzato z [20]

2.8.1 Hyperkoagulační stavy

Trombofilie patří mezi poruchy hemostázy, kdy dochází u člověka ke zvýšenému srážení krve a následnému vzniku krevních sraženin. Často se vznik těchto krevních sraženin případně tromboembolií opakuje. Trombofilní stav je považován za multifaktoriální onemocnění, které způsobí více faktorů - dědičnost, věk, přidružená onemocnění či hormonální léčba. [12] [13]

Mezi dědičné trombofilní stavy patří především genové mutace, kdy u nositelů genetické mutace se první trombotická příhoda může projevit již před 40. rokem života. [12]

Mezi nejčastější dědičné, klinicky významné, trombofilie neboli trombofilní mutace patří mutace F V (Leidenská mutace) a mutace F II (Protrombin). Naopak mezi klinicky nezávažné stavy, s vysokou mírou četnosti, patří mutace v genu pro MTHFR. [13]

Leidenská mutace patří mezi bodové mutace, při které dochází k záměně guaninu za adenin. Touto substitucí se místo aminokyseliny argininu syntetizuje

glutamin, což se projevívá v rezistenci faktoru V proti APC neboli aktivovanému proteinu C. Tento protein C působívá v koagulační kaskádě jako přirozený inhibitor. Pokud je organismus postižený touto trombofilní mutací, dochází ke koagulační nerovnováze a tím ke zvýšenému riziku trombózy. V heterozygotní formě se vyskytuje u 5 – 10 % populace, homozygotní forma se nachází v poměru 1:5000 obyvatel. [12] [13]

Další, klinicky závažnou mutací je mutace faktoru II neboli mutace protrombinu. Při této mutaci dochází k záměně glutaminu za arginin v pozici 20210. Protrombin je inaktivní forma koagulačního faktoru II. a je produkován játry. Jeho tvorba je závislá na přítomnosti vitamínu K. Pomocí komplexu protrombinázy je protrombin aktivován na trombin. Celkový výskyt heterozygotní formy v populaci se odhaduje na 1 - 2 %. Tato mutace v homozygotní formě není běžná a její výskyt se odhaduje na 1: 10 000 jedinců. Heterozygotní přenašeči mají zhruba o 30 % zvýšenou hladinu plazmatického protrombinu a 2 - 3x vyšší riziko trombózy hlubokých žil. Uvedená mutace bývá někdy spojována se zvýšeným rizikem vzniku mozkové a hluboké žilní trombózy příp. i plicní embolie. [12] [13]

Velmi častou (cca 40 % výskytu v populaci), ale klinicky málo závažnou trombofilíí je mutace v genu pro MTHFR neboli enzym methylenetetrahydrofolátreduktáza. Tento enzym má zásadní roli pro metabolismus homocysteinu. Při defektu MTHFR se homocystein neodbourává, stává se termolabilním a shromažďuje se v těle. Následně se z něj stává toxická látka, která podporuje protrombotickou aktivitu. [13]

Získané trombofilní stavy jsou v populaci zastoupené více než vrozené trombofilie a mohou být vyvolány též přítomností antifosfolipidových protilátek, těžkými záněty nebo zhoubnými nádory. Mezi závažné onemocnění patří především diseminovaná intravaskulární koagulopatie, kdy se tvoří mikrotromby

v celém těle. Během celého procesu dochází k rychlému a nevratnému spotřebování koagulačních faktorů a následnému rozvoji krvácení. [12] [13]

Trombogenní riziko mohou mít i látky, které se hemostázy neúčastní, ale běžně se nacházejí v krvi – lipidy, homocystein, leukocyty. Tělo má své vlastní mechanismy, kterými se brání vzniku trombózy. Mezi ně patří neporušený endotel s antitrombogenními účinky nebo plazmatický a fibrinolytický systém. V neposlední řadě má důležitý účinek i neporušený a kontinuální krevní proud, který svou činností ředí krev. Tak je zachována a udržována tzv. Virchowova triáda, která zabraňuje vzniku tromboembolické nemoci. [13]



Obrázek 5 Virchowova triáda. Převzato z [14]

2.8.2 Tromboembolická nemoc

Tromboembolická nemoc (TEN) je označení pro skupinu trombofilních stavů s komplikacemi. Mezi hlavní komplikace patří především DIC, plicní embolie, tepenné tromby a embolie, v neposlední řadě i postflebický syndrom. Virchowova triáda zahrnuje tři faktory, které jsou příčinou žilní trombózy, a to poškození stěny, zpomalení krevního proudu, hyperkoagulabilita. Trombóza začíná adhezí destiček

a vznikne tzv. bílý trombus, následně se uzavře lumen rány a vytvoří se trombus červený. Následně ve stěně vznikne zánět, který vede k fibroblastické organizaci trombu. [15]

2.8.3 Krvácivé stavy

Krvácivý stav můžeme popsat jako spontánní krvácení, které je neúměrné stavu, které ho vyvolalo. Dochází k narušení rovnováhy hemostázy několika mechanismy. Může jít o narušení v jakékoliv části zástavy krvácení od defektní funkce krevních destiček po nedostatečnou funkci fibrinolytického systému. Krvácivé stavy se dělí na získané a vrozené. Trombofilní stav tvoří tzv. „přechod“ mezi oběma stavy, jelikož může být vrozený nebo častěji získaný. Záleží především na genetické predispozici a rizikových faktorech. Oba dva typy poruchy hemostázy se projevují vznikem trombóz. [13] [16]

Mezi vrozené krvácivé stavy patří Hemofilie A, B a von Willebrandova choroba, které patří mezi nejčastější vrozené krvácivé choroby. Hemofilie A je způsobena deficitem vnitřního faktoru VIII. Patří mezi recesivní onemocnění, které je vázané na pohlavní chromozom X. Z toho vyplývá, že ženy, jelikož mají dva chromozomy X tuto nemoc pouze přenášejí bez zjevných známek projevu. Bohužel muži, jelikož mají jen jeden chromozom X od matky jsou nemocní, a tudíž choroba se u nich projeví téměř se 100 % pravděpodobností. Záleží na kombinaci alel obou rodičů. Von Willebrandovu chorobu způsobuje nejenom defekt faktoru vW, ale i ovlivnění proteolýzy či posttranslačních úprav. Je několik typů Von Willebrandovy choroby, které se dědí jak autozomálně dominantně, tak autozomálně recesivně. Projevuje se nejčastěji krvácením ze sliznic nebo častými kožními hematomy. [13] [16]

Mezi získané krvácivé stavy patří i diseminovaná intravaskulární koagulopatie. Dochází k produkci mikrotrombů a pacient je ohrožen nekontrolovatelným krvácením. [5] [11]

Obávaná DIC se objevuje často jako sekundární stav při polytraumatech či sepsích. [5] [11]

2.9 Cévní systém

V cévním systému krev proudí pod určitým tlakem v kapilárách, cévách a tepnách. [5]

„Je to uzavřený systém, kdy krev je pumpovaná z levé komory srdeční do aorty a přes menší arterie a arterioly se dostává až na úroveň kapilár, kde je předáván kyslík do tkání. Z kapilár pak krev protéká venulami a většími cévami stékajícími se do horní a dolní duté žíly a do pravého srdce, odkud je plicní tepnou přiváděna do plic. V plicních kapilárách je krev okysličována a přes plicní žíly je transportována do levého srdce, kde se cyklus uzavírá“ [5, s. 31]

Stavba cévní stěny

Obecně mají se cévy a tepny skládají ze tří vrstev – tunica intima, tunica media a tunica adventicia. [17]

Tunica intima

- Vnitřní vrstva cévy, obsahuje endotelové buňky, které vznikají oploštěním buněk mezenchymových a subendotelové vazivo (řídke kolagenní vazivo) [17]

Tunica media

- Střední vrstva cévy, obsahuje hladké svalové buňky cirkulárně orientované a elastická komponenta, čímž jsou elastická vlákna či elastické fenestrované blanky. Vždy záleží na typu cévy. Tato vrstva je nejsilnější u arterií. [17]

Tunica adventicia

- Zevní vrstva cévy, která obsahuje především řídké kolagenní vazivo s příměsí elastických vláken. V této vrstvě se nachází i vasa vasorum – tedy výživa a nervové zásobení cév [17]

Endotelové buňky mají v organismu několik důležitých funkcí. Udržují nesmáčivý povrch cév a kapilár. Udržují cévní lumen průchodné. Podílí se na vazomotorice cévy, což je důležité především pro plynulý průtok krve a krevní tlak. V neposlední řadě se podílí na hemostáze a správné funkci trombocytů. [16]

2.9.1 Endotel

Neporušený endotel patří mezi fyziologickou a aktivní složku prevence vzniku krevních sraženin. Pokrývá téměř 7 m² plochy, kde se krev stýká s cévní stěnou. Na cévních stěnách se vyskytuje mnoho receptorů, které mají schopnost syntetizovat, hromadit a v případě nutnosti exprimovat na povrch nebo sekretovat řadu působků pro správnou funkci cév. Mezi hlavní působky, které jsou sekretovány patří vasokonstriční působky, které jsou nutné pro kontrakci cév nebo prokoagulační působky při poranění endotelu a rychlé potřebě zastavit krvácení. Dále dochází k sekreci působků potřebných k rozpuštění trombu a udržení rovnováhy mezi koagulačními faktory a inhibitory krevního srážení. Endotelie se mohou dostat do protrombotického režimu i bez předchozího poranění – pomocí cytokinů např. tumor nekrotizujícím faktorem TNF,

interleukinem 1, vysokou hladinou homocysteinu nebo vysokým krevním tlakem. Rozsáhlá aktivace cytokiny u sepse může vést až k diseminované intravaskulární koagulopatii. [5]

2.10 Hemostáza

Hemostáza je nezbytný specifický proces v cévním systému, který dokáže zastavit krvácení v místě poranění a zároveň zachovává celistvost krevního oběhového systému. Na hemostáze se podílí endotel, krevní destičky, inhibitory a aktivátory koagulační kaskády, plazmatický systém a v neposlední řadě i fibrinolytický systém. Ke správnému srážení jsou potřeba všechny složky krve. Neporušená cévní stěna udržuje trombocyt v inaktivním stavu a po jejím porušení dochází k aktivaci trombocytu. V některých případech může být v souvislosti s jinou chorobou, případně se může jednat o vrozený defekt některého z koagulačních faktorů. Při zástavě krvácení je nejdůležitější složkou endotel, který kontroluje protrombotické děje a udržuje fluiditu krve. Endotel je také hlavním místem interakce všech systémů hemostázy. Hlavní funkcí endotelu je aktivace proteinu C, tvorba heparansulfátů (mukopolysacharidů) a uvolnění inhibitoru tkáňové faktoru – TFPI. Poraněná tkáň uvolňuje do okolních buněk ADP, který vyvolá primární agregaci a tkáňový faktor, který umožní přeměnit protrombin na trombin. Další složkou hemostázy jsou trombocyty, které interagují mezi krví a cévní stěnou. Mají fosfolipidový povrch pro navázání koagulačních faktorů FVIII a V. Trombocyty jsou schopny aktivovat přímo faktory XII a XI. [5] [18] [19]

2.10.1 Primární hemostáza

Fyziologický proces krevních destiček a cévy vedoucí k tvorbě primární hemostatické zátky. Krevní destičky se dostávají do krevního oběhu pomocí megakaryocytů, které nasedají na krevní kapiláry. Tvorba primární hemostatické

zátky začíná vazokonstrikcí poraněné cévy, ke které dochází bezprostředně po poranění. Následuje adheze destiček na endotel pomocí kolagenních vláken nacházejících se na povrchu bazální membrány cév a glykoproteinem Ib, který se nachází na povrchu trombocytu. Druhým krokem je agregace neboli shlukování krevních destiček pomocí glykoproteinu IIb/IIIa v tomto procesu je přítomen i von Willebrandův faktor a fibrinogen. Poslední důležitou vlastností trombocytu je tzv. retraktibilita, což je schopnost stažení nebo smrštění hemostatické zátky, tvořené z kontraktibilních bílkovin v destičkové membráně. Celý proces trvá od několika sekund až po minuty. [5] [18]

2.11 Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém tvoří proteiny plazmy tzv. koagulační faktory, které se přímo účastní krevního srážení a vedou ke vzniku nerozpustného fibrinu. Od aktivace plazmatického systému až po vytvoření stabilního zesíťovaného fibrinu uběhnou pouze sekundy až minuty. Postupně dochází k přeměně fibrinogenu na fibrin, poté na fibrinové monomery, které mají sklon polymerovat. Působením faktoru XIII vzniká pevný nerozpustný fibrin, ve kterém jsou zachycovány krevní buňky a tím vzniká stabilní fibrinová zátka. Celý proces je velmi složitý a vytváří řetězce reakcí, které jsou kontrolovány různými faktory. Účelem celého procesu a dějů má za cíl udržet dynamickou rovnováhu. [18]

Většina koagulačních faktorů je tvořena v játrech. Dělíme je dle místa účinku na faktory koagulační, přirozené inhibitory a faktory fibrinolýzy. Po biochemické stránce se faktory dělí na enzymy, kofaktory, fibrinogen, adhezivní plazmatické proteiny, regulační proteiny, fosfolipidy a v neposlední řadě ionty a minerály. Enzymy kolují v krvi neaktivované ve formě proenzymů, které se aktivují až v potřebném místě. Patří sem proenzymy serinových proteáz a transglutaminázy. Další důležitou látkou jsou kofaktory, které urychlují enzymatické reakce. Dělíme je na kofaktory plazmatické a buněčné. Fibrinogen se

pomocí trombinu mění na fibrin. Von Willebrandův faktor patří mezi adhezivní plazmatické proteiny spolu s fibronektinem a viktronektinem. Mezi tzv. regulační proteiny neboli přirozené inhibitory krevního srážení patří především antitrombin, α_2 antiplazmin, metaloproteinázy nebo α_2 makroglobulin. V organismu tyto proteiny mají důležitou úlohu zabránění nekontrolovatelného srážení krve. Podílejí se tedy hlavně na udržení průchodnosti cév. Krevního srážení se účastní i látky, které se volně nenachází v krevním řečišti – fosfolipidy neboli estery glycerolu a kyseliny fosforečné. Jsou součástí buněčné membrány. Mezi hlavní funkce fosfolipidů patří transport tuku v organismu. Fosfolipidy také poskytují negativně nabitý povrch potřebný pro koagulační reakce. Posledními látkami, které se nachází v krevním oběhu a bez kterých by kaskádovité reakce v organismu neplnili svojí funkci správně jsou ionty a minerály - Mg, Zn. Naše tělo pro správnou funkci plazmatického koagulačního systému potřebuje především vápníkové ionty, které jsou nezbytné pro reakce s vitamínem K. [5] [20] [21]

2.11.1 Inhibitory plazmatického koagulačního systému

Mezi inhibitory plazmatického koagulačního systému patří především antitrombin neboli heparinový kofaktor, poté heparinový kofaktor II a systém proteinu C, který se skládá z podjednotek – protein C, protein S a trombomodulin. [5] [20]

Antitrombin patří mezi inhibitory serinových proteáz a jeho hlavní funkcí je vyvazovat trombin a jiné proteázy za vzniku odbouratelného komplexu. Heparinový kofaktor II také patří mezi inhibitory serinových proteáz, nachází se v endotelu cév a jeho aktivita je především namířena proti trombinu. Dalším inhibitorem plazmatického koagulačního systému je směs inhibitorů tvořena třemi proteiny – proteinem C, S a trombomodulin. Aktivace tohoto systému probíhá na povrchu endotelových buněk. První z proteinů – Protein C vzniká v játrech za přítomnosti vitamínu K. Jeho aktivace probíhá navázáním na trombin nebo

trombomodulin. Po aktivaci vznikne odštěpením 12AMK aktivní protein C, který v přítomnosti Ca^{2+} a fosfolipidů je schopen štěpit FVa a FVIIIa. Druhý protein z komplexu – Protein S vzniká také v játrech v přítomnosti vitamínu K. Jeho největší zásoba je v α granulích trombocytů. Usnadňuje vazbu aktivního proteinu C, k cytoplazmatické membráně a endotelu – jedná se tedy o kofaktor. Posledním z komplexu je trombomodulin, který se nachází trvale v endotelu a jeho hlavní funkcí je schopnost vázat trombin. [5] [20]

2.12 Fibrinolytický systém

Fibrinolytický systém je specializovaný systém aktivátorů a inhibitorů, který zajišťuje regulaci a rovnováhu v koagulačním systému. Tím je odpovědný za rozpuštění vzniklého stabilního fibrinového koagula. Fibrinové koagulum omezuje tok krve v cévě, kde je za fyziologických podmínek udržována rovnováha, ale při nekontrolovatelné aktivaci hemostázy může dojít i k uzavření cévy. Celý proces fibrinolýzy je aktivován po poranění endotelu spolu s aktivací koagulačního systému. Tento proces, ale trvá delší dobu než procesy předchozí a to cca 48–72 hodin. Při chorobných stavech se může tato doba zkrátit nebo prodloužit. Zvýšená funkce fibrinolytického systému neboli hyperfibrinolýza je spojována s velmi těžkými krvácivými stavy a může být zatím predispozicí ke vzniku nerozpustného trombu. V organismu lze takovýto stav velmi těžce běžnými laboratorními metodami prokázat. Nejspolehlivější metodou je tzv. tromboelastografie TEG. Tromboelastometrické přístroje se používají nejčastěji na odděleních ARO a na kardiochirurgických operačních sálech, kde při operacích v mimotělním oběhu s vysokými dávkami heparinu je vysoké riziko akutně probíhajících poruch hemostázy. Naopak snížená funkce fibrinolytického systému tzv. hypofibrinolýza je spojená především s nedostatečnou funkcí některého z komponentů fibrinolýzy. [18]

Hlavní složkou fibrinolytického systému je plazmin a jeho prekurzor plazminogen. Mezi nejdůležitější aktivátory plazminogenu jsou tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA) a urokináza (uPA). Tkáňový aktivátor plazminogenu se účastní i jiných procesů např. angiogeneze, kde má pozitivní i negativní účinek. Negativně působí při metastazování tumorů a patří mezi rizikové faktory kardiovaskulárních chorob. tPA má pozitivní vliv na nidaci vajíčka. Organismus na fibrinové koagulum reaguje aktivací fibrinolytického systému. Plazminogen, který se váže na koagulum je působením aktivátorů uvolněných z endotelu přeměněn na plazmin. V místě určeném pro navázání plazminogenu jsou vazebná místa i pro jeho aktivátory. Fibrinolýza probíhá pouze v místě poranění, kdy přeměněný plazmin proteolyticky působí na koagulum a dochází ke specifickému štěpení fibrinu a následnému obnovení krevního toku. Pokud se sníží fibrinolytická schopnost krve, může to vést až k trombotickým stavům - pokud se ale tato schopnost zvýší i mimo místo poraněné cévy, může to vést ke krvácení. K aktivaci fibrinolýzy dochází souběžně s aktivací hemokoagulačních procesů. [5] [18] [19]

„Zvýšení fibrinolytických schopností krve může vést ke krvácení, snížení fibrinolýzy může naopak vyvolat trombotické stavy.“ [18, s. 87]

2.12.1 Aktivátory fibrinolýzy

Aktivace fibrinolýzy nastane při kontaktu poraněného endotelu s faktorem XII. Dochází k odbourání již nepotřebného fibrinového koagula a zhojení rány. Vlastním a hlavním enzymem fibrinolýzy je plazmin, který vzniká štěpením plazminogenu pomocí tPA (tkáňový aktivátor plazminogenu) v krevním řečišti. Tkáňový aktivátor plazminogenu je syntetizován v endotelu, stejně jako urokináza (uPA). Vlivem aktivovaného proteinu C a histaminu se z buněk endotelu uvolní. Největší koncentrace tPA se nachází v děloze, ledvinách a plicích. Mezi další aktivátory plazminu patří i uPA (urokinázový aktivátor plazminogenu), má hlavní

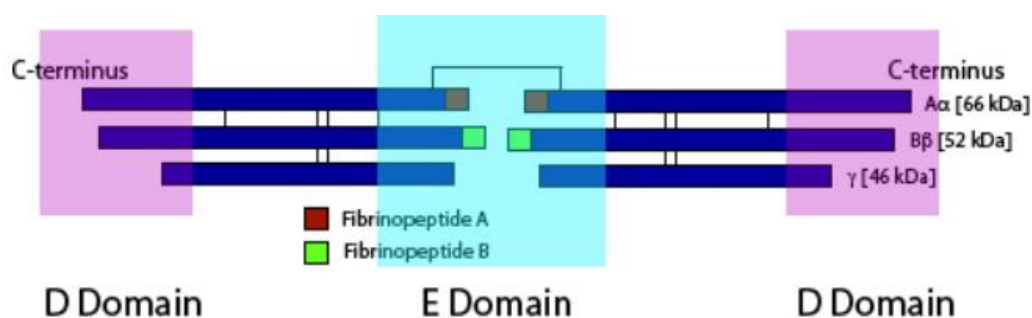
funkci při štěpení extracelulární tekutiny a tím i na transportní procesy v cévním řečišti. Plasmin lze také aktivovat i pomocí vnitřní cesty koagulační kaskády přes koagulační faktor XII. [5] [19] [20]

2.12.2 Inhibitory fibrinolýzy

Celý proces fibrinolýzy je složitý a komplexní, proto potřebujeme i inhibitory, které po aktivní stimulaci celý proces zastaví, aby nedocházelo ke krvácení. Mezi hlavní inhibitory fibrinolýzy patří α_2 antiplasmin a inhibitory aktivátoru plazminogenu (PAI). Antiplazminy vznikají v játrech a vyskytují se v plazmě, kde nejsou nijak vázané – pohybují se volně, dokud není potřeba regulovat fibrinolýzu. PAI patří mezi serinové proteázy a je obsažen v α granulích trombocytů, plazmě a endotelu. Dle inhibovaných aktivátorů lze PAI rozlišit na PAI 1, PAI 2 a PAI 3. PAI 1 inhibuje především u – Pa a t – Pa. PAI 2 inhibuje pouze u – Pa. Mezi posledními je PAI 3, která inhibuje oba u – Pa i t – Pa, ale navíc inhibuje i trombin. Hlavním úkolem PAI-1, 2, 3 je zamezení šíření fibrinolytických procesů do okolí. Mezi další důležité inhibitory patří i TAFI neboli inhibitor fibrinolýzy aktivovaný trombinem. Funkčně se jedná o enzym, který se tvoří v játrech. K aktivaci TAFI dochází při nízkých hladinách trombomodulinu, při vyšších koncentracích se však účinnost jeho aktivace snižuje, nejspíše v důsledku zvýšené koncentrace proteinu C. Mechanismus účinku je takový, že po aktivaci trombinem odštěpí aminokyseliny arginin a lysin z fibrinových vláken, které představují vazebná místa pro tPA a plazminogen. Dochází k blokování vazby tPA a plazminogenu na fibrin, tím se zpomalí aktivace plazminu a následně dojde ke snížení fibrinolytického potenciálu. Při snížené hladině TAFI lze pozorovat u pacientů krvácivé projevy, naopak při zvýšené aktivitě mohou nastat komplikace ve formě arteriálních i venózních hyperkoagulací. Posledními zástupci z řady inhibitorů fibrinolýzy jsou α_2 – makroglobulin a α_1 – antitrypsin, kdy α_2 – makroglobulin je tvořen hepatocyty v játrech a makrofágy, je schopen navázat na sebe enzymy plasmy

a leukocyty. Syntéza α_1 – antitrypsinu probíhá v játrech a jeho hlavní funkcí je inhibice proteáz slinivky břišní a bílých krvinek. [5] [18] [19] [20]

Mezi inhibitory fibrinolýzy patří i získané inhibitory, pokud jsou u pacienta přítomny vždy to patří mezi patologické nálezy. Nejznámějším získaným inhibitorem jsou antifosfolipidové protilátky neboli APA, což jsou heterogenní skupiny protilátek IgG nebo IgM, které reagují s negativně nabitými fosfolipidy či fosfolipidovými komplexy. Vazba těchto komplexů s fosfolipidy znemožní tvorbu koagulačních nebo inhibičně aktivních komplexů. Následkem toho mají tyto protilátky antikoagulační i prokoagulační účinky. Tento stav nenacházíme jen u autoimunitních onemocnění, ale i u nádorových onemocnění, zánětů či během gravidity. Přítomnost těchto protilátek může být i u zdravých jedinců. U žen se většinou diagnostikují po opakovaných spontánních potratech. U látek závislých na fosfolipidech dochází k patologii či prodloužení některých testů. Jedním z testů, který může být prodloužen je základní screeningový test: Aktivovaný parciální tromboplastinový čas – APTT. [19]



Obrázek 6 Struktura fibrinogenu. Převezato z [25]

2.12.3 Fibrin

Molekula fibrinogenu se skládá ze 3 jednotek. Dvě D domény jsou spojené jednou doménou E. Trombin štěpí koncové aminokyseliny z řetězce α a β . Odštěpením dvou peptidů FPA a FPB se uvolní vazebná místa na E doméně. Celá molekula zbývajícího fibrinogenu může být dále segmentovaná na fibrinové monomery. Vzniknou tedy dvě D domény a jedna doména E. Nově vzniklé fibrinové monomery mají náchylnější strukturu k polymeraci, ta probíhá na základně interakce mezi E a D doménami. Postupně se vytvoří protofibrily – vzniká tzv. fibrinový gel, což je rozpustný fibrin. Stabilizace fibrinu probíhá za působení faktoru XIIIa, který za pomoci Ca^{2+} vytváří mezi koncovými částmi γ řetězce příčné kovalentní vazby. Tato nově vzniklá struktura se nazývá polymerní stabilní fibrin, který je potřebný pro hemostázu. Je odolnější, pomáhá ke zpevnění koagula, a dokonce není rozpustný ani v urey – močovíně. [18] [22] [23]

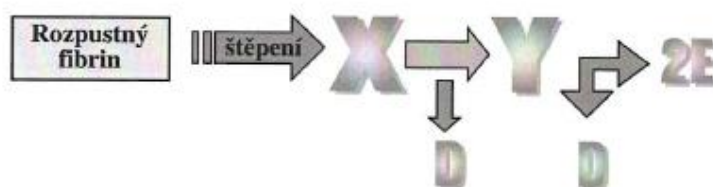
2.12.4 Fibrin degradační produkty

Po hemokoagulaci a zastavení krvácení dochází k fibrinolýze. Pokud by byl tento proces narušen, mohlo by dojít k nekontrolovatelné tvorbě mikrotrombů až neprůchodnosti cévy. Během celého procesu fibrinolýzy je odstraňován trombus z krevního řečiště za působení plazminu, který štěpí fibrin na vysokomolekulární a nízkomolekulární fibrinové fragmenty tzn. fibrin degradační produkty. Mezi tyto produkty patří i D–dimery. [19] [24] [25] [26]

Fibrin – degradační produkty vznikají působením plazminu na fibrin. Je nutné si uvědomit, jaký fibrin je štěpen, zda rozpustný či nerozpustný. Při štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu vznikají vysokomolekulární (X, Y) nebo nízkomolekulární fragmenty (D, E). Vysokomolekulární štěpy zabraňují v polymeraci monomerům fibrinu, tím že s nimi vytvoří rozpustný komplex. Dále mají schopnost inhibovat agregaci krevních destiček a tím kontrolovat koagulaci.

Nízkomolekulární štěpy nemají velký význam, jsou odbourávané monocyty – makrofágovým systémem. [18]

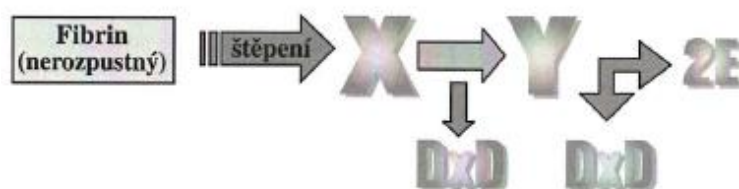
SCHÉMA ŠTĚPENÍ FIBRINOGENU A ROZPUSTNÉHO FIBRINU



Obrázek 7 Schéma štěpení rozpustného fibrinu. Převzato z [18]

Při štěpení fibrinogenu a nerozpustného fibrinu jsou také odštěpovány fragmenty X a Y, které jsou spojeny pevnou kovalentní vazbou, takže se od sebe neoddělují. Konečným stadiem jsou D-dimery o MW 182 kDa, které se dostávají do periferní krve, kde fungují jako marker možné tromboembolické nemoci. [18]

SCHÉMA ŠTĚPENÍ NEROZPUSTNÉHO FIBRINU



Obrázek 8 Schéma štěpení nerozpustného fibrinu. Převzato z [18]

Fyziologicky se fibrin degradační produkty – FDP nacházejí v plazmě v malé koncentraci asi $4,9 \pm 2,8$ mg/l. Zvýšená koncentrace FDP může být způsobena primárním nebo sekundárním rozpadem fibrinogenu, které doprovází intenzivní srážení krve. Mezi hlavní onemocnění, které zvýšení FDP může signalizovat patří diseminovaná intravaskulární koagulopatie DIC, hluboká žilní trombóza HŽT, infarkt myokardu a některé stavy provázející těhotenství. Ke stanovení se používá přímá latexová aglutinace pro stanovení přítomnosti FDP v krvi nebo v moči. [26]

2.12.5 D–dimery

D–dimery jsou látky bílkovinné povahy, které patří mezi degradační produkty fibrinu. Vznikají štěpením nerozpustného fibrinu, kdy se uvolní fragmenty X a Y, které se v nerozpustném koagulu od sebe neoddělují, jelikož jsou vzájemně spojeny pevnou kovalentní vazbou. Takto vzniklé D–dimery jsou následně uvolňovány do krve. Skládají se ze dvou podjednotek D, odtud název D–dimery. Jejich zvýšená koncentrace ukazuje na přítomnost čerstvě vzniklé krevní sraženiny v cévním řečišti, případně může signalizovat i poruchu odbourávání D–dimerů, která může vzniknout jako následek těžkých jaterních onemocnění. Negativní výsledek či nízká koncentrace hladiny D–dimerů slouží k vyloučení hluboké žilní trombózy, plicní embolie a diseminované intravaskulární koagulopatie, což je důležité především pro lékaře, který potřebuje u pacienta rychle vyloučit závažnější cévní onemocnění (HŽT, plicní embolii PE a DIC) a zvolit vhodný způsob léčby. [24] [25] [26]

Ke stanovení koncentrace D–dimerů se používá imunochemický latex – imunoturbidimetrický test. Stanovuje se kovalentní vazba (antigen) mezi dvěma D–podjednotkami pomocí monoklonálních protilátek. V případě přítomnosti antigenu D-dimeru dochází k aglutinaci latexových částic. Míru aglutinace měříme fotometricky. Po vzniku imunokomplexu zesílí zakalení směsi v kyvetě, čímž se sníží intenzita světla, která prochází kyvetou. Analyzátor na základě zeslabení tohoto světla z kalibrační křivky odečte koncentraci D-dimerů. Monoklonální protilátka, která byla využita je specifická pro epitop D podjednotky D-dimerů. Vazebné místo má specifické prostorové uspořádání, které se změní s vytvořením příčné vazby. Tímto uspořádáním protilátka nereaguje s degradačními produkty fibrinogenu, kde nedochází ke spojení dvou D podjednotek. [24] [25] [26]

Další možností stanovení hladiny antigenu je ELISA test – zlatý standard (Vidas). Posledním testem jsou tzv. bedside POCT testy neboli testy u lůžka pacienta. POCT imunotesty mohou být však méně citlivé. [18] [24] [25] [26]

Hodnoty D–dimerů se vyjadřují se ve dvou jednotkách – mg/l DDim nebo mg/l FEU (fibrinogen ekvivalentní jednotky). V literatuře, se udává že 1 mg/l DDim odpovídá 2 mg/l FEU. Referenční rozmezí se pohybuje od 0 mg/l do 0,230 – 0.250 mg/l DDim. Výjimkou je období gravidity, kdy bývá běžná koncentrace D-Dimerů často dvojnásobná. Koncentrace D–Dimerů může kontinuálně narůstat, neměla by však v 36.týdnu překročit hodnotu 1,0 mg/l DDim. [24] [25] [26]

Při interpretaci výsledků musí lékař přihlížet k udanému cut-off, které laboratoř používá. Nelze tedy obecně říci, že výsledek je při měření různými metodikami při použití různých kalibrátorů stejný kvantitativně, ale měl by být vždy posuzován kvalitativně. Jedná se především o bezpečné vyloučení PE, HŽT a DIC - tzn. nesmí být vydán žádný falešně negativní výsledek, protože senzitivita testů se ideálně pohybuje kolem 99 %. Jinak je to se specifitou testu: pozitivitu výsledku D – Dimerů zaznamenejme nejen u klíčových tří PE, HŽT a DIC, ale u mnoha dalších zánětlivých až septických nebo jaterních onemocnění, dále hematologických, myeloproliferativních, tumorových a mnoha patologických stavů včetně období gravidity. [27]

Neexistuje jednotný mezinárodní standard pro navázání kalibrátorů pro různé metodiky stanovení D–dimerů v plazmě. D–dimery patří mezi obtížně zkoumaný analyt, jelikož se nejedná o čistou protilátku, ale o směs derivátů fibrinu s různými molekulovými hmotnostmi. D–dimery mohou být lokalizovány jak v trombech, tak diseminovaně po celém těle. Ošetřující lékař, pak dle laboratorních, klinických výsledků a doplňujících vyšetření pomocí zobrazovacích technik rozhodne o léčbě. [27]

2.13 Diseminovaná intravaskulární koagulopatie

„Získaný syndrom způsobený neregulovatelnou a nelokalizovanou intravaskulární aktivací koagulace, vedoucí k poruše mikrocirkulace a ke konzumpci koagulačních faktorů a inhibitorů“ [10, s. 120]

Koagulace je fyziologicky aktivována endotelem a jeho obnaženou strukturou. Hemostáza zde za fyziologických podmínek probíhá lokalizovaně a systematicky. Hemostáza je zastavena inhibitory koagulace a fibrinolýzy, tím snižuje riziko uvolnění trombu do krevního řečiště. Mechanismus při DIC se liší tím, že celý tento proces není lokalizovaný a nelze ho regulovat. Dochází ke spotřebě faktorů koagulační kaskády, inhibitorů a krevních buněk červené řady, převážně tedy erytrocytů a trombocytů. Mohou nastat dva stavy, a to orgánově specifická konzumpce, ke které dochází při nefritis nebo cirhóze jater. Tento stav je velmi závažný, ale nedochází k samotnému rozvoji DIC. Druhým o mnoho závažnějším stavem je plně generalizovaná konzumpce v podobě DIC – dochází zde k nekontrolovatelné spotřebě koagulačních faktorů a inhibitorů a následně uvolnění trombů do celého organismu. [10] [28] [29]

Diseminovaná intravaskulární koagulopatie patří mezi závažné získané hemoragické syndromy, které jsou vyvolané základním onemocněním. Mezi hlavní základní onemocnění, která mohou DIC vyvolat, můžeme zařadit závažné infekce a sepse, polytraumata, akutní leukémie, tumory a embolie. Další příčinou DIC jsou rizikové výkony či operace, kam patří například i porod, kdy hrozí pacientce embolie plodovou vodou, předčasné odloučení placenty, odumření plodu či (pre)eklampsie. Zajímavým případem může být i otrava krve hadími jedy, kdy se koagulační kaskáda aktivuje na mnoha místech organismu najednou, krev se začne srážet téměř okamžitě a vytvoří koagulum. Bez včasného dopravení k lékaři je pacient ohrožen smrtí. [10]

DIC můžeme rozlišit dle symptomů na akutní a chronické. Mezi projevy akutní diseminované intravaskulární koagulopatie patří poruchy mikrocirkulace a krvácivé projevy. U chronické diseminované intravaskulární koagulopatie se na těle pacienta vyskytují petechie, epistaxe a ekchymózy a hrozí mu embolie v cévním systému i v orgánech a riziko následné smrti. Přesná diagnostika a léčba je však velmi obtížná, jelikož projev jsou velmi polymorfní jak po klinické, tak i laboratorní stránce. Pacient může mít mnoho variant příznaků a tím se diagnostika stává obtížnější. [10] [28]

2.13.1 Stadia DIC syndromu

Diseminovaná intravaskulární koagulopatie má několik stádií. V literatuře najdeme různá dělení těchto stádií. Uvádím zde informace z článku, kde DIC dělí na čtyři stadia. [28]

První stadium je fáze aktivace, kdy nejsou ještě známky krvácení a hladina koagulačních testů je v normě, či jen lehce zvýšená. Laboratoř je i v tomto stadiu schopna citlivými testy prokázat hyperkoagulaci. Druhé stadium je stadium dekompenzované DIC, u které můžeme pozorovat plynulý přechod z první do druhé fáze. Klinické projevy jsou velice pestré až kuriózní. Hlavním klinickým kritériem je krvácení ze tří nezávislých lokalit, které na sobě nejsou závislé. Pozorujeme časné či pozdní hluboké i povrchové krvácení, které má kombinovaný charakter. Následně vstupují i poruchy mikrocirkulace a mohou nastat i lokální nekrózy. Postupně se prohlubují orgánové dysfunkce až do plně orgánového selhání. [28]

„Etiopatogeneticky se jedná o postupné selhávání obranných a kompenzačních mechanismů proti rozvoji DIC.“ [28, s. 2]

Předposlední fáze je již fáze nevratná, která je vystupňováním poruch mikrocirkulace. Čtvrtá a poslední fáze je plně kompenzovaný DIC, který může být následkem akutního zaléčeného DIC a chronickou trombotizací. [28]

Klinicky se DIC nemusí vůbec projevit mírný stupeň, tzv. Low grade DIC. Také ale může mít středně těžké až velmi vážné projevy, které mohou ohrožovat pacienta na životě těžkými trombózami či rozsáhlým krvácením. Z krvácivých projevů lze u pacienta nalézt petechie, purpuru či krvácení z ran, případně můžeme nalézt i gangrénu. Diagnostika DIC je snadnější až v pokročilém stadiu. [21]

Vzhledem k variabilitě klinických projevů jsou laboratorní nálezy obtížně interpretovatelné. Zatím neexistuje jeden rychlý univerzální test, který by měl maximální citlivost jen pro DIC. [21]

Rozvoj DIC lze laboratorně sledovat základními hematologickými testy:

- Snížení trombocytů
- Schistocyty v KO
- Proloužení koagulačních testů (APTT, PT, TT) vlivem vyčerpání (spotřebování) faktorů srážení (u 75 % nemocných)
- Pokles aktivity antitrombinu a fibrinogenu v plazmě
- Vystupňovaná fibrinolýza
- Štěpení fibrinu a nárůst D – dimerů v plazmě (FPA, FPB) – zvýšeny u 85 % nemocných, jsou velmi citlivé, ale málo specifické [21] [28]

Vzhledem k polymorfismu DIC a obtížné diagnostice se zavedly a používají různá skórovací schémata, která zohledňují klinické projevy u pacienta, výsledky laboratorního vyšetření i orgánové dysfunkce. Negativní výsledky laboratorního vyšetření DIC nevylučují [21]

Léčba

Primárně je léčba zaměřena základních onemocnění, které DIC vyvolalo, poté na život ohrožující komplikace a jako poslední se léčí samotná DIC. [21] [22]

2.14 Plicní embolie

Plicní embolie vzniká při uvolnění trombu z jiné části těla, většinou z dolní končetiny. Trombus se dostane až do plic, kde následně dochází k uzávěru plicního oběhu. Embolie není vždy tvořena jen krevními sraženinami, ale i vzduchovými bublinami či plodovou vodou. Tyto případy, ale nejsou tak časté. Mezi hlavní rizikové faktory vzniku embolie patří především vyšší věk nad 60 let, genetická predispozice (Leidenská mutace) a poruchy koagulačního systému. Tyto faktory jsou dané, a nemůžeme je nikterak ovlivnit. Naopak mezi ovlivnitelné faktory patří hormonální léčba včetně hormonální antikoncepce, nedostatek pohybu a obezita. Tyto faktory můžeme ovlivnit, případně toto riziko minimalizovat. Projevy plicní embolie jsou různorodé, záleží na míře uzavření cévy či tepny. Při uzavěru větší cévy či tepny v plicích dochází k přetížení srdce a k náhlému selhání oběhu, což může vést ke smrti. Při méně významném uzavěru plicního oběhu se objevují typické příznaky – bolest na hrudi, klidová dušnost, bolest mezi lopatkami, suchý kašel. Při podezření na plicní embolii se krev vyšetřuje na D – dimery a ostatní základní testy krevního srážení, případně CT s kontrastem nebo je provedena scintigrafie plic. Prvotní léčbou je podávání kyslíku, poté se podávají léky, které působí na rozpuštění trombu a zároveň zabraňují vzniku dalších trombů. [26]

2.15 Hluboká žilní trombóza

Při hluboké žilní trombóze dochází k uzávěru cév hlubokého žilního systému především dolních končetin. Toto onemocnění má velmi bolestivé příznaky a způsobuje otok postižené končetiny. Závažnou komplikací je pak plicní embolie.

Současný výskyt hluboké žilní trombózy a plicní embolie se nazývá tromboembolická nemoc. [30] [31]

Příčiny vzniku hluboké žilní trombózy jsou různé, stačí již dlouhodobá rekonvalescence po nemoci (dlouhodobá nepohyblivost dolních končetin, především lýtka). Dalším rizikovým faktorem je poškození cév či různá dědičná onemocnění především srdce a cév. Riziko hluboké žilní trombózy dále zvyšuje hormonální antikoncepce a substituční léčba léky, které obsahují ženský hormon estrogen. [30] [31]

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je srovnání výsledků hodnot D–dimerů v mg/l DDim a mg/l FEU. U rutinně změřených vzorků pomocí soupravy DD HS v mg/l DDim doměřit DD HS 500 v mg/l FEU jednotkách a porovnat korelaci mezi oběma metodikami. Najít a ověřit vztah mezi oběma používanými jednotkami, ve kterých jsou naměřené koncentrace D–Dimerů vyjadřovány.

4 METODIKA

4.1 Definice souboru

Vzorky, jejichž výsledky byly použity pro moji bakalářskou práci, byly odebrány v Ústřední vojenské nemocnici – Vojenské fakultní nemocnici Praha (ÚVN) a zpracovány na Oddělení hematologie a krevní transfuze (OHKT).

Do kontrolního souboru bylo zařazeno 65 vzorků pacientů, u kterých bylo indikováno rutinní změření koncentrace D – dimerů v plazmě.

4.2 Preanalytická fáze

Vzorky žilní krve byly správně odebrány pacientům dle platných postupů do zkumavky k rysce v uzavřeném vakuovém odběrovém systému Vacuette Vacutainer obsahující citrát sodný v poměru citrátu k odebrané krvi 1:9.

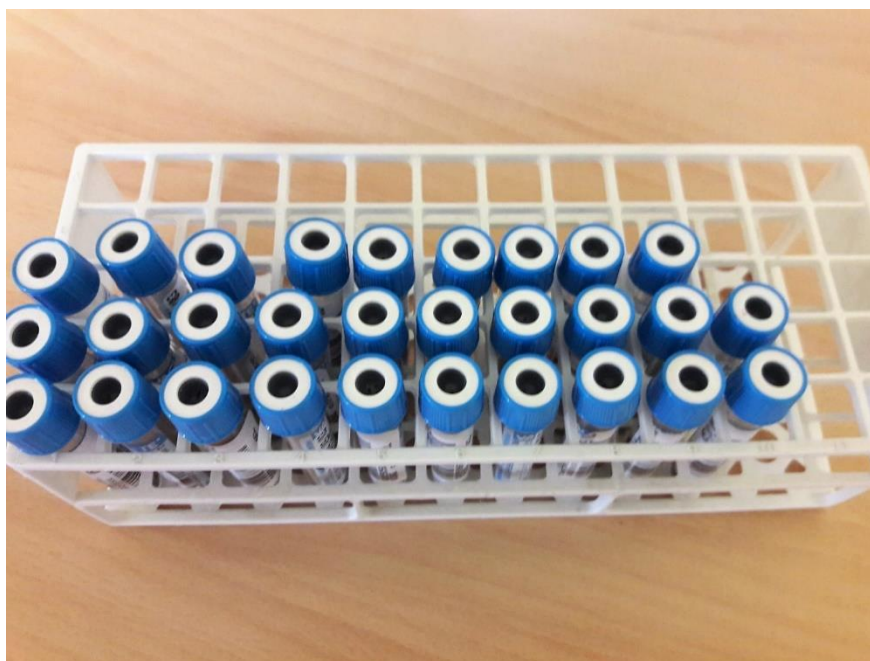
K měření byly zařazeny vzorky plazmy bez viditelné hemolýzy, chylozity a ikterity. Režim preanalytické fáze ACL TOP 550 proto nebyl využíván. Vzorky byly měřeny v běžném režimu z otevřených zkumavek.

4.2.1 Odběr krve

Během odběru je důležité dodržet několik základních pravidel, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. Pacient nemusí být ráno na lačno, může lehce a netučně posnídat, měl by být dobře hydratován. Také by pacient neměl před odběrem krve s indikací k měření D-Dimerů dostat intramuskulární injekci, tzv. falešnou pozitivitu, jelikož biologický poločas rozpadu D-dimerů v krvi je 8 hodin.

Venózní krev byla odebrána bez použití turniketu do zkumavky obsahující citrát sodný v poměru citrátu k odebrané krvi 1:9 Při odběru je nutné dodržet

poměr odebrané krve a protisrážlivého činidla (9:1). Obsah zkumavky šetrně promícháme – několikanásobným převrácením. Odběr plné krve nesmí být prováděn stříkačkou, provádí se venepunkcí bezpečným uzavřeným podtlakovým systémem, což zamezuje kontaminaci vzorku. [32]



Obrázek 9 Odebrané vzorky ve zkumavkách s citrátem sodným [vlastní zdroj]

Odebraný materiál je třeba neprodleně po odběru krve transportovat do laboratoře při teplotě 15–25°C. Nedodržení správného transportu může mít za následek zkreslení laboratorních výsledků. Následuje centrifugace při 2500 G, která odpovídá cca 4000 otáčkám za minutu. Centrifugace trvá po dobu 15 minut, čímž získáme plazmu chudou na destičky (PPP) k měření.

Separovaná plazma pro stanovení D-dimerů metodou LIA má stabilitu 8 h při 15-25 °C. Vzorek lze uchovat v lednici při 2-8 °C 24 hodin po odběru. Pro dlouhodobé uchování stability vzorku se zamrazí na -30 °C, takto může být vzorek uchován až 2 měsíce. Následně se vzorek se musí rozmrazovat při 37 °C ve vodní lázni a stanovení by mělo proběhnout do 2 hodin, případně je vhodné vzorek znovu centrifugovat. [33]

Pokud by byla získaná plazma pro měření D-Dimerů LIA metodou chylózní, mohlo by dojít k naměření falešně nižších výsledků měření. Tento stav může nastat obecně u pacientů s poruchou metabolismu lipidů – s vysokou triglyceridémií nad 13 g/l (odpovídá 15 mmol/l) [33]

Další omezení měření D–dimerů – interference:

V případě ikterické plazmy obsahující bilirubin lze tolerovat hodnotu do 306 $\mu\text{mol/l}$. Přítomnost hemolýzy naše měření neovlivní do koncentrace hemoglobinu do 5 g/l. Hodnota revmatoidního faktoru může být až do 1400 kIU/l. Ostatní FDP (fragmenty D+E) neinterferují do 10 mg/l. Nestandardní a velmi vysoké vzorky nad měřicí rozsah daný mezí linearity metody (nejsou diskutovány v této BP) je potřeba před změřením naředit systémovým roztokem Factor Diluent (fyziologický roztok). [32]

4.2.2 Příjem vzorků do laboratoře

Při příjmu vzorků musíme dbát na to, aby nedošlo k záměně vzorků. Proto je nutná dostatečná identifikace pacienta i vzorku. Také musíme zkontrolovat, zda souhlasí údaje na žádance a na vzorku. Ke vzorku v laboratoři se přiřadí identifikační číslo a štítek s kódem.

Žádanka na laboratorní vyšetření musí obsahovat tyto údaje:

- Jméno a příjmení
- Rodné číslo
- Odesílající oddělení se jménem lékaře
- Diagnóza
- Datum a hodina odběru
- Číslo zdravotní pojišťovny

4.2.3 Spolehlivost laboratorní metody

Správnost, také pravdivost měření

Správnost měření vyjadřuje, že se hodnota analytu shoduje se skutečnou hodnotou měřené veličiny. Je příčinou tzv. systematických chyb.

Preciznost měření

Preciznost měření vyjadřuje, že při opakovaných stanoveních analytu v jednom vzorku není překročen rozptyl výsledků stanovené meze. Je příčinou tzv. náhodných chyb.

Citlivost – senzitivita metody

Vyjadřuje požadovanou odezvu metody již na malé množství hledaného analytu.

Specifičnost metody

Specifičnost metody je schopnost selektivně měřit stanovovaný analyt a vyloučit interferující látky, které by mohli narušit specifitu.

Latexové imunoturbidimetrické stanovení D-dimerů vykazuje vysokou citlivost – senzitivitu 95–100 %. Spolu s vysokou senzitivitou je vykazována i plná negativní prediktivní hodnota 95–100 %. Měření v IR oblasti zaručuje nízkou specifitu (45%) právě pro D-Dimery s minimalizací interferencí při vlnové délce 671 nm

Výsledkem měření preciznosti a správnosti je verifikační protokol, který obsahuje jméno pracovníka, výsledky měření, potřebné reagentie a jejich identifikaci (katalogové číslo a číslo šarže).

V tabulce 1 a 2 můžeme vidět hodnoty dvou vzorků plazmy, která nám udává preciznost měření vzorku v sérii metodou D-Dimer HS 500 a D-Dimer HS. Výsledkem měření je průměrná hodnota koncentrace ze všech měření, směrodatná odchylka a variační koeficient měření.

Tabulka 1 Preciznost – opakovatelnost v sérii DD HS 500 pro ACL TOP 550 [vlastní zdroj]

	n	x_p	SD	CV %
Pacientský vzorek A	6	0,960	0,010	1,2
Pacientský vzorek B	9	0,443	0,019	4,0

Tabulka 2 Preciznost v sérii DD HS pro ACL TOP 550 [vlastní zdroj]

	n	x_p	SD	CV %
Pacientský vzorek A	10	0,720	0,01	1,4
Pacientský vzorek B	6	1,220	0,02	1,8

Variační koeficienty měření preciznosti v sérii všech čtyř vzorků pro obě metody byly ve shodě s výsledky výrobce uvedenými v příbalovém letáku obou metod. Výrobce uvádí pro měření preciznosti v sérii metodou DD HS 500: CV % = 2,9 a metodou DD HS: CV % = 2,0.

Variační koeficienty preciznosti v čase obou metod jsem neporovnávala, protože měření metodou DD HS 500 bylo v krátkém časovém úseku menším než 20 dní. Kontroly obsahovaly vysoké a nízké koncentrace D-dimerů a ležely uvnitř výrobcem deklarovaného intervalu.

Interference během měření dle výrobce jsou shodné pro obě soupravy Instrumentation Laboratory:

V případě ikterické plazmy neovlivní bilirubin měření D-Dimerů oběma metodami až do koncentrace 306 $\mu\text{mol/l}$. Přítomnost hemolýzy není měření ovlivněno až do koncentrace hemoglobinu do 5 g/l. Hodnota revmatoidního faktoru neovlivní výsledek až do hodnoty 1400 kIU/l. Ostatní FDP (fragmenty D+E) neinterferují do 10 mg/l. Nestandardní a velmi vysoké vzorky nad měřicí rozsah daný mezí linearity metody (nejsou diskutovány v této BP) je potřeba před změřením naředit Factor diluentem (fyziologický roztok). [33] [34]

Interference dané složením reagensů

Monoklonální protilátka (MA – 8D3), která se používá v latexové suspenzi vykazuje vysokou specifitu právě pro D-dimerové domény zesíťovaných fibrin degradačních produktů. Reakční pufr v soupravě obsahuje blokuující činidlo proti myším heterofilním protilátkám HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies), aby se v případě měření vzorku se vzácnou lidskou anti-myší protilátkou interference měření zcela minimalizovala a výsledky imunoanalýz nebyly falešně nadhodnoceny. [33] [34].

Tzv. anti-myší lidské protilátky jsou multispecifické, polyreaktivní, relativně slabé protilátky, které mohou být v krvi pacienta vzácně přítomné po indukci infekcí, po specifické léčbě nebo v případě některých revmatoidních onemocnění.

Také často diskutovaný prozónový neboli Hook efekt je při měření oběma soupravami vyloučen. Při tomto efektu dochází při vysokém přebytku antigenu, který vysytí protilátku v jedностupňových analýzách. k naměření falešně negativním či velice nízkým a nepřesným výsledkům. Tento efekt je během analýzy vyloučen po celý rozsah měření až do 69 mg/l DDim. (128 mg/lFEU). Analyzátor sám ředí vzorky automaticky již při hodnotách kolem 3 mg/l DDim (resp. 6 mg/l FEU). Vysoké vzorky s D-Dimery nad rozsah měření lze ručně doředit Factor Diluentem. [33] [34] [35]

4.2.4 Automatický koagulometr s optickou detekcí ACL TOP 550 (Werfen)

Diagnostika D – dimerů je velice senzitivní stanovení, kdy se měří vzorek plazmy s latexovou suspenzí, která je pokryta specifickou monoklonální myší protilátkou proti D–dimerům. Ty následně s touto protilátkou aglutinují a tvoří imunokomplex. Měření probíhá v infračervené oblasti při 671 nm. Při této vlnové délce jsou potlačeny běžné interference na minimum. Pokles intenzity světla paprsku při průchodu vzniklým imunokomplexem (zákalem) v této oblasti je přímo úměrný koncentraci D-dimerů v měřeném vzorku.



Obrázek 10 Optický koagulometr s optickou detekcí ACL TOP 550 [vlastní zdroj]

Analyzátor má SW uložený a validovaný pipetovací protokol. V následující tabulce uvádím parametry pipetovacího protokolu pro analyzátor ACL TOP 550.

Tabulka 3 Spotřeby reagensů pro ACL TOP 550 [vlastní zdroj]

	DD HS (objem v μl)	DD HS 500 (objem v μl)
Vzorek	18	20
Pufr	150	105
Latex	45	90

4.2.5 Měřicí soustavy

„D-Dimer vzniká odbouráváním fibrinové sraženiny v procesu fibrinolýzy za působení enzymu plazminu (tj. plazminolýzou). Současně se odbourává i fibrinogen na FDP (fibrinogen degradační produkty). Vytvoří se D-dimer, D-trimer a D-tetramer.“ [36]

D-dimery jsou obsaženy v rozpustných derivátech, které se vytvoří po degradaci zesíťovaného fibrinu plazminem. Pokud neobsahují inhibitory, tak štěpí nerozpustný zesíťovaný fibrin, čímž získáme řadu rozpustných derivátů. Jejich molekulová hmotnost závisí na rozsahu štěpení. Většina těchto štěpných produktů obsahuje neoantigen, který není na původní molekule fibrinogenu přítomný. Stanovení D-dimerů je užitečným nástrojem pro diagnostiku trombózy a je možné efektivní sledování poklesu koncentrace D-Dimerů poklesu při úspěšné léčbě. Vyšší hladiny D-dimerů se nacházejí i při PE, DVT nebo DIC. Výsledek negativního výsledku vykazuje vysokou negativní prediktivní hodnotu pro PE a DVT. [34]

Latexové činidlo je suspenzí polystyrenových latexových částic, které jsou potaženy F fragmentem monoklonální protilátky vysoce specifické pro D-dimer doménu, která je součástí derivátů rozpustných ve fibrinu. Použitím fragmentu F

umožňuje specifičtější detekci D-dimerů. Potažené latexové částice aglutinují v přítomnosti D-dimerů s latexovým činidlem a reakčním pufrům. Stupeň aglutinace je přímo úměrný koncentraci D – dimeru ve vzorku a je měřen pokles absorpance při průchodu světla agregáty imunokomplexu – imunoturbidimetrická analýza. [34]

4.2.6 D – dimer HS

Tato souprava se užívá pro stanovení D – dimerů v mg/l DDim jednotkách.

Reagencie

Souprava reaglií se skládá z reakčního pufru, latexové reagliie a kalibrační plazmy. Jedna souprava reaglií vystačí cca na 100 měření včetně kontroly kvality.

D-Dimer HS, REF 0020007700 Hemosil, Instrumentation Laboratory:

3 x 2 ml **Latex (Cat. No. 0020007720)** – lyofilizovaná suspenze polystyrenových latexových částic s myší monoklonální protilátkou

3 x 8 ml **Pufr (Cat. No. 0020007721)** – obsahuje fosfátový pufr a hovězí sérový albumin (BSA) se stabilizátory a konzervanty

2 x 1 ml **D – dimer kalibrátor (Cat. No. 0020007722)** – lyofilizovaný roztok částečně purifikovaný z lidského fibrinu štěpeného lidským plazminem, který obsahuje lidský sérový albumin, pufr, stabilizátory a konzervanty

Ke stanovení je nutný i Factor Diluent, systémový roztok používaný k ředění vzorků.



Obrázek 11 Souprava pro stanovení D-dimerů [vlastní zdroj]

Kontrolní materiál

D-Dimer Controls, REF (Cat. No. 00200013000)

Balený, tekutý materiál s deklarovanými hodnotami od výrobce

5 x 1 ml Low D-D Control 314 ng/ml (0,341 mg/l)

5 x 1 ml High D-D Control 677 ng/ml (0,677 mg/l)

Stabilita: originál. lahvička	2–8 °C do expirace v lednici
po otevření	2–8 °C 10 dní
zmrazené	- 30°C max. 2 měsíce

4.2.7 D – dimer HS 500

Tato souprava se užívá pro stanovení koncentrace D – dimerů v jednotkách mg/l FEU. [34]

Reagencie

Souprava reagensí se opět skládá z reakčního pufru, latexové reagencie a D – dimer kalibrátoru neboli kalibrační plazmy.

D-Dimer HS 500, REF 0020500100, Hemosil, Instrumentation Laboratory:

3 x 4 ml **Latex (Cat. No. 0020500110)** – lyofilizovaná suspenze polystyrenových latexových částic, které jsou potažené fragmentem F (ab¹)₂ myší monoklonální protilátky MA8D3 namířené k detekci a samotného D – dimeru v měřeném vzorku. Současně tento fragment potlačuje vliv endogenních faktorů jako např. revmatoidního faktoru.

Dále obsahuje pufr s obsahem hovězího sérového albuminu, stabilizátory a konzervační látky.

3 x 6 ml **Pufr (Cat. No. 0020500120)** – obsahuje hepes pufr a hovězí sérový albumin se stabilizátory a konzervanty

2 x 1 ml **D – dimer kalibrátor (Cat. No. 0020500130)** – lyofilizovaný roztok částečně purifikovaný z lidského fibrinu štěpeného lidským plazminem, který obsahuje lidský sérový albumin, pufr, stabilizátory a konzervanty

Kontrolní materiál

D-Dimer HS 500 Controls, REF (Cat. No. 0020500200)

Balený, tekutý materiál s deklarovanými hodnotami od výrobce

5 x 1 ml Low D-D Control 611 ng/ml FEU (0,611 mg/l FEU)

5 x 1 ml High D-D Control 1953 ng/ml FEU (1,953 mg/l FEU)

4.2.8 Údržba, čištění a kalibrace přístroje

Čištění přístroje

Minimálně 1x denně se provádí údržba – čištění všech sond neředěným roztokem Cleanu B. Tento roztok má vlastnosti ředěného chlornanu sodného, je tedy nutné pracovat s ním v rukavicích a bezpečně.

Kalibrace přístroje

Kalibraci provádíme, když měníme šarži reagensů nebo v případě nutnosti rekalibrace. Používáme automaticky opakované pětibodové kalibrace.

Kontrola kvality

Kontrola kvality probíhá interně či externě. Interní kontroly probíhají každé ráno, kdy se měří 2 kontrolní vzorky dané metody. Každá z kontrol má výrobcem deklarovanou hodnotu. Kontroly měříme na nízké a vysoké hladině, tzv. Low control a High control. Externí kontrolu kvality je zajištěna systémy SEKK ve spolupráci s ECAT, 4 x za rok.

4.2.9 Princip

Principem měření je senzitivní imunoturbidimetrický test. Latexová suspenze je pokrytá vysoce specifickou protilátkou pro D – dimery. Vzorek plazmy následně reaguje s touto protilátkou a dochází k aglutinaci na povrchu latexových částic. Měří se pokles intenzity světla v infračervené oblasti při 671 nm po průchodu zákalem. Zeslabení intenzity paprsku je přímo úměrné koncentraci D – dimerů ve vzorku. [33] [34]

4.2.10 Postup měření

Před vlastním měřením vzorků jsem provedla kontrolu reagensů a analyzátoru, především tedy zda je dostatečné množství reagensů a jejich správné umístění. Bylo také důležité zkontrolovat hladinu dalších systémových roztoků potřebných k analýze – Faktor Diluent a Cleaning solution. Následně jsem proměřila hladinu koncentrace komerčních kontrol v soupravě HemosIL™. Na základě platné kalibrační křivky SW analyzátoru zhodnotil výslednou koncentraci obou kontrol a přístroj byl připraven k měření vzorků.

Vzorky jsem nejprve centrifugovala 15 minut při 2500 ot. /min (odpovídá 4000G). Po vyjmutí vzorku z centrifugy jsem odstranila zátku ze zkumavky a vložila do stojánku k měření, tak aby čárový kód na zkumavce směřoval na čtečku v analyzátoru. Na počítači jsem aktivovala měření ikonkou „Running“. Nebylo třeba již zadávat požadavky k měření, jelikož systém si je načetl z LIS a po změření vzorků se výsledky převedly zpět do systému a po kontrole mohly být uvolněny kompetentním pracovníkem laboratoře.

4.3 Postanalytická fáze

Po změření plazmatické koncentrace D-dimerů Jsou výsledky následně odeslány ošetřujícím lékařům a uchovávány na oddělení v elektronické podobě. Žádanky na laboratorní vyšetření se uchovávají v tištěné podobě po dobu 5 let.

V případě pozitivního či sporného negativního výsledku D-dimerů se pro potvrzení výsledků používají zobrazovací techniky. Diagnostiku žilní trombózy provedeme nejlépe pomocí kompresní ultrasonografie. Toto vyšetření je specifické a nezatěžuje pacienta, jeho nevýhodou je však nutnost opakování po 2-3 dnech po negativním výsledku. Další metodou je kontrastní flebografie, která je však invazivní a pacienta zatíží zářením. Pro konečnou diagnostiku plicní embolie je nevhodnější stanovení pomocí EKG či RTG plic a perfúzně – ventilační scan. Z těchto metod patří mezi hlavní zobrazovací metody ultrazvuk žil a CT – angiografie. [37]

5 VÝSLEDKY

Pro srovnání koncentrace D – dimerů jsme vycházeli ze souboru, který obsahoval 65 vzorků. Do tohoto souboru jsme zahrnuli nejen patientské plazmy ale i sedm vzorků kontrolní plazmy a dalších šest EHK vzorků, které byli zaslány v rámci EHK firmou SEKK s.r.o. Výpočty a grafy byli vytvořeny pomocí softwaru Statistica 11 společnosti StatSoft ČR s.r.o.

5.1 Naměřené hodnoty

V této kapitole uvádím statisticky zpracované výsledky mého měření, kdy jsem zjišťovala koncentraci D–dimerů na analyzátoru ACL TOP 550 oběma soupravami – tj. metodikami ve dvou jednotkách, a to v mg/l DDim i v mg/l FEU.

V tabulce 4 uvádím cut-off hodnoty měřených parametrů, které jsou dány doporučením od výrobce a zároveň jsou v souladu s ČHS ČLS JEP. Laboratoř si případně tato cut-off může po provedení verifikace snížit, aby byl záchyt pozitivních pacientů co největší a tím se minimalizovalo riziko vydání falešně negativních výsledků u pacientů.

Tabulka 4 Hodnoty Cut off [33] [34]

Měřené parametry	Cut off
D – dimery v mg/l	0,230
D – dimery v mg/l FEU	0,500

V tabulce 5 jsou uvedeny počty měření a výsledky naměřených hodnot. Do měření jsme zahrnuli i vzorky z externí kontroly kvality SEKK (označené zeleně), které byly pro potřeby mé práce zamrazeny a po rozmrazení ve vodní lázni při 37 °C do 2 hodin změřeny. Dále jsme do kontrolního souboru zahrnuli vzorky kontrol (označené modře).

Tabulka 5 Primární naměřené hodnoty [vlastní zdroj]

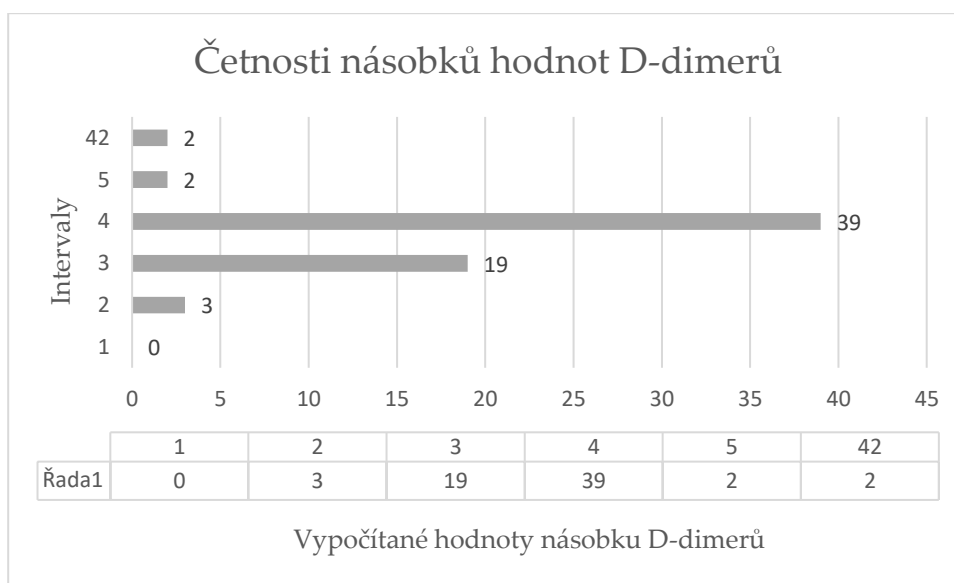
Počet měření	DD HS mg/l	DD HS 500 mg/l FEU	Vypočtený koeficient
1	0,145	0,529	3,648
2	0,516	1,791	3,470
3	0,160	0,559	3,493
4	0,521	1,653	3,172
5	0,521	1,791	3,437
6	0,517	1,765	3,413
7	0,570	1,756	3,080
8	0,149	0,442	2,966
9	0,003	0,122	40,666
10	0,072	0,199	2,763
11	0,118	0,546	4,627
12	0,450	0,959	2,131
13	5,730	16,754	2,920
14	3,154	9,608	3,046
15	0,185	0,262	1,416
16	0,353	0,489	1,385
17	0,061	0,194	3,180
18	3,630	8,952	2,458
19	0,069	0,212	3,072
20	0,056	0,168	3,000
21	0,564	1,987	3,523
22	0,319	0,956	2,996
23	0,333	1,086	3,261
24	0,074	0,263	3,554
25	0,051	0,098	1,921
26	0,062	0,237	3,822
27	4,775	17,412	3,646
28	0,380	1,216	3,200
29	0,029	0,189	6,517
30	0,807	1,837	2,276
31	0,145	0,535	3,689

Počet měření	DD HS mg/l	DD HS 500 FEU	Vypočtený koeficient
33	0,169	0,429	2,538
34	0,054	0,213	3,944
35	0,085	0,283	3,329
37	0,101	0,321	3,178
38	0,058	0,227	3,913
39	0,101	0,321	3,178
40	0,224	0,693	3,093
41	0,494	1,539	3,115
42	0,194	0,547	2,819
43	0,242	0,753	3,111
44	0,237	0,555	2,341
45	0,242	0,784	3,239
46	0,220	0,539	2,450
47	0,161	0,445	2,763
48	0,166	0,417	2,512
49	0,058	0,187	3,224
50	0,120	0,407	3,391
51	0,262	0,563	2,148
52	0,192	0,726	3,781
53	0,106	0,216	2,037
54	0,116	0,428	3,689
55	0,085	0,267	3,141
56	0,033	0,148	4,484
57	0,172	0,640	3,720
58	1,802	5,392	2,992
59	0,058	0,218	3,620
60	0,302	0,883	2,923
61	0,203	0,715	3,522
62	0,305	0,923	3,026
63	0,153	0,516	3,372
64	1,913	6,318	3,302
65	0,095	0,306	3,221

Na obrázku 13 je vidět četnost rozdílů naměřených hodnot, pro které jsme určily interval. Zjišťovali jsme vztah mezi jednotlivými měřeními pro každého pacienta zvlášť. Rozmezí intervalů hodnot bylo následující 0-1, 2-3, 3-4, 4-5, 5-42. Takto

rozsáhlé intervaly byly proto, že jedna hodnota byla velmi vysoká (při statistickém zpracování byla hodnota vyňata)

Z grafu lze vyčíst, že násobky u jednotlivých pacientů mezi hodnotami měřenými v mg/l a mg/l FEU se nacházely u 39 případů v intervalu od 3 do 4. Druhé obsáhlého intervalu od 2 do 3 dosáhlo 19 pacientů. Již dle těchto hodnot lze předpokládat, že v měřeném souboru se nepohybujeme v univerzálním přepočtovém koeficientu, který je udán vztahem: 1 FEU odpovídá přibližně 2 D-dimerovým jednotkám [38]



Obrázek 12 Graf četnosti násobků hodnot [vlastní zdroj]

5.2 Statistické zpracování naměřených dat

Jednotlivá naměřená data byla zpracována v programu Statistica 11 a v programu EXCEL.

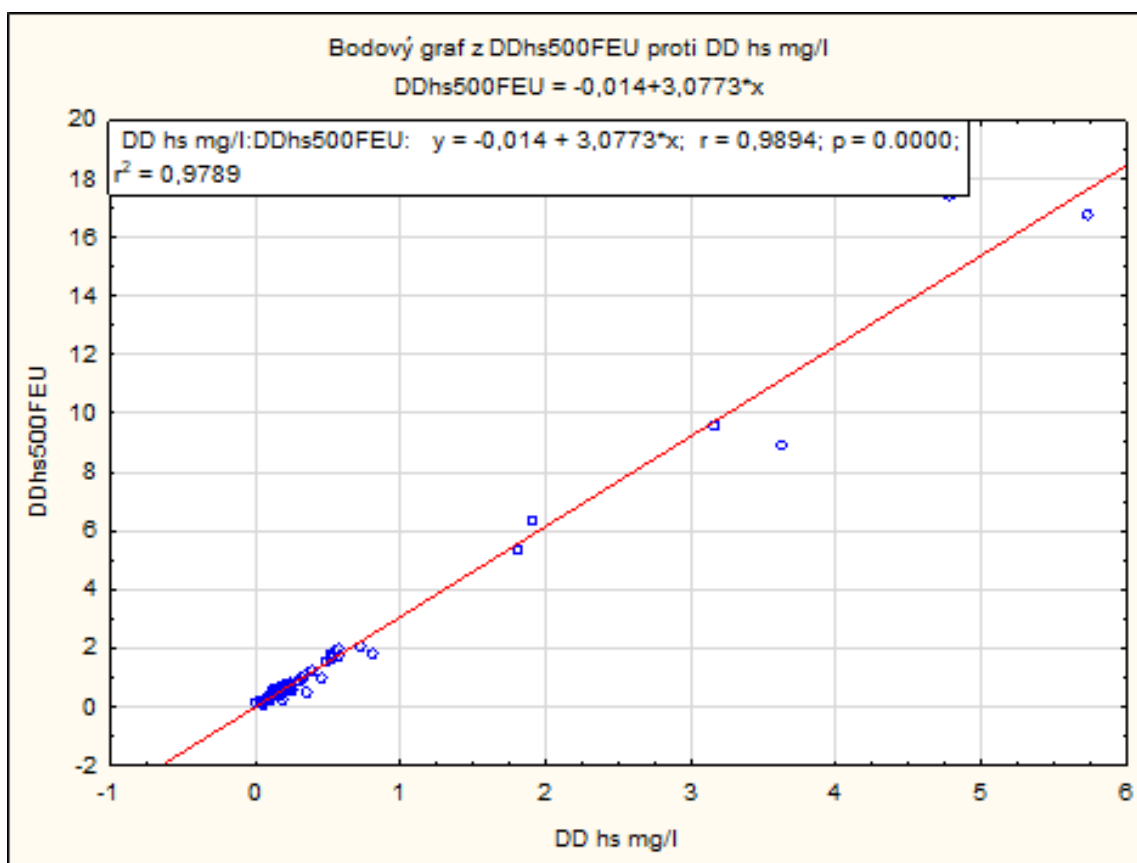
Deskriptivní statistika, která zde byla použita k vyhodnocení dat kvantitativně popisuje hlavní vlastnosti a stručně vystihuje podstatné informace o změřeném souboru. Pro naměřené hodnoty byly vytvořeny kvartilové grafy neboli boxploty, které vyjadřují rozptýlenost našich hodnot.

V tabulce 6 jsou uvedeny statistické hodnoty naměřených dat.

Tabulka 6 Deskriptivní statistika [vlastní zdroj]

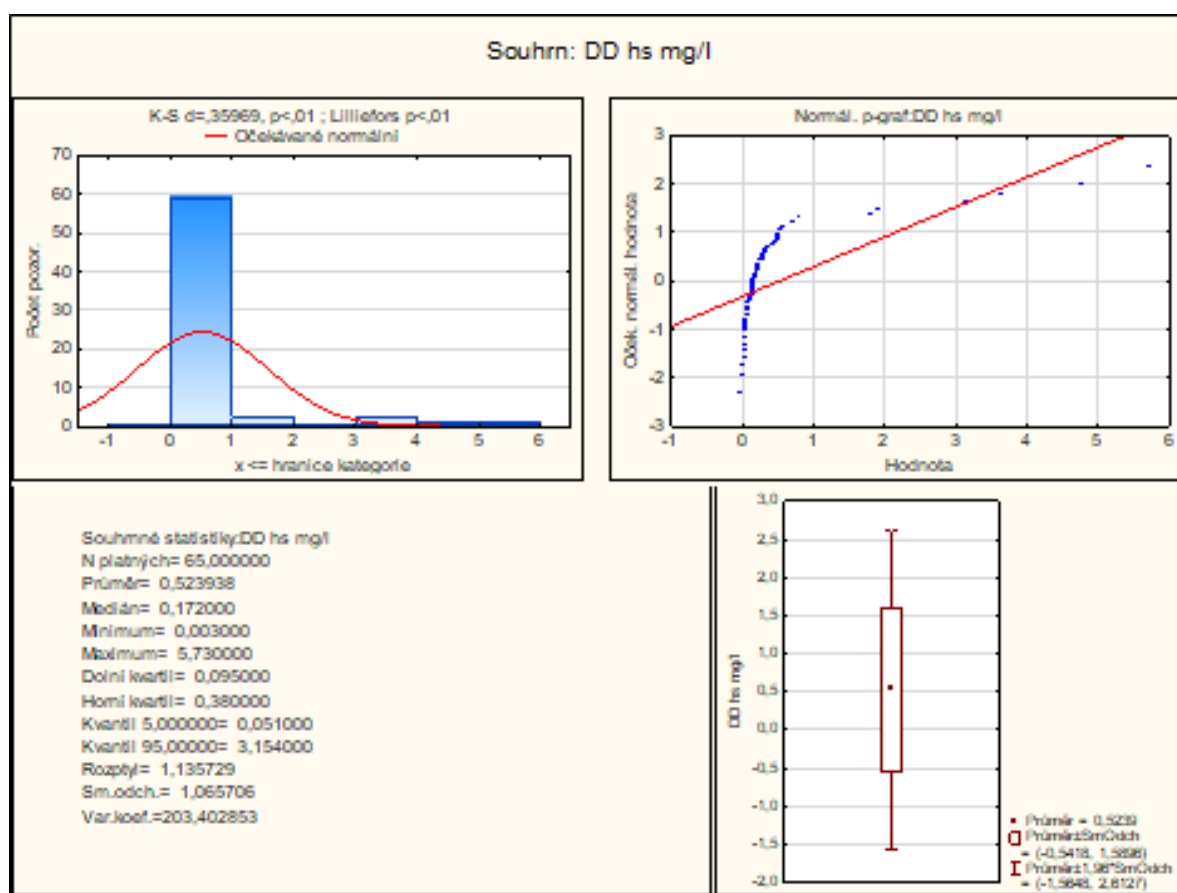
Proměnná	Popisné statistiky					
	N platných	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. Odch.
DD HS mg/l	65	0,524	0,172	0,003	5,73	1,066
DD HS 500 FEU	65	1,598	0,539	0,098	17,412	3,315

Na obrázku 14 je znázorněn QC graf pro srovnání hodnot DD HS mg/l FEU a DD HS v mg/l. Z grafu lze vyčíst rozptýlení naměřených hodnot.



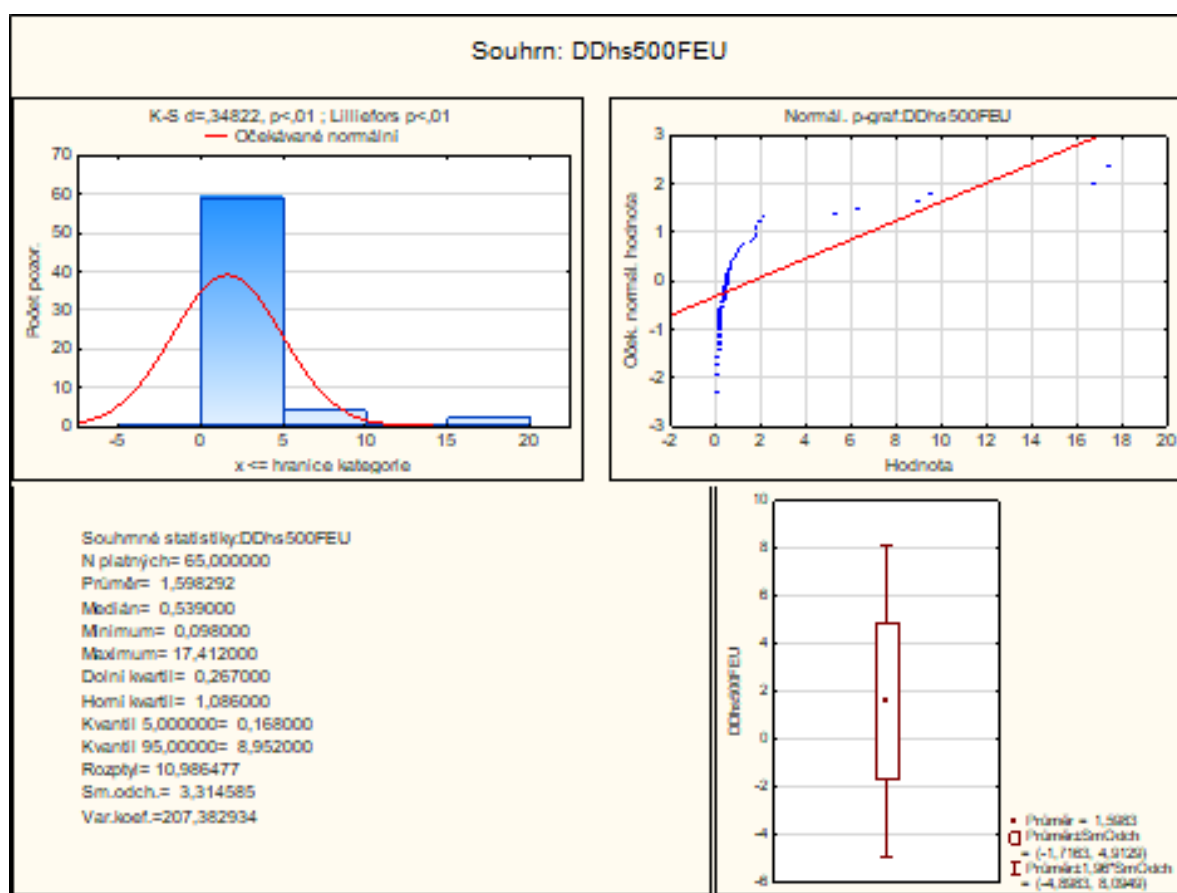
Obrázek 13 Pravděpodobnostní QC graf hodnot D – dimerů [vlastní zdroj]

Na obrázku 15 můžeme vidět grafické souhrny D – dimerů v mg/l. V levém horním rohu můžeme vidět naměřené hodnoty zobrazené pomocí histogramu s proložením Gaussovy křivky. V pravém horním rohu můžeme vidět pravděpodobnostní QC graf, který ověřuje normalitu naměřených hodnot v mg/l. Pod QC grafem vidíme krabicový graf – boxplot, který nám srovnává statistické údaje o naměřených hodnotách pro D–dimery v mg/l. Vyhodnocuje tedy podobu dat (dolní kvartil, kvantil, medián, horní kvartil atd.). Z grafu lze vyčíst, že nejvíce hodnot se nachází v intervalu od 0 do 1. Průměrná hodnota, kterou jsme získali po změření a statistickém vyhodnocení všech vzorků je 0,524 mg/l. Při zohlednění Cut off je tato hodnota již silně pozitivní.



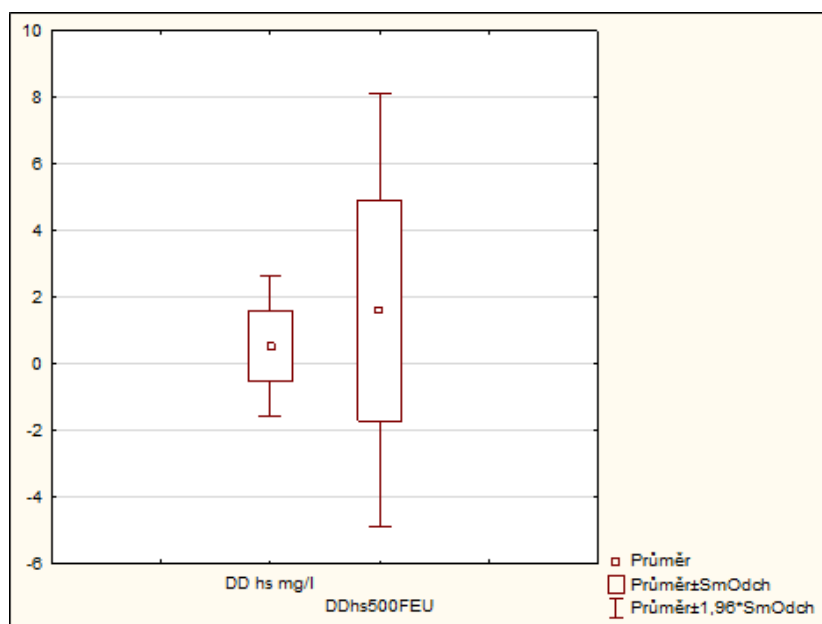
Obrázek 14 Výsledné grafy D – dimerů v mg/l [vlastní zdroj]

Na obrázku 16 můžeme vidět grafické souhrny D – dimerů ve FEU. V levém horním rohu můžeme vidět naměřené hodnoty zobrazené pomocí histogramu s proložením Gaussovy křivky. V pravém horním rohu můžeme vidět pravděpodobnostní QC graf, který ověřuje normalitu naměřených hodnot ve FEU. Pod QC grafem vidíme boxplot, který nám srovnává statistické údaje o naměřených hodnotách pro D – dimery. Vyhodnocuje tedy podobu dat (dolní kvartil, kvantil, medián, horní kvartil atd.) Z grafu lze vyčíst, že nejvíce hodnot se nachází v intervalu od 0 do 5. Průměrná hodnota, kterou jsme získali po změření a statistickém vyhodnocení všech vzorků je 1,598 mg/l. Při zohlednění Cut off je tato hodnota již silně pozitivní.



Obrázek 15 Výsledné grafy D – dimerů ve FEU [vlastní zdroj]

Na obrázku 17 můžeme vidět srovnání kvartilových grafů D – dimerů v mg/l i ve FEU.



Obrázek 16 Boxplot [vlastní zdroj]

V tabulce 7 vidíme párový T – test pro hodnoty D – dimerů v mg/l i ve FEU.

Tabulka 7 T – test pro závislé vzorky [vlastní zdroj]

T – test pro závislé vzorky (FEU_lida23042018)										
Rozdíly jsou významné na hladině významnosti $p < 0,05000$										
Proměnná	Průměr	Sm. Odch.	Počet vzorků (n)	Rozdíl	Sm. Odch (rozdílu)	t	sv	p	Int. spolehl. (-95 %)	Int. spolehl. (+95 %)
DD HS mg/l	0,524	1,066	65							
DD HS FEU	1,598	3,315	65	-1,074	2,265	-3,823	64	$3,01 \cdot 10^{-5}$	-1,636	-0,513

5.2.1 Vzájemné korelace

Korelace latinsky correlatio v překladu znamená „vzájemný vztah“ mezi dvěma procesy či veličinami. Pokud je tento vztah platný a dojde ke změně jedné veličiny, přiměřeně se změní i veličina druhá. Jedná se o obecný pojem, ale neobjasňuje nám orientaci vzájemných vztahů, tj. která veličina či metoda je závislá na druhé. V našem případě nám vyjádří závislost mezi použitými metodami. [39]

Míru korelace mezi dvěma hodnotami určuje korelační koeficient, který nabývá hodnot od -1 do +1. [39]

Spearmanův korelační koeficient

Spearmanův korelační koeficient Tento koeficient patří mezi neparametrické veličiny, který je stabilní vůči odchylkám od normality, jelikož pracuje pouze s pořadím hodnot. Spearmanův koeficient můžeme odhadnout pomocí vzorce uvedeného níže. Pokud jsou hodnoty x_i a y_i náhodně zpřeházené a Spearmanův korelační koeficient má hodnotu kolem 0 znamená to, že mezi sledovanými veličinami není žádný vztah. V případě, že tento koeficient nabývá hodnoty od -1 do 1, určuje nám závislost jedné veličiny na druhé. [39]

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n d_i^2}{n(n^2-1)}$$

Obrázek 17 Spearmanův korelační koeficient. Převzato z [39]

V tabulce 8 jsou statistické hodnoty spolu s hodnotou korelačního koeficientu. Z tabulky lze vyčíst, že hodnota korelace se blíží 1, což znamená vzájemnou závislost použitých metod na hladině významnosti $p < 0,05000$.

Tabulka 8 Statistické hodnoty a korelační koeficient [vlastní zdroj]

	DD HS v mg/l	DD HS ve FEU
SD	1,0657	3,3146
Medián	0,1720	0,5390
x_p	0,5239	1,5983
Korelační koeficient k		0,9894

6 DISKUZE

Nález zvýšené koncentrace D – dimerů v plazmě je průkazem probíhající fibrinolýzy, která následuje při odbourávání stabilního fibrinu. Jeho přítomnost je známkou aktivace krevního srážení případně sekundární nebo reaktivní primární hyperfibrinolýzy, která je indukována vzniklou krevní sraženinou. D – dimery jsou vhodným ukazatelem pro sledování pacienta na antikoagulační či antitrombotické léčbě, která při úspěšné léčbě může vést ke snížení či normalizaci plazmatické koncentrace. Cílem této práce bylo ověřit nebo rozporovat známý vztah, který je udáván v literatuře:

1 FEU odpovídá přibližně 2 D-dimerové jednotky [38]

To by ale mohlo vést k zavádějícímu přepočtu - nelze nikdy změřit koncentraci D–dimerů v mg/l DDim a následně výsledek přepočítat na mg/l FEU pouhým přenásobením dvěma. Dokonce by pak mohla nastat i situace, kdy výsledky D – dimerů vyjdou v mg/l DDim hraničně negativní, ale ve FEU jednotkách jsou již za hranicí cut-off (0,500 mg/l FEU), tj. pozitivní. V případě falešně zvýšených D – dimerů u relativně zdravého jedince a následného vyloučení podezření na PE, HŽT zobrazovacími metodami nebude pacient poškozen. V opačném případě, kdy nemocný bude dle výsledků D-Dimerů označen za falešně negativního je vysoce pravděpodobné, že pacienta bychom tímto výsledkem mohli poškodit, když bychom lékaři vydali nesprávný, resp. nepravdivý výsledek. Měření D-Dimerů provádí většina laboratoří vysoce senzitivní LIA metodou, která poskytuje dle výrobce 95–98 % citlivost.

V kapitole Výsledky nacházíme odpověď na vztah obou jednotek měření D-Dimerů v plazmě.

Bylo provedeno paralelní stanovení koncentrace D – dimerů pomocí LIA u 65 patientských plazem soupravami D – dimer HS a D – dimer HS 500. Následně byl vypočten korelační koeficient $R^2 = 0,9894$ dle Spearmanova korelačního koeficientu, ze kterého jsme zjistili, že korelace mezi měřenými metodami existuje – lineární regrese.

Výsledný vztah dle výpočtu mezi jednotkami mg/l DDim a mgFEU je až trojnásobný. Průměrná koncentrace 0,524 mg/l DDim patřila již mezi pozitivní hodnoty, jelikož námi používaný referenční interval normálních hodnot je v rozmezí od 0 – 0,230 mg/l DDim. Průměrná koncentrace v mg/l FEU byla vyhodnocena na hladině 1,598 mg/l FEU, zde se udávaný referenční interval normálních hodnot pro dospělé od 18 roku se pohybuje od 0 do 0,500 mg/l FEU.

U pacientů nad 50 let věku až do 80 let je velmi vhodné zavedení tzv. modifikovaného cut – off pro vyloučení falešně pozitivních výsledků.

$$\text{věk pacienta} \cdot 10 \cdot 0,001 = \text{mg/l FEU}$$

Toto je uvedeno i v doporučení ČHS ČLS JEP dle referenčního rozmezí koagulačních stanovení u dětí a dospělých, zda u pacientů se suspektní diagnózou na PE lze využít. Tento vztah je vhodný pouze pro zavedení cut – off hodnoty v mg/l FEU. Normální referenční rozmezí: 0 – 0,5 (nad 50 let kontinuálně přes 0,6 až do 0,8) mg/l FEU dle věku pacienta.

Vyloučení falešně pozitivní hodnoty D-dimeru významně přispívá k přesnému určení diagnózy a tím ke správné, včasné a účinné léčbě.

Pokud cut – off hodnota pro D – dimery HS 500 ve FEU je stanovena na 0,500 mg/l tj. 500 ng/ml a není vztažena na věk, mohou se zpřísnit laboratorní podmínky pro posouzení positivity čímž snížíme možný počet nebezpečných falešně negativních výsledků.

Za negativní hodnoty se považují koncentrace D-dimerů nižší než přibližně 0,200 – 0,250 mg/l DDim nebo při měření ve FEU jednotkách koncentrace nižší než 0,5 resp. 0,6 mg/l FEU. V dnešní době není známo žádné laboratorní vyšetření, které by jednoznačně indikovalo tromboembolickou nemoc (TEN). Hlavní marker, který přispívá k diagnostice TEN, je stanovení D-dimerů, které slouží rovněž jako důležitý marker trombofilních stavů. [18]

Při interpretaci výsledků je třeba se ohlížet na dvě důležitá kritéria. Prvním z nich je klinický stav pacienta a ostatní předchozí vyšetření např. případně při podezření na tromboembolické onemocnění se provádí vyšetření zobrazovacími technikami, které je důležité pro potvrzení či vyloučení konečné diagnózy. V případě jejich potvrzení určí i rozsah a klinickou závažnost onemocnění, což platí především pro ultrazvuk žil při trombóze či CT – angiografii plic a plicní scintigrafii při podezření na plicní embolii. [40]

Vyšetření, které se provádí mezi prvními patří laboratorní stanovení, jelikož vyšetření pomocí zobrazovacích metod je finančně náročné oproti rychlé laboratorní diagnostice, která je navíc i běžně dostupná. Důležitým krokem je dbát na správné jednotky, ve kterých vyšetření hodnotíme, zda se jedná o mg/l DDim či mg/ml FEU v literatuře i v praxi bývají velmi často jednotky u D-Dimerů nesprávně nebo neúplně uváděny a nezbyvá nám než se v dané situaci orientovat dle uvedeného referenčního rozmezí nebo cut-off, pokud je ale vůbec uvedeno.

„Je vhodnější vyjadřovat množství stanoveného D-dimeru v $\mu\text{g/l}$ nebo mg/l a ne v různých tzv. fibrinových ekvivalentních jednotkách (FEU), protože je zřejmé, že velká část fibrinogenových molekul není kompletně přeměněna na D-dimer.“ [41, s. 28]

Dle odborného článku, který napsal prof. J. E. Dyr z ÚHKT je tedy vhodnější měřit koncentraci D-dimerů v mg/l, jelikož ve fibrinových ekvivalentních

jednotkách není jisté, zda došlo ke konečné přeměně fibrinogenových molekul na D-dimery. Tím by mohlo dojít k falešné negativitě výsledné koncentrace, což by mohlo vést k vážným následkům a dokonce i ohrozit pacientův život.

Zde je nutno znovu poznamenat, že D-Dimer není na rozdíl od stanovení FDP specifický marker trombózy – při nálezů sporných pozitivních či negativních výsledků je nutné objektivně ověřit nález dle klinického stavu pacienta zobrazovacími metodami.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo porovnat hodnoty D – dimerů ve dvou jednotkách mg/l DDim a v mg/l FEU. V teoretické části práce jsme se zabývala základními vztahy a pojmy v hematologickém základu a problematikou stanovení D – dimerů. V praktické části jsem teoreticky shrnula laboratorní stanovení a provedla porovnání výsledků měření koncentrace D-dimerů v plazmě metodou kalibrovanou v jednotkách mg/l DDim proti metodě s kalibrací v mg/l FEU obě měřené LIA vysoce citlivou metodou od výrobce Instrumentation Laboratory (Werfen) na optickém koagulometru ACL TOP 550 CTS (Werfen).

Cílem bylo ověřit nebo rozporovat vztah, který je udáván v literatuře:

1 FEU je přibližně 2 D-dimerové jednotky [38]

Do souboru měření bylo zahrnuto 65 vzorků od dospělých pacientů, které byly statisticky zpracovány dvojím způsobem. Zjišťovala jsem hodnotu přepočtu pro každého pacienta a následně jsem vytvořila graf procentuálního zastoupení jednotlivých násobků v měřeném souboru. U většiny pacientů násobek mezi oběma jednotkami ne dvojnásobný, ale 3–4 násobný. Již v tomto měření se jsem správnost udávaného vztahu vyloučila.

Po vypočtení průměrných koncentrací jsem došla těmito výsledkům. Průměrná koncentrace všech výsledků souboru byla 0,524 mg/l DDim. Ve fibrinových ekvivalentních jednotkách nám průměrná koncentrace vyšla 1,598 mg/l FEU. Z naměřených výsledků vyplývá, že vztah mezi jednotkami je trojnásobný, což neodpovídá vztahu uváděnému v literatuře. Z výsledku korelačního koeficientu, který se blíží 1, lze metody využít k zastoupení. Je tedy na laboratoři, jaké jednotky při vyšetření využívá, je však na místě doporučit použití pouze jedné metody, případně při použití metod s výsledky vyjádřenými ve FEU jednotkách využívat přepočtu výsledků na věk. Z uvedených koncentrací vyplývá, že vztah

mezi jednotkami je až trojnásobný, což neodpovídá vztahu uváděnému v literatuře. Cíl bakalářské práce byl tímto splněn.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	Adenosindifosfát
APC	Aktivovaný protein C
APTT	Aktivovaný parciální tromboplastinový čas
ČHS ČLS JEP	Česká hematologická společnost Jana Evangelisty Purkyně
DDim	D-Dimery
DIC	Diseminovaná intravaskulární koagulopatie
DVT	Hluboká žilní trombóza
EPO	Erytropoetin
FDP	Fibrin degradační produkty
G – CSF	Granulocytární stimulující faktor
GM – CSF	Granulocyto – monocytární stimulující faktor
HAMA	Human Anti-Mouse Antibodies
HŽT	Hluboká žilní trombóza
IL - 1	Interleukin 1
IL - 3	Interleukin 3
IL - 6	Interleukin 6
IL - 11	Interleukin 6
IR	Infračervená oblast záření
LIS	Laboratorní informační systém
OHKT	Oddělení hematologie a krevní transfuze
PAI	Inhibitory aktivátoru plazminogenu
PC	Fosfatidilcholin

PE	Plicní embolie
PE	Fosfatidyletanolamin
PPP	Plazma chudá na destičky – Platelet Poor Plasma
PS	Fosfatidylserin
PT	Protrombinový čas
SM	Sfingomyelin
TAFI	Inhibitor fibrinolýzy aktivovaný trombinem
TEG	Tromboelastografie
TEN	Tromboembolická nemoc
TFPI	Inhibitor tkáňového faktoru
TNF	Tumor nekrotizující faktor
tPA	Tkáňový aktivátor plazminogenu
TPO	Trombopoetin
TT	Trombinový čas
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
uPA	Urokináza

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

9.1 Citovaná literatura

- [1] DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. 1. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [2] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krevetvorba*. 1. Český Těšín: FINIDR, 2002. ISBN 80-86682-01-3.
- [3] *Omic 's Clinical* [online]. b.r. [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <http://www.clinicalomics.com/articles/fda-clears-septicitye-lab-for-suspected-sepsis-patients/960>
- [4] PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. 1. Český Těšín: FINIDR, 2006. ISBN 80-86682-02-1.
- [5] PENKA, Miroslav. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [6] MOUREK, Jindřich. *Fyziologie*. První. Praha: Grada Publishing, 2012. ISBN 978-80-247-3918-2.
- [7] SEDLÁČKOVÁ, MUDr. *Stručné texty z hematologie*. b.r.
- [8] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha: Galén, 2012. ISBN 80-7262-32-49.
- [9] BOHONĚK, Miloš. *Trombocyt*. Ústřední vojenská nemocnice, 2016.
- [10] VYDRA, Jan a Petr CETKOVSKÝ. *Hematologie v kostce*. 1. vydání. Praha: Mladá fronta a.s., 2015. ISBN 978-80-204-3698-6.
- [11] LANDOVÁ, Ludmila. *Speciální koagulační vyšetření: Vyšetření krvácivých poruch*. Ústřední vojenská nemocnice, 2016.
- [12] Trombofilní stavy. *Www.labtest.cz* [online]. b.r. [cit. 2018-02-28]. Dostupné z: www.labtestsonline.cz/trombofilni-stavy.html
- [13] Trombofilie. *Www.trombofilik.cz* [online]. b.r. [cit. 2018-04-02]. Dostupné z:

<https://trombofilik.cz/category/trombofilie/>

- [14] ŠTUKA, Čestmír. Virchowova triáda. In: *Www.wikiskripta.eu* [online]. 2012 [cit. 2018-05-05].
- [15] *Tromboembolická nemoc* [online]. b.r. [cit. 2018-05-04]. Dostupné z: <https://trombofilik.cz/tromboembolicka-nemoc/>
- [16] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu III. 1.* Český Těšín: FINIDR, 2004. ISBN 80-86682 -03-X.
- [17] BECKE, Richard. *Cévní a lymfatický systém. 1.* LF, 2016.
- [18] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie hemostázy. První.* Český Těšín: FINIDR, 2004. ISBN 808668203X.
- [19] ŠLECHTOVÁ, Jitka. *Klinická biochemie a metabolismus. 2007, 15(2).* ISSN 1210 - 7921.
- [20] LANDOVÁ, Ludmila. *Koagulace: Plazmatický koagulační systém a koagulační kaskáda.* ÚVN, 2016.
- [21] MATÝŠKOVÁ, Miroslava, Jiřina ZAVŘELOVÁ a Ingrid HRACHOVINOVÁ. *Hematologie pro zdravotní laboranty. První.* Brno: MIKADA, 1999. ISBN 8070132787.
- [22] PROCHASKA, Jürgen H., Bernd FRANK a Markus NAGLER. Age-related diagnostic value of D-dimer testing and the role of inflammation in patients with suspected deep vein thrombosis. *Scientific Reports. 2017, (7).* DOI: 10.1038/s41598-017-04843-x.
- [23] MAVROMATIS, B. H. a C.M. KESSLER. D-Dimer testing: the role of the clinical laboratory in the diagnosis of pulmonary embolism. *J Clin Pathol. 2001.* ISSN 54:664–668.
- [24] *Vyšetřování D-dimerů v Hradci Králové* [online]. b.r. [cit. 2018-02-20]. Dostupné z: <http://www.medila.cz/website/news/news/ddimeryhk/>

- [25] D-dimers. *Practical haemostasis* [online]. b.r. [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: www.practical-haemostasis.com/Fibrinolysis/d_dimers.html
- [26] Fibrinogen degradační produkty. *Www.exbio.cz* [online]. b.r. [cit. 2018-02-28].
- [27] DEMPFLÉ, Carl. Stanovení antigenu D-dimeru v klinické rutině. *Deutsches Aerzteblatt*. 2005, 102(7).
- [28] *Farmakoterapeutické informace*. 2016, (10). ISSN 1211-0647.
- [29] PENKA, Miroslav. *Diseminovaná intravaskulární koagulace*. Grada, 1990. ISBN 8024703416.
- [30] Hluboká žilní trombóza. <https://cs.medlicker.com> [online]. 2017 [cit. 2018-03-19].
Dostupné z: <https://cs.medlicker.com/943-hluboka-zilni-tromboza#vysetreni-na-d-dimery>
- [31] *Hluboká žilní trombóza* [online]. b.r. [cit. 2018-03-11]. Dostupné z: <https://trombofilik.cz/hluboka-zilni-tromboza/>
- [32] ČERMÁKOVÁ, Marta a Irena ŠTĚPÁNOVÁ. *Klinická biochemie 1. díl. 2*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2010. ISBN 978-80.7013- 515-0.
- [33] *Příbalový leták D - dimer HS*. b.r.
- [34] *Příbalový leták D - dimer HS 500*. b.r.
- [35] ŠTERN, Petr. *Interference při imunoanalýzách*. VFN a 1. LF UK Praha, b.r.
- [36] KOPÁČ, J. *Lékařská laboratorní diagnostika*. 1. Turnov: Lékařská laboratoř, 2004.
- [37] WIDIMSKÝ, J. *Doporučení diagnostiky, léčby a prevence plicní embolie*. 2007.
Dostupné z:
http://www.kardiocz.cz/data/upload/Doporučení_diagnostiky_lečby_a_prevence_plicni_embolie_verze_2007.pdf

- [38] PENKA, Miroslav. *Hematologie I. První*. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-247-0023-9.
- [39] Korelace. *Portál matematická biologie* [online]. b.r. [cit. 2018-05-01].
- [40] ŠTEFÁNEK, Jiří. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. b.r. [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/>
- [41] DYR, J. E. *Sborník příspěvků ke konferenci XI. Česko – slovenská konference laboratorní hematologie: Co stanovují testy na D-Dimer?*. Hradec Králové, 2006. ISBN 80-86780-29-5.
- [42] DYR, Jan Evangelista a Jiří SUTTNAR. *Platelet adhesion to fibrinogen, fibrin monomer, and fibrin protofibrils in flowing blood : the effect of fibrinogen immobilization and fibrin formation*. 2006.
- [43] *Hematopoéza* [online]. b.r. [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f0/Hematopoiesis_simple.svg/440px-Hematopoiesis_simple.svg.png
- [44] Platelets. In: *Www.wikipedia.cz* [online]. b.r. [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Platelet>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Krevní elementy. Převzato z [3]	14
Obrázek 2 Krvetvorba. Převzato z [43]	20
Obrázek 3 Aktivované a neaktivované trombocyty. Převzato z [44]	23
Obrázek 4 Váhy trombofilie vs. Koagulace. Převzato z [20]	29
Obrázek 5 Virchowova triáda. Převzato z [14]	31
Obrázek 6 Struktura fibrinogenu. Převzato z [25]	41
Obrázek 7 Schéma štěpení rozpustného fibrinu. Převzato z [18].....	43
Obrázek 8 Schéma štěpení nerozpustného fibrinu. Převzato z [18].....	43
Obrázek 9 Odebrané vzorky ve zkumavkách s citrátem sodným [vlastní zdroj]	53
Obrázek 10 Optický koagulometr s optickou detekcí ACL TOP 550 [vlastní zdroj].....	58
Obrázek 11 Souprava pro stanovení D-dimerů [vlastní zdroj].....	61
Obrázek 12 Graf četnosti násobků hodnot [vlastní zdroj]	68
Obrázek 13 Pravděpodobnostní QC graf hodnot D – dimerů [vlastní zdroj]	70
Obrázek 14 Výsledné grafy D – dimerů v mg/l [vlastní zdroj]	71
Obrázek 15 Výsledné grafy D – dimerů ve FEU [vlastní zdroj]	72
Obrázek 16 Boxplot [vlastní zdroj]	73
Obrázek 17 Spearmanův korelační koeficient. Převzato z [39].....	74

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Preciznost – opakovatelnost v sérii DD HS 500 pro ACL TOP 550 [vlastní zdroj]	56
Tabulka 2 Preciznost v sérii DD HS pro ACL TOP 550 [vlastní zdroj]	56
Tabulka 3 Spotřeby reagentů pro ACL TOP 550 [vlastní zdroj]	59
Tabulka 4 Hodnoty Cut off [33] [34]	65
Tabulka 5 Primární naměřené hodnoty [vlastní zdroj]	66
Tabulka 6 Deskriptivní statistika [vlastní zdroj]	69
Tabulka 7 T – test pro závislé vzorky [vlastní zdroj]	73
Tabulka 8 Statistické hodnoty a korelační koeficient [vlastní zdroj]	74