



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích**  
**Zdravotně sociální fakulta**  
**Katedra laboratorních metod a informačních systémů (KLI)**

**Bakalářská práce**

**Stanovení koagulačního faktoru VIII – zhodnocení výsledků různých  
metod v závislosti na typu kauzální mutace v genu pro faktor VIII  
u pacientů s hemofilii A**

Vypracovala: Kateřina Housková  
Vedoucí práce: RNDr. Ingrid Hrachovinová, Ph.D.

České Budějovice 2014

## Abstrakt

Hemostáza je pro život nezbytná, jedná se o schopnost organismu zastavit krvácení a současně udržet tekutost krve v neporušeném cévním řečišti. Jde o mechanismus, který udržuje rovnováhu mezi sklonem ke krvácení a trombóze. Na funkci hemostázy se podílí krevní destičky, cévy a plazmatické faktory. K zástavě krvácení dochází vytvořením primární zátky tvořené agregátem krevních destiček. Zpevněním fibrinovými vlákny vzniká definitivní koagulum.

Faktor VIII je nazýván antihemofilický globulin nebo antihemofilický faktor. Jedná se o plazmatický glykoprotein, tvořený dvěma nekovalentně spojenými řetězci. Z těžkého, složeného z domén A1-A2-B a z lehkého, složeného z domén A3-C1-C2. V plazmě koluje spolu s von Willebrandovým faktorem. Z této vazby se uvolňuje po aktivaci FVIII trombinem. Větší množství faktoru VIII vzniká v játrech, menší pak ve slezině, uzlinách, slinivce, ledvinách a svalech. Aktivita FVIII se měří historicky dvěma způsoby a) jednofázovou metodou, kdy je směs plazmy s deficitem FVIII a pacientské plazmy testována pomocí testu APTT a v případě nedostatku FVIII v pacientské plazmě dochází k prodlužování času měření; b) dvoufázovou metodou, kdy v prvním kroku dochází k tvorbě FVIIIa a FXa a v druhé fázi se tvoří trombin a fibrin. Dvoufázová metoda je náročnější na provedení, a proto se postupně přestala používat. Po vyvinutí chromogenních substrátů byla tato metoda nahrazena metodou chromogenní, kdy v prvním kroku za přítomnosti FIXa, fosfolipidů a  $Ca^{2+}$  dojde k vytvoření FVIIIa a FXa a ve druhém kroku vznikne přidáním chromogenního substrátu žluté zbarvení. Deficit FVIII způsobuje závažné krvácivé onemocnění, hemofilii A.

Hemofilie A je jedna z nejčastějších vrozených poruch krevního srážení. Postihuje především muže, přibližně 1 z 10 000 obyvatel, ženy toto onemocnění pouze přenášejí na své potomky.

Cílem mé práce bylo:

1. Porovnat výsledky stanovení funkční aktivity FVIII jednofázovou koagulační a dvoufázovou chromogenní fotometrickou metodou u jednotlivých pacientů se středně těžkou a lehkou hemofilií A.
2. Rozdělit výsledky dle kritéria uvedeného v publikaci (Pavlova et al. 2010).
3. Stanovit poměrné množství pacientů, kteří mají výrazný rozdíl aktivity FVIII stanovené dvěma prováděnými metodami.
4. Stanovit podíl pacientů, u kterých byla zpřesněna diagnóza vyšetřením FVIII dvoufázovou chromogenní metodikou.

V teoretické části své práce jsem se věnovala tomu, co je to vlastně hemostáza a jejímu rozdělení na primární a sekundární. Dále jsem zmínila koagulační systém a popsala koagulační faktory, jejich poločas rozpadu, místo vzniku a funkci. Uvedla jsem koagulační kaskádu. Podrobněji jsem se věnovala faktoru VIII, který byl předmětem mé práce, uvádím historii, stanovení a gen tohoto faktoru. Další část je věnovaná hemofilii A, charakteristice, popisu dědičnosti onemocnění, historii, klinickým projevům, laboratorní diagnostice, léčbě a substituci.

Praktická část práce obsahuje výčet použitých reagensů a materiálu, postup příjmu a skladování biologického materiálu, přípravu reagensů, měření kalibračních křivek, stanovování kontrol a analýzu vzorků. Měření jsem prováděla od května do září 2013 v laboratoři pro poruchy hemostázy v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze, kde jsem zaměstnaná. Vyšetřila jsem celkem 76 pacientů, hemofiliků A, kteří byli minimálně 8 dní bez jakékoli léčby nebo substituce. U pacientů bylo vyšetření FVIII oběma metodami indikováno ošetřujícím lékařem jako odpovídající skrínig hemofilie A. Pacientským vzorkům jsem přiřadila čísla, aby byla zajištěna anonymita pacientů. Pracovala jsem na automatickém koagulačním analyzátoru STA-R Evolution® od firmy Diagnostica Stago, a.s.a., který pracuje na principu fotometrie a chronometrie. Stanovovala jsem faktor VIII jednofázovou koagulační a dvoufázovou chromogenní metodou a porovnávala jsem výsledky. Genetická část byla zpracována v genetické laboratoři, která je součástí našeho oddělení.

Získané výsledky obou metod u 76 pacientů jsem zpracovala do tabulky i grafu. V souboru bylo 14 (18%) středně těžkých a 56 (74%) lehkých hemofiliků, dále 6 (8%) hemofiliků, kteří nesplňovali kritérium lehké hemofilie A, ale klinicky spadali mezi lehké hemofiliky. Na základě přijatého kritéria jsme zjistili, že 15 (20%) pacientů mělo poměr  $FVIII:C_{1st}/FVIII:Chr$  nebo  $FVIII:Chr/FVIII:C_{1st} \leq 0,6$ , výrazně se tedy u nich lišili hodnoty FVIII stanovené jednofázově koagulačně a FVIII stanovené dvoufázově chromogenně. Celkem u 11 pacientů byla aktivita FVIII vyšší u jednofázové koagulační metody. Z toho u 3 pacientů  $FVIII:C_{1st}$  byl dokonce na hranici normy, zatímco FVIII chromogenně byl v průměru 16%.

U 14 pacientů s rozdílnými výsledky se nám podařilo najít kauzální mutaci ve FVIII, u 1 pacienta jsme genetiku nemohli vyšetřit z důvodu chybějícího genetického materiálu. Mutace u pacientů s nižší aktivitou FVIII chromogenní dvoufázovou metodou byly soustředěny převážně do A3 domény, mutace u pacientů s nižší aktivitou FVIII jednofázovou koagulační metodou byly soustředěny v doméně A2.

Z prezentovaných výsledků vyplývá, že každý pacient s lehkou a středně těžkou hemofilií A by měl mít stanoven FVIII oběma metodami.

Klíčová slova: Hemostáza  
Hemofilie  
Faktor VIII

## **Abstract**

Hemostasis is essential to life; it is the ability of organism to stop bleeding and to maintain the fluidity of the blood in an intact vascular bed at one time. This is the mechanism that maintains the balance between the tendency to bleeding and thrombosis. Platelets, blood vessels, and plasma factors participate on the hemostasis. Creating the primary plug consisting of aggregated platelets leads to stop the bleeding. Fibrin fibers harden the plug and form the definite clot.

Factor VIII is called antihemophilic globulin or antihemophilic factor. It is a plasma glycoprotein composed of two noncovalently associated chains. One chain is a heavy one, comprising domains A1- A2- B and the light chain composed of the domains A3- C1-C2. Factor VIII circulates in plasma together with von Willebrand factor. Factor VIII is released from this binding upon activation with thrombin. Larger quantities of factor VIII are produced in the liver, the minor amount in the spleen, lymph nodes, pancreas, kidney and muscle. FVIII activity was measured in two ways from historical reasons a) a one-phase method, where a mixture of FVIII deficient plasma and patient plasma is analyzed using APTT assay; the absence of FVIII in the patient plasma leads to lengthening of the time, b) two-phase method, where the first step leads to formation of FVIIIa and FXa and in the second phase there are thrombin and fibrin created. Two-phase method is difficult to implement in routine laboratory, and therefore it was stopped using during time. This method was substituted by the chromogenic method after development of the chromogenic substrates, where there is in the first step created FVIIIa and FXa in the presence of FIXa, phospholipids and Ca<sup>2+</sup>, and in the second step there is formed a yellow coloration by the addition of the chromogenic substrate. FVIII deficiency causes a severe bleeding disorder, hemophilia A.

Hemophilia A is one of the most common congenital disorders of the blood coagulation. It affects mainly men, approximately 1 in 10,000 of the population; women only transmit the disease to their offspring.

The aim of my thesis was:

1. Compare the results of the first determination of the functional activity of FVIII (one-phase clotting method) and two-phase chromogenic photometric method for individual patients with moderate and mild hemophilia A.
2. Divide results by the criterion mentioned in the publication (Pavlova et al. 2010).
3. Determine the relative number of patients who have a significant difference of the FVIII activity analyzed by two implemented methods.
4. Determine the proportion of patients in whom the diagnosis was refined by examination of FVIII with chromogenic methodology.

The theoretical part of my work is devoted to what hemostasis is and its division into primary and secondary ones. I also mentioned the coagulation system and described the coagulation factors, their half-lives, spot of a formation and function. I stated the coagulation cascade. I focused in more detail on factor VIII, which was the subject of my thesis; I present the history, determination and the gene of this factor. Another section of my thesis is dedicated to hemophilia, characteristics, and description of the inheritance of the disease, history of the disease, clinical manifestations, laboratory diagnosis, treatment and substitution.

The practical part consists of a list of the reagents and materials, processes, receiving and storage of biological material, reagent preparation, measurement of calibration curves, setting controls and analysis of samples. I performed measurements from May to September 2013 at Coagulation laboratory at the Institute of Hematology and Blood Transfusion in Prague, where I was employed. I examined in total 76 patients, hemophiliacs A, who were at least 8 days without any treatment or substitution. These patients were indicated to the examination of FVIII by both methods by their treating physician as an appropriate screening for hemophilia A. I assigned numbers to patient's samples to ensure anonymity of patients. I worked with the automatic coagulation analyzer STA- R Evolution® from Diagnostica Stago, which works on the principle of photometry and chronometry. I determined the factor VIII by one-phase method and two-phase method and I compared the results.

The genetic part of the work was analyzed in the genetic laboratory, which is part of our department.

I worked up the results obtained from both methods in 76 patients to the table and the graph. The group included 14 (18 %) moderate and 56 (74 %) of mild hemophiliacs, then 6 (8%) hemophiliacs who did not meet the criterion of a mild hemophilia A, but clinically they belonged into mild hemophiliacs. Based on the stated criteria, we found out that 15 (20 %) patients had a ratio of FVIII: C1st/FVIII: Chr or FVIII: Chr / FVIII: C1st  $\leq 0.6$ , they differed significantly in their values set by one-stage clotting FVIII and FVIII set by the chromogenic method. A total of 11 patients with FVIII activity were higher in the single-phase method. At three patients FVIII: C1st was even on the upper limit of the normal value, while FVIII chromogenic method gave on average 16%.

We managed to find a causal mutation in the FVIII in 14 patients with “the different results”, we could not investigate 1 patient genetically because of the missing genetic material. Mutations in patients with lower activity of FVIII set up by the chromogenic two-phase method were concentrated predominantly into the A3 domain; mutations in patients with FVIII a lower activity set up by one-phase clotting assay were concentrated in the A2 domain.

The results presented show, that diagnostic of any patient with mild or moderate hemophilia A should include determination of FVIII by both methods; FVIII: C1st and FVIII: Chr.

Keywords: Hemophilia

Hemostasis

Factor VIII

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 5.5.2014

.....  
Kateřina Housková



## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé práce RNDr. Ingrid Hrachovinové, Ph.D. za pomoc a poskytování důležitých rad a informací. Dík patří také mým kolegyním a kolegovi z laboratoře pro poruchy hemostázy z Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze, za jejich spolupráci a podporu. Další velké dík patří mé rodině za podporu a trpělivost.

## OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>13</b>
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Hemostáza .....</b>	<b>15</b>
1.1.1 Primární hemostáza.....	15
1.1.2 Sekundární hemostáza.....	15
<b>1.2 Koagulační systém.....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Koagulační faktory .....	16
1.2.2 Koagulační kaskáda .....	20
<b>1.3 Faktor VIII.....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Historie FVIII.....	23
1.3.2 Gen pro FVIII.....	25
1.3.3 Princip stanovení FVIII.....	26
<b>1.4 Hemofilie .....</b>	<b>28</b>
1.4.1 Charakteristika hemofilie .....	28
1.4.2 Dědičnost .....	28
1.4.3 Historie.....	29
1.4.4 Hemofilie A.....	30
1.4.5 Klinický obraz .....	30
1.4.6 Laboratorní diagnostika .....	30
1.4.7 Léčba a substituce.....	31
<b>2. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Cíl práce .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2 Hypotézy.....</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIÁLY A METODIKA.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Preanalytická fáze .....</b>	<b>33</b>

3.1.1 Použitý materiál.....	33
3.1.2 Příprava a skladování biologického materiálu .....	34
<b>3.2 Analytická fáze .....</b>	<b>35</b>
3.2.1 Analyzátor STA-R Evolution® .....	35
3.2.1.1 Kalibrace.....	37
3.2.1.2 Interní kontrola kvality .....	38
3.2.1.3 Externí kontrola kvality .....	38
3.2.2 Jednofázová metoda-koagulační – FVIII:C <sub>1st</sub> .....	38
3.2.2.1 Použité reagensy.....	38
3.2.2.2 Kalibrace.....	39
3.2.2.3 Kontrola kvality .....	40
3.2.2.4 Provedení testu.....	40
3.2.3 Dvoufázová metoda-chromogenní – FVIII:Chr.....	40
3.2.3.1 Použité reagensy.....	40
3.2.3.2 Kalibrace.....	40
3.2.3.3 Kontrola kvality .....	41
3.2.3.4 Provedení testu.....	42
3.2.4 Pracovní postup .....	42
<b>3.3 Postanalytická fáze.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4. Výpočet a statistické vyhodnocení.....</b>	<b>43</b>
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>44</b>
<b>5. DISKUSE .....</b>	<b>51</b>
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>53</b>
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>54</b>

## Seznam použitých zkratk

AGH – Antihemofilický globulin

AMK - Aminokyselina

APTT – Aktivovaný parciální tromboplastinový čas

EGF – Epidermal growth factor–like

FI – Faktor I, Fibrinogen

FII – Faktor II, Protrombin

FV – Faktor V, Proakcelerin

FVII – Faktor VII, Prokonvertin

FVIII – Faktor VIII, Antihemofilický globulin

FIX – Faktor IX, Antihemofilický faktor

FX – Faktor X, Stuart-Prowerův faktor

FXI – Faktor XI, Rosenthalův faktor

FXII – Faktor XII, Hagemanův faktor

FXIII – Faktor XIII, Faktor stabilizující fibrin

pNA – Paranitroanilin

OD/min (mn) – změna optické jednotky za jednotku času (minutu)

PL – Fosfolipid

SOP – Standardní operační postup

SOPT – Standardní operační postup přístroje

TF – Tkáňový faktor

ÚHKT – Ústav hematologie a krevní transfuze

vWF – von Willebrandův faktor

WHO – Světová zdravotnická organizace

## ÚVOD

Hemofilie A je krvácivé onemocnění vázané na X chromosom, které je způsobeno různě hlubokým deficitem koagulačního faktoru VIII (FVIII). Podle mezinárodního doporučení (White et al. 2001) je rozdělena podle aktivity FVIII do skupin těžké (<1% FVIII), středně těžké (1-5% FVIII) a lehké formy (5-40% FVIII) hemofilie A.

Změřit správně FVIII je velmi důležité jak pro diagnózu, tak i pro léčbu koncentráty FVIII. Dvě různé metody měření koagulační aktivity FVIII (FVIII:C), jednofázová (FVIII:C<sub>1st</sub>) a dvoufázová, byly zavedeny již v 50. letech minulého století. V 70. letech byla upravena dvoufázová metoda na chromogenní dvoufázovou metodu (FVIII:Chr). Metody se od sebe liší způsobem aktivace jednotlivých faktorů koagulační kaskády.

U většiny hemofilických pacientů je aktivita FVIII:C oběma metodami identická. Před 20 lety se objevily studie, které poukazovaly na rozdílné hodnoty FVIII:C získané těmito metodami u středně těžkých a lehkých hemofiliků. Publikované práce prokazovaly, že více než u 50 % hemofiliků s rozdílnými výsledky byla vyšší aktivita jednofázovou metodou. To bylo závažné zjištění, protože většina laboratoří po celém světě měří FVIII:C jednofázovou metodou a nepřesné měření by mohlo vést k podhodnocení diagnózy hemofilie A. I když do dnes není známo, která metoda lépe reflektuje závažnost hemofilie A, bylo popsáno, že pacienti s normální aktivitou FVIII:C<sub>1st</sub> a nízkou aktivitou FVIII:Chr mají krvácivé projevy.

Hemofilie A je velmi heterogenní onemocnění, které je způsobeno obrovským množstvím různých kauzálních mutací. Od konce 90. let prokazují mnohé práce, že „FVIII:C rozdílný fenotyp“ je způsoben určitým typem kauzálních mutací.

Důvodem této studie a vybrání tématu mé bakalářské práce bylo prokázat rozdílné výsledky FVIII:C měřené FVIII:C<sub>1st</sub> a FVIII:Chr u skupiny středně těžkých a lehkých hemofiliků A. Stanovit u těchto pacientů kauzální mutaci v genu pro FVIII, porovnat genotyp a fenotyp. Stanovit množství pacientů, kteří budou profitovat ze stanovení FVIII metodou FVIII:Chr.

První část mé práce je věnována teorii: hemostáze, faktoru VIII a hemofilii A. V metodické části jsem popsala použité reagentie, materiál a přístroje. Dále jsem se věnovala podrobnému popsání dvou metod stanovení aktivity FVIII, zacházení s biologickým materiálem, popsání použitého koagulačního analyzátoru STA-R Evolution® a stanovení aktivity FVIII u 76 pacientů v laboratoři pro poruchy hemostázy v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze.

## **1. Teoretická část**

### ***1.1 Hemostáza***

Hemostáza je nezbytná pro život, je to schopnost organismu zastavit krvácení a současně udržet tekutost krve v neporušeném cévním řečišti. Jde o velmi složitý mechanismus, který udržuje rovnováhu mezi sklonem ke krvácení a zvýšeným srážením, tedy trombóze. Na hemostáze se podílí především cévy, krevní destičky a plazmatické faktory (Penka et al. 2011, s. 31).

K zástavě krvácení dochází vytvořením primární zátky tvořené agregátem krevních destiček. Zpevněním fibrinovými vlákny vzniká definitivní koagulum.

#### ***1.1.1 Primární hemostáza***

Primární hemostáza je proces tvorby agregátu krevních destiček, tedy primární cévní zátky. Jde o zacelení porušené cévy, k tomu dochází právě díky destičkovému agregátu.

Při poranění jako první nastane vazokonstrikce (zúžení) cévy, to způsobí zmenšení průsvitu cévy a tím i zmenšení průtoku krve daným místem. Následně dojde k vytvoření prvotní destičkové sraženiny, k adhezi a agregaci destiček.

#### ***1.1.2 Sekundární hemostáza***

Prvotní destičková sraženina je druhotně zpevněna fibrinovým vláknem. Fibrin vzniká prostřednictvím koagulační kaskády, která je rozdělena na tři cesty: vnější, vnitřní a společnou. Vnější cesta zahrnuje tkáňový faktor a faktor VII. Vnitřní cesta obsahuje faktor XII, XI, IX, VIII, prekalikrein, vysokomolekulární kininogen. Společná cesta zahrnuje tvorbu trombinu z protrombinu a tvorbu fibrinu z fibrinogenu. Krátkou chvíli po vazokonstrikci následuje vazodilatace (rozšíření) cévy, která usnadňuje rychlé odplavení hemostaticky aktivních látek a udržuje srážení pouze v místě poranění.

## ***1.2 Koagulační systém***

Cílem koagulace je tvorba pevného fibrinového vlákna a zástava krvácení. Fibrinové vlákno vzniká postupnou, přesně koordinovanou a regulovanou kaskádovitou enzymatickou reakcí.

### ***1.2.1 Koagulační faktory***

Faktory, které jsou v krvi jako neaktivní formy – proenzymy, jsou štěpeny na aktivní formy - enzymy. Tyto látky označujeme jako koagulační faktory a značíme je „F“ a římskou číslicí, aktivované formy s malým „a“ (Penka et al. 2011, s. 43). Faktory II, VII, IX, X jsou nazývány vitamín K-dependentní, to proto, že k jejich správné funkci je zapotřebí vitamín K. Bez tohoto vitamínu nedojde ke karboxylaci  $\gamma$ -karboxyglutámového aminokyselinového zbytku a daný koagulační faktor není schopen vazby na  $\text{Ca}^{2+}$  a fosfolipidy.

#### **Faktor I – Fibrinogen**

Fibrinogen je velký glykoprotein přítomný v plazmě a v granulích destiček, je to faktor s nejvyšší koncentrací v plazmě. Jeho poločas rozpadu je přibližně 100 hodin. Molekulu tvoří dimer, který je složený ze tří různých polypeptidových řetězců,  $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  a  $\gamma$ . Fibrinogen má tři vazebná místa pro  $\text{Ca}^{2+}$ , pokud jsou tato místa obsazena, nedochází k štěpení fibrinogenu plazminem.

Fibrinogen je štěpen buď trombinem na fibrin nebo plazminem (Matýšková et al. 1999, s. 43). Může být štěpen enzymy podobnými trombinu, jedná se především o hadí jedy.

Koncentrace fibrinogenu stoupá při poranění, zánětech a v těhotenství.



## Faktor II – Protrombin

Poměrně stabilní faktor s poločasem rozpadu 60 – 96 hodin, který je tvořen v játrech. Je závislý na vitamínu K, který je potřeba k jeho řádné funkci. Jeho aktivní forma, trombin, hraje klíčovou roli v koagulaci, štěpí fibrinogen na fibrin, aktivuje FXIII, je schopen i aktivace FIX. V koagulační kaskádě katalyzuje tři skupiny reakcí, které regulují tvorbu krevního koagula, aktivaci buněk, při které vzniknou povrchy pro koagulační reakce, k podpoře probíhající koagulace a zpevnění koagula a naopak zabránění nadměrnému srážení.

## Tkáňový faktor

Tkáňový faktor (TF) je buněčný kofaktor, který se v organismu vyskytuje na buňkách, které se nedostanou do kontaktu s krví. Za normálních podmínek tedy není přítomen na krevních elementech, cévních endoteliích a necirkuluje v plazmě. Jde o jednořetězový apoprotein o hmotnosti 45 kD. TF zahajuje koagulaci tvorbou komplexu s koagulačním FVII a VIIa (Matýšková et al. 1999, s. 42).

## Faktor V – Proakcelerin

Faktor V je plazmatický kofaktor homologní s faktorem VIII. Tvoří se v játrech a megakaryocytech, nalézá se v plazmě a granulích krevních destiček (Matýšková et al. 1999, s. 39). Poločas rozpadu je 12 – 15 hodin, molekulová hmotnost je 330 kDa a minimální aktivita potřebná k zástavě krvácení je udávána 10-15%. FV stabilizují  $Ca^{2+}$  a jsou nutné k jeho aktivaci, může být aktivován také plazminem, elastázou neutrofilů nebo destičkovým kalpainem. Faktor V Leiden je název genové mutace, která způsobuje hyperkoagulační stavy s vážnými klinickými důsledky, nejčastěji způsobuje hlubokou žilní trombózu.

## Faktor VII – Prokonvertin

Faktor s velmi krátkým poločasem, 4 – 5 hodin. Jeho syntéza probíhá v játrech, nachází se i v séru. Aktivovaná forma FVII je tvořena lehkým a těžkým řetězcem. FVII je schopen štěpit faktor X. Je aktivován FXa, FXIIa, FXIa, IXa a komplexem TF-FVIIa (Matýšková et al. 1999, s. 35). Aktivita stoupá v těhotenství a s věkem.

## Faktor VIII – Antihemofilický globulin

Tomuto faktoru se podrobněji věnuji v samostatné kapitole 1.3.

## Faktor IX – Antihemofilický faktor

Jinak také nazývaný Christmasův faktor. Má dlouhý poločas, do 30 hodin. Syntéza probíhá v játrech, nalézáme jej i v séru. Molekulová hmotnost je 56 kDa. Množství potřebné k zástavě krvácení je udáváno 20 – 30% jeho aktivity. Je aktivován FXIa a FVIIa.

## Faktor X – Stuart-Prowerův faktor

Je tvořen v játrech jako dvouřetězový glykoprotein, který je přítomen i v séru. Jeho biologický poločas je uváděn kolem 40 hodin. Molekulová hmotnost je 56 kDa. K zastavení krvácení je zapotřebí přibližně 20% jeho aktivity. Je aktivován komplexem: FIXa, fosfolipidy,  $Ca^{2+}$ , FVIIIa, kterému se říká tenka a komplexem FVIIa-TF.

#### Faktor XI – Rosenthalův faktor

Faktor XI je dvouřetězový glykoprotein vznikající v játrech. Jeho poločas v plazmě je 48 – 60 hodin, molekulová hmotnost je 160 kDa. Minimální hladina pro krevní srážení je 15 – 20% aktivity. Je aktivován proteolýzou FXIIa, FVIIa a trombinem a aktivuje FIX a tím napomáhá formaci a stabilitě fibrinu. V plazmě koluje v komplexu s vysokomolekulárním kininogenem.

#### Faktor XII – Hagemanův faktor

Vyskytuje se v plazmě i v séru, jeho biologický poločas je 50 – 70 hodin, molekulová hmotnost je 80 kDa. Skládá se ze dvou řetězců, lehkého a těžkého. Zvýšená hladina tohoto faktoru se objevuje u žen po menopauze a v těhotenství. K jeho aktivaci dochází kontaktem se subendotelovými strukturami při poranění nebo proteázami (Matýšková et al. 1999, s. 37). FXIIa aktivuje FXI a prekalikrein.

#### Faktor XIII – Faktor stabilizující fibrin

Poslední faktor koagulační kaskády. V plazmě se vyskytuje navázaný na molekulu fibrinogenu, dále se vyskytuje v placentě, játrech a buněčných komponentách. Asi 50% celkové aktivity FXIIIa obsahují destičky. Biologický poločas je 72 – 160 hodin, molekulová hmotnost je 320 kDa. Je aktivován trombinem za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  (Matýšková et al. 1999, s. 36). Hraje velmi důležitou roli v hojení ran, udržení těhotenství a v hemostáze.

### 1.2.2 Koagulační kaskáda

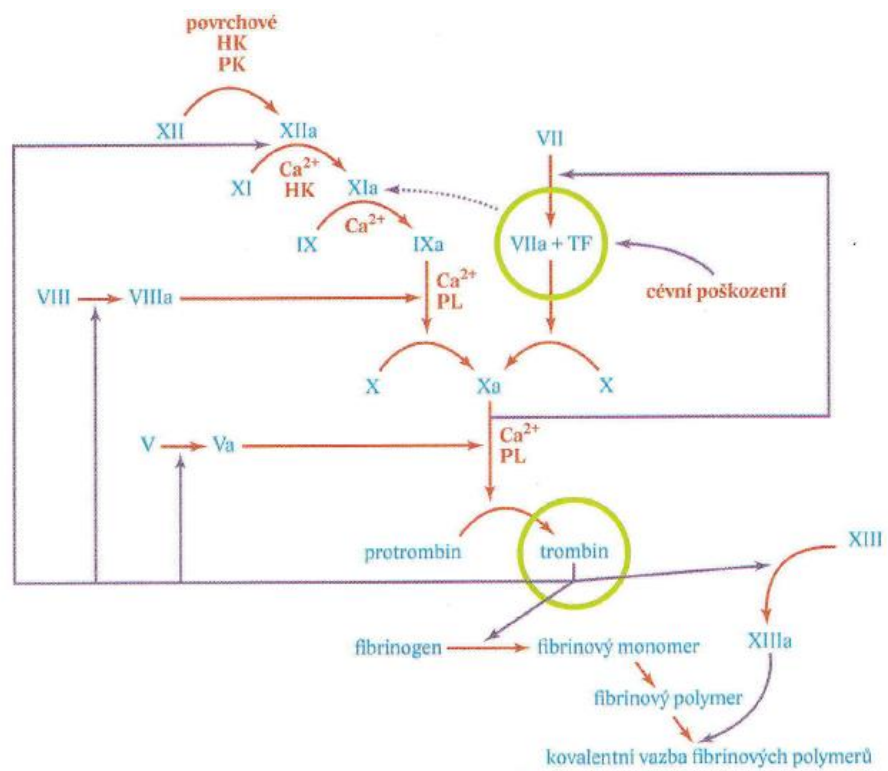
Teorie z 60. let tvrdí, že se koagulační kaskáda dle způsobu aktivace, dělí na zevní a vnitřní systém. Spojují se při aktivaci FX. K aktivaci zevního systému je potřeba tkáňový faktor, uvolňovaný např. v případě poraněním nebo aktivací monocytárních buněk toxiny, k aktivaci vnitřní cesty dochází kontaktem FXII a FXI s aktivním povrchem, fyziologicky s kolagenem obnaženým po poranění (Matýšková et al. 1999, s. 29).

Později došlo k opravě této teorie. K aktivaci koagulace dochází po vytvoření komplexu tkáňového faktoru (TF) s FVIIa, který aktivuje FX na FXa. FVIIa je ve stopových množstvích běžně přítomen v krvi. Stopová množství FVIIa aktivují FX na FXa. Malá množství FXa jsou schopna štěpení FVIII na FVIIIa a FV na FVa. Komplex TF/FVIIa dále aktivuje také FIX a zasahuje i do vnitřní cesty.

Po aktivaci FXa následuje tvorba komplexu zvaného protrombináza. Tato je fyziologickým aktivátorem protrombinu a je složena z FXa, kofaktoru FVa navázaného na povrch fosfolipidů (PL) za přítomnosti  $Ca^{2+}$ . Tento komplex štěpí neaktivní protrombin na  $\alpha$  trombin a fragmenty protrombinu 1+2 (F1+2) (Penka et al. 2011, s. 44). Trombin je jediný koagulační enzym, který je schopen štěpit fibrinogen na fibrin.

Působením trombinu dochází k odštěpení fibrinopeptidu A a B z řetězce  $A\alpha$  a  $B\beta$  fibrinogenu. Uvolnění fibrinopeptidu A probíhá rychleji než uvolnění fibrinopeptidu B. Odštěpením těchto peptidů se obnaží vazebná místa v centrální E doméně a vznikají fibrinové monomery. Tyto spontánně polymerizují na rozpustný fibrin (Matýšková et al. 1999, s. 30).

Na rozpustný fibrin působí FXIIIa a tím vznikají pevné kovalentní příčné vazby mezi jednotlivými vlákny a vytváří se trojrozměrná síť stabilního, nerozpustného fibrinu. Fibrin zpevní primární destičkové koagulum a dochází ke vzniku pevné krevní sraženiny. Tím je uzavřen vlastní proces krevního srážení. Koagulační kaskáda viz obrázek 1.



Obrázek 1 – Koagulační kaskáda

Zdroj: Pospíšilová et al. 2013

### 1.3 Faktor VIII

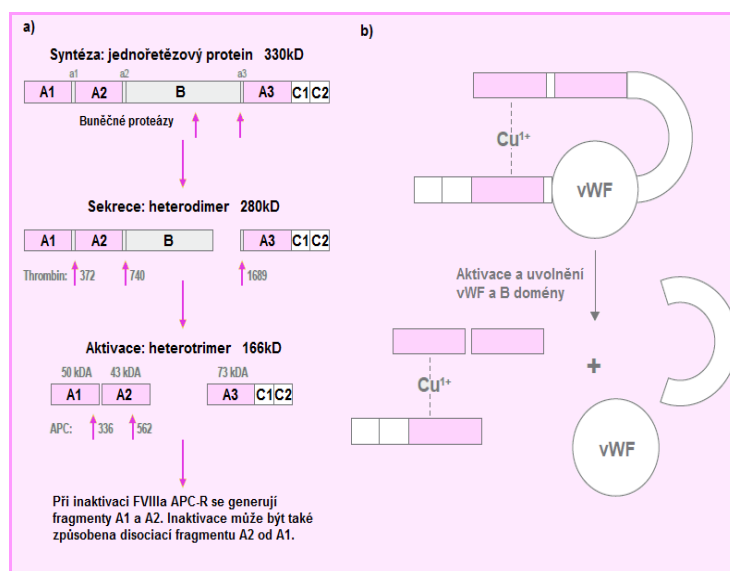
Faktor VIII nazývaný antihemofilický faktor nebo také antihemofilický globulin je plazmatický glykoprotein,  $\beta$ -globulin, který je velmi citlivý k enzymatické degradaci. V plazmě koluje v komplexu s von Willebrandovým faktorem (vWF). Z vazby na vWF se uvolňuje po aktivaci trombinem. Vzniká v játrech, méně ve slezině, uzlinách, slinivce, svalech a ledvinách. Zvláštní je, že játra neprodukují faktor VIII, není-li v krvi přítomen vWF.

Molekulová hmotnost faktoru VIII je 330 kDa, poločas rozpadu je 8 – 12 hodin. Poločas rozpadu bez přítomnosti VWF je pouze 2 hodiny. Faktor VIII je tvořený ze dvou nekovalentně spojených řetězců: těžkého, složeného z domén A1-A2-B a lehkého, složeného z A3-C1-C2 domén. A1, A2 a A3 domény jsou kulovité, doména B je velmi dlouhá. Doména A2 obsahuje několik vazebných míst (558-656 a 698-710) pro FIXa. Doména A3 obsahuje vazebné místo (1811-1818) pro sekundární domény EGF(epidermal growth factor-like) FIX. Doména A1 obsahuje vazebné místo pro FX. Doména C2 obsahuje 4 peptidové smyčky umožňující ukotvení k fosfolipidové membráně. Také obsahuje vazebné místo (2303-2332) pro vWF.

Trombin, a v menší míře FXa, štěpí FVIII na několika místech. Působí na N-konec lehkého řetězce a uvolňuje a3 zónu z domény A3. V důsledku toho je štěpena vazba vWF, což usnadňuje vazbu FVIII na membrány fosfolipidů. Trombin štěpí vazbu mezi A1 a A2 doménami, které jsou spojeny slabými elektrostatickými vazbami. Tím vznikne heterotrimer obsahující A1 (50 kDa), A2 (43kDa) a A3 - C1 - C2 (73kDa) domény, známý jako aktivovaný FVIIIa. Trombin a FXa rovněž působí na B doménu, trombin proteolyzuje Arg740 - Ser741 v a2 zóně, což vede k úplnému uvolnění B domény. Aktivní FXa také může aktivovat FVIII a to v místech: Arg336 - Met337, Arg372 - Ser373, Arg740 - Ser741, Arg1689 - Ser1690 a Arg1721 - Ala1722. FVIII aktivovaný tímto způsobem je méně aktivní, než když je štěpen/aktivován trombinem.

V koagulační kaskádě se vyskytuje FVIIIa v komplexu s faktorem IXa, fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$ . Tento komplex označujeme tenáza. Je důležitý pro tvorbu FXa.

Zvýšenou hladinu FVIII nalézáme v plazmě při stresu, infekcích nebo při zánětech. Naopak pokles hladiny faktoru pozorujeme při vrozených nebo získaných poruchách. Mezi vrozené poruchy řadíme hemofilii A a vonWillebrandovu chorobu. Mezi poruchy získané se řadí inhibitor VIII.



Obrázek 2 – Schéma aktivace a inaktivace FVIII.

### 1.3.1 Historie FVIII

Antihemofilický globulin objevil v roce 1936 až 1938, Patek et al. Není známo, proč dostal číslo VIII, ačkoliv byl objeven dříve než faktor V a VII.

Příčina krvácení u hemofiliků dlouho zůstávala záhadou i přes relativně velký počet těchto případů po celém světě. Vysvětlením je pravděpodobně nedostatek metod pro vyšetřování a hodnocení krevního srážení. Původně byl větší sklon ke krvácení vysvětlován pouze abnormalitou vápníku, protrombinu, fibrinogenu nebo krevních destiček, nebo přebytkem heparinu, případně antithromboplastinu.

V roce 1927, Frank a Hartmann zjistili, že destičky a protrombin (Bordets proserozyne) byly v krvi hemofiliků normální. Autoři publikovali teorii, že v hemofilické krvi byl přebytek stabilizační látky, která měla tendenci inhibovat aktivaci protrombinu.

V roce 1936 skupina Pateka zjistila, že 1 díl normální plazmy koriguje dlouhý čas srážení 40 dílů hemofilické plazmy. Zkrácení způsobil globulin, který byl termolabilní a byl přítomný i v normální plazmě zbavené fibrinogenu a protrombinu. „Globulinová substance“ podávaná intravenózně hemofilikům korigovala čas srážení jejich plazmy (Lozner and Taylor, 1939). Protein byl dále purifikován a nazván *antihemofilický globulin*.

První frakcionace normální lidské plazmy k získání antihemofilického globulinu, byla ve skutečnosti provedena již Bendienem a van Creveldem v letech 1937 až 1939.

Zdá se, že Feisslyho plazmatický aktivátor (1941) byl totéž jako antihemofilický globulin (AHG). I mnoho jiných badatelů získalo plazmatické frakce, které byly pravděpodobně stejné jako AHG: Widenbauer a Reichel (1941) - prothrombokinase, Lenggenhager (1936,1944) - prothrombokinin, Apitz (1942) - X-faktor, a Laki (1943,1944) - plasmakinin.

Quick et al. (1935) jasně ukázal, že obsah protrombinu v plazmě hemofiliků byl normální. Nicméně, Brinkhouse (1939), ve své studii zjistil, že se trombin tvoří velmi pomalu při spontánním srážení krve hemofiliků. Když pacient dostal krevní transfuzi, protrombin na trombin se přeměňoval mnohem rychleji. Jelikož přidání tromboplastinu ke vzorku hemofilické plazmy zkrátilo dlouhou dobu srážení, Brinkhouse si myslel, že krevní transfuze nahrazovala tromboplastin, který hemofilici postrádali.

V roce 1953, pozorovali tři výzkumné skupiny nedostatek faktoru VIII u pacientů s von Willebrandovou chorobou, která se dědí autosomálně, na rozdíl od hemofilie. Vysvětlením je to, že faktor VIII cirkuluje jako komplex s mnohem větším proteinem, von Willebrandovým faktorem.

Vyvinuly se různé metody pro oddělení faktoru VIII z normální plazmy. Precipitační činidla, která se používala, byl: ethanol, diethylether, glycin, tanin a polyethylenglykol. Velmi populární se stala metoda *kryoprecipitace*. Ware et al. (1947) zjistili, že zmrazená plazma taje nehomogenně. V poslední fázi neroztáté plazmy je fibrinogen. Pool a Robinson (1959) byli překvapeni tím, že supernatant z částečně rozmrazované plasmy neobsahoval faktor VIII. Nicméně, faktor VIII nebyl zničen



mražením a rozmrazováním, ale byl ve frakci s fibrinogenem. Tato frakce se začala označovat jako „kryoprecipitát“.

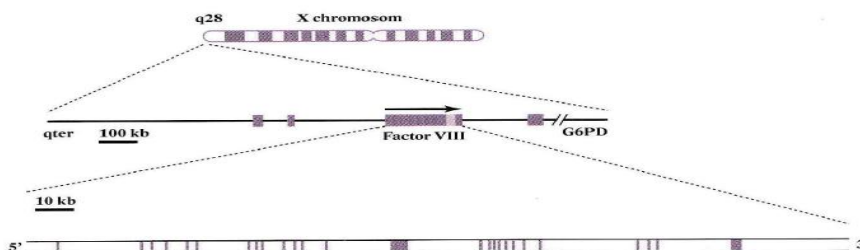
Hynes et al. (1969) dělil normální plazmu na DEAE-celulózových kolonách a oddělil faktor VIII od fibrinogenu. Vznikající faktor VIII byl velmi labilní, dokud nebyl přidán citrát jako stabilizační činidlo.

V roce 1972, Wagner a Owen separovali faktor VIII do dvou komponent pomocí vysoké koncentrace vápníku. Jednou složkou byl velký protein, druhý malý. Menší protein byl faktor VIII, větší protein byl von Willebrandův faktor.

### 1.3.2 Gen pro FVIII

Gen pro faktor VIII, obrázek 2, je dlouhý 186 kb a je složen z 26 exonů, nalézá se na konci dlouhého raménka X chromozomu. mRNA je ~9kb dlouhá. Dvě kopie pseudogenu F8A jsou umístěny extragenově 0.3 a 0.4 Mb směrem ke konci raménka X chromozomu. Podobně v intronu 1 byla nalezena repetitivní sekvence, jejíž extragenová kopie byla nalezena 0.1 Mb distálně od genu pro FVIII. Genetický defekt, který je způsobený rekombinací homologních oblastí intronu 22 nebo v intronu 1 má za následek nejčastější mutace způsobující těžkou formu hemofilie A, vyskytují se u 50% případů těžké formy hemofilie A (Pospíšilová et al. 2013, s. 303-304).

Je známo široké spektrum mutací v genu, které způsobuje deficit FVIII, mutace způsobují poruchy na úrovni transkripce a translace, nebo změny aminokyselinového zbytku. Většinou jde o jedinečné mutace, výjimkou jsou inverze.



Obrázek 3 – Gen FVIII

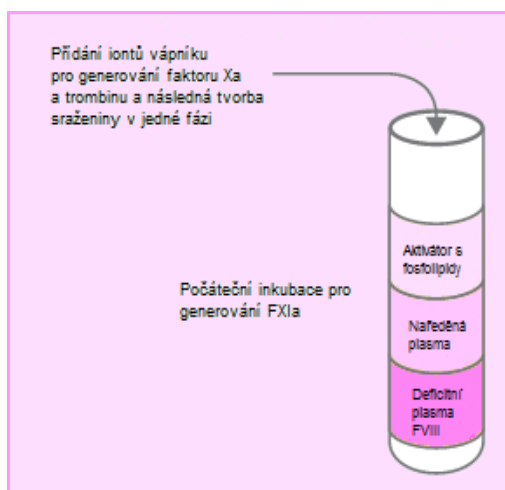
Zdroj: Pospíšilová et al. 2013

### 1.3.3 Princip stanovení FVIII

Dvě různé metody měření koagulační aktivity FVIII (FVIII:C), jednofázová (FVIII:C<sub>1st</sub>) a dvoufázová, byly zavedeny již v 50. letech minulého století (Biggs et al. 1955, Langdell et al. 1953). V 70. letech byla upravena dvoufázová metoda na chromogenní dvoufázovou metodu (FVIII:Chr) (Seghatchian et al. 1978). Metody se od sebe liší způsobem aktivace jednotlivých faktorů koagulační kaskády.

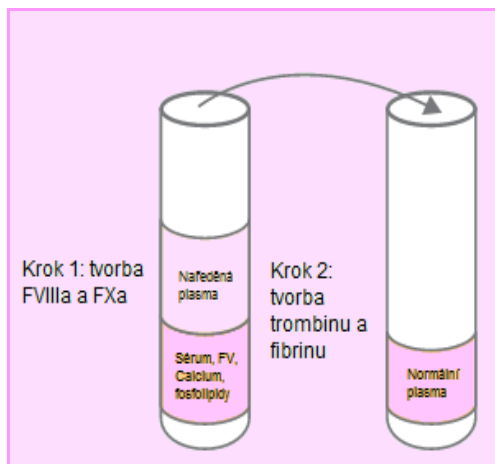
#### Jednofázová metoda-koagulační – FVIII:C<sub>1st</sub>

Směs plazmy s deficitem faktoru VIII a patientské plazmy je testována pomocí testu APTT (aktivovaný parciální tromboplastinový test). V případě deficitu faktoru VIII v patientské plazmě nemůže dojít ke kompenzaci chybějícího faktoru v deficitní plazmě, a proto dojde k prodloužení času měření. Jednofázovou koagulační metodu znázorňuje obrázek 4a.



Obrázek 4a – Jednofázová koagulační metoda

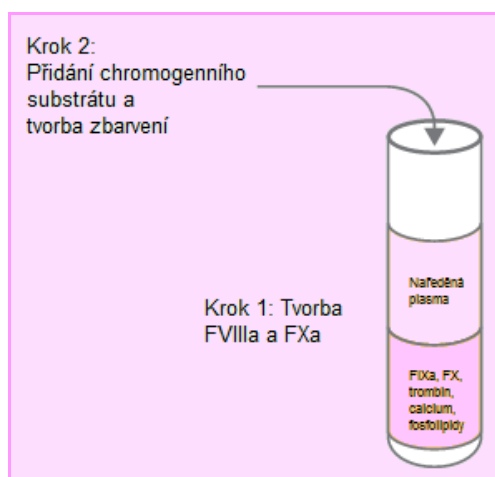
Schéma dvoufázové metody je vidět na obrázku 4b.



Obrázek 4b – Dvoufázová metoda

#### Dvoufázová metoda-chromogenní – FVIII:Chr

Při aktivaci faktoru VIIIa trombinem vzniká při stálém množství FIXa, fosfolipidů a vápenatých iontů tenáza, ta zaktivuje FX přidaný v nadbytku, na FXa. Vznik FXa měříme za přítomnosti chromogenního substrátu, při jehož rozkladu se odštěpuje paranitroanilin (pNA). Odštěpený paranitroanilin detekovaný zabarvením při 405nm, je přímo úměrný aktivitě FXa a tím i FVIIIa. Dvoufázové chromogenní stanovení znázorňuje obrázek 4c.



Obrázek 4c – Dvoufázová chromogenní metoda

## 1.4 Hemofilie

Synonyma hemofilie: *Amyhaemorrhagia*, *Bleeder*, *Bloederziekte*, *Bluter*, *Bluterkrankheit*, *Blutsucht*, *Haemorrhagic diathesis*, *Haemorrhoea*, *Hematophilia*, *Hémorrhagie constitutionelle*, *Hemorrhagophilia*, *Homme saignants*, *Idiosyncrasia haemorrhagica*, *Morbus Haematicus*

### 1.4.1 Charakteristika hemofilie

Hemofilie patří mezi dědičné krvácivé choroby, současně je jednou z nejčastějších vrozených poruch krevní srážlivosti. Dochází k tvorbě primární zátky, tvořené trombocyty, nedostatkem příslušného faktoru však selhává sekundární hemostáza a dochází ke zpomalení zástavy krvácení. Existují dva typy hemofilie, hemofilie A a hemofilie B. Hemofilie A je způsobená deficitem faktoru VIII, hemofilii B způsobuje deficit faktoru IX. Dle tíže defektu koagulační aktivity faktorů VIII a IX se oba typy hemofilie dělí na hemofilii těžkou (< 1 %), středně těžkou (1-5 %) a lehkou (>5-40 %) (Penka et al. 2011, s. 244).

### 1.4.2 Dědičnost

Dědičnost a projevy obou typů jsou stejné. Dědičnost nemoci je recesivní. Geny pro koagulační faktor VIII a IX jsou umístěny na distálním konci dlouhého ramene X chromosomu (Pospíšilová et al. 2013, s. 303). Toto onemocnění postihuje muže, přibližně 1 z 10 000 obyvatel, ženy s postiženým chromozomem X onemocnění pouze přenášejí, nazývají se přenašečky.

Z dědičnosti vyplývá, že muž hemofilik ( $X^HY$ ) a zdravá žena ( $XX$ ) budou mít všechny syny zdravé ( $XY$ ) a všechny dcery přenašečky ( $X^HX$ ). Žena přenašečka ( $X^HX$ ) a zdravý muž ( $XY$ ) budou mít 50% synů zdravých ( $XY$ ) a 50% nemocných ( $X^HY$ ) a 50% dcer zdravých ( $XX$ ) a 50% přenašeček ( $X^HX$ ) (Matýšková et al. 1999, s. 81).

Příčinou krvácení je selhání sekundární hemostázy, dojde sice k vytvoření primární zátky a vzniku malého množství trombinu, toto množství je však nedostatečné pro tvorbu kvalitní fibrinové zátky (Matýšková et al. 1999).

#### *1.4.3 Historie*

První zprávy o hemofilii jsou pravděpodobně v Babylónském Talmudu z 2. století našeho letopočtu. Píše se v něm: „Když nechala obřezat svého prvního syna a on zemřel, druhého syna a ten také zemřel, třetí syn nesmí být obřezán“. Podobně se píše: Kdysi byly čtyři sestry v Sepphoris. První obřezala svého syna a on zemřel, druhá také a třetí také. Čtvrté řekl Rabbi Simeon ben Gamaliele: „Nesmíte obřezat svého syna“. Při studiu Talmudu a písemností z různých židovských komunit bylo zjištěno, že již ve 12. století bylo známo, že krvácivou a mnohdy fatální chorobu přenášejí ženy.

V roce 1803 John Otto z Plymouth, NH popsal krvácivé dispozice v rozsáhlé rodině Shepardů. Muži krváceli i z malých ran, někdy fatálně. Ženy nekrvácely, ale byly schopny přenášet krvácivé onemocnění na syny. Kromě této rodiny popsal ještě několik dalších, o kterých mu vyprávěli kolegové – lékaři.

Deset let po Ottově objevu, John Hay (1813) popsal rodinu z Massachusetts, jejíž rodokmen začínal před 200 lety Oliverem Appletonem. Stejně jako Otto, Hay nazýval své pacienty „krváčeči“. Zmínil, že jejich děti nikdy neměli krvácivé problémy, pouze synové jejich dcer.

V roce 1820 shrnul všechny poznatky C. Nasse. Napsal, že se jedná o nemoc mužů, která je přenášena ženami. Popsal první genetická pravidla X-vázaných onemocnění.

Termín „hemophilia, milující krev“ byl poprvé použit v roce 1828 F.Hopffem v jeho diplomové práci. Někdy se také název „hemophilia“ přičítá Schönleinovi, který název používal, ale včas nepublikoval. V 70. letech 20. století se do diskuse připojil Brinkhous s tím, že termín existoval již v 16. století, protože v muzeu ve Vídni visí obraz krvácející ženy z roku 1570 s názvem: "La Guerison de l'hémophilique."

Grandidier (1855) publikoval rozsáhlý přehledný článek o hemofilii. Popsal 150 rodin s 420 hemofiliky z Německa, Velké Británie, Švýcarska a ze Severní Ameriky.

#### *1.4.4 Hemofilie A*

Náchylnost ke krvácení je způsobena vrozenou nízkou hladinou faktoru VIII. Výskyt v populaci je 1 případ na 10 000 obyvatel. Jako substitute se používají koncentráty faktoru VIII, u lehké formy lze použít i analog antidiuretického hormonu.

#### *1.4.5 Klinický obraz*

Mezi nejčastější projevy patří snadná tvorba modřin. U těžkých hemofiliků se s krvácením setkáváme již v prvním roce života, v průběhu druhého roku života se objevuje kloubní krvácení. Průměrně jednou měsíčně dochází ke spontánnímu krvácení do kloubu a 1-2x do roka do svalu. Středně těžký hemofilik většinou nemívá spontánní krvácení, ale také se mohou objevovat kloubně svalová krvácení, především po drobných úrazech. U lehkých hemofiliků se krvácení často projeví jen při poranění nebo stomatologickém, chirurgickém zákroku (Penka et al. 2011, s. 245). Často také dochází ke krvácení do svalů, které v případě opakovaného krvácení způsobuje svalovou dystrofii až trvalé poškození hybnosti pacienta.

#### *1.4.6 Laboratorní diagnostika*

K nejdůležitějším laboratorním vyšetřením patří vyšetření aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT), k jehož prodloužení dochází při poklesu faktoru VIII a IX pod 25-40%. Množství faktoru, při němž dojde k prodloužení APTT, závisí na citlivosti APTT reagentie. Ostatní vyšetření bývá v normě. Pro potvrzení diagnózy je třeba stanovit koagulační aktivitu faktoru VIII a IX. U těžkých hemofiliků je nezbytné molekulárně biologické vyšetření k identifikaci kauzální mutace

(Penka et al. 2011, s. 245). Při snížené hladině faktoru VIII je nutné vyloučit získaný inhibitor faktoru VIII, von Willebrandovu chorobu a kombinovaný defekt faktorů. U nově diagnostikovaných pacientů je vhodné hladinu faktoru VIII a IX stanovit alespoň dvakrát.

#### *1.4.7 Léčba a substituce*

Kauzální léčba hemofilie je předmětem výzkumu, existuje pouze substituční léčba. Substituční léčbou se rozumí podávání koncentrátů chybějícího faktoru. Většina preparátů se vyrábí z lidské krve. U lehkých forem hemofilie se z důvodu šetření krevních derivátů používá podpůrná léčba (antifibrinolytika – Pamba). Standardem je v dnešní době v ČR používání plazmatických, vysoce čištěných a protivirově ošetřených koncentrátů (Penka et al. 2011, s. 245). Někteří výrobci za použití genetického inženýrství produkují uměle vytvořené faktory VIII a IX, výsledné rekombinantní faktory se chovají stejně jako ty vyrobené z lidské krve.

## **2. Cíl práce a hypotézy**

### **2.1 Cíl práce**

Stanovila jsem si následující cíle své bakalářské práce:

1. Porovnat výsledky stanovení funkční aktivity FVIII jednofázovou koagulační a dvoufázovou chromogenní fotometrickou metodou u jednotlivých pacientů se středně těžkou a lehkou hemofilií A.

2. Rozdělit výsledky dle kritéria uvedeného v publikaci (Pavlova et al. 2010).

3. Stanovit poměrné množství pacientů, kteří mají výrazný rozdíl aktivity FVIII stanovené dvěma prováděnými metodami.

4. Stanovit podíl pacientů, u kterých byla zpřesněna diagnóza vyšetřením FVIII dvoufázovou chromogenní metodikou.

### **2.2 Hypotézy**

1. Výsledky obou metod se budou lišit alespoň u 10% pacientů se středně těžkou a lehkou formou hemofilie A.

2. Hodnoty FVIII získané jednofázovou koagulační metodou budou u většiny pacientů vyšší než hodnoty získané dvoufázovou fotometrickou metodou.

3. Rozdílné výsledky budou vázány na mutační změny ve FVIII.



### **3. Materiály a metodika**

#### ***3.1 Preanalytická fáze***

Preanalytická fáze je období, od zadání požadavku na vyšetření, do doby, než je vzorek vložen do analyzátoru. Obsahuje tedy přípravu pacienta k odběru, samotný odběr krve, přepravu materiálu do laboratoře, příjem materiálu, zacházení se vzorkem a jeho skladování před analýzou. Všechny tyto faktory mohou ovlivnit laboratorní výsledky.

Krev musí být pacientovi odebrána na lačno nebo po lehké snídani bez tuků. Vždy musí být na žádance kromě základní identifikace uveden datum a čas odběru, komplikace při odběru a léčba. Vždy by měla platit zásada nejprve označit zkumavku identifikací pacienta a před vlastním odběrem ještě údaje překontrolovat, aby bylo vyloučeno riziko záměny. U většiny koagulačních testů musí být odebraná krev nejdéle do dvou hodin zpracována, tedy centrifugována. Doporučená doba skladování plazmy po centrifugaci a oddělení od krevního sedimentu je 4 hodiny při teplotě 15-25°C, pro pozdější vyšetření musí být plazma zmrazena.

##### ***3.1.1 Použitý materiál***

V praktické části této práce byl použit následující spotřební materiál. Zkumavky 10ml od Gama Group, a.s., CZ. Zkumavky 4ml nesterilní, kyvety do přístroje STA-R – Cuvettes, oboje od Diagnostica Stago, s.a.s., France. Zkumavky Micro tube 1,5ml nesterilní, Transpipette 3,5ml nesterilní, zmrazovací zkumavky s víčkem – Microtube 2ml, vše od Sarstedt AG, Germany. Špičky k pipetám – Finntip 1000 od P-LAB, a.s., CZ. Jednorázové rukavice, nádoby na infekční odpad.

### *3.1.2 Příprava a skladování biologického materiálu*

Vzorky použité v této práci pocházejí od pacientů z Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT) v Praze. V období květen – září 2013 jsem na svém pracovišti, v laboratoři pro poruchy hemostázy, průběžně prováděla měření vzorků, které pocházely od pacientů léčených a dispenzarizovaných v ÚHKT.

Bylo vyšetřeno 76 vzorků pacientů - hemofiliků A, kteří byli minimálně 8 dní bez léčby a substituce. U pacientů bylo vyšetření FVIII oběma metodami indikováno ošetřujícím lékařem jako odpovídající skrínig hemofilie A. K odběru vzorků byl použit vakuový uzavřený náběrový systém Sarstedt Monovette s antikoagulačním činidlem 0,109M citrátem sodným. Při odběru do vakuové zkumavky je vyčerpán vzduch z nádoby a po spojení nádoby s jehlou zavedenou do žíly dojde vlivem vakua k nasátí krve do zkumavky. Vždy je nutné, aby byl dodržen správný poměr krve a antikoagulačního činidla 1:10, po odběru musí být zkumavka 5-7krát převrácena dnem vzhůru, aby bylo zajištěno důkladné promíchání krve a antikoagulačního činidla.

Vzorky byly do laboratoře dodávány v co nejkratší době, maximálně však do jedné hodiny po odběru, s řádně vyplněnou žádankou a označeny identifikačními štítky pacienta, které musí nutně obsahovat, jméno a příjmení pacienta, rodné číslo, diagnózu, číslo pojišťovny, datum odběru a do jaké laboratoře vzorek náleží. Transport probíhal donosem. Teplota při transportu byla dodržována 15 – 25°C.

Po dodání vzorku do laboratoře byl zkontrolován jeho stav, zda je dodrženo potřebné množství krve, a tím je zachován správný poměr s antikoagulačním činidlem, zda není vzorek sražen nebo zda není zkumavka poškozená. Dále byly zkontrolovány údaje o pacientovi, jméno a příjmení, rodné číslo, číslo pojišťovny, diagnóza, datum a čas odběru, a to na zkumavce i na přiložené žádance.

Zkontrolovaný vzorek byl centrifugován při 3200 otáčkách (2000g) po dobu 30 minut. Mezitím byl pacient zapsán do laboratorního informačního systému a byly připraveny potřebné zkumavky pro další zpracování materiálu. 10ml zkumavky byly označeny pořadovým číslem a příjmením pacienta, v případě dvou shodných příjmení byl připsán i rok narození, zmrazovací 2 ml zkumavky byly polepeny identifikačními

štítky příslušného pacienta, které se tisknou z laboratorního informačního systému a splňují všechny potřebné náležitosti. Bezprostředně po centrifugaci byla plazma oddělena od sedimentovaných krvinek a přenesena do připravené 10 ml zkumavky. Následně byla rozdělena na alikvoty po 400  $\mu$ l do zmrazovacích zkumavek, uzavřena a uložena do krabiček do mrazáku s monitorovanou teplotou  $-80^{\circ}\text{C}$ . Místo uložení bylo poznamenáno do laboratorního systému.

Před samotnou analýzou byl vzorek vyhledán v mrazáku a rozmrazován ve vodní lázni při  $37^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 minut a poté byl krátce temperován na laboratorní teplotu.

### ***3.2 Analytická fáze***

Analytická fáze obsahuje faktory ovlivňující vlastní provedení stanovení. Do této fáze patří příprava reagensů, provedení kalibrace, provedení kontrol kvality a vlastní analýza vzorku, každá laboratoř musí mít vypracované vlastní standardní operační postupy (SOP), jak se všechny tyto úkony musí provádět.

#### ***3.2.1 Analyzátor STA-R Evolution®***

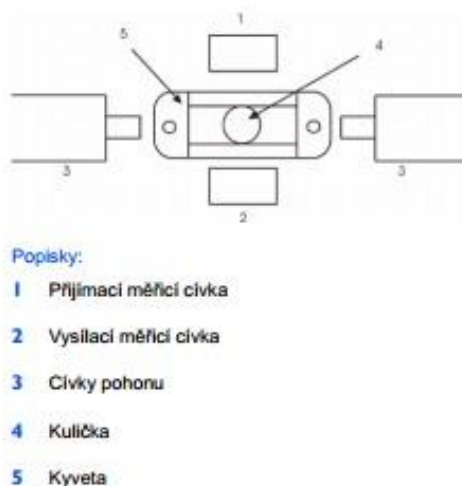


Obrázek 5 - Automatický koagulační analyzátor STA-R Evolution®

Zdroj: vlastní foto

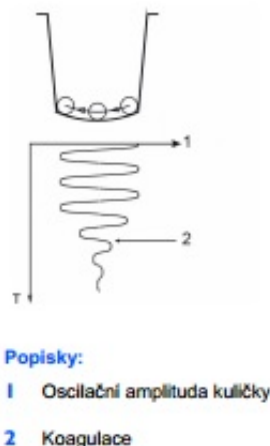
Měření bylo prováděno na analyzátoru STA-R Evolution® od firmy Diagnostica Stago, s.a.s., France, obrázek 5. Jedná se o plně automatický, samostatně pracující laboratorní robotický systém pro kompletní koagulační laboratorní diagnostiku. Současně lze provádět koagulační (srážecí) testy, chromogenní stanovení a imunochemické postupy. Stanovení koagulačních parametrů je založeno na metodách chronometrie a fotometrie.

Princip chronometrie spočívá v měření odchylky oscilační amplitudy kuličky. Zmenšení amplitudy odpovídá nárůstu viskozity prostředí, tedy jevu koagulace (Diagnostica Stago 2005). Stálá viskozita zajišťuje kyvadlový pohyb kuličky po kolejničkách na dně kyvet v elektromagnetickém poli. Velmi vysokou citlivost tohoto systému umožňuje frekvence pole blíží se vlastní oscilační frekvenci kuličky (Diagnostica Stago 2005). Magnetické pole tvoří pro každou hlavu 2 cívky, vysílací a přijímací, viz obrázek 6, které jsou automaticky softwarově upravovány dle viskozity a typu testu. Oscilační amplituda kuličky stálá při stálé viskozitě. Když se viskozita zvětšuje (jev srážení), oscilační amplituda kuličky se zmenšuje, jak je vidět na obrázku 7. Tuto změnu amplitudy využívá algoritmus stanovující dobu srážení (Diagnostica Stago 2005).



Obrázek 6 – Kyveta s kuličkou v magnetickém poli

Zdroj: Referenční příručka STA-R Evolution®



Obrázek 7 - Jev srážení (koagulace)

Zdroj: Referenční příručka STA-R Evolution®

Princip fotometrie je založen na absorbanci (optické hustotě) monochromatického zdroje světla o vlnové délce 405 nm nebo 540 nm procházejícího kyvetou, při probíhající reakci, při níž vzniká barevná reakce. Dopadající světlo pronikající kyvetou, je při průchodu z části pohlcováno reakčním prostředím. Prošlé světlo se změní a převede na absorbanci. Zdrojem dopadajícího jednobarevného světla je wolfram-halogenová lampa a filtr.

### 3.2.1.1 Kalibrace

Kalibrace se provádí analýzou různých ředění kalibrační plazmy, změřené hodnoty jsou vyneseny do grafu a je sestavena kalibrační křivka. Kalibrační křivka by měla být nejméně tříbodová.

V případě mého stanovení byly kalibrační křivky pětibodové. Jako kalibrátory jsem používala, pro jednofázovou koagulační metodu standardní plazmu, pro dvoufázovou chromogenní metodu referenční plazmu dodávanou v kitu přímo pro stanovení faktoru VIII chromogenní metodou, oboje popsáno v použitých reagentech. Příklad kalibračních křivek uvádím na obr. 7 a 8.

### *3.2.1.2 Interní kontrola kvality*

Interní kontrolou kvality ověřujeme denní informace o metodě, tedy přesnost, správnost, reprodukovatelnost, srovnatelnost, senzitivitu a specifickou. Cílem je minimalizovat analytické chyby, které mohou negativně ovlivnit výsledek. Každá laboratoř musí mít podmínky interní kontroly kvality uvedeny ve standardních operačních postupech. Vzorky pro interní kontrolu kvality jsou vyráběny komerčně, kontroly vždy musí být dvě, normální a patologická.

### *3.2.1.3 Externí kontrola kvality*

Laboratoře se v pravidelných intervalech účastní externí kontroly kvality. Jde o vzorky, které jsou rozesílány na hematologická pracoviště za účelem kontrolních analýz. Dle výsledků stanovení se hodnotí způsobilost laboratoře vykonávat jednotlivé analýzy.

Laboratoř, ve které jsem prováděla stanovení, se pravidelně účastní externí kontroly kvality stanovení FVIII, a to od firmy ECAT a NEQAS.

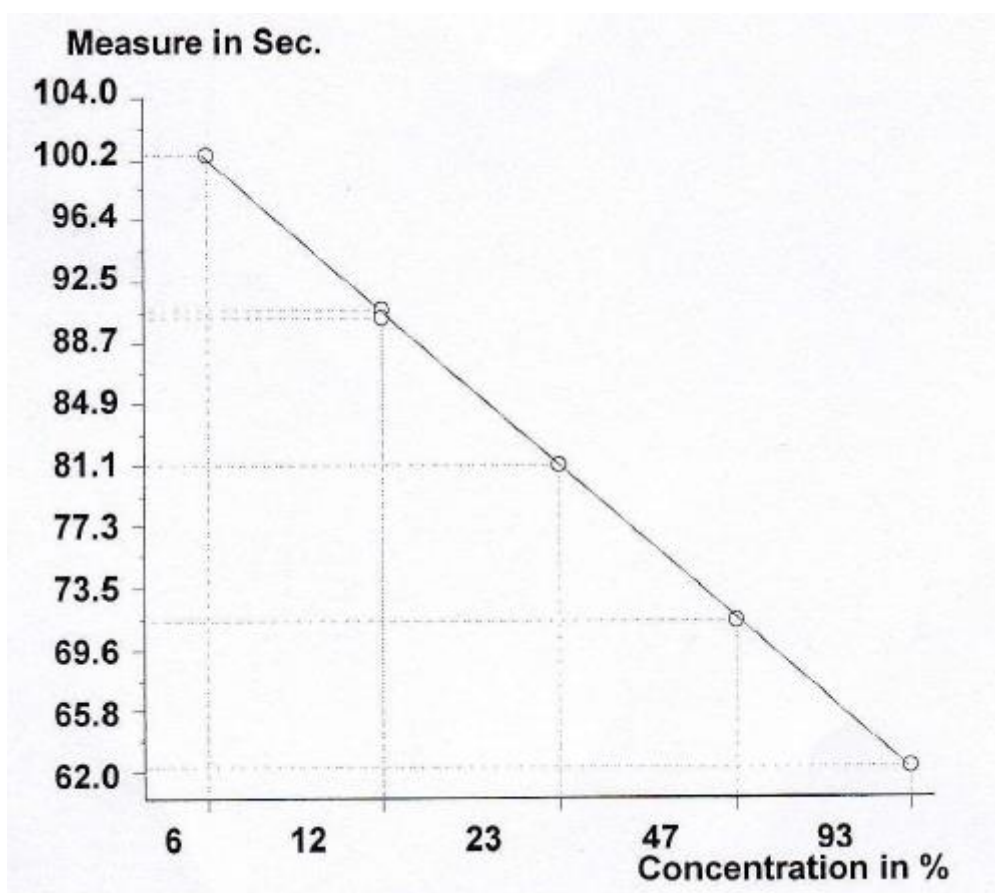
## *3.2.2 Jednofázová metoda-koagulační – FVIII:C<sub>1st</sub>*

### *3.2.2.1 Použité reagensy*

Na stanovení jednofázové koagulační metody, tedy faktoru VIII koagulační metodou byly použity následující reagensy: deficitní plazma – Coagulation Factor VIII Deficient Plasma, kalibrátor – Standard Human Plasma, kontroly – Control Plasma N a P, APTT aktivátor Pathromtin FS (vše od Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Marburg, Germany), ředící roztok (pufrovaný) – Owren-Koller buffer, promývací roztok – Desorb U, Calcium Chloride Solution 0,025M, čistící roztok – Cleaner Solution, vše od Diagnostica Stago, s.a.s., France. Voda na ředění – Aqua pro injectione, od B. Braun, Melsungen AG, Germany.

### 3.2.2.2 Kalibrace

Kalibrační křivka je používána pětibodová. Reagencie použitá v tomto měření jako kalibrační činidlo byla Standard Human Plasma, kterou přístroj ředil pufrovaným roztokem na jednotlivá ředění: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 a 1:160. Pro tato měření vyšly časy v sekundách, ze kterých přístroj sestavil kalibrační křivku. Čas každého změřeného bodu odpovídá naředěné aktivitě FVIII. Ředění 1:10 odpovídá aktivitě uvedené v příbalovém letáku. Tato aktivita je odvozená a navázaná na mezinárodní kalibrátor pro FVIII (*WHO International Standard 2010*). Kalibrační křivku znázorňuje obrázek 8.



Obrázek 8 – Kalibrační křivka FVIII:C<sub>1st</sub> z 30. 7. 2013

### *3.2.2.3 Kontrola kvality*

Kontroly kvality jsem měřila vždy po změření kalibrační křivky, před započítím analýzy patientských vzorků. Používala jsem reagentie Control Plasma N a P. Hodnoty udávané pro normální kontrolu od výrobce jsou v rozmezí 70-112% , rozmezí pro patologické hodnoty je 18-36%. Naměřené hodnoty kontrol uvádím v tabulce 1.

### *3.2.2.4 Provedení testu*

Přístroj si v kyvetě naředí 50  $\mu$ l patientského vzorku 1:10 pufrovaným roztokem, přidá 50  $\mu$ l plazmy s deficitem faktoru VIII a 50  $\mu$ l Pathromtinu, to vše inkubuje 4 minuty při teplotě 37°C. Po uplynutí doby inkubace je kyveta přenesena do měřicí pozice, je přidáno 50  $\mu$ l  $\text{Ca}^{2+}$  a začne se měřit čas, za který se vytvoří koagulum. Tím dojde k zastavení kuličky v kyvetě. Změřený čas v sekundách se přenesse na kalibrační křivku a dojde k výpočtu procentuální hladiny faktoru VIII.

### *3.2.3 Dvoufázová metoda-chromogenní – FVIII:Chr*

#### *3.2.3.1 Použité reagentie*

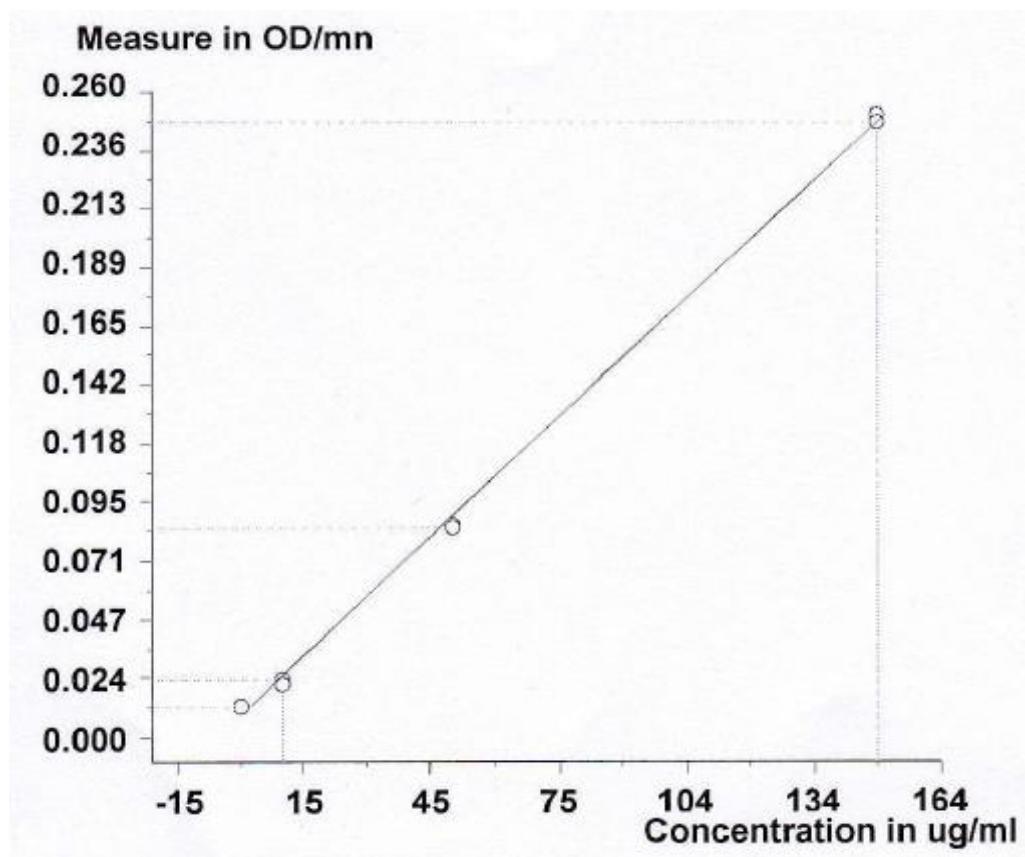
Ke stanovení faktoru VIII dvoufázovou chromogenní metodikou, jsem použila tyto reagentie: Kit – DG Chrom FVIII, od firmy Grifols, který vyrábí Technoclone GmbH, Vienna, Austria, kontroly – System Control N + P, promývací roztok – Desorb U, čistící roztok – Cleaner Solution, vše od Diagnostica Stago, s.a.s., France. Voda na ředění – Aqua pro injectione, od B. Braun, Melsungen AG, Germany.

#### *3.2.3.2 Kalibrace*

I pro tuto metodu se stanovuje pětibodová kalibrační křivka. Kit obsahuje 4 referenční plazmy potřebné k změření kalibrační křivky, které jsou ředěny diluentem



DG-DIL 1:40, diluent je také součástí kitu. Pro stanovení pátého bodu kalibrační křivky se používá DG-DIL, který vykazuje 0% hodnotu. U všech bodů přístroj změří zabarvení, které vyjde v jednotkách OD/mn (změna optické jednotky – optické denzity O. D. za jednotku času-min.), z těchto hodnot analyzátor sám sestaví kalibrační křivku, viz obrázek 9.



Obrázek 9 – Kalibrační křivka FVIII:Chr z 21. 8. 2013

### 3.2.3.3 Kontrola kvality

Kontroly kvality jsem opět měřila ihned po změření kalibrační křivky, před analýzou pacientů. Pro dvoufázovou chromogenní metodu jsem použila Systém Control N + P. Normální hodnoty jsou udávané výrobcem v rozmezí 70-98%, patologické hodnoty výrobce uvádí v rozmezí 29-43%.

### *3.2.3.4 Provedení testu*

Do kyvety, ve které probíhá analýza, přístroj pipetuje 25  $\mu$ l pacientské plazmy, dojde k naředění 1:40 diluentem DG\_DIL, dále je přidáno 40  $\mu$ l DG – Phos (obsahujícího fosfolipidy a albumin), spolu s 40  $\mu$ l DG – FIXa/FX (obsahujícím FIXa, FX,  $\text{Ca}^{2+}$ , albumin a trombin). Kyveta je přesunuta do inkubační pozice a je po dobu 5 minut inkubována při teplotě 37°C. Po uplynutí doby inkubace je kyveta přesunuta do měřicí pozice a je přidáno 200  $\mu$ l DG – FXa Sust (chromoforu), dojde k tvorbě zbarvení, které analyzátor změří, naměřené jednotky jsou OD/mn, kterou analyzátor přenese na kalibrační křivku a vypočte procentuální hladinu faktoru VIII.

### *3.2.4 Pracovní postup*

Potřebné reagentie jsem vyndala z lednice a 30 minut nechala temperovat na laboratorní teplotu. Teplota v laboratoři se pohybovala mezi 20° a 25°C, teplota laboratoře je monitorována. Po uplynutí 30 minut jsem reagentie naředila vodou pro injekce přesně dle návodu od výrobce. Po naředění jsem reagentie 30 minut rozpouštěla za občasného promíchání, aby bylo zajištěno řádné rozpuštění. Během rozpouštění bylo potřeba reagentie nechat 5 minut stát na víčku, aby došlo k rozpuštění reagentie přichycené na špuntu.

Mezitím jsem zapnula analyzátor STA-R Evolution® od firmy Diagnostika Stago, s.a.s., aby se vytemperoval na potřebnou teplotu a zinicizoval, během inicializace dojde ke kontrole přístroje. Poté jsem provedla potřebnou údržbu, hlavně promytí jehel a jamek, ve kterých dochází k proplachování jehel během analýzy.

Po rozpuštění jsem reagentie přenesla pomocí pipety do předem označených 4ml zkumavek a zadala do přístroje, reagentie od firmy Diagnostica Stago se načítají čárovým kódem, upravuje se pouze množství a zda reagentii vkládáme v originálním obalu nebo ve zkumavce, tzv. „na mikro“, v úsporném režimu. Reagentie od jiných firem je nutné identifikovat ručně, a to tak, že je potřeba zapsat název produktu, lot,

množství a opět zda vkládáme originální lahvičku nebo zkumavku. Po zadání všech reagensů jsem spustila měření kalibrační křivky a kontrol kvality.

Z mrazáku jsem vyndala potřebné patientské vzorky, rozpouštěla jsem je po dobu 5 minut ve vodní lázni při teplotě 37°C, poté jsem je pár minut temperovala na laboratorní teplotu. Řádně rozpuštěné vzorky jsem přenesla pipetou do zkumavek eppendorf, označených příjmením pacienta a datem odběru. Takto připravené vzorky jsem v kovových nástavcích vložených do karuselu vkládala do nakládacího prostoru přístroje. Vyplnila jsem identifikační tabulku, kam jsem zapsala příjmení pacienta a datum odběru a vzorky vložila do přístroje. Po načtení pacientů jsem zadala požadavek na analýzu vzorku. Změřené hodnoty jsem vytiskla a zapsala do tabulky.

### ***3.3 Postanalytická fáze***

Jedná se o výstupní analytickou kontrolu vzorků a interpretaci výsledků vzhledem k fyziologickým hodnotám a diagnóze.

Změřené výsledky jsem z analyzátoru průběžně tiskla. Vytisknuté výsledky jsem archivovala v laboratoři. Výsledky jsem průběžně zapisovala do tabulek a dále zpracovávala v programu Microsoft Excel. Každému pacientovi bylo přiřazeno číslo, aby byla zajištěna anonymita pacientů.

### ***3.4. Výpočet a statistické vyhodnocení***

Výsledky byly deklarovány jako rozdílné, když podíl  $FVIII:C_{1st}/FVIII:Chr$  nebo  $FVIII:Chr/FVIII:C_{1st}$  byl  $\leq 0,6$  (Pavlova et al. 2010). Podíl se tvoří tak, že vždy menší hodnota je v dělenci.

Vzhledem k charakteru tématu nemuselo být využito statistické vyhodnocení výsledků.

#### 4. Výsledky

V období květen – září 2013 jsem na svém pracovišti, v laboratoři pro poruchy hemostázy v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze, průběžně prováděla měření 76 vzorků pacientů s hemofilií A. Při práci jsem dodržovala standardní operační postupy (SOP).

*Tabulka 1 - Hodnoty interních kontrol kvality*

FVIII:C <sub>1st</sub>		FVIII:Chr	
N	P	N	P
70-112%	18-36%	70-98%	29-43%
92	31	89	42
91	31	75	37
92	30	72	37
88	31	79	39
85	29	79	37
85	28	79	36
77	21	76	32
89	29	80	33
88	30	84	34
93	30	87	33
86	28	82	32
83	28	73	39
90	29	76	42
104	34	82	40
96	32	73	40
94	29	74	38
91	28	72	40
Normální rozmezí: 50% - 150%			

Průměrné výsledky interních kontrol (n=17) ±SD jsou:

N FVIII:C<sub>1st</sub> = 89,6%±5,9

P FVIII:C<sub>1st</sub> = 29,3%±2,7

N FVIII:Chr = 78,3%±5,3

P FVIII:Chr = 37%±3,3

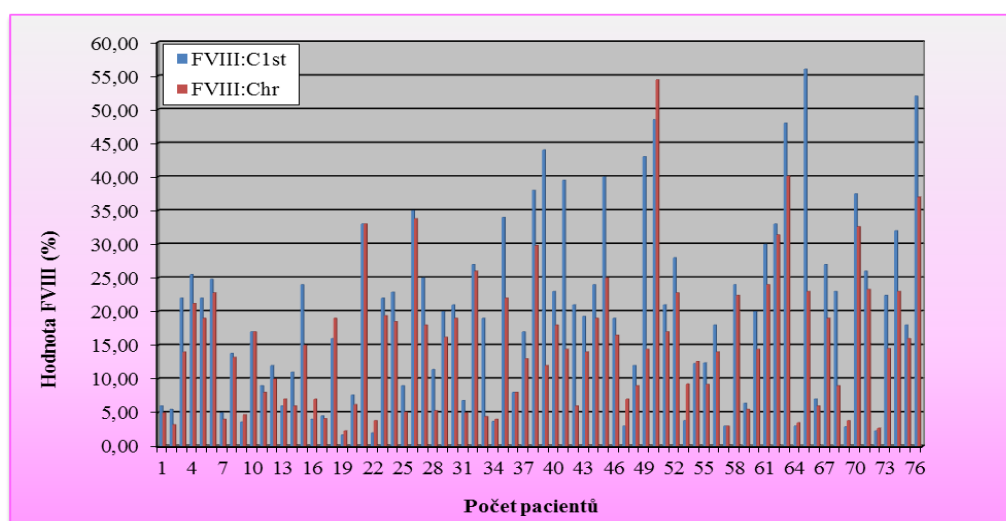
Vždy jsem prováděla měření kontrol správnosti, využívala jsem systémové kontroly N + P a control plasma N a P, jak je popsáno v použitých reagentiích a u jednotlivých metod stanovení. Kontroly jsem prováděla vždy po změření kalibrační křivky, před započítím samotné analýzy vzorků. Změřené hodnoty kontrol jsem zapsala do tabulky 1. Fyziologické hodnoty jsou značené N „normální“ a jsou dané od výrobce kontrol: pro jednofázovou koagulační metodu 70-112% (x=91%), pro dvoufázovou chromogenní metodu 70-98% (x=79%), patologické hodnoty jsou značené P, hodnoty pro jednofázovou koagulační metodu udává výrobce 18-36% (x=27%), pro dvoufázovou chromogenní metodu 29-43% (x=36%).

Výsledky se neliší od průměrných hodnot udávaných výrobcem kontrol. Variační koeficient obou metod u nízkých hodnot je CV(%) 9,2 vs. 9,0 a u normálních hodnot je CV(%) 6,6 vs. 6,7. Nejistota měření obou metod je stejná.

*Tabulka 2 - Naměřené hodnoty faktoru VIII jednofázovou koagulační (C<sub>1st</sub>) a dvoufázovou chromogenní metodou (Chr)*

	<b>FVIII: C<sub>1st</sub></b>	<b>FVIII: Chr</b>		<b>FVIII: C<sub>1st</sub></b>	<b>FVIII: Chr</b>		<b>FVIII: C<sub>1st</sub></b>	<b>FVIII: Chr</b>		<b>FVIII: C<sub>1st</sub></b>	<b>FVIII: Chr</b>
<b>1</b>	6,0	5,0	<b>20</b>	7,6	6,2	<b>39</b>	44	12	<b>58</b>	24	22
<b>2</b>	5,5	3,2	<b>21</b>	33	33	<b>40</b>	23	18	<b>59</b>	6,4	5,5
<b>3</b>	22	14	<b>22</b>	2,0	3,8	<b>41</b>	40	14	<b>60</b>	20	14
<b>4</b>	26	21	<b>23</b>	22	19	<b>42</b>	21	6,0	<b>61</b>	30	24
<b>5</b>	22	19	<b>24</b>	23	19	<b>43</b>	19	14	<b>62</b>	33	31
<b>6</b>	25	23	<b>25</b>	9,0	5,1	<b>44</b>	24	19	<b>63</b>	48	40
<b>7</b>	5,0	4,0	<b>26</b>	35	34	<b>45</b>	40	25	<b>64</b>	3,0	3,5
<b>8</b>	14	13	<b>27</b>	25	18	<b>46</b>	19	17	<b>65</b>	56	23
<b>9</b>	3,6	4,7	<b>28</b>	11	5,3	<b>47</b>	3,0	7,0	<b>66</b>	7,0	6,0
<b>10</b>	17	17	<b>29</b>	20	16	<b>48</b>	12	9,0	<b>67</b>	27	19
<b>11</b>	9,0	8,0	<b>30</b>	21	19	<b>49</b>	43	14	<b>68</b>	23	9,0
<b>12</b>	12	10	<b>31</b>	6,8	5,0	<b>50</b>	49	54	<b>69</b>	2,9	3,8
<b>13</b>	6,0	7,0	<b>32</b>	27	26	<b>51</b>	21	17	<b>70</b>	38	33
<b>14</b>	11	6,0	<b>33</b>	19	4,4	<b>52</b>	28	23	<b>71</b>	26	23
<b>15</b>	24	15	<b>34</b>	3,7	4,0	<b>53</b>	3,8	9,3	<b>72</b>	2,3	2,7
<b>16</b>	4,0	7,0	<b>35</b>	34	22	<b>54</b>	12	13	<b>73</b>	22	15
<b>17</b>	4,5	4,1	<b>36</b>	8,0	8,0	<b>55</b>	12	9,2	<b>74</b>	32	23
<b>18</b>	16	19	<b>37</b>	17	13	<b>56</b>	18	14	<b>75</b>	18	16
<b>19</b>	1,7	2,3	<b>38</b>	38	30	<b>57</b>	3,0	3,0	<b>76</b>	52	37
<b>Normální rozmezí pro obě metody: 50% - 150%</b>											

Graf 1 - Porovnání hodnot FVIII získaných jednofázovou koagulační (FVIII:C1st) a dvoufázovou chromogenní metodou (FVIII:Chr)



Naměřené hodnoty FVIII pacientů jednofázovou koagulační (FVIII:1st) i dvoufázovou chromogenní (FVIII:Chr) metodou jsou shrnuty v tabulce 2.

V grafu 1 je vidět porovnání hodnot obou metod u každého pacienta.

Pacienty jsem si dle výsledků stanovení FVIII jednofázovou koagulační metodou rozdělila do skupin: středně těžká hemofilie (hladina FVIII 1-5%), lehká hemofilie (hladina FVIII 6-40%) (White et al. 2001) a pacienty se sníženou, případně normální hodnotou FVIII „normální hodnota“ (hladina FVIII >40%), jak znázorňuje tabulka 3.

V souboru bylo 18% středně těžkých a 74% lehkých hemofiliků, dále 8% hemofiliků, kteří nesplňovali kritérium lehké hemofilie A ale klinicky spadali mezi lehké hemofiliky.

Tabulka 3 - Rozdělení pacientů dle výsledků stanovení FVIII jednofázovou koagulační metodou

Rozdělení pacientů dle výsledků FVIII:C1st			
Středně těžká hemofilie (1-5%)	Lehká hemofilie (6-40%)	Normální hodnota (>40%)	Celkem
14	56	6	76

Změřené hodnoty FVIII:C<sub>1st</sub> a FVIII:Chr jsem mezi sebou vydělila, vždy menší číslo jsem dělila větším. Na základě vypočteného poměru jsem pacienty rozdělila do dvou skupin. Hranici 0,6 pro rozdělení jsem převzala z publikace (Pavlova et al. 2010). Toto rozdělení pacientů uvádím v tabulce 4.

*Tabulka 4 - Rozdělení pacientů dle poměru naměřených dat*

Počet pacientů s poměrem FVIII:C <sub>1st</sub> /FVIII:Chr (FVIII:Chr/FVIII:C <sub>1st</sub> )		
≤ 0,6	> 0,6	Celkem
15	61	76

V našem souboru jsme zjistili 20% hemofiliků A s výrazným rozdílem mezi FVIII:C<sub>1st</sub> a FVIII:Chr, z toho 11 pacientů mělo vyšší FVIII stanovený jednofázovou koagulační metodou a 4 pacienti měli vyšší FVIII stanovený dvoufázovou chromogenní metodou.

Pacienty s poměrem ≤0,6 jsem si také rozdělila do skupin: středně těžká hemofilie (hladina FVIII 1-5%), lehká hemofilie (hladina FVIII 6-40%) a pacienty s „normálním“ rozmezím (hladina FVIII >40%), viz tabulka 5. Ve všech skupinách bylo zastoupení pacientů velmi podobné, nejvíce pacientů bylo lehkých hemofiliků.

*Tabulka 5 - Rozdělení pacientů s poměrem ≤0,6 dle výsledků jednofázového koagulačního stanovení FVIII*

Rozdělení pacientů s poměrem ≤ 0,6 dle výsledků FVIII:C <sub>1st</sub>			
Středně těžká hemofilie (1-5%)	Lehká hemofilie (6-40%)	Normální hodnota (>40%)	Celkem
5	7	3	15

U 15 pacientů s poměrem  $\leq 0,6$  jsme zjišťovali kauzální mutaci v genu pro FVIII. Genetické vyšetření bylo prováděno v genetické laboratoři, která je součástí našeho oddělení. U 14 pacientů se podařilo mutaci najít, u 1 pacienta bohužel nebylo možné genetické vyšetření provést z důvodu nedostatku materiálu. Nalezené mutace jsem spolu s výsledky stanovení FVIII uvedla v tabulkách 6 a 7.

*Tabulka 6 - Mutace v genu pro FVIII nalezené u pacientů s vyšší hodnotou jednofázového koagulačního stanovení FVIII*

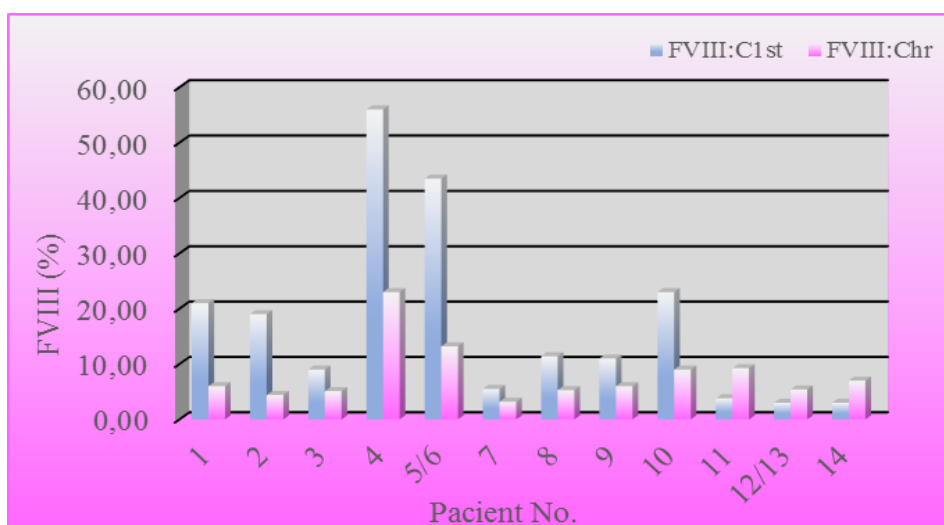
<b>FVIII:C<sub>1st</sub> &gt; FVIII:Chr</b>				
Pacient No.	Mutace	FVIII:C <sub>1st</sub> (%)	FVIII:Chr (%)	Poměr FVIII Chr/1st
1	p.Glu272Lys	21	6,0	0,29
2	p.Glu479Arg	19	4,4	0,23
3	p.Ser616Asn	9,0	5,1	0,57
4	p.Asn694Lys	56	23	0,41
5/6	p.Ser1788Thr	43/44	12/14	0,30
7	p.Glu1829Val	5,5	3,2	0,58
8	p.Val1857Leu	11	5,3	0,47
9	p.His1961Pro	11	6,0	0,54
10	p.Val1962Met	23	9,0	0,39



Tabulka 7 - Mutace v genu pro FVIII nalezené u pacientů s vyšší hodnotou dvoufázového chromogenního stanovení FVIII

FVIII:Chr > FVIII:C <sub>1st</sub>				
Pacient No.	Mutace	FVIII:C <sub>1st</sub> (%)	FVIII:Chr (%)	Poměr FVIII 1st/Chr
11	p.Arg372His	3,8	9,3	0,40
12/13	p.Trp382Gly	2,0/4,0	3,8/7,0	0,55
14	p.Asp569Tyr	3,0	7,0	0,43

Graf 2 - Hodnoty FVIII u pacientů s nalezenou mutací a poměrem  $\leq 0,6$



Pacienti 1-10 měli vyšší hodnoty jednofázového koagulačního FVIII, pacienti 11-14 měli vyšší hodnotu dvoufázového chromogenního FVIII.

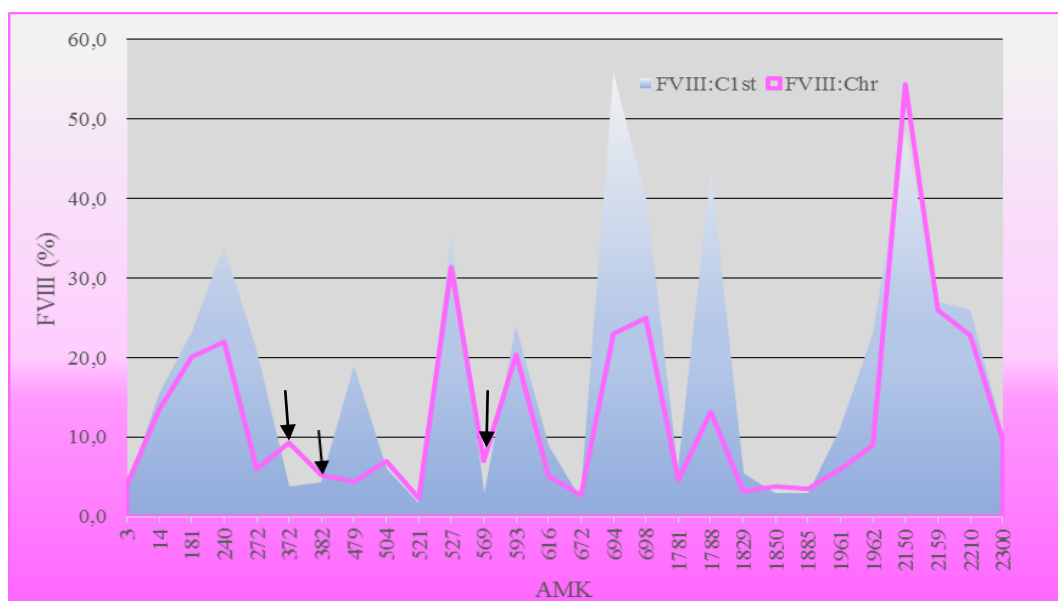
Nalezené mutace jsem zakreslila do genu pro FVIII, jak je uvedeno na obrázku 10.



Obrázek 10 - Mutace ve FVIII, A1, A2, B, A3, C1 a C2 jsou domény FVIII.

- a) mutace u pacientů s vyšší hodnotou FVIII získanou jednofázovou koagulační metodou  
 b) mutace u pacientů s vyšší hodnotou FVIII získanou dvoufázovou chromogenní metodou
- Z obrázku vyplývá, že mutace pacientů s výrazným rozdílem v hladině FVIII různými metodami se soustřeďuje v určitých doménách FVIII.

Graf 3 – FVIII u nalezených mutací (šedá plocha =FVIII:C<sub>1st</sub>, růžová čára =FVIII:Chr)



V grafu 3 jsou uvedeny hladiny FVIII stanovené oběma metodami u nalezených mutací. Na ose „x“ jsou zapsána čísla aminokyselin, ve kterých byla nalezena mutace. U většiny mutací byla vyšší hladina FVIII u jednofázové koagulační metody. V místech označených šipkou byla nalezena vyšší hladina FVIII u dvoufázové chromogenní metody.

## 5. Diskuse

Většina měření aktivity FVIII u pacientů různými metodami dává stejné výsledky. Byly ale popsány případy, kdy tyto výsledky byly rozdílné. Jedná se například o měření FVIII v koncentrátech FVIII nebo měření FVIII u pacientů po podání koncentrátů (Oldenburg et al. 2010). Dále se jedná o měření velmi nízké aktivity FVIII, kdy se projevuje odlišná přesnost a citlivost měření jednotlivých metod, nižší hodnoty zpravidla dává metodika dvoufázová, jak tvrdí ve své práci Rychlá (2012). Rozdílné výsledky byly opakovaně popsány ve vztahu ke genotypu pacientů s hemofilií A (Pavlova et al. 2010). V rámci mé bakalářské práce jsem získala výsledky FVIII oběma metodami u 76 pacientů se středně těžkou a lehkou hemofilií. K hodnocení rozdílných výsledků jsem využila kritéria převzatého z publikace Pavlové (2010), kde byly rozdílné výsledky ty, jejichž podíl  $FVIII:C_{1st}/FVIII:Chr$  nebo  $FVIII:Chr/FVIII:C_{1st}$  byl  $\leq 0,6$ . Jsou popsána i jiná kritéria ke stanovení „FVIII rozdílného fenotypu“ jako například v publikaci (Cid et al. 2008) bylo využito kritérium, že poměr výsledků obou metod musí být  $>1,5$ . Kritérium Pavlovové (2010) jsem použila proto, že jej použila pro skrining velké skupiny německých hemofilických pacientů a já jsem chtěla porovnat naše výsledky s jejich skupinou.

Ze 76 pacientů splňovalo dané kritérium 15 pacientů, což je 20% z celkového počtu. Ve studii Pavlovové (2010) to bylo téměř 36%. Rozdíl si vysvětluji tím, že její skupina zahrnovala více hemofiliků z jedné rodiny, a to až 13, zatímco v naší skupině byl většinou z každé rodiny jen jeden hemofilik. Ve španělské skupině našli shodně s námi také 20% „diskrepantních“ pacientů, jak uvádí ve své práci Cid (2008).

V naší skupině převažovali pacienti, kteří měli vyšší hodnoty FVIII koagulační jednofázovou metodou. Celkem u 11 pacientů byla aktivita FVIII vyšší u jednofázové koagulační metody. Převaha pacientů s vyšší aktivitou FVIII jednofázovou koagulační metodou je dána genotypem naší vyšetřované skupiny, kdybychom měli pacienty z celé české republiky a ne jen ze středočeského kraje, výsledky by byly pravděpodobně vyrovnané.

U 14 pacientů s rozdílnými výsledky se nám podařilo najít kauzální mutaci ve FVIII, u 1 pacienta genetika nemohla být vyšetřena z důvodu chybějícího genetického materiálu. Mutace naší skupiny se neshodovali ani v jenom případě s německou ani se španělskou skupinou, ale umístění mutací v rámci struktury FVIII se shodovalo. Mutace u pacientů s nižší aktivitou FVIII chromogenní dvoufázovou metodou byly soustředěny převážně do A3 domény, mutace u pacientů s nižší aktivitou FVIII jednofázovou koagulační metodou byly soustředěny v doméně A2.

Ráda bych zdůraznila výsledky 3 pacientů, kteří měli FVIII:C<sub>1st</sub> dokonce na hranici normy, ale FVIII dvoufázovou chromogenní metodikou měli v průměru 16%. V případě, že by se diagnóza stanovovala jen podle vyšetření FVIII jednofázovou metodou, nebyli by diagnostikováni jako hemofilici. Tito pacienti však klinicky krváčeli jako středně těžcí hemofilici.

Důvod pro rozdílné výsledky oběma metodami nebyl ještě jednoznačně vysvětlen, předpokládá se, že u skupiny pacientů s nižší FVIII:C<sub>1st</sub> jsou příčinou mutace v místě štěpení trombinem nebo mutace v místě vazby FIX (Oldenburg et al. 2010).

Další otázka, která dosud není jednoznačně vyřešena, je, která hodnota FVIII se blíží více fenotypu. Pomineme-li extrémy, jedná se většinou o lehkou formu hemofilie, kde se klinicky velmi těžko odliší například FVIII 4% od 9% nebo 24% od 12%.

Z prezentovaných výsledků jednoznačně vyplývá, že by každý pacient s podezřením na hemofilii A měl mít stanoven FVIII oběma metodami, aby byla zajištěna správná diagnostika a nedošlo k závažnému pochybení.

## 6. Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo, porovnat výsledky stanovení funkční aktivity FVIII koagulační jednofázovou a chromogenní dvoufázovou metodou.

Hypotézy jsem definovala takto:

1. Výsledky obou metod se budou významně lišit alespoň u 10% pacientů se středně těžkou a lehkou formou hemofilie A.
2. Hodnoty FVIII získané koagulační jednofázovou metodou budou u většiny pacientů vyšší než hodnoty získané dvoufázovou chromogenní metodou.
3. Rozdílné výsledky budou vázány na mutační změny ve FVIII.

Tyto hypotézy se potvrdily. Výsledky obou metod se významně lišily u 20% pacientů se středně těžkou a lehkou formou hemofilie A. Hodnoty FVIII získané koagulační jednofázovou metodou byly opravdu u většiny pacientů vyšší než hodnoty získané dvoufázovou chromogenní metodou, pouze ve čtyřech případech tomu bylo naopak. Dalo by se říci, že 11 hemofiliků A (15%) profitovalo z vyšetření FVIII:Chr, protože vyšetření FVIII:C<sub>1st</sub> zkreslilo jejich fenotyp. Vzhledem k tomu, že se nám podařilo najít kauzální mutaci u většiny pacientů, je možné shrnout, že rozdílné výsledky jsou vázány na mutace v určitých částech FVIII a že fenotyp rozdílných výsledků FVIII:C<sub>1st</sub> oproti FVIII:Chr je dán genotypem pacienta.

## 7. Použitá literatura

BARROWCLIFFE, Tw. Methodology of the two-stage assay of factor VIII (VIII:C). *Scand J Haematol Suppl.* 1984, 41: 25–38.

BIGGS, R., EVELING, J., RICHARDS, G. The assay of antihæmophilic–globulin activity. *Br J Haematol.* 1955, 1: 20–34.

CID, A., CALABUIG, M., CORTINA, V. et al. One-stage and chromogenic FVIII:C assay discrepancy in mild haemophilia A and the relationship with the mutation and bleeding phenotype. *Haemophilia.* 2008, 14: 1049–1054.

DASTYCH, M., BREINEK, P. et al., 2008. *Klinická biochemie: bakalářský obor zdravotní laborant.* Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4572-9.

DONNER, L., 1985. *Klinická hematologie.* Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství. ISBN 08-077-85.

DUNCAN, E., DUNCAN, B., TUNBRIDGE, L., LLOYD, J. Familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *Br J Haematol.* 1994, 87: 846–8.

HRUBIŠKO, M. a kol., 1983. *Hematologie a krevní transfuze I. Hematologie.* Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství. ISBN 08-040-83.

JONES, P., 2007. *Život s hemofilií.* Praha: Grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-239-9850-4.

KEELING, D., SUKHU, K., KEMBALL-COOK, G., WASEEM, N., BANGALL, R., LLOYD, J. Diagnostic importance of the two-stage factor VIII:C assay demonstrated by a case of mild haemophilia associated with His1954 to Leu substitution in the factor VIII A3 domain. *Br J Haematol.* 1999, 105: 1123–6.

KUBISZ, P. a kol., 2006. *Hematológia a transfuzológia: učebnica*. Bratislava: Grada Slovakia. ISBN 80-8090-000-0.

*Laboratorní příručka*, ÚHKT: Laboratoř pro poruchy hemostázy, 2008.

LAGA, A. et al. The effect of specimen hemolysis on coagulation test results. *Am J Clin Pathol.* 2006, 126(5): 748–755.

LANGDELL, R., WAGNER, R., BRINKHOUSE, K. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia and a simple one stage antihemophilic factor assay procedure. *J Lab Clin Med.* 1953, 41: 637–647.

LEE, Ch., E. BERNTORP a K. HOOTS, 2010. *Textbook of hemophilia*. NJ: Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-4051-6914-1.

LENTING, P., van MOURIK, J., MERTENS, K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood.* 1998, 92: 3983–3996.

LIPPI, G. et al. Influence of centrifuge temperature on routine coagulation testing. *Clin Chem.* 2006. 52(3): 537–538.

MATÝŠKOVÁ, M., J. ZAVŘELOVÁ a I. HRACHOVINOVÁ, 1999. *Hematologie pro zdravotní laboranty, Krevní srážení*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-278-7.

OLDENBURG, J., PAVLOVA, A. Discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assay results can lead to misdiagnosis of haemophilia A phenotype. *Hamostaseologie*. 2010, 30(4): 207-11.

OWEN, A., Ch., 2001. *A History of Blood Coagulation*. Mayo foundation for medical education and research: Rochester, Minnesota. ISBN 1-893005-90-9.

PAVLOVA, A., DELEV, D., PAHL, S., DRIESEN, J., BRONDKE, H., OLDENBURG, J. Molecular genetic background of haemophilia A patients with discrepancy between one-stage and two-stage factor VIII assays. *Hamostaseologie*. 2010, 30: S153-S155.

PECKA, M., 1995. *Přehled laboratorní hematologie I., Krvetvorba, Červená krevní řada*. Praha: Galén. ISBN 80-85824-28-0.

PECKA, M., 1996. *Přehled laboratorní hematologie II., Bílá krevní řada, Krevní destička*. Praha: Galén. ISBN 80-85824-43-4.

PECKA, M., 2004. *Laboratorní hematologie v přehledu III.: Fyziologie a patofyziologie hemostázy*. Český Těšín: FINIDR, s.r.o. ISBN 80-86682-03-X.

PECKA, M. a kol., 2010. *Praktická hematologie, Laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art, s.r.o. ISBN 978-80-903871-9-5.

PENKA, M. a A. BULIKOVÁ, 2009. *Neonkologická hematologie*. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-2299-3.

PENKA, M., E. Tesařová a kol., 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I, Hematologie*. Praha: Grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-247-3459-0.



POSPÍŠILOVÁ, Š., D. Dvořáková a J. MAYER, 2013. *Molekulární hematologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-942-8.

*Příbalová informace: Coamatic FVIII*. Chromogenix 2001.

*Příbalová informace: DG - Chrom FVIII*. Grifols: Technoclone GmbH, Austria. 2006.

*Příbalová informace: Coagulation Factor VIII Deficient Plasma*. Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH. 2008.

RACEK, J. et al., 1999. *Klinická biochemie*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-023-1.

RODRIGUEZ, B., 2005. *Atlas of haemostasis*. Spain: Ferré Olsina. ISBN 84-609-6315-2.

ROSÉN, S. and CHIARION, CASONI, M. *Chromogenic determination of factor VIII activity in plasma and factor VIII concentrates*. Factor VIII. Chromogenix Monograph Series, 2010.

RYCHLÁ, J. *Porovnání stanovení funkční aktivity FVIII koagulační jednofázovou a fotometrickou metodou*. Brno, 2012. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, lékařská fakulta. Vedoucí práce: RNDr. Zavřelová.

Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/326347/lf\\_b/Bakalarska\\_prace.pdf](http://is.muni.cz/th/326347/lf_b/Bakalarska_prace.pdf)

SEDLÁČEK, P., 2006. *Jak se vyznat v laboratorních hodnotách: Jak správně rozumět laboratorním výsledkům? Jaké jsou normální hodnoty? Co znamenají odchylky?*. Praha: Eminent. ISBN 80-7281-256-4.

SEGHATCHIAN, M., MILLER-ANDERSSON, M. A colorimetric evaluation on factor VIII:C potency. *Med Lab Sci*. 1978, 35: 347–54.

*SOPT 4.A ÚHKT: Laboratoř pro poruchy hemostázy, 2008.*

*SOPT 4.C – Standardní operační postup přístroje Analyzátor STA-R, ÚHKT: Laboratoř pro poruchy hemostázy, 2009.*

THOMSON, J., 1980. *Blood Coagulation and Haemostasis*, a practical guide, second edition, Churchill Livingstone.

WHITE, G., ROSENDAAL, F., ALEDORT, L., LUSHER, J., ROTHSCHILD, Ch., INGERSLEV, J. Definitions in Hemophilia: Recommendation of the Scientific Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 2001, 85:560.

WHO International Standard, *8th INTERNATIONAL STANDARD FACTOR VIII CONCENTRATE*, NIBSC code: 07/350, Instructions for use (Version 1.0, Dated 14/01/2010) dostupné z: <http://www.nibsc.org/documents>.