

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

Iveta Hniličková

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Katedra biologicko-biochemických věd

Leidenská mutace

Iveta Hnilíčková

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Iveta Hnilíčková**
Osobní číslo: **C14270**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Leidenská mutace**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. charakterizovat onemocnění - Leidenská mutace
2. biochemické, lékařské a genetické hledisko
3. diagnostika a možnosti léčby
4. statistické hledisko, kazuistika

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

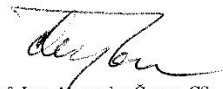
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Iveta Hniličková

Podpis:

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. za ochotu, přátelský přístup a cenné rady, které mi poskytovala v průběhu psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům kliniky Gennet, za ochotu při poskytování materiálů. Poslední poděkování patří mé rodině a blízkým přátelům za podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato práce se věnuje tématu Leidenské mutace, která je považována za jednu z nejrozšířenějších vrozených trombofilií. Popisovaná mutace způsobuje zvýšené srážení krve a stává se rizikovým faktorem pro tromboembolismus. Práce se zabývá charakteristikou onemocnění, klinickými projevy, možnostmi diagnostiky, rizikovými faktory, dále přístupy ke zmírnění rizika trombózy a četností výskytu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Leidenská mutace, faktor V, hemostáza, trombofilie, tromboembolismus

TITLE

Leiden mutation

ANNOTATION

This thesis is devoted with Leiden mutation, which is considered one of the most inherited thrombophilia. Described mutation is increases the blood clotting and becomes risk factor for thromboembolism. The thesis concerns with the characteristics of disease, clinical manifestations, diagnostic possibilities, risk faktors, attitudes to reduce the risk of thrombosis also and accurrence of this mutation.

KEYWORDS

Leiden mutation, factor V, hemostasis, thrombophilia, thromboembolism

OBSAH

SEZNAM POJMŮ	10
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	11
SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	14
SEZNAM PŘÍLOH.....	15
ÚVOD.....	16
1 HISTORIE.....	17
2 GENETICKÉ HLEDISKO	18
2.1 Genetické mutace	18
2.1.1 Typy mutací	19
2.2 Genetický podtext u Leidenské mutace	21
3 HEMOSTÁZA	22
3.1 Endotel	22
3.2 Primární hemostáza.....	22
3.3 Plazmatický koagulační systém	23
3.3.1 Inhibitory koagulačního systému.....	24
3.4 Fibrinolýza	25
3.4.1 Faktor V	26
3.4.2 Rezistence na aktivovaný protein C.....	27
4 LEIDENSKÁ MUTACE	29
4.1 Charakteristika mutace.....	29
4.2 Klinické projevy.....	30
4.2.1 Venózní tromboembolická nemoc	30
4.2.2 Komplikace v těhotenství	31
4.2.3 Leidenská mutace a Budd-Chariho syndrom.....	33
5 DIAGNOSTIKA.....	35
5.1 Testování rezistence na aktivovaný protein C	35
5.2 Molekulárně genetické stanovení.....	36
5.2.1 Polymerázová řetězcová reakce.....	36
5.2.2 Polymerázová řetězcová reakce v reálném čase	37
5.2.3 Amplifikační refrakční mutační systém.....	38
5.2.4 Polymorfismus délky restričních fragmentů.....	38

5.2.5	Denaturační gradientová gelová elektroforéza	39
5.2.6	Polymorfismus konformace jednoduchých řetězců	39
5.2.7	Pyrosekvenování	39
6	LÉČBA A PŘÍSTUPY	41
6.1	Rizikové faktory	41
6.1.1	Hormonální antikoncepce	41
6.1.2	Hormonální substituční terapie	42
6.1.3	Další trombofilní stavy	43
6.1.4	Systém AB0	43
6.1.5	Ostatní rizikové faktory	43
6.2	Léčba a přístupy	44
7	STATISTICKÉ HLEDISKO	46
8	ZÁVĚR	48
	SEZNAM ZDROJŮ	50
	ZDROJE OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	55
	ZDROJE PŘÍLOH	56
	PŘÍLOHY	57

SEZNAM POJMŮ

Abrupce placenty: předčasné odloučení placenty.

Edém: otok, jde o nadměrné hromadění tekutiny v buňkách, tkáních a orgánech, které dále může vést k jejich zvětšení a poruše funkce.

GPIb alfa: glykoproteinové molekuly s alfa řetězcem sloužící jako receptory pro von Willebrandův faktor.

Hemodiluce: zředění krve zvýšením objemu tekutiny v cévách.

Hemolýza: rozpad erytrocytů.

Ikterus: žloutenka, jedná se o žluté zbarvení kůže a sliznic způsobené zvýšením obsahem žlučového barviva.

Jaterní fibróza: zmnožení vaziva na úkor zániku jaterních buněk.

Lupus antikoagulans: protilátky, které produkuje imunitní systém proti vlastním fosfolipidům nebo bílkovinám vázaným na fosfolipidy.

Nidace: zahnízdění oplodněného vajíčka do děložní sliznice.

Osteoporóza: onemocnění, které se vyznačuje úbytkem kostní hmoty, tzv. řídnutí kostí.

Prekalikrein: bílkovina, která se účastní časných fází koagulace, její aktivací vzniká kalikrein. Kromě koagulace má význam také pro fibrinolýzu a zánět.

Proband: vyšetřovaný jedinec, který je postižen danou dědičnou nemocí.

Proteinurie: přítomnost bílkoviny v moči.

Splenomegalie: zvětšení sleziny.

Varix: vakovitě rozšířená, vinutá žíla [1].

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	autozomálně dominantní dědičnost
ADP	adenosin trifosfát
ALP	alkalická fosfatáza
APC	aktivovaný protein C
aPPT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
ARMS	amplifikační reakční systém
AST	aspartátaminotransferáza
AT	antitrombin
ATP	adenosin trifosfát
BCS	Budd-Chiariho syndrom
BMI	Body mass index
COC	kombinovaná hormonální antikoncepce
ddATP	dideoxyadenosin trifosfát
ddCTP	dideoxycytidin trifosfát
ddGTP	dideoxyguanosin trifosfát
ddNTP	dideoxynukleotid
ddTTP	dideoxythymidin trifosfát
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
dNTP	deoxynukleotid

DVT	hluboká žilní trombóza
EE	ethylenestradiol
FDP	fibrin degradační produkty
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie
ERPC	endoteliální receptor proteinu C
HC II	heparinový kofaktor II
HELLP syndrom	haemolysis, elevated liver enzymes, low platelets
HMWK	vysokomolekulární kininogen
HRT	hormonální substituční terapie
INR	mezinárodní normalizovaný poměr
LA	lupus antikoagulans
LD	laktátdehydrogenáza
LMWK	nízkomolekulární heparin
MT1-MMP	matrix metaloproteináza membránového typu I
PAI-1, 2	inhibitor aktivátorů plazminogenu 1, 2
PAR	receptor aktivované proteinázy
PCR	polymerázová řetězcová reakce
PE	plicní embolie
PPi	pyrofosfát
PT	tromboplastinový čas
Real-time PCR	polymerázová řetězcová reakce v reálném čase

RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
SSCP	polymorfismus konformace jednoduchých řetězců
TAFI	trombinem inhibitor fibrinolýzy
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TGT	trombin generační test
TIPS	transjugulární intrahepatální portosystémová spojka
tPA	tkáňový aktivátor plazminu
TXA ₂	tromboxan A ₂
uPA	urokináza
VTE	žilní tromboembolická nemoc
vWf	von Willebrandův faktor

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1: Rogier M. Bertina	17
Obrázek 2: Druhy strukturních chromozomálních aberací	20
Obrázek 3 : Umístění F5 genu.....	21
Obrázek 4: Koagulační kaskáda	24
Obrázek 5: Antikoagulační aktivace faktoru V aktivovaným proteinem C a prokoagulační aktivace faktoru V trombinem	26
Obrázek 6: Rodokmen pro autozomálně dominantní typ dědičnosti	29
Obrázek 7: Jaterní venografie ženy s BCS po angioplastice.....	34
Obrázek 8: Schéma principu polymerázové řetězcové reakce	37
Obrázek 9: Detekce mutace v genu pro faktor V pomocí PCR a RFLP analýzy.....	38
Tabulka 1: Prevalence LM	46
Graf 1: Výskyt Leidenské mutace u obou pohlaví v ČR, Praha (2016)	47
Graf 2: Poměr Homozygoti/Heterozygoti obou pohlaví LM, ČR, Praha (2016)	47

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Pravděpodobnost dědičnosti pro heterozygotní typ LM.....	57
Příloha 2: Pravděpodobnost dědičnosti pro homozygotní typ LM.....	57
Příloha 3: Zmije řetízková (<i>Daboia russelli</i>)	58
Příloha 4: Pakobra páskovaná (<i>Notechis scautus</i>).....	58
Příloha 5: Výsledek testu ARMS	59
Příloha 6: Záznam pyrogramu, závislost intenzity světla na čase	59

ÚVOD

Žilní tromboembolismus (VTE) je poměrně časté a závažné onemocnění ohrožující život pacienta. Nejběžnější projevem VTE je hluboká žilní trombóza, zejména dolních končetin. Riziko VTE stoupá jednak s rostoucím věkem a jednak s přítomností trombofilních stavů, ať už vrozených či získaných. Jednou z těchto vrozených trombofilii je Leidenská mutace (LM).

LM se v současné době řadí mezi nejrozšířenější zděděné trombofilie u bělošské populace Evropských států, s prevalencí čítající průměrně 3 – 7 %. LM je charakteristická odolností proti aktivovanému proteinu C (APC). Úkolem APC je inhibovat aktivovaný koagulační faktor V, ale díky bodové mutaci v tomto faktoru, je zrušeno jedno z hlavních štěpných míst pro APC a tím je pak inhibice faktoru V více než 10 – násobně pomalejší. LM je tedy porucha srážlivosti krve ve smyslu zvýšené koagulace. O její objevení v roce 1994 se zaslouhuje profesor Rogier M. Bertina ve městě Leiden, podle kterého je mutace pojmenována.

LM představuje významný rizikový faktor zvyšující nebezpečí vzniku tromboembolismu, toto riziko stoupá v interakci s dalšími rizikovými faktory (obezita, věk, trauma, užívání hormonální antikoncepce apod.). Dále může být LM možnou příčinou spontánních potratů a výskytu komplikací během těhotenství.

Ačkoliv je LM značně široce rozšířená, je stále pro laickou veřejnost neznámou. Cílem bakalářské práce je shrnout veškeré informace týkající se přítomnosti LM a obeznámení s riziky, kterými LM disponuje.

1 HISTORIE

V roce 1943 byla na kliniku v Oslu přijata pacientka, která trpěla těžkými sklony ke krvácení. P. A. Owren, tehdejší docent na témže oddělení, zkoumal krev pacientky. Zjistil, že pacientka trpí nedostatkem (v té době ještě neznámého) srážecího faktoru. V roce 1947 objevil nový koagulační element, pojmenoval ho faktor V [2].



Obrázek 1: Rogier M. Bertina, dostupné z: Zdroj [1]

V roce 1993 profesor Björn Dahlbäck a kolektiv provedl několik laboratorních testů plazmy hlášeného případu rodiny. Proband z této rodiny v minulosti prodělal několik epizod hluboké žilní trombózy a následná rodinná anamnéza ukázala výskyt trombózy i mezi příbuznými. U 14 z 19 testovaných členů rodiny se projevila slabá antikoagulační odpověď na aktivovaný protein C (APC). Po dalším zkoumání se dospělo k závěru, že APC rezistence může být způsobena anomálií ve funkci antikoagulačního faktoru V [3].

O rok později, tedy v roce 1994, profesor Rogier M. Bertina (viz obrázek 1) objevil bodovou mutaci v genu pro faktor V, která je příčinou APC rezistence, a tedy zvýšeného rizika hluboké žilní trombózy. Mutace byla pojmenována podle města Leiden, ležící v Nizozemí, kde byla tato anomálie poprvé odhalena [4].

2 GENETICKÉ HLEDISKO

Deoxyribonukleová kyselina, zkráceně DNA, má zásadní vliv pro přenos a zachování genetické informace. Molekula DNA se skládá ze dvou polynukleotidových řetězců. Tyto řetězce jsou spojeny vodíkovými vazbami. Cukerné složky DNA (2-deoxy-D-ribózy) jsou spojeny prostřednictvím fosfodiesterové vazby přes fosfátové skupiny. Na každou deoxyribózu je vždy připojena příslušná dusíkatá báze. Mezi dusíkaté báze odvozené od purinu patří adenin a guanin, od pak pyrimidinu cytosin a thymin. Tyto báze se navzájem párují a tvoří tak dvoušroubovicovou strukturu. Adenin se páruje s thyminem a guanin s cytosinem.

DNA společně s proteiny tvoří chromozom. Existují 2 typy chromozomů: pohlavní chromozomy neboli gonozomy, ty určují typ pohlaví a autozomy, které se vyskytují u obou pohlaví. Lidská buňka obsahuje 23 homologních chromozomů. Autozomy se značí číslicemi (1-22), zatímco gonozomy písmeny (X a Y). Na chromozomech jsou uloženy geny. Každý má své specifické místo neboli lokus a v každém genu je zapsána informace k vytvoření určitého znaku, proto je označován jako základní jednotka dědičnosti [5].

Geny existují v konkrétních formách tzv. alelách. Pro každý gen jsou v somatické buňce přítomny 2 alely. Jsou-li tyto alely funkčně shodné, pak se takovýto jedinec nazývá homozygot. Homozygot může mít obě alely dominantní (AA) nebo recesivní (aa). Jsou-li alely odlišné, což znamená, že párové alely mají odlišnou specifitu, potom je jedinec označen jako heterozygot (Aa).

V mezialelických vztazích může dojít k úplné dominanci, neúplné dominanci a ke kodominanci. Úplná dominance je stav, kdy dominantní alela plně potlačí projev recesivní alely. Pokud dominantní alela nepotlačí recesivní alelu úplně, jedná se o neúplnou dominanci. Recesivní alela se tedy také projeví. Zvláštním případem je kodominance, zde se u heterozygota zcela projeví obě alely, aniž by se ovlivňovaly.

2.1 Genetické mutace

Jestliže dojde k chybě například při replikaci DNA nebo jinému poškození DNA, nastává změna genetické informace neboli mutace. Tyto změny mívají často nepříznivý dopad na organismus. Některé mutace vyvolávají nádorová onemocnění, poruchy metabolismu nebo

způsobují těžké vývojové vady. Mutace může být zapříčiněna působením tzv. mutagenů, což jsou faktory, které jsou schopny měnit strukturu DNA, mohou způsobit její zlomy či jiné přestavby. Tyto faktory lze rozdělit do tří skupin: fyzikální, chemické a biologické mutageny. Do fyzikálních mutagenů patří například UV záření, které je hlavní příčinou rakoviny kůže, dále radioaktivní či rentgenové záření, které vyvolávají chromozomální zlomy. Chemické mutageny jsou například aromatické uhlovodíky, některé léky, barviva, pesticidy a další. Různé druhy virů řadíme k biologickým mutagenům [5, 6].

2.1.1 Typy mutací

Mutace se dělí do určitých skupin. Dle rozsahu poškození genetické výbavy organismu se rozlišují mutace genomové, chromosomální a genové. Podle typu poškozených buněk členíme na somatické a gametické mutace. Z pohledu mechanismu vzniku rozeznáváme mutace spontánní neboli samovolné a dále indukované, tedy vyvolané nějakým vnějším/vnitřním faktorem [6].

Mutace na chromozomální úrovni lze rozdělit na numerické aberace a strukturní aberace. Numerické aberace jsou mutace související se změnou počtu chromozomů. Do těchto aberací řadíme aneuploidie a polyploidie. Aneuploidie je stav, kdy některý chromozom z celé chromozomální sady chybí či přebývá. Takovým příkladem je trisomie ($2N + 1$), což je výskyt tří kopií jednoho chromozomu. Naopak monosomie ($2N - 1$) je přítomnost pouze jednoho chromozomu z chromozomálního páru, došlo tedy ke ztrátě. Tyto poruchy jsou zapříčiněny chybným rozestoupením chromozomů při meiotickém dělení. V případě polyploidie dochází ke znásobení celé chromozomální sady. Příkladem takového znásobení je triploidie, zde karyotyp obsahuje 69 chromozomů ($3N$). Polyploidie se často využívají při šlechtění rostlin, např. při zvýraznění některých žádoucích vlastností.

Strukturní aberace lze charakterizovat jako změny ve struktuře chromozomů (viz obrázek 2). Do této skupiny mutací patří delece, duplikace, inverze, translokace, izochromozomy a centrické fragmenty. Izochromozomy jsou chromozomy složeny pouze ze dvou krátkých nebo naopak ze dvou dlouhých ramének.

Při delecí dochází ke ztrátě části chromozomů. Jestliže je delece intersticiální, jedná se o ztrátu vnitřní části chromozomu, terminální delece je ztráta okrajové části chromozomu. Delece může být způsobena vznikem dvou zlomů a následné chybné reparaci. Další variantou

je nerovnoměrný crossing-over. Kdyby došlo na témže chromozomu ke dvěma delecím, mohlo by dojít ke vzájemnému propojení a vznikl by tzv. kruhový chromozom (ring chromozom).

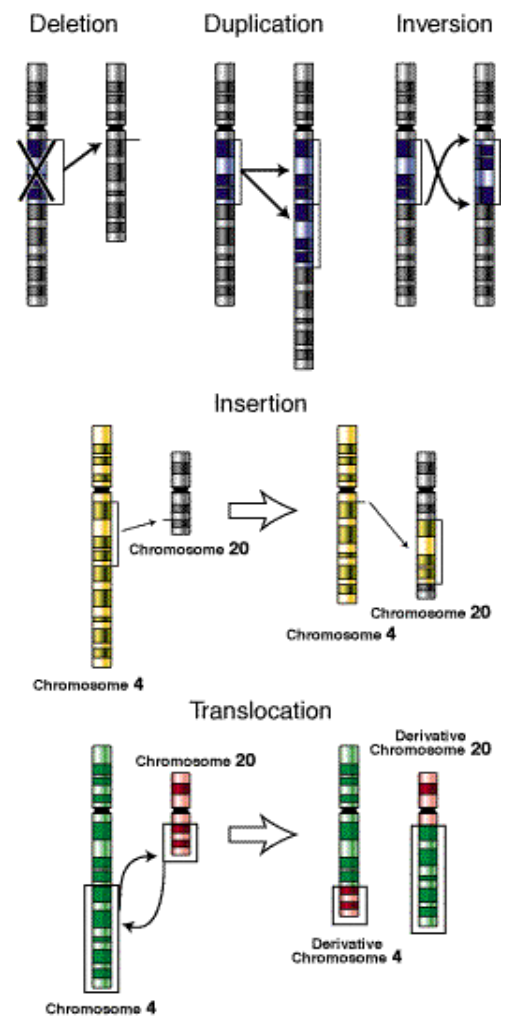
Duplikace je aberace, při které dojde ke znásobení určitého chromozomálního úseku. Jedná se o důsledek nerovnoměrného crossing-overu. Jinou možností příčiny může být translokace, inverze nebo přítomnost izochromozomu.

Inverzi chápeme jako přestavbu chromozomálních segmentů vlivem chromozomální nestability. Obsahuje-li segment centromeru, jedná se o inverzi pericentrickou. Pokud centromera v daném úseku není přítomna, jde o inverzi paracentrickou.

Translokace je charakteristická tím, že dochází k výměně chromozomového materiálu mezi chromozomy či přenosu části chromozomu na jiný chromozom. Robertsonská translokace neboli centromerická fúze je druh translokace, při které vznikají zlomy blízko nebo přímo v oblasti centromer dvou akrocentrických chromosomů, poté dochází k jejich fúzi. Tato výměna nemá škodlivé následky, jelikož ztráta genetického materiálu v tomto případě je zanedbatelná. Jedná se tedy o tzv. balancovanou

translokaci. Dalším druhem jsou tzv. translokace reciproké, což jsou interchromozomové výměny, například vzájemná záměna ramen mezi dvěma chromozomy. Posledním a nezácnějším druhem je translokace inzerční, při které se určitá část chromozomu začlení do jiného chromozomu [7].

Mutace genové ovlivňují pouze jeden gen. Dojde-li k záměně nukleotidového páru, označujeme tuto mutaci jako bodovou. Do této skupiny řadíme substituce, delece, inserce, duplikace a mutace posttranskripčních úprav RNA.



Obrázek 2: Druhy strukturních chromozomálních aberací, dostupné z: Zdroj [2]

Substitucí rozumíme výměnu páru bází. Jestliže dojde k záměně purinové báze za purinovou nebo pyrimidinové za pyrimidinovou, jedná se o transici. V případě záměny purinové báze za pyrimidinovou bázi či naopak, pak mluvíme o transverzi.

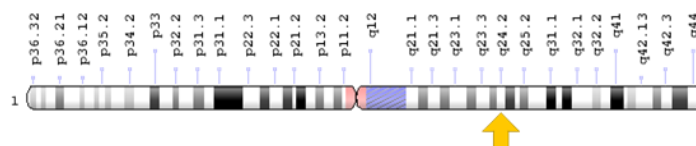
Inzerce neboli adice je označována jako přítomnost nadbytečného nukleotidového páru. Zatímco delece představuje ztrátu jednoho či více nukleotidových párů. Tyto mutace mohou vést k poruše translačního čtecího rámce, což způsobuje chybnou sekvenci aminokyselin.

Podle vlivu mutací na proteosyntézu, lze genové mutace rozlišit na mutace neměnicí smysl, měnicí a nesmyslné. Mutace neměnicí smysl, jinými slovy tiché mutace, je stav kdy je aminokyselina kódovaná novým kodonem totožná. Je-li nově zařazená aminokyselina odlišná, pak se jedná od mutaci měnicí smysl tzv. missense mutace. Při nesmyslné mutaci vzniká předčasně terminační kodon v sekvenci DNA. Výsledkem je nefunkční protein [6, 7].

2.2 Genetický podtext u Leidenské mutace

Gen, který je zodpovědný za syntézu proteinu faktoru V, se nachází na dlouhém raménku 1. chromozomu (1q24.2; viz obrázek 3). Chromozom 1 je největší z lidských chromozomů. Gen F5 je dlouhý asi 80 kb (kilobáze) a je složen z 25 exonů a 24 intronů.

Příčinou LM je bodová mutace v právě zmíněném genu pro faktor V. Jedná se o substituci neboli výměnu páru bází, konkrétně guanin za adenin v nukleotidové pozici 1691, čímž nastává nahrazení aminokyseliny argininu (Arg) za glutamin (Gln) v peptidovém řetězci v poloze Arg506. V důsledku substituce jedné aminokyseliny se stává faktor Va odolný vůči APC. Inaktivace je tak více než 10 - násobně pomalejší než za normálního stavu, což vede ke zvýšené tvorbě trombinu. Faktor V tak ztrácí své antikoagulační schopnosti a jeho funkce v APC inaktivaci faktoru VIIIa je slabá [8].



Obrázek 3 : Umístění F5 genu, dostupné z: Zdroj [3]

3 HEMOSTÁZA

Hemostáza je složitý fyziologický mechanismus, jehož úkol je zastavit krvácení v místě poranění. V okamžiku, kdy dojde k poranění cévní výstelky, začne se uplatňovat ochranný mechanismus, který přemění tekutou krev na krevní sraženinu a tím ránu zacelí. Po uplynutí určité doby, se sraženina rozpustí a obnoví se tekutost krve. Hemostáza se skládá ze tří navzájem propojených hemostatických procesů (primární hemostáza, koagulační systém, fibrinolýza) [9].

3.1 Endotel

Cévní systém, nejen že poskytuje transport kyslíku ke tkáním, ale hraje i významnou roli v hemostáze. Struktura cévní stěny zahrnuje 3 složky, jedná se o intimu, mediu a adventicii. Adventicia je vrstva vnější a nacházejí se zde fibroblasty, adipocyty a žírné buňky. Další vrstva tvořená hladkým svalem a zodpovídající za elasticitu a cévní tonus je media. Intima je tvořena vrstvou endotelových buněk obklopenými fibroblasty a endoteliemi syntetizovanou, bazální membránou.

Endotel kromě jiných funkcí má zásadní význam při procesu hemostáze. V důsledku probíhajícího metabolismu kyseliny arachidonové je zde umožněno tvořit a uvolňovat látky, které např. způsobují vazokonstrikci či vazodilataci, dále zde probíhá uvolňování látek zabraňující agregaci krevních destiček, aktivující protein C nebo látek aktivující či inhibující fibrinolýzu. Na povrchu endotelových buněk se nachází četné množství receptorů např. pro trombomodulin, receptor pro protein S nebo fibronektin [10].

3.2 Primární hemostáza

Při poškození cévní stěny a tím narušení endotelové vrstvy dojde k navození mechanismu zvaný primární hemostáza. Jedná se proces, který zodpovídá za vytvoření primární hemostatické zátky a tím uzavření poškozeného místa.

Následně po porušení cévní stěny dojde k odkrytí kolagenních vláken v subendotelovém prostoru a jinak za normálního stavu neaktivní protékající trombocyty, se

začnou přichytávat na obnažená kolagenní vlákna prostřednictvím svých receptorů glykoproteinové povahy (GP Ia/IIa/IIIb a GP Ib/V/IX) a dále pomocí von Willebrandova faktoru (vWf). Tento děj se nazývá adheze. Adhezi se krevní destičky aktivují a tím začnou měnit svůj tvar. Z původně diskovitého tvaru se trombocyty formují do kulovitého tvaru a vysílají tenké výběžky tzv. filopodie. Dalším krokem je agregace, tedy shlukování krevních destiček. Agregaci vyvolává jednak ADP (adenosintrifosfát), který tvoří granula destiček a tromboxan A₂ (TXA₂), vznikající metabolismem kyseliny arachidonové. ADP a TXA₂ se váží na destičkové receptory glykoproteinové povahy (GP IIb/IIIa) a tím je aktivují. Nejprve probíhá primární agregace, která je reverzibilní. Dalším uvolňováním ADP, TXA₂ a trombospondinu se vytváří destičkovitý agregát a jde tedy o sekundární agregaci, která je ireverzibilní. Při aktivaci destiček probíhá tzv. flip – flop reakce, při níž se fosfolipidy přesouvají z vnitřní membránové dvojvrstvy na vnější membránu, čímž přispívají k dalším fázím hemostázy, povrch destiček tak získá negativní náboj [9, 10].

3.3 Plazmatický koagulační systém

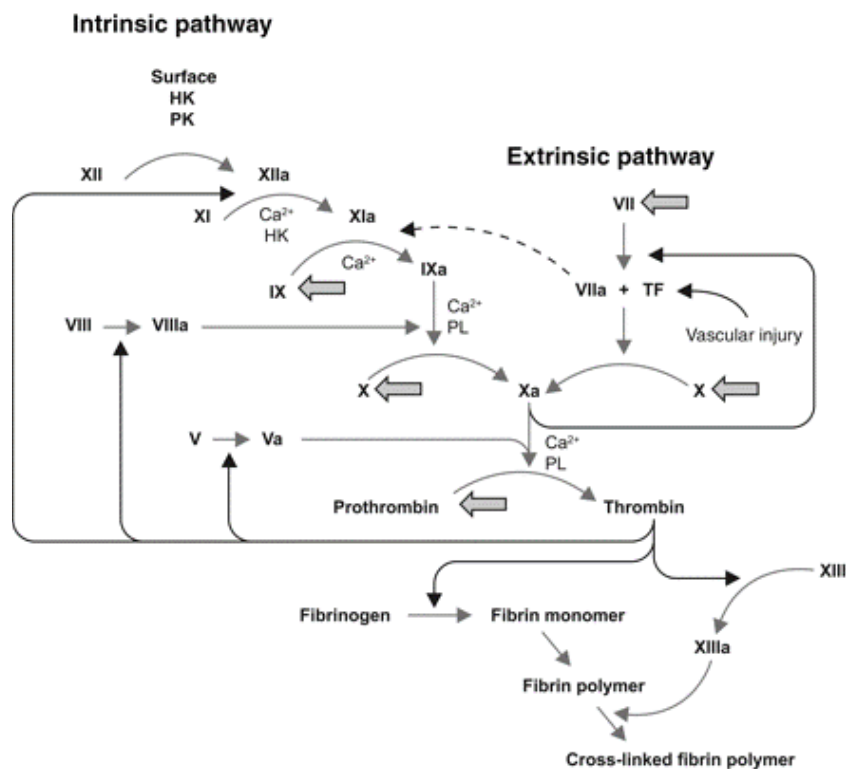
Proces srážení krve je děj směřující k přeměně rozpustného fibrinogenu na nerozpustnou fibrinovou síť za působení trombinu. Fibrinová síť se vytváří v místě poranění, zachycují se v ní krevní buňky a vzniká tak koagulum.

Vnější systém konverze protrombinu na trombin začíná, dojde-li k poranění cévní stěny, tkáňový faktor (TF), tvořený subendotelovými buňkami, se naváže na faktor VII, tím vzniká aktivovaná forma faktoru VIIa. Tento komplex (TF a FVIIa) spolu s Ca²⁺ ionty a fosfolipidy krevních destiček přeměňují faktor X a na aktivovanou formu Xa. Faktor Xa ve spolupráci Ca²⁺ ionty, destičkovými fosfolipidy a s dalším faktorem Va tvoří komplex zvaný protrombináza. Protrombináza převádí neaktivní protrombin na trombin. Vzniká pouze určité množství trombinu, který aktivuje faktory XI, IX, dále kofaktory VIII, V a krevní destičky. Touto cestou zároveň vzniká i inhibitor tkáňového faktoru (TFPI) [9, 11].

Trombin jako jeden z nejdůležitějších koagulačních faktorů obsahuje kromě svých aktivních míst (Ser195, His57, Asp189), ještě dvě významná místa označovaná jako oblast I a II. Přes oblast I se váže trombomodulin, fibrinogen a faktor V, přes oblast II se váže heparin, fibrinogen, faktor V a GPIb alfa. Molekula trombinu obsahuje místo Na⁺, jedná se o důležité vazebné místo, které ovlivňuje aktivitu trombinu. Na tzv. Na⁺ místo se váží sodné ionty, jestliže

jsou navázány, pak trombin uskutečňuje vazbu s fibrinogenem, faktorem V, VII, nebo proteinem PAR1. Nejsou-li sodné ionty navázány, váže trombin protein C [12].

Vnitřní systém je započat fází kontaktu, při které se faktor XII po kontaktu s negativně nabitou subendotelovou strukturou mění na aktivovaný faktor XIIa. Tvoří se jen určité množství faktoru XIIa potřebné k přeměně ve spolupráci s HMWK (vysokomolekulární kininogen) prekalikreinu na kalikrein. Kalikrein se pak váže na faktor XII a vniká patřičné množství aktivovaného faktoru XIIa, který aktivuje faktory XI a IX. Faktor IXa spolu s aktivovaným a faktorem VIIIa způsobují přeměnu faktoru X na faktor Xa. Faktor Xa v kombinaci s faktorem Va tvoří protrombinázu, která aktivuje trombin. Ten pak přeměňuje rozpustný fibrinogen a na rozpustný fibrin. Dále dochází k aktivaci faktoru XIII, neboli fibrin stabilizujícího faktoru [9, 12].



Obrázek 4: Koagulační kaskáda, dostupné z: Zdroj [4]

3.3.1 Inhibitory koagulačního systému

Koagulační systém má své přirozené inhibitory a jsou to: inhibitor tkáňového faktoru, systém proteinu C, antitrombin (AT) a heparinový kofaktor II (HC II).

Při zvýšené aktivitě faktoru Xa se spustí tvorba TFPI. TFPI v kooperaci s faktorem Xa blokuje aktivitu tkáňového faktoru a faktoru VIIa.

Dalším inhibítozem koagulačního procesu je systém proteinu C. Protein C je glykoprotein tvořený v játrech v závislosti na působení vitamínu K. Kofaktorem tohoto proteinu je protein S. Aktivace proteinu C spočívá ve vazbě trombomodulinu a trombinu, kde se trombin stává neaktivní. Trombin v této vazbě je schopen přeměnit protein C na aktivní formu. Tato aktivace probíhá na povrchu endotelových buněk, kde se protein C váže na tzv. endoteliální receptor proteinu C (ERPC). APC inhibuje faktory Va a VIIIa. U faktoru Va probíhá inhibice proteolytických štěpením postupně v místech Arg506, Arg306 a Arg679. V důsledku inaktivace Va, nemůže vznikat komplex protrombináza, která způsobuje přeměnu protrombinu na trombin, proto nedochází k další syntéze trombinu. Inaktivací faktoru VIIIa je zamezena vazba s faktorem IXa, nemůže být aktivován faktor Xa a tedy nedochází vzniku trombinu. Inaktivace samotného proteinu C probíhá za působení inhibitoru proteinu C, α_2 -antitrypsinu, α_2 -makroglobulinu či α_2 -antiplazminu.

Za klíčový inhibitor je považován antitrombin, který je tvořen jaterními a endotelovými buňkami. AT je schopen inhibovat nejen trombin, ale i ostatní serinové proteázy. Účinnější inaktivace probíhá v kombinaci s navázanou molekulou heparinu.

Inhibitor opět syntetizovaný v játrech a endotelu se nazývá heparinový kofaktor II. Účinek HC II spočívá v inhibici pouze trombin, pokud poklesne hladina antitrombinu [9, 10].

3.4 Fibrinolýza

Hlavní funkcí fibrinolýzy je rozpuštění trombu a opětné zprůchodnění krevní cévy. Za působení enzymu plazminu se fibrinová síť rozštěpí na fibrin degradační produkty (FDP).

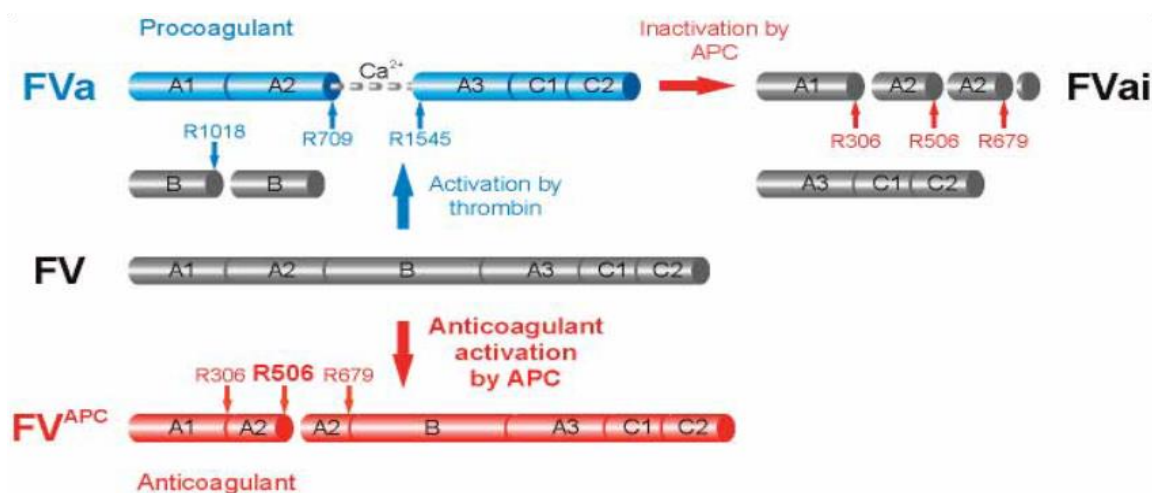
Z aktivátorů plazminogenu je nejdůležitější tkáňový aktivátor plazminu (tPA) a urokináza (uPA), k dalším aktivátorům patří kalikrein, aktivovaný faktor XIa, XIIa nebo MT1-MMP (matrix metaloproteináza membránového typu). Tkáňový aktivátor plazminu se naváže na fibrin a štěpí vazbu mezi Arg561-Val562 v plazminogenu vázaného na fibrin, což způsobuje syntézu plazminu, který štěpí fibrin. Plazmin dále štěpí vazbu mezi Arg275-Ile276 v molekule tPA a vzniká aktivnější forma.

Obdobně jako tPA, urokináza nasedá na plazminogen a štěpí vazbu mezi Arg561-Val562, čímž vzniká plazmin. Vzniklý plazmin dále štěpí fibrin. Poté plazmin ve spolupráci

s kalikreinem štěpí vazbu mezi Lys158-Ile159 v molekule uPA a následně vzniká aktivnější dvouřetězcová forma.

Vedle aktivátorů je stejně tak zapotřebí i inhibitorů, kteří zastávají regulační funkci fibrinolytického systému. Inhibitory fibrinolýzy jsou tedy α_2 -antiplazmin, ten zabezpečuje inaktivaci plazminu, dále inhibitory aktivátorů plazminogenu 1, 2 (PAI-1, PAI-2), inhibují tedy tPA a uPA, posledním inhibitorem je trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI) [12].

3.4.1 Faktor V



Obrázek 5: Antikoagulační aktivace faktoru V aktivovaným proteinem C a prokoagulační aktivace faktoru V trombinem, dostupné z: Zdroj [5]

Faktor V je tedy protein působící v koagulační kaskádě. Tento faktor má dvojí funkci, a to jak v prokoagulačních, tak v antikoagulačních dráhách. Jedná se o jednořetězcový glykoprotein vznikající v játrech a megakaryocytech.

Trombin aktivuje faktor V štěpením v Arg709, Arg1018 a Arg1545. Tím vzniká prokoagulační molekula faktor Va. Ta je složena z lehkého a těžkého řetězce, které jsou spojeny prostřednictvím iontu vápníku a nekovalentních interakcí. Těžký řetězec se skládá z domén A1-A2, zatímco lehký řetězec je složen z A3-C1-C2 domén. Faktor Va a faktor Xa jsou součástí komplexu protrombinázy, která katalyzuje přeměnu protrombinu na trombin, ten přeměňuje fibrinogen na fibrin. APC inaktivuje faktor Va a vzniká inaktivovaný faktor Vai (viz obrázek 5). Tato proměna probíhá prostřednictvím proteolytického štěpení v polohách Arg306, Arg506 a Arg679, které jsou umístěny na těžkém řetězci. Jako první probíhá štěpení v poloze Arg506, poté v Arg306 a tím je molekula zcela inaktivována. Štěpení na Arg679 je nejpomalejší a nemá žádný fyziologický význam [8, 13].

Kromě prokoagulační funkce se faktor V vyznačuje tedy i antikoagulační funkcí a to tak, že napomáhá inaktivaci faktoru VIIIa prostřednictvím aktivovaného proteinu C [13].

3.4.2 Rezistence na aktivovaný protein C

Protein C, jak už bylo výše zmíněno, je přirozeným inhibítorem koagulační kaskády. Termín rezistence vůči aktivovanému proteinu C lze charakterizovat jako výrazně sníženou až žádnou odpověď na APC, jedná se tedy o odolnost aktivovaných koagulačních faktorů (Va, VIIIa) vůči působení proteinu C, což vede ke vzniku hyperkoagulačního stavu. Nejčastější příčinou této rezistence na APC je mutace v genu pro faktor V, Leidenská mutace. Na základě studií, bylo zjištěno, že přibližně u 40 % pacientů trpící venózní tromboembolickou nemocí (VTE) byla detekována přítomnost právě APC rezistence. Dále je prokázáno, že u 90 % případů postižených pacientů APC rezistencí souvisí s mutací v genu pro faktor V.

V případě APC rezistence zapříčiněnou LM, dochází k defektu jednoho z předních štěpných míst v molekule faktoru V pro APC, místa Arg506. Za normálního stavu se místo Arg506 zaslouhuje o rychlou a účinnou inaktivaci aktivovaného faktoru Va. Jestliže je tedy toto místo v důsledku přítomnosti LM postiženo, jeho funkci zastupuje místo Arg306, které dokáže plně, ale mnohem pomaleji inaktivovat faktor Va. Rychlost inaktivace ve srovnání se stavem, kdy je místo Arg506 zcela funkční je řádově 10 – 20x pomalejší. Dalším dopadem v závislosti na defektu tohoto štěpného místa je, že molekula faktoru V nemůže být přeměněna na kofaktor procesu inaktivace aktivovaného faktoru VIIIa prostřednictvím APC, což vede tedy k neúčinné degradaci faktoru VIIIa.

Kromě LM existují i další mutace faktoru V, jedná se mutace Cambridge a Hong Kong (faktor V Cambridge, faktor V Hong Kong). Jejich mutace spočívá v obou případech v ovlivnění štěpného místa Arg306. Opět se jedná (jako u LM) o nahrazení aminokyseliny, u mutace Cambridge konkrétně záměnou aminokyseliny argininu za threonin (Thr) v peptidovém řetězci v poloze Arg306 a v případě mutace Hong Kong jde o náhradu argininu za glycin. Ve srovnání s LM tyto dvě mutace vykazují o něco slabší rezistenci vůči APC, jejich výskyt je poměrně vzácný a sami o sobě nespádají do rizikových faktorů vzniku trombózy. Avšak mohou toto riziko zvýšit v kombinaci s další vrozenou nebo získanou trombofilií.

Haplotyp HR2 je další mutace spojená s faktorem V, jde o mutaci v nukleotidu 4070 zapříčiňující náhradu aminokyseliny histidinu (His) za arginin. S touto mutací je spojená snížená hladina faktoru V a zároveň vykazuje i rezistenci na APC.

Mezi další elementy způsobující APC rezistenci patří i změny v hladinách některých koagulačních faktorů a inhibitorů. Zejména se jedná o sníženou hladinu TFPI, proteinu S nebo faktoru V, dále naopak zvýšenou hladinu protrombinu, faktoru VIII, IX či X.

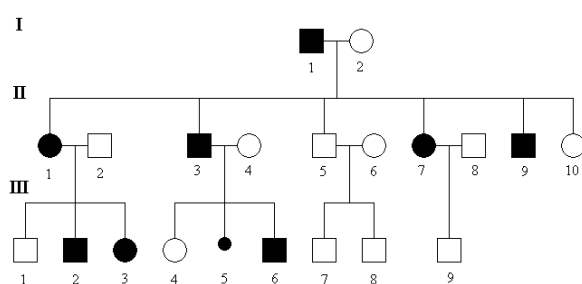
Získaná APC rezistence je zaznamenána např. při užívání hormonální antikoncepce, nebo při hormonální substituční léčbě, nádorovém onemocnění dále během období těhotenství, či přítomností antifosfolipidových protilátek [14].

4 LEIDENSKÁ MUTACE

Leidenská mutace (LM) nebo také faktor V Leiden mutace je dědičná porucha krevní srážlivosti. Jedná se bodovou mutaci v genu pro faktor V, která způsobuje sníženou až nulovou antikoagulační odpověď na aktivovaný faktor C, což vede k abnormálně zvýšené tvorbě trombinu a následně i krevních sraženin. Tato mutace vytváří hyperkoagulační (trombofilní) stav a zesiluje tím tak riziko vzniku trombózy. LM je řazena mezi vrozené trombofilie. Nejčastějším projevem trombofilie je VTE zahrnující plicní embolii (PE) a hlubokou žilní trombózu (DVT). LM bývá také častou příčinou spontánních potratů a komplikací během těhotenství.

4.1 Charakteristika mutace

V případě LM se jedná o dědičnost autozomálně dominantní (AD). Autozomální dědičnost značí, že mutace není uložena na pohlavních chromozomech (gonozómech) a není tedy na pohlaví závislá. Tato mutace je umístěna na nepohlavních chromozomech (autozomech), tedy se dědí nezávisle na pohlaví. Pravděpodobnost zdědění LM z rodiče postiženého mutací na potomka činí 50 % (viz příloha 1) a tedy bez rozdílu na pohlaví jedince (viz obrázek 6), jestliže ale rodič znak pro LM na potomka nepřenesl, potomci zdravého jedince už mutaci dále zdědit nemohou. V tomto typu dědičnosti se v drtivé většině vyskytuje mutace v heterozygotním stavu, což znamená, že jedinec má mutantní pouze jednu alelu. Kdežto výskyt LM v homozygotní formě, kde jsou zmutované obě alely, je poměrně vzácný. Jestliže je jeden



Obrázek 6: Rodokmen pro autozomálně dominantní typ dědičnosti, dostupné z: Zdroj [6]

z rodičů homozygot, tak je 100 % pravděpodobnost, že potomci zdědí LM v heterozygotní formě (viz příloha 2). Pokud jsou oba rodiče heterozygotní, možnost pro přenos LM v homozygotní formě činí 25 %, dále je 50 % šance, že potomci budou heterozygotní a zároveň existuje 25 % pravděpodobnost, že potomci mutaci nezdědí.

U LM se rozdíl mezi heterozygotem a homozygotem liší rizikem vzniku trombózy. U jedince s LM v heterozygotním stavu je riziko rozvoje hluboké žilní trombózy 5 – 10x vyšší oproti populaci bez postižení LM. Homozygotní pacient má toto riziko o něco vyšší

než heterozygot. Jeho riziko vzniku trombózy je tedy až 80x vyšší než u běžné populace a zároveň je tak i vyšší šance rozvoje své první VTE v mladším věku [15].

4.2 Klinické projevy

Klinické projevy u jedinců s diagnostikovanou LM je značně ovlivněna s dalšími vyskytujícími genetickými či získanými trombofiliemi a okolními rizikovými faktory.

4.2.1 Venózní tromboembolická nemoc

VTE je hlavním klinickým projevem LM. Tromboembolie je stav, při kterém vzniká krevní sraženina, ta se odtrhne od svého místa a putuje krevním řečištěm, kde se usadí v krevní cévě a dojde k jejímu uzavření.

Na základě studií bylo prokázáno, že struktura fibrinu má významný vliv na mechanickou a fibrinolytickou stabilitu trombu. Husté a vysoce stabilní sraženiny jsou předpokladem pro vznik trombózy, zatímco méně stabilní až nestabilní sraženiny jsou spojovány s poruchami krevní srážlivosti [16].

Jeden z projevů VTE je hluboká žilní trombóza, což je onemocnění s tvorbou trombů v hlubokých žilách. Žilní systém může být postižen po celém těle, nejčastěji se však jedná o vznik trombózy dolních končetin, naopak málo častá je trombóza horních končetin. Do vážných komplikací DVT řadíme plicní embolii a chronické žilní onemocnění tedy posttrombotický syndrom. Plicní embolie nastává tehdy, jestliže dojde ke zneprůchodnění plicní tepny nebo její větve krevní sraženinou, vzácně pak může být ucpána vzduchovou bublinou, plodovou vodou při porodu nebo tukovými částicemi. Jedná se o závažné onemocnění, které může vést až k úmrtí pacienta. Typickými příznaky PE jsou dušnost, bolest na hrudníku a tachypnoe. V některých případech se vyskytuje vykašlávání krve či horečky [17]. Projevy žilní trombózy se mohou objevit v jakémkoliv věku, často už v pubertě či do 30. věku života jedince. V dětském věku nebo u zdravých jedinců je trombóza velice vzácná. U mladých žen často souvisí s užíváním hormonální antikoncepce.

Mezi primární projevy VTE patří otok, lokální změna barvy kůže, bolestivost v místě otoku, u dolních končetin pocity tíhy, únavy a svalová křeč. Žilní otok je nahromadění tkáňového moku v mezibuněčném vazivovém prostoru. Příčinou kumulování tkáňového moku

je nadměrná filtrace plazmy z krevních kapilár při zvýšeném intrakapilárním hydrostatickém tlaku. Volná tekutina se pak hromadí v podkoží [18].

Dnes je VTE vnímána jako multifaktoriální onemocnění, což znamená, že příčinou VTE může být jeden nebo interakce více dědičných/získaných faktorů. Tyto faktory společně naruší hemostatickou rovnováhu mezi prokoagulačními a antikoagulačními drahami. Mezi zděděné rizikové faktory patří APC rezistence, nedostatek proteinu C, proteinu S, antitrombinu a mutace protrombinu 20210. Mezi získané rizikové faktory řadíme například antifosfolipidový syndrom, autoimunní choroby, nádorové onemocnění, užívání orální antikoncepce, těhotenství, obezita a věk.

Jak už bylo výše zmíněno, LM u heterozygotních nosičů zvyšuje riziko vzniku trombózy 5 - 7x, zatímco u homozygotních nosičů zvyšuje riziko až 80x. Závažnost a místo vzniku trombózy je u jedinců s LM individuální. Nejvíce však převládá hluboká žilní trombóza dolních končetin, méně časté jsou povrchové nebo mozkové žilní trombózy. Jedinci s LM mají zvýšené riziko recidivy trombózy. U homozygotů je toto riziko vyšší než u heterozygotů. U mnohých jedinců s LM nemusí za celý život dojít k vyvinutí trombózy [19].

4.2.2 Komplikace v těhotenství

Dalším klinickým projevem spojený s přítomností LM je možný výskyt komplikací během těhotenství. LM je také spojená se zvýšeným rizikem vzniku VTE během těhotenství. Četné studie potvrdily, že LM může být příčinou zvýšeného rizika spontánních potratů a dalších komplikací během těhotenství jako je hypertenze, odloučení placenty, nitroděložní růstová retardace, preeklampsie či HELLP syndrom. Pravděpodobnost úspěšného těhotenství je však vysoká, a to i u žen s LM v homozygotním stavu [20].

Během gravidity dochází k mnoha změnám v hemostáze. Tyto koagulační změny nastávají postupně už od začátku těhotenství. Do původního stavu se hemostáza dostává až okolo 8. týdnu po porodu. Tyto opatření mají předcházet nadměrné ztrátě krve při porodu. V těhotenství nastává tedy vznik tzv. fyziologického hyperkoagulačního stavu, poranění žil při porodu a dále dochází ke zpomalení toku dolních končetin. Průtok je snížený až o 50 %, což může být doprovázeno vznikem otoku. V průběhu 2. a 3. trimestru těhotenství dochází ke snížení proteinu S. Dalším mechanismem, který je zapříčiněn zvýšenou aktivitou protrombinu v plazmě, je nástup druhotné APC rezistence. Dále nastává zvýšení koncentrace fibrinogenu, koagulačních faktorů, mezi které patří faktor V, VII, VIII, vWf a hladina inhibitorů

fibrinolýzy (PAI-1, PAI-2 a TAFI), což je způsobeno na základě zvýšené hladiny některých steroidních hormonů. Za fyziologické gravidity jsou tyto změny souběžně vyvažovány dalšími mechanismy jako je hemodiluce či zvýšením koncentrace inhibitorů koagulace, mezi které náleží hlavně inhibitor tkáňového faktoru, α_2 -makroglobulin a další inhibitory produkované placentou. Tato rovnováha přestane platit při porodu, a následně v šestinedělí v důsledku chybějící placenty, která fungovala jako zdroj některých inhibitorů koagulace, proto může v tomto období vzniknout zvýšené riziko vzniku VTE [21].

V průběhu gravidity a zvláště během poporodního období se riziko vzniku VTE zvyšuje 5 - 6x. U těhotných žen s LM v heterozygotním stavu je riziko projevu VTE 5 - 10x vyšší. U homozygotních žen se jedná o riziko vzniku trombózy 50 - 100x vyšší [20, 21].

Za fyziologického těhotenství systolický i diastolický krevní tlak postupně klesá přibližně do poloviny těhotenství, poté krevní tlak začíná opět stoupat a před porodem nabývá hodnot zhruba totožných jako před otěhotněním. Jestliže se během gravidity vyskytuje hypertenze, krevní tlak dosahuje hodnot i vyšších než 160/110 mmHg [22]. Při diagnostice hypertenze je třeba odlišit, jestli se jedná o preexistující hypertenzi či gestační. Gestační hypertenze vzniká po 20. týdnu těhotenství a trvá nejdéle do 12. týdnu po porodu. U preexistující hypertenze hovoříme tedy o onemocnění vyskytující se ještě před těhotenstvím, jedná se o typ méně závažný. Tento druh hypertenze lze rozdělit na arteriální a sekundární. Arteriální hypertenze se často vyskytuje u obézních žen, ale i u diabetiček.

Preeklampsii chápeme jako závažné onemocnění ohrožující jednak matku ale i plod. Příčinou je řada mechanismů vedoucí k defektu funkce cévního endotelu u těhotné pacientky. Toto onemocnění je přítomno již od počátku těhotenství a vymizí s ukončením těhotenství. Typickým příznakem je hypertenze doprovázená proteinurií, dalším příznakem mohou být edémy vyskytující se nejčastěji v dolních končetinách. Postupně vede k poškození ledvin, placenty, jater, mozku a jiných orgánů, jedná se tedy o mnohočetné orgánové onemocnění. Preeklampsie může předcházet eklampsii, což je stav charakteristický přítomností záchvatů, jehož původem je porucha funkce mozku, ke které přispívá především edém mozku. Eklampsii značí bolesti hlavy, nauzea, porucha zraku, poruchy vědomí, dále toniccko-klonické křeče a následuje kóma. Jestliže dojde k rozvoji záchvatu, hrozí nebezpečí předčasného odloučení placenty a odumření plodu, jedná se o stav vysoce ohrožující život matky a je tedy nezbytné ukončit těhotenství [23].

Další nebezpečnou komplikací během gravidity je HELLP syndrom (H – haemolysis, EL – elevated liver enzymes, LP – low platelets). Pro HELLP syndrom je charakteristická hemolýza, snížená hladina krevních destiček, dále zvýšená hladina některých jaterních enzymů jako je laktátdehydrogenázy (LD), alkalické fosfatázy (ALP), či aspartátaminotrasferázy (AST). Důsledek zvýšené hladiny LD přispívá právě zmíněná hemolýza. Zvýšená hladina ALP a AST souvisí s poškozením jater. V souvislosti s HELLP syndromem hrozí riziko spontánního prasknutí jaterního hematomu, jedná se život ohrožující, ale vzácně se vyskytující, komplikaci. Další více častou komplikací je abrupce placenty či diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC). DIC je stav vedoucí k poruše hemostázy, dochází k aktivaci endotelu cév, kdy se ve velkém množství začne uvolňovat tkáňový faktor. Na základě uvolňování TF se spouští koagulační kaskáda, jelikož není dostatečně regulovaná jako za fyziologického stavu, vzniká nadměrné množství sraženin různě v kapilárách po celém těle, což může vést k nedostatečnému zásobení určitých tkání či orgánů a dále k selhání orgánů. Následně dochází ke zvýšenému krvácení v důsledku vyčerpání trombocytů a koagulačních faktorů. HELLP syndrom se může vyskytovat u žen s preeklampsií, byl nalezen u 10 – 20 % pacientek s těžkou preeklampsií [24].

4.2.3 Leidská mutace a Budd-Chiariho syndrom

Budd-Chiariho syndrom (BCS) je poměrně vzácné onemocnění. Jde o jaterní žilní obstrukci, tím rozumíme poruchu průtoku jaterních žil a to na úrovni malých jaterních žil, velkých jaterních žil a dolní duté žíly, dále se může vyskytovat kombinace obstrukce velkých jaterních žil a dolní duté žíly. Při obstrukci dochází ke zvýšení sinusového tlaku, ten způsobuje přetlak v portální žíle, snížení průtoku krve játry a tím narušení funkce hepatocytů, které může zapříčinit až nekrózu jaterních buněk, následuje fibróza, což může vést až k cirhóze jater.

Podle příčiny může být toto onemocnění primární nebo sekundární. Primární BCS rozumíme jako defekt průtoku krve v důsledku uzavření jaterní žíly krevní sraženinou. Sekundární BCS bývá tehdy, jestliže je jaterní žíla zablokována tumorem, či útlakem nádoru z vnějšího okolí. Z hlediska závažnosti projevů a rychlosti šíření onemocnění lze BCS rozlišit na typy superakutní neboli fulminantní, akutní, subakutní a chronický. Mezi projevy BCS patří rostoucí bolest v nadbříšku, zvětšení jater a nepřiměřená kumulace tekutin v dutině břišní tzv. ascites. U fulminantní a akutní formy bývá často přítomen ikterus a neuropsychické poruchy. Zatímco u chronické formy převládá splenomegalie, jícnové a žaludeční varixy [25].

Rizikové faktory pro rozvoj BCS zahrnují užívání perorální antikoncepce, myeloproliferativní onemocnění, chronická zánětlivá onemocnění, těhotenství, následně

šestinedělí a nevhodná životospráva. Jak už bylo výše zmíněno, primární BCS je způsoben obstrukcí jaterní žíly trombem, proto mezi vrozené faktory zvyšující riziko vzniku BCS patří zděděná trombofilie charakteristická poruchou odpovědi na aktivovaný protein C tedy Leidenská mutace. Mezi další vrozené rizikové faktory patří antifosfolipidový syndrom či nedostatek antitrombinu a proteinů C a S [26].

Hlavním cílem léčby BCS je zlepšení prokrvení jater a zachování funkcí jaterních buněk. Nejprve je třeba zjistit příčinu jaterní obstrukce, jedná-li se o trombózu jater, měla by být zahájena antikoagulační terapie. Při ucpaní žíly či zhoršení průtoku žíly je třeba obnovit její průchodnost. Provádí se angioplastika (viz obrázek 7), která umožňuje odstranit překážku, jedná se o zavedení katetru do poškozené vény a implantace tzv. stentu, který slouží jako její výztuž. V případě selhání jater nebo pokročilé cirhózy jater je nejvhodnějším řešením transplantace jater. U pacientů, u kterých nelze provést angioplastiku, je nutno provést metodu, která spočívá ve vytvoření spojky mezi jaterní žílou a portální žílou, tento výkon se nazývá transjugulární intrahepatální portosystémová spojka, zkratkovitě TIPS [25, 26].



Obrázek 7: Jaterní venografie ženy s BCS po angioplastice, dostupné z: Zdroj [7]

5 DIAGNOSTIKA

Rezistence vůči aktivovanému proteinu C, způsobující vznik hyperkoagulačního stavu, je charakteristická pro LM. APC rezistence je v dnešní době považována za jednu z nejčastějších zděděných genetických poruch zvyšující riziko vzniku žilní trombózy. Diagnostika LM spočívá jednak v testování rezistence na APC nebo za pomoci molekulárně diagnostického vyšetření [27].

5.1 Testování rezistence na aktivovaný protein C

Obecně je aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPPT) testem, který se používá ke zjištění správného chodu krevního srážení, resp. slouží k vyšetření vnitřní koagulační kaskády a společné části kaskády (faktory XII, XI, IX, VIII, prekalikrein, HMWK a dále i faktory V, X, fibrinogen). Při provedení toho testu se do zkumavky s vyšetřovanou dekalciifikovanou plazmou přidá parciální tromboplastin a aktivátor. Parciální tromboplastin je směs fosfolipidů, která má za úkol napodobit povrch trombocytů. Aktivátor je látka s negativním nábojem zajišťující navození vnitřní koagulační kaskády. Touto látku může být např. kaolin, oxid křemičitý či kyselina ellagová. V okamžiku přidání Ca^{2+} iontů se spustí srážení krve a zaznamenává se čas do vytvoření fibrinového vlákna, fyziologicky se hodnoty toho času pohybují v rozmezí 25 – 45s. V případě prodloužení časů bývá příčinou nedostatek některého koagulačního faktoru např. faktoru XII, XI, IX, VIII, prekalikreinu, HMWK, v kombinaci s prodloužením protrombinového času (PT) může se jednat o deficit faktoru X, V či fibrinogenu. Výsledkem je poměr koagulačního času testované plazmy vzhledem koagulačního času standardní plazmy [28].

Testování APC rezistence prošlo určitým vývojem za účelem zvýšení specifčnosti a citlivosti výsledků. Původní test APC rezistence využívá poměru mezi dvěma koagulačními časy, a to aktivovaného parciálního tromboplastinového času s přídavkem APC a aPPT bez přídavku APC. Jestliže je výsledek tohoto poměru vyšší než hodnota 2, jedná se o fyziologický stav. Hodnota poměru nižší než 2 je typická pro APC rezistenci tedy LM. Tento test na APC rezistenci může být ovlivněn různými vlivy. Jedním z těchto negativně působících činitelů na výsledek testu může mít zvýšená či snížená hladina jakéhokoliv koagulačního faktoru. Nízká hodnota poměru a tedy falešně pozitivní APC rezistence nastává u užívání kontraceptiv, hormonální substituční terapii nebo v období těhotenství, kdy je hladina proteinu

C snížena a faktoru VIII naopak zvýšena. Naopak falešně zvýšené hodnoty způsobuje např. antikoagulační terapie, snížená hladina vitamínu K, či přítomnost LA (lupus antikoagulans). Právě z těchto důvodů bylo nutno zlepšit test APC rezistence za účelem eliminovat nepříznivé vlivy rušící výsledek.

Upravení původního testu spočívá jednak ve zředění vyšetřované plazmy plazmou s nedostatkem faktoru V a jednak v přidavku heparinu, který má neutralizační účinek. Ředěním plazmou s deficitem faktoru V se ruší omezení předchozího testu a to tím, že dojde k eliminaci působení nedostatku či nadbytku některého z koagulačních faktorů, vlivu Warfarinu při antikoagulační léčbě, kontraceptiv či snížené hladiny proteinu C. Zatímco přítomnost LA stále ruší výsledky testů a vykazuje falešně pozitivní hodnoty. Přítomnost přímých inhibitorů trombinu naopak vykazují falešně zvýšené výsledky, proto je na základě těchto nežádoucích vlivů doporučeno uvést výsledek v tzv. normalizovaném poměru, který se získá tak, že je výsledek testu APC rezistence vydělen normální směsnou plazmou. Ovšem některé studie nepotvrzují zlepšení tohoto testu za použití normalizovaného poměru.

Dalším typem testu APC rezistence je opět založený na měření dvou koagulačních časů a to s přidavkem aktivovaného proteinu C a bez APC. Test je ozvláštněn specifickým aktivátorem, kterým je enzym izolovaný z jedu zmije řetízkové (*Daboia russelli*; viz příloha 3), tento jed obsahuje láky schopné aktivovat faktor V. Po přidavku na aktivovaném faktoru Va závislém aktivátoru protrombinu, který je vyrobený z hadího jedu pakobry páskované (*Notechis scutatus*; viz příloha 4), spustí koagulační kaskáda. Test už není ovlivněn abnormality koagulačních faktorů ani přítomností LA či heparinu [27, 28].

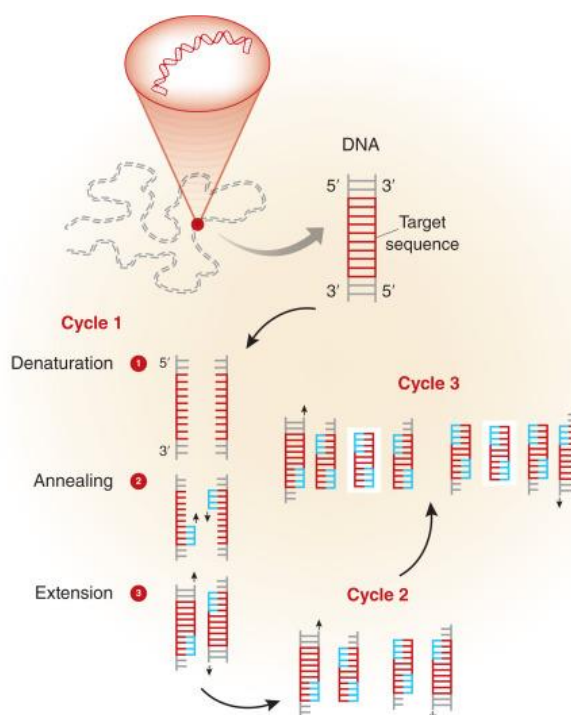
5.2 Molekulárně genetické stanovení

K odhalení LM lze použít řadu metod molekulární genetiky, v následujících kapitolách jsou uvedeny některé z nich.

5.2.1 Polymerázová řetězcová reakce

Řada molekulárně genetických metod za účelem detekce bodové mutace ve faktoru V jsou založeny na polymerázové řetězcové reakci (PCR). PCR je metoda, která využívá schopnost zmnožení neboli amplifikace určitého úseku DNA pomocí enzymů. K reakci je potřeba tzv. primerů, což jsou krátké jednovláknové úseky DNA, kterými se označí daný úsek

DNA. K odhalení LM se konkrétně značí úsek exonu 10 v genu pro faktor V. Metoda se skládá ze tří kroků, které se opakují cyklicky (viz obrázek 8). Prvním krokem reakce je tepelná denaturace, probíhající při teplotě 95 °C. Za této teploty dochází k rozvolnění dvouřetězcové DNA na dvě jednoduchá vlákna. Po poklesu teploty na 50 – 60 °C nastává hybridizace tedy druhý krok reakce, při které primery nasedají na komplementární 3' konce dané DNA. Tyto hybridizované primery jsou základem pro vznik nového komplementárního vlákna DNA. Syntéza nových vláken je umožněna za přítomnosti DNA polymerázy. Zde se používá polymeráza Taq, což je enzym izolovaný z bakterie (*Thermus aquaticus*) rezistentní vůči vysokým teplotám. Taq polymeráza sloužící jako katalyzátor této reakce přepisuje informaci z templátu od 5' konce ke 3' konci a to pouze v místě označené primery. Poté se cyklus opakuje obvykle 30x s opět počínající denaturací. Přístroj, který PCR využívá je termocyklomer. Při PCR se chtěný úsek amplifikuje řádově $10^5 - 10^6$. Následně probíhá separace produktu PCR za pomoci elektroforézy [29].



Obrázek 8: Schéma principu polymerázové řetězcové reakce, dostupné z: Zdroj [8]

5.2.2 Polymerázová řetězcová reakce v reálném čase

Polymerázová řetězcová reakce v reálném čase (real-time PCR) je metoda odvozená od PCR, která dokáže stanovit tvorbu PCR produktu (amplikonu) v průběhu reakce. Metoda využívá k detekci zmnoženého DNA změn fluorescence. V reakci jsou použity fluorescenčními molekulami (fluorofory) značené sondy a primery. Fluorofory jsou schopny emitovat světlo

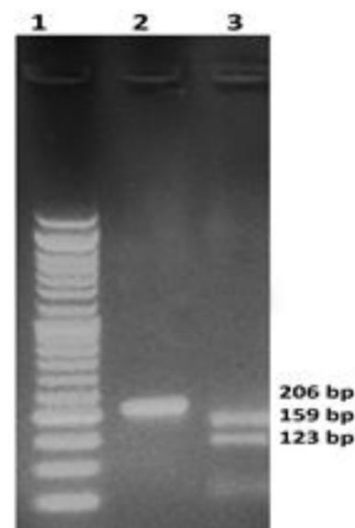
dané vlnové délky. K monitorování produktů PCR lze aplikovat různé technologie, jednou z nich je využití přenosu energie fluorescenčních rezonancí (FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer), kde je použita dvojice fluorescenčně značených sond, z nichž jedna sonda, která je na 3' konci je označována jako donor a druhá sonda na 5' konci jako akceptor. Jde tedy o interakci donoru a akceptoru závislé na vzdálenosti, kdy akceptor přijímá emitovanou energii od donoru a dojde tím tak k jeho excitaci a následně uvolnění emitovaného světla, které je zachyceno detektorem na základě změny intenzity fluorescence [30, 31].

5.2.3 Amplifikační refrakční mutační systém

K odhalení mutace v genu pro faktor V se používá různých metod založené na PCR. Jednou z těchto metod je ARMS (amplifikační refrakční mutační systém). Tato metoda je vhodná k detekci bodové mutace či malých inzercí nebo delecí. Test probíhá ve dvou oddělených PCR reakcích za pomoci specifických primerů. Jedna reakce je specifická pro úsek s mutací a druhá pro normální DNA. Amplifikovaný úsek lze analyzovat elektroforézou na polyakrylamidovém nebo na agarózovém gelu (výsledek ARMS testu viz příloha 5).

5.2.4 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

Další metoda je RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů), ta je založena na enzymatickém štěpení určitého úseku DNA po předchozí amplifikaci pomocí metody PCR. Restrikční enzymy používající se v RFLP se nazývají restrikční endonukleázy. RFLP je vysoce citlivá a spolehlivá metoda schopná detekovat určitou mutaci. Nejprve se tedy prostřednictvím metody PCR provede zmnožení zkoumaného (primery označeného) úseku DNA. Amplifikovaný fragment je dále štěpen příslušnou restrikční endonukleázou a to právě v místě, kde je lokalizovaná mutace. Produkty štěpení jsou vizualizovány po separaci gelovou elektroforézou na polyakrylamidovém (nebo agarózovém) gelu pod UV světlem po obarvení ethidiumbromidem. Výsledek lze pozorovat na obrázku 9, tomuto pacientovi byl diagnostikován heterozygotní genotyp LM [30, 32].



Obrázek 9: Detekce mutace v genu pro faktor V pomocí PCR a RFLP analýzy, dostupné z: Zdroj [9]

5.2.5 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) je metoda, která využívá rozdílné body tání fragmentů dvouvláknové DNA. K produktům PCR jsou přidávány tzv. GC-svorky, což je 30 – 60 nukleotidů bohaté na GC (guanin – cytosin) páry. GC-svorky se používají, protože jsou odolné vůči denaturaci a udržují komplementární části fragmentů pospolu. Pro vlastní elektroforézu je používán gel s obsahem směsi formamidu a močoviny, tato směs zajišťuje denaturační gradient. Jedná se o citlivou techniku vhodnou k odhalení mutace a tedy i pro detekci LM.

5.2.6 Polymorfismus konformace jednoduchých řetězců

SSCP (polymorfismus konformace jednoduchých řetězců) je rychlá a jednoduchá metoda. Nejprve se amplifikovaný úsek DNA denaturuje na jednoduchá vlákna a poté se vzorek analyzuje prostřednictvím gelové elektroforézy, kde se pohybují závisle na své konformaci. Zde lze odhalit i malé konformační změny např. záměnu páru bází [33].

5.2.7 Pyrosekvenování

Obecně sekvenování DNA lze charakterizovat jako metodu poskytující informaci o pořadí nukleových bází ve zkoumaném úseku DNA. Sekvenování DNA se využívá k identifikaci genetických mutací. Mezi metody sekvenování řadíme Sangerovu metodu a Maxam-Gilbertovu metodu. Z těchto dvou metod je Sangerova daleko více používána. Princip Sangerovy metody je opět stavěn na základě PCR, kdy dochází k množení zkoumaného úseku, ale je použit pouze jeden primer, dalšími složkami je DNA polymeráza a nukleotidy. Následuje krok začlenění dideoxynukleotidu (ddNTP) do syntetizovaného řetězce DNA. Jeho náhodným začleněním se zastaví syntéza a dochází ke vzniku různě dlouhých fragmentů DNA. Původně je tento test prováděn ve čtyřech zkumavkách, z nichž každá obsahuje daný ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP). Modifikace metody spočívá v použití fluorescenčních barviv na každém ddNTP, lze tedy test provést v jedné zkumavce a vzniklé fragmenty DNA rozdělit dle velikosti prostřednictvím kapilární elektroforézy.

Pyrosekvenování je metoda odvozená od Sangerovy metody, je značně zjednodušená a vhodná k detekci LM. Ve spolupráci s DNA polymerázou se přidáný dNTP začlení do prostřednictvím PCR vzniklé jednořetězcové DNA. V závislosti na tomto kroku se uvolní pyrofosfát (PPi). PPi je dále převeden za katalýzy ATP sulfurylázy na ATP. ATP pak pomáhá přeměně luciferinu na oxyluciferin za působení enzymu luciferinázy, při této přeměně je

uvolněno světelné záření, které je zaznamenáno jako pík v pyrogramu (viz příloha 6). S každým dalším začleněným dNTP je detekován světelný signál, čímž získáme informaci o nukleotidové sekvenci. V této metodě tedy není potřeba využití elektroforézy [30, 34].

6 LÉČBA A PŘÍSTUPY

Před kapitolou, která se zabývá léčbou a hlavně tedy přístupy ke zmírnění dopadů v životě pacienta s diagnostikovanou LM, je třeba si blíže představit rizikové faktory zvyšující nebezpečí rozvoje tromboembolismu.

6.1 Rizikové faktory

6.1.1 Hormonální antikoncepce

Hormonální antikoncepce je dnešní době široce využívaná a vysoce spolehlivá metoda zabraňující početí. Dle složení lze antikoncepci rozlišit na gestagenní antikoncepci a kombinovanou hormonální antikoncepci (COC), která je kombinací estrogenů a gestagenů. Principem jejich účinku v organismu ženy je využití negativní zpětné vazby k ovlivnění hypotalamo-hypofyzárního centra a následně tak zamezení sekrece FSH (folikuly stimulující hormon) a LH (luteinizační hormon) a tím nedojde k ději, při kterém se uvolní zralé vajíčko z vaječníku, tedy ovulaci. Mechanismus COC zahrnuje kromě zablokování ovulace i další opatření. V důsledku působení látky obsažené v pilulce, progestinu (gestagenu) je omezena výživa děložní sliznice a tím narušena nidace vajíčka, dále z důvodu zahuštění hlenu, který je produkován děložním čípkem, nemůže dojít k průniku spermií při pohlavním styku k vejcovodům [35].

Bylo prokázáno, že užívání hormonální antikoncepce je spojeno se zvýšeným rizikem vzniku trombózy. S porovnáním s ženami, které antikoncepci neužívají je toto riziko 2 – 6x vyšší. Hormonální antikoncepce prošla určitým vývojem lišící se dávkováním, složením a způsobem podáváním. Dávka ethinylestradiolu (EE), což je estrogen obsažený v kontraceptivech, se zpočátku pohybovala na 100 – 150 µg, poté byla snížena na 50 µg a následně na 20 – 35 µg EE. Toto snížení dávky EE mělo za následek snížení rizika vzniku VTE, které bylo na počátku při 150 µg EE poměrně vysoké. Dalšími úpravy spočívaly s použitým druhem gestagenu. Nejprve byly použity tzv. progestiny I. generace (norethisteron a lynestrenol), poté byly vyvinuty progestiny II. generace (levonorgestrel) a dále III. generace (gestoden, desogestrel, norgestimát), z čehož bylo zjištěno, že COC s gestageny III. generace vykazují vyšší riziko rozvoje VTE než gestageny II. generace [36].

Jak už je známo hormonální antikoncepce způsobuje v organismu ženy rozsáhlé účinky, ať jde o negativní či pozitivní. Jedním z těchto negativních účinků jsou změny v hemokoagulačním systému a to jednak v prokoagulačních, antikoagulačních i fibrinolytických drahách. Dochází ke zvýšení hladiny fibrinogenu, protrombinu, dále faktoru VII, VIII a X. Naopak je snížena hladina proteinu S a antitrombinu. Mírně snížena je i hladina faktoru V. Zároveň nastává zvýšení aktivity proteinu C, která je ale kompenzována zvýšením hladin hlavních inhibitorů proteinu C, což je inhibitor proteinu C, α_1 -antitrypsin a α_2 -makroglobulin. Změny ve fibrinolytickém systému související s užíváním kontraceptiv, jsou založeny na vzestupu hladiny plazminogenu, tPA a TAFI, naopak snížené hladině PAI-1, což vede celkově ke zvýšení aktivity fibrinolýzy. Následkem těchto změn je stav směřující ke zvýšenému riziku tromboembolismu.

Trombofilní stavy získané či vrozené v kombinaci s užíváním hormonální antikoncepce značně zvyšují riziko rozvoje trombózy. Jedním z vrozených trombofilních stavů je právě LM. Nebezpeční vzniku tromboembolismu u uživatelky antikoncepce s LM v heterozygotním stavu je až 35x vyšší. Zatímco u uživatelky s LM v homozygotním stavu je toto riziko více než 100x vyšší. Dle pozorovaných údajů bylo zjištěno, že ženy s vrozenými trombofiliemi (jako je LM) mají mnohem vyšší riziko vzniku trombózy během prvního roku užívání antikoncepce. Nicméně, k propuknutí trombózy může dojít i po několika letech užívání kontraceptiv, což může být zapříčiněno působením dalších získaných trombofilních stavů jako je například kouření, obezita, věk apod.

Na základě testu tzv. trombin generačního testu (TGT), jehož úkolem je sledovat tvorbu trombinu v čase, bylo prokázáno, že v důsledku hemokoagulačních změn, které způsobuje antikoncepce, se jejím užíváním vytváří tzv. získaná rezistence na aktivovaný protein C. Tento poznatek zdůvodňuje zvýšené riziko trombózy u žen, které užívají antikoncepci a zároveň jsou nositelky LM [37].

6.1.2 Hormonální substituční terapie

Hormonální substituční terapie (HRT) je způsob léčby za účelem doplnění nedostatku estrogenu, které souvisí s klimakterickým obdobím v průběhu života ženy. V tomto období dochází k mnohým změnám v ženském těle, jedná se o změny endokrinní, metabolické či psychické, které vyplývají ze ztráty funkce vaječnicků. Úkolem HRT není jen nahrazení deficitu estrogenu, ale i eliminace negativních důsledků klimakteria a prevence osteoporotických zlomenin. Z důvodu poklesu ovariální funkce dochází ke ztrátě menstruace, následně k poklesu

estrogenu a progesteronu, tento jev je nazýván menopauza. Menopauza může být přirozená, předčasná nebo indukovaná. Předčasná menopauza má souvislost genetickými vlivy, či autonomním onemocnění. V případě chirurgického odstranění ovarií nebo podstoupení chemoterapie se jedná o indukovanou menopauzu. Dávky estrogenu v HRT s porovnáním s dávkami při užívání hormonální antikoncepce mnohem menší. Riziko vzniku tromboembolismu při HRT je 1,3 – 3x vyšší. V kombinaci s LM se toto riziko zvětšuje, je tedy 13 – 15x vyšší [38].

6.1.3 Další trombofilní stavy

U osob s LM se nebezpečí rozvoje trombózy dále zvyšuje v kombinaci s dalšími trombofilními vadami. Jedná se o nedostatek hladin proteinu C, proteinu S či antitrombinu. Naopak zvýšené plazmatické koncentrace koagulačních faktorů např. fibrinogenu, faktoru VIII, IX nebo protrombinu.

Zvýšenou plazmatickou hladinu protrombinu způsobuje mutace genu pro protrombin v nukleotidové pozici 20210, kde dochází k záměně guaninu za adenin. Tato mutace stejně jako LM byla objevena ve městě Leiden. Riziko vzniku trombózy samotné protrombinové mutace je vyšší 3 – 4x [39].

6.1.4 Systém AB0

Dle studií bylo zjištěno, že krevní skupiny systému AB0 mají vliv na riziko vzniku trombózy. Krevní skupiny A, B a AB jsou spojeny s vyšším rizikem vzniku VTE, zatímco krevní skupiny 0 s nižším rizikem. Osoby s krevní skupinou 0 mají ve srovnání s krevními skupinami A, B a AB nižší hladinu faktoru VIII a vWf, což souvisí s nižším rizikem VTE. Hladina vWf je u krevní skupiny 0 až o 25 % menší než u ostatních krevních skupin. Krevní skupiny jiné než 0 mají riziko rozvoje trombózy 2,2x vyšší, v kombinaci těchto krevních skupin a LM je riziko až 7x vyšší.

6.1.5 Ostatní rizikové faktory

Rizikovým faktorem související s přítomností LM je věk. S přibývajícím věkem se zvyšuje riziko vzniku tromboembolismu. Toto riziko dále stoupá jednak u kuřáků a jednak u osob s BMI (body mass index) vyšším než 30 kg/m² [40, 41]

Dalšími rizikovými faktory je těhotenství a následné šestinedělí (viz kapitola 4.2.2 Komplikace v těhotenství) nebo dále chirurgický zákrok, imobilizace, trauma, dlouhé cestování letadlem či výskyt nádorového onemocnění [39, 40, 41].

6.2 Léčba a přístupy

Pro LM neexistuje léčba, protože se jedná o geneticky vrozenou vadu. Jelikož LM představuje určité riziko pro rozvoj trombózy, je třeba předcházet další rizikové faktory, které riziko trombózy v interakci s LM mnohonásobně zvyšují.

Jak už bylo výše řečeno, významným rizikovým faktor je hormonální antikoncepce, výhradně kombinovaná hormonální antikoncepce obsahující estrogen. Pro pacienty s LM není doporučeno užívání hormonální antikoncepce, pokud se ovšem pacienta rozhodne pro antikoncepci, je nutno se vyhnout antikoncepci s vysokým obsahem estrogenu a gestagenu III. generace. Takovým preparátem by pak mohla být gestagenní hormonální antikoncepce. Tato antikoncepce může být vhodná pro pacientky se zvýšeným rizikem hluboké žilní trombózy a tedy i pro nositelky LM. Základem jsou progestiny (gestageny) nikoliv estrogény. Gestagenní antikoncepce na rozdíl od COC není spojena se zvýšeným rizikem trombózy. Nevýhodou však bývá nepravidelnost menstruačního cyklu. Další možností kontraceptiv je použití nitroděložního tělíska s progestinim. Jedná se o tělísko ve tvaru písmena T, které se zavede do dělohy a jeho doba trvání účinku bývá od 3 do 5 let (dle typu) [42].

Během těhotenství a následného období šestinedělí u pacientek s LM výrazně stoupá nejen riziko trombózy, ale i další komplikace během gravidity (viz kapitola 4.2.2 Komplikace v těhotenství). Z těchto důvodů je doporučeno u nositelek LM v době těhotenství a šestinedělí užívat nízkomolekulární heparin (LMWH – low molecular heparin). Účinek LMWH spočívá ve vazbě na antitrombin a následná inhibice trombinu. U pacientek s rekurentními spontánními potraty je podávána kyselina acetylsalicylová a dále od 8. týdne těhotenství jsou podávány i LMWH. U žen s trombofilií (LM) a anamnézou komplikací v těhotenství jako je preeklampsie, odtržení placenty, HELLP syndromu či nitroděložní růstové retardace je podávána kyselina acetylsalicylová do počátku gravidity a LMWH pak individuálně [43].

Jestliže pacient prodělal hlubokou žilní trombózu, je nutná hospitalizace a následné zahájení antitrombotické terapie. Léčba spočívá v podávání LMWH, dále se podává po 1 – 2

dnech zároveň i Warfarin. Poté se dle hodnoty INR, která vyjadřuje krevní srážlivost, upravují dávky Warfarinu až do dosažení fyziologických hodnot INR [44].

V neposlední řadě je pro osoby s LM k minimalizaci rizik vhodné dodržovat obecných doporučení prevence vzniku trombózy a kardiovaskulárních onemocnění, jako je dostatečný pohyb, nekuřáctví, udržovat tělesnou hmotnost úměrně k výšce a věku, nepožívat nadměrné množství alkoholu, používání kompresních punčoch v případě žilní nedostatečnosti dolních končetin [45].

7 STATISTICKÉ HLEDISKO

Zajímavé je, že Leidenská mutace (LM) se vyskytuje mezi bělochy výhradně u kavkazské populace. Vzácná je pak mezi obyvateli Afriky, jihovýchodní Asie, Číny, Japonska, Grónska, dále u původních obyvatel Ameriky a Austrálie. Z důvodu tohoto specifického výskytu se předpokládá, že kořeny LM sahají až do vzdálené minulosti. Odhadované staří mutace je více než 21 000 let, kdy docházelo k oddělování lidských ras. Vzhledem k tomu, že osoby s LM mají stejný haplotyp, lze usoudit, že kdysi existoval společný kavkazský předek, jehož prapůvodní kmen se usadil v Evropě.

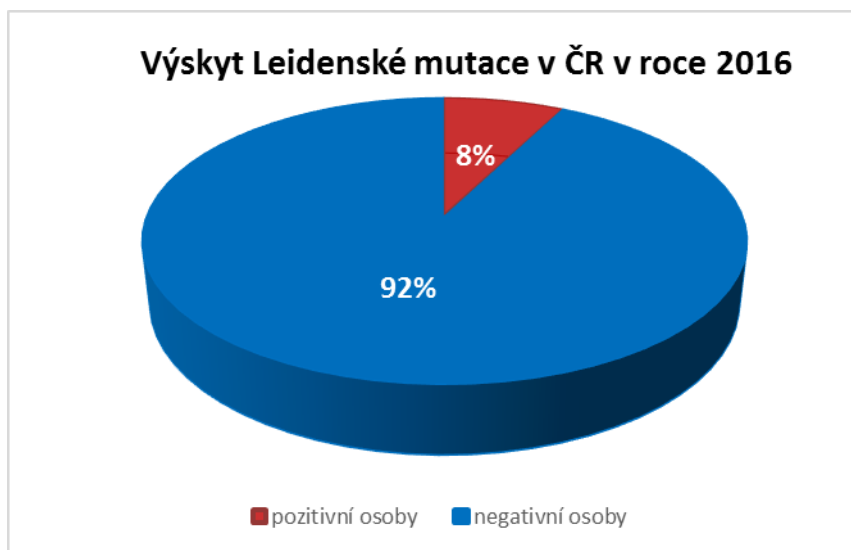
Průměrně se LM vyskytuje v rozmezí cca 3 - 7 % u běžné bílé evropské populace. V tabulce 1 je uvedena prevalence LM, a to jednak pacientů, u kterých došlo k VTE a zdravě žijících pacientů v některých evropských a neevropských státech [46].

Tabulka 1: Prevalence LM, upraveno podle: Zdroj [10]

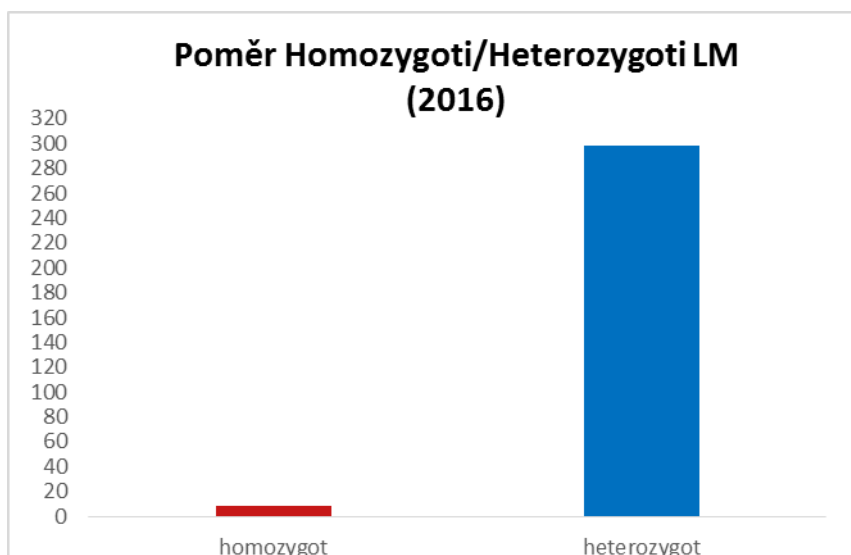
Prevalence LM		
Státy	Pacienti s VTE (%)	Zdravě žijící populace (%)
UK	----	1,74 - 5,6
Švédsko	41,5 - 50	7,5 - 11,4
Polsko	----	5
Nizozemí	21	2
Německo	30	7,1 - 12
Belgie	22	3,3
Slovensko	29,5 - 37	4
Rakousko	26	----
Maďarsko	44	6,9
Srbsko	29,9	5,8
Španělsko	9,2 - 26,3	1,6 - 5,8
Francie	9 - 18	3,5 - 5
Itálie	9 - 42,8	2 - 13,1
Slovinsko	12,9	6,3
Chorvatsko	21 - 28,2	2,4 - 4
Řecko	16,2 - 31,9	2,5 - 7
USA	8,6	3,2 - 6

Na základě získaných informací je v následujícím grafu č. 1 uveden výskyt LM v České Republice v roce 2016, který činí 8 %. Graf č. 2 zaznamenává poměr genotypového zastoupení mutace [47].

Graf 1: Výskyt Leidenské mutace u obou pohlaví v ČR, Praha (2016), upraveno podle: Zdroj [11]



Graf 2: Poměr Homozygoti/Heterozygoti obou pohlaví LM, ČR, Praha (2016), upraveno podle: Zdroj [11]



8 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat Leidenskou mutaci (LM) a na základě dostupných informací utvořit ucelený přehled, jednak z biochemického, lékařského a genetického hlediska. Úvodní kapitola je věnována historii objevení LM, poté je rozebrán genetický podtext mutace. V další kapitole je popsán celý hemostatický systém pro pochopení role koagulačního faktoru V, který hraje významnou roli v rozvinutí onemocnění a dále mechanismu poruchy krevního srážení u tohoto onemocnění. V práci jsou dále zpracovány rizika v souvislosti s LM, její diagnostika, možnosti léčby a statistické hledisko zaměřené na přehled výskytu LM v ČR a Evropských zemí.

V roce 1993 profesor Björn Dahlbäck a kolektiv uvedl možnou souvislost mezi rezistencí na aktivovaný protein C a poruchou ve funkci faktoru V. O rok později v roce 1994 odhalil profesor Rogier M. Bertina bodovou mutaci, která je příčinou odolnosti proti APC a pojmenoval ji podle místa objevení – Leiden v Nizozemsku.

LM je vrozená trombofilie, která se přenáší z rodičovské generace na generaci potomků autozomálně dominantním způsobem. Mutace postihuje úsek na dlouhém raménku 1. chromozomu, který nese informaci o genu pro faktor V. V důsledku této mutace vykazuje aktivovaný faktor V odolnost vůči APC a dochází tak ke zvýšené tvorbě krevních sraženin a tím zvýšenému riziku VTE. Pro ženu s LM je rizikové období během těhotenství a následného šestinedělí. LM může být příčinou spontánních potratů nebo výskytu komplikací během gravidity jako je hypertenze, odloučení placenty, nitroděložní růstová retardace, preeklampsie či HELLP syndrom. Dále se ukázalo, že LM představuje rizikový faktor pro vznik Budd-Chiariho syndromu, což je vzácné a nebezpečné onemocnění jater způsobeno poruchou průtoku jaterních žil.

LM lze odhalit na základě testů na APC rezistenci, ovšem díky různým faktorům, které mohou znehodnotit výsledek, je vhodnější pro detekci LM použít metody molekulární genetiky. Řada těchto metod je založena nebo odvozena od PCR reakce, jako např. real-time PCR, ARMS, RFLP apod.

LM představuje určité riziko VTE a ačkoliv LM nelze léčit, lze předcházet zvyšování tohoto rizika. Jedním z rizikových faktorů je hormonální antikoncepce (či HRT) s vysokým obsahem estrogenu a gestagenu III. generace, kdy jejím užíváním se riziko mnohonásobně

zvyšuje. Proto je pro nositelky LM nejvhodnější antikoncepce gestagenní. Dalšími rizikovými faktory je obezita, věk, kuřáctví, chirurgický zákrok, imobilizace, trauma, dlouhé cestování letadlem nebo také kombinace LM s dalšími trombofilními poruchami (např. protrombinová mutace, snížená hladina proteinu C, proteinu S či antitrombinu). Riziko VTE zvyšují i krevní skupiny, konkrétně krevní skupina A, B a AB, naopak krevní skupina 0 je spojena s nižším rizikem VTE. Při léčbě VTE nebo při prevenci VTE např. těhotenství jsou podávány léky na ředění krve jako je LMWK.

SEZNAM ZDROJŮ

- [1] *Velký lékařský slovník* [online]. [cit. 2016-06-16]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/edem>
- [2] STORMORKEN, H. The discovery of factor V: a tricky clotting factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003, **1**, 206-213.
- [3] DAHLBÄCK, B., M. CARLSSON a P. J. SVENSSON. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993, **90**, 1004-1008.
- [4] BERTINA, R. M., B. P. C. KOELEMAN, T. KOSTER, F. R. ROSENDAAL, R. J. DIRVEN, H. DE RONDE, P. A. VAN DER VELDEN a P. H. REITSMA. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994, **369**, 64-67
- [5] KOČÁREK, E. Genetika: obecná genetika a cytogenetika: molekulární biologie: biotechnologie: genomika. Praha: Scientia, 2004. Biologie pro gymnázia. ISBN 80-718-3326-6.
- [6] GENETIKA – BIOLOGIE. *Molekulární genetika* [online]. 24.10.2016 [cit. 2016-10-24]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/molekularni-genetika>
- [7] PRITCHARD, D. J. a B. R. KORF. Základy lékařské genetiky. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-449-2.
- [8] SEGERS, K., B. DAHLBÄCK a G. A. F. NICOLAES. Coagulation factor V and thrombophilia: Background and mechanisms. *Thromb Haemost*. 2007, **98**, 530-542.
- [9] PECKA, M. Laboratorní hematologie v přehledu. Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN 80-866-8203-X.
- [10] PENKA, M. a E. SLAVÍČKOVÁ. Hematologie a transfuzní lékařství. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.

- [11] ŠLECHTOVÁ, J. Hemostáza – jak ji možná neznáme. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2007, **15**(36), 97-101.
- [12] KOTLÍN, R. a J. E. DYR. Tvorba fibrinu a jeho degradace. *Chemické listy*. 2008, **102**, 314-318.
- [13] ROSENDORFF, A. a D. M. DORFMAN. Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden. *Arch Pathol Lab Med*. 2007, **131**, 866–871.
- [14] CASTOLDI, E. a J. ROSING. APC resistance: biological basis and acquired influences. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010, **8**, 445–453.
- [15] KUJOVICH, J. L. Factor V Leiden Thrombophilia. *NCBI*. [online]. 29.10.2016 [cit. 2016-10-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1368/>
- [16] WOLBERG, A. S. a R. A. CAMPBELL. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfusion and Apheresis Science* [online]. 2008, **38**(1), 15-23 [cit. 2016-09-23]. ISSN 14730502. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473050207001826>
- [17] KADLEC, B. a J. SKŘIČKOVÁ. Diagnostika a léčba venózní tromboembolické nemoci. *Medicína pro praxi*. 2008, **5**(2), 54–58.
- [18] HERMAN, J a D MUSIL. Žilní onemocnění v klinické praxi. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3335-7.
- [19] NICOLAES, G. A. F. Factor V and Thrombotic Disease: Description of a Janus-Faced Protein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **22**(4), 530-538. ISSN 10795642. Dostupné také z: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000012665.51263.B7>
- [20] LANGAN, R. C. Factor V Leiden Mutation and Pregnancy. *JABFP*. 2004, **17**(4), 306-308.
- [21] DOLEŽAL, A. Porodnické operace. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-0881-2.
- [22] HRČKOVÁ, Y. a H. ŠARAPATKOVÁ. Hypertenze v těhotenství. *Medicína pro praxi*. 2013, **10**(5), 191-193.

- [23] JANKŮ, P. Hypertenze v těhotenství. *Interní medicína*. 2007, **2**, 91-95.
- [24] HARAM, K., E. SVENDSEN a U. ABILDGAARD. The HELLP syndrome: Clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2009, **9**(8).
- [25] CURA, M., Z. HASKAL aj. LOPERA. Diagnostic and Interventional Radiology for Budd-Chiari Syndrome. *RadioGraphics*. 2009, **29**, 669-681.
- [26] ZHANG, P., J. ZHANG, G. SUN, et al. Risk of Budd-Chiari Syndrome Associated with Factor V Leiden and G20210A Prothrombin Mutation: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2014-4-22, **9**(4), e95719-. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0095719>
- [27] KADAUKE, S., B. KHOR a E. M. VAN COTT. Activated protein C resistance testing for factor V Leiden. *American Journal of Hematology*. 2014, **89**(12), 1147-1150. ISSN 03618609. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajh.23867>
- [28] PENKA, M. a A. BULIKOVÁ. Neonkologická hematologie. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.
- [29] OTOVÁ, B. a R. MIHALOVÁ. Základy biologie a genetiky člověka. Praha. Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2109-8.
- [30] COOPER, P. C. a S. M. REZENDE. An overview of methods for detection of factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutations. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2007, **29**(3), 153-162.
- [31] ŠMARDA, J.. Metody molekulární biologie. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [32] OTA, M., H. FUKUSHIMA, J. K. KULSKI a H. INOKO. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature Protocols*. 2007, **2**(11), 2857-2864. ISSN 1754-2189. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2007.407>
- [33] OH, H. a C. L. SMITH. Evolving methods for single nucleotide polymorphism detection: Factor V Leiden mutation detection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2011, **25**(4), 259-288. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcla.20470>

- [34] HARRINGTON, C. T., E. I. LIN, M. T. OLSON a J. R. ESHLEMAN. Fundamentals of Pyrosequencing. *Archives of Pathology*. 2013, **137**(9), 1296-1303. ISSN 0003-9985.
- [35] HRUŠKOVÁ, H. Hormonální antikoncepce – novinky, přínosy, rizika, nové preparáty. *Interní medicína pro praxi*. 2009, **11**(12), 569-572.
- [36] DE BASTOS, M., F. R. ROSENDAAL, A. VAN HYLCKAMA VLIEG, F. M. HELMERHORST, T. STIJNEN, O. M. DEKKERS. Different combined oral contraceptives and the risk of venous thrombosis: systematic review and network meta-analysis. *BMJ* [online]. 2013, **347**(sep12 1), f5298-f5298 [cit. 2017-03-25]. ISSN 1756-1833. Dostupné z: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.f5298>
- [37] TCHAIKOVSKI, S. N. a J. ROSING. Mechanisms of Estrogen-Induced Venous Thromboembolism. *Thrombosis Research*. 2010, **126**(1), 5-11. ISSN 00493848. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384810001003>
- [38] KUBÍKOVÁ, D. Menopauzální symptomy a hormonální substituční terapie. *Praktické lékařství*. 2014, **10**(2), 68-73.
- [39] DAHLBACK, B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*. 2008, **112**(1), 19-27. ISSN 0006-4971. Dostupné také z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-01-077909>
- [40] FRANCHINI, M. a M. MAKKRIS. Non-O blood group: an important genetic risk factor for venous thromboembolism. *Blood Transfus*. 2013, **11**, 164-165.
- [41] EL-GALALY, T. C., S. R. KRISTENSEN, K. OVERVAD, R. STEFFENSEN, A. TJØNNELAND a M. T. SEVERINSEN. Interaction between blood type, smoking and factor V Leiden mutation and risk of venous thromboembolism: a Danish case-cohort study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012, **10**(10), 2191-2193. ISSN 15387933. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2012.04772.x>
- [42] PROCHÁZKA, M. a H. PROCHÁZKOVÁ. Hormonální antikoncepce a trombofilní stavy. *Interní medicína pro praxi*. 2010, **12**(7 a 8), 369-371.
- [43] KESSLER, P. Trombofilní stavy. *Interní medicína pro praxi*. 2006, **9**, 374-379.

- [44] KESSLER, P. Nízkomolekulární hepariny v ambulantní praxi. *Interní medicína pro praxi*. 2010, **12**(7 a 8), 361-365.
- [45] ORNSTEIN, D. L. Factor V Leiden. *Circulation*. **107**(15), 94e-97. ISSN 00097322. Dostupné také z: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.0000068167.08920.F1>
- [46] JADAON, M. M. M. Epidemiology of activated protein c resistance and factor V leiden mutation in the mediterranean region. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2011, **3**(1), e2011037-. ISSN 2035-3006. Dostupné také z: <http://www.mjhid.org/index.php/mjhid/article/view/2011.037>
- [47] *Přehled výskytu pacientů s Leidenskou mutací za rok 2016 v ČR*. Praha. Gennet, s.r.o., 2017

ZDROJE OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

- [1] LEIDS UNIVERSITAIR MEDISCH CENTRUM. *Bertina, R. M* [online]. [cit. 06.04.2017]. Dostupné z: <https://www.lumc.nl/over-het-lumc/hoo/bertina>
- [2] GENETIKA – BIOLOGIE. *Mutace* [online]. 2010 [cit. 03.05.2017]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/mutace>
- [3] GENETICS HOME REFERENCES. *F5 gene* [online]. 24.10.2016 [cit. 2016-10-24]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/F5#location>
- [4] LIN, P. J. Reviewing the reality: why we need to change. *Eur Heart J Suppl.* 2007, **7**, E15-E20. DOI: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/sui031>.
- [5] CRAMER, T. J. a A. J. GALE. The anticoagulant function of coagulation factor V. *Thromb Haemost.* 2012, **107**, 15-21.
- [6] GENETIKA – BIOLOGIE. *Typy dědičnosti v rodokmenu* [online]. [cit. 06.04.2017]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/typy-dedicnosti-v-rodokmenu>
- [7] CURA, M., Z. HASKAL a J. LOPERA. Diagnostic and Interventional Radiology for Budd-Chiari Syndrome. *RadioGraphics.* 2009, **29**, 669-681
- [8] GARIBYAN, L a N AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology.* 2013, **133**, 1-4.
- [9] EBRAHIMZADEH-VESAL, R., R. AZAM, Arvin GHAZARIAN, et al. Recurrent pregnancy loss in a subject with heterozygote factor V Leiden mutation; a case report. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology.* 2014, **2**(2).
- [10] JADAON, M. M. M. Epidemiology of activated protein c resistance and factor V leiden mutation in the mediterranean region. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases.* 2011, **3**(1), e2011037-. ISSN 2035-3006. Dostupné také z: <http://www.mjhid.org/index.php/mjhid/article/view/2011.037>
- [11] *Přehled výskytu pacientů s Leidenskou mutací za rok 2016 v ČR.* Praha. Gennet, s.r.o., 2017

ZDROJE PŘÍLOH

- [1] NATIONAL BLOOD CLOT ALLIANCE. *Factor V Leiden* [online]. [cit. 3.4.2017]
Dostupné z: https://www.stoptheclot.org/learn_more/factor-v-leiden-2.htm

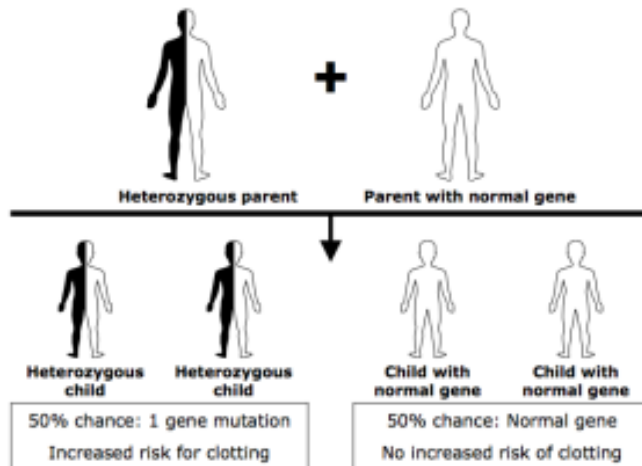
- [2] ALL ABOUT WILDLIFE. *Russell's viper* [online]. [cit. 03.05.2017]. Dostupné
z: <http://ahwmrc.com/russell%27s-viper-1.html>

- [3] AUSTRALIAN MUSEUM. *Notechis scutatus* [online]. 2016 [cit. 24.3.2017]. Dostupné
z: <https://australianmuseum.net.au/image/notechis-scutatus>

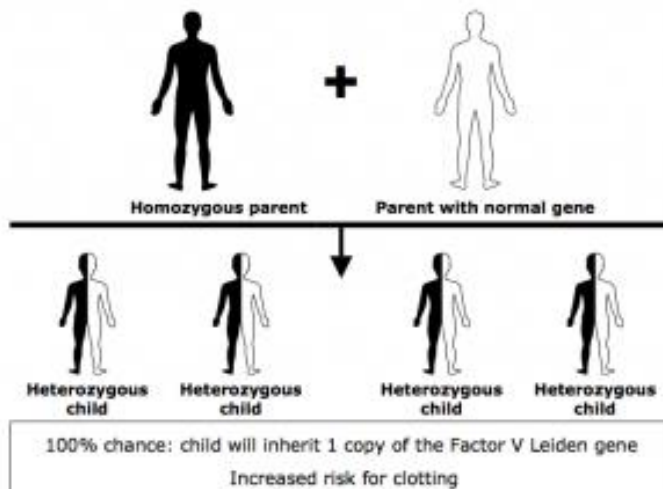
- [4] OH, H. a C. L. SMITH. Evolving methods for single nucleotide polymorphism
detection: Factor V Leiden mutation detection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*.
2011, **25**(4), 259-288. ISSN 08878013. Dostupné také z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/jcla.20470>

PŘÍLOHY

Příloha 1: Pravděpodobnost dědičnosti pro heterozygotní typ LM, dostupné z: Zdroj příloh [1]



Příloha 2: Pravděpodobnost dědičnosti pro homozygotní typ LM: dostupné z: Zdroj příloh [1]



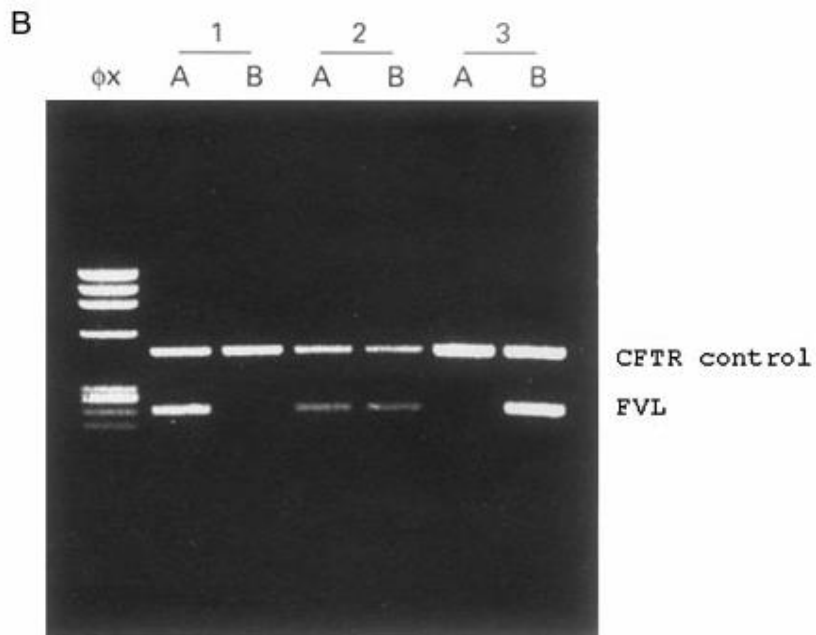
Příloha 3: Zmije řetízková (*Daboia russelli*), dostupné z: Zdroj příloh [2]



Příloha 4: Pakobra páskovaná (*Notechis scautus*), dostupné z: Zdroj příloh [3]



Příloha 5: Výsledek testu ARMS, dostupné z: Zdroj příloh [4]



Příloha 6: Záznam pyrogramu, závislost intenzity světla na čase, dostupné z: Zdroj příloh [4]

