

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Trombofilní mutace v těhotenství  
Bakalářská práce

2023

Nikola Linhartová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Nikola Linhartová**  
Osobní číslo: **C19259**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Trombofilní mutace v těhotenství**  
Téma práce anglicky: **Thrombophilic Mutations in Pregnancy**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma Trombofilní mutace v těhotenství
  - a) Přehled nejdůležitějších trombofilních mutací
  - b) Přehled diagnostických metod
  - c) Terapeutické možnosti

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**  
Herbacos Recordati s.r.o.

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

## **Prohlašuji:**

Práci s názvem Trombofilní mutace, detekce a vliv na těhotenství jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30.6.2023

Nikola Linhartová v.r.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za jeho cenné rady, podněty a v neposlední řadě trpělivost, čas a ochotu v průběhu vedení bakalářské práce. Mé poděkování patří také rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

## **Anotace**

Bakalářská práce se skládá z teoretické části věnující se trombofilním mutacím a jejich vlivu na těhotenství. Popisuje fyziologii krevního srážení a patogenní změny, které u mutací nastávají. V práci jsou vyjmenovány a popsány nejrozšířenější trombofilní mutace. Velká pozornost je věnována diagnostice, zejména za pomoci genetických vyšetřovacích metod. Závěr práce se zabývá terapií, jejíž užívání pomáhá předcházet komplikacím v průběhu těhotenství, porodu i šestinedělí.

## **Klíčová slova**

Hemostáza, Trombofilní mutace, Těhotenství, Diagnostické metody, Terapie

## **Title**

Thrombophilic Mutations in Pregnancy

## **Annotation**

The bachelor's thesis consists of a theoretical part focuses on thrombophilic mutations and their effect on pregnancy. It describes the physiology of blood clotting and the pathogenic changes that occur with mutations. The work describes the most widespread thrombophilic mutations. Great attention is paid to diagnosis, especially with the help of genetic investigation methods. The conclusion of the thesis deals with therapy, which helps to prevent complications during pregnancy, childbirth and postpartum.

## **Keywords**

Hemostasis, Thrombophilic Mutations, Pregnancy, Diagnostic methods, Therapy

## Obsah

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
1.1. HEMOSTÁZA .....	11
1.1.1. Reakce cévy .....	11
1.1.2. Reakce trombocytů .....	12
1.1.3. Hemokoagulace .....	13
1.1.4. Fibrinolýza .....	15
1.2. ZMĚNY HEMOSTÁZY V GRAVIDITĚ .....	16
1.3. TROMBOFILIE.....	17
1.4. ROZDĚLENÍ TROMBOFILNÍCH STAVŮ .....	18
<b>2. TROMBOFILNÍ MUTACE V TĚHOTENSTVÍ .....</b>	<b>20</b>
2.1. MUTACE FAKTORU II .....	20
2.2. MUTACE FAKTORU V .....	23
2.3. MUTACE GENU PRO MTHFR .....	25
2.4. MUTACE GENU PRO PAI.....	27
<b>3. DIAGNOSTIKA.....</b>	<b>29</b>
3.1. TROMBÓZY A JEJICH DIAGNOSTIKA .....	29
3.2. MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ DIAGNOSTICKÉ METODY .....	30
3.2.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	30
3.2.2. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR).....	32
3.2.3. Metoda restrikčních enzymů - RFLP .....	34
3.2.4. Amplifikační refrakční mutační systém (ARMS).....	35
3.2.5. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	35
3.2.6. Přímé sekvenování .....	35
3.3. BIOCHEMICKÉ DIAGNOSTICKÉ METODY .....	37
3.3.1. Vyšetření proteinu C a S .....	39
<b>4. TERAPIE.....</b>	<b>40</b>
4.1. NEFRAKCIHOVANÝ HEPARIN .....	41
4.2. NÍZKOMOLEKULÁRNÍ HEPARINY .....	41
4.3. KUMARINY .....	42
4.4. POROD .....	43
4.5. PÉČE BĚHEM ŠESTINEDĚLÍ.....	44
<b>5. ZÁVĚR .....</b>	<b>45</b>
<b>6. POUŽITÁ LITERATURA A INTERNETOVÉ ZDROJE.....</b>	<b>46</b>

## **Seznam obrázků**

- Obrázek 1: Aktivace trombocytu v klidovém stádiu, vytvoření pseudopodií (13)
- Obrázek 2: Schéma hemokoagulační kaskády (13)
- Obrázek 3: Trombóza koronární arterie (16)
- Obrázek 4: Vývoj aktivity protrombinu v průběhu normálního těhotenství (●) a v průběhu rizikového těhotenství s těžkou preeklampsií(◆) (22)
- Obrázek 5: Záměna guaninu za adenin (25)
- Obrázek 6: Metabolismus kyseliny listové (31)
- Obrázek 7: Detekce polymorfismu PAI-1 4G/5G v agarózovém gelu (40)
- Obrázek 8: Schéma PCR metody (54)
- Obrázek 9: Amplifikační křivka qPCR (57)
- Obrázek 10: Pyrogram (59)

## **Seznam tabulek**

- Tabulka I: Přehled hemokoagulačních faktorů
- Tabulka II: Welsovo klinické skóre (45)
- Tabulka III: Referenční meze krevního obrazu a koagulace zdravého jedince (61)
- Tabulka IV: Přehled a dávkování nízkomolekulárních heparinů (61)



## **Seznam zkratek**

**aPTT** – aktivovaný parciální tromboplastinový čas

**ARMS** – amplifikační refrakční mutační systém

**ATP** – adenosintrifosfát

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina

**dNTP** – deoxyribonukleotidtrifosfát

**DUS** – duplexní ultrasonografie

**ELISA** – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

**HŽT** – hluboká žilní trombóza

**LMWH** – nízkomolekulární frakcionované hepariny

**MPW** – střední objem trombocytů

**NGS** – sekvenování nové generace

**NR** – normalizovaný poměr

**PA** – aktivátor plazminogenu

**PAI-1** – inhibitor aktivátoru plazminogenu-1

**PDW** – šíře distribuce trombocytů

**qPCR** – polymerázová řetězová reakce v reálném čase

**TEN** – tromboembolická nemoc

**UFH** – nefrakcionovaný heparin

## 1. Úvod

Trombofilii charakterizujeme jako poruchu hemostatického mechanismu, kdy dochází ke zvýšené tendenci vzniku krevních sraženin – trombů. Během gravidity se riziko vzniku hluboké žilní trombózy zvyšuje pětikrát až sedmkrát a stoupá v závislosti na přítomnosti dalších rizikových faktorů. V souvislosti s trombofilními stavy jsou zaznamenána zvýšená rizika mateřské a perinatální morbidity a mortality.

Bakalářskou práci na toto téma jsem se rozhodla psát z důvodu nedávno diagnostikované Leidenské mutace a mutace protrombinu, které byly v naší rodině zjištěny na základě genetického vyšetření. Podnětem pro bližší zkoumání byl vznik hlubokožilní trombózy a s ní souvisejících komplikací u blízkého člena rodiny. Zároveň bych ráda upozornila na tuto problematiku, o které řada žen z důvodu nedostatečné informovanosti neví.

Práce obsahuje teoretickou část zaměřující se v úvodu na trombofilní mutace, které mohou těhotenství negativně ovlivnit, zejména na způsob vzniku mutací a jejich charakteristiku. V další části se věnuji diagnostice mutací na genetické a biochemické úrovni. Diagnostikování trombofilie je stěžejním krokem k bezpečnějšímu průběhu těhotenství i samotného porodu. Závěr práce se zaměřuje na léčbu a medikaci, kterou by měly ženy v průběhu těhotenství a následně i šestinedělí užívat, aby předešly zdravotním komplikacím spojeným se vznikem krevních sraženin. Další neopomenutelnou kapitolou je samotný porod. Zaměřuji se na jeho odlišnosti v porovnání s porodem zdravé ženy netrpící trombofilními mutacemi, medikaci, rizikové faktory, které negativně porod ovlivňují a samotná rizika a komplikace, ke kterým může v průběhu porodu dojít.

Cílem mé bakalářské práce je upozornit na tuto problematiku a rozšířit povědomí o rizicích, které pro matku i dítě trombofilie představuje, zejména v případě, pokud není diagnostikována a nedojde ke včasnému nasazení antikoagulační léčby, která napomáhá předcházet komplikacím během gravidity.

## 1.1.Hemostáza

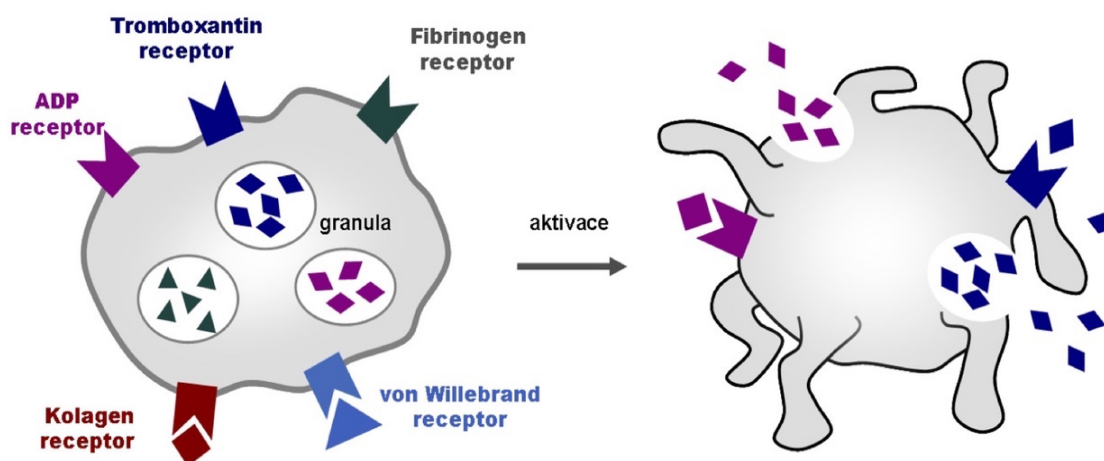
Hemostáza je životně důležitým a přísně regulovaným procesem, jehož cílem je zástava krvácení v místě poranění. Jedná se o prvotní obranný mechanismus, ke kterému dochází při poranění cévy. Po aktivaci hemostatických procesů začíná vznikat krevní sraženina. Hemostatické procesy se skládají z řady pozitivních a negativních zpětných vazeb. Pro zachování hemostatické rovnováhy a obnovení fyziologického stavu dojde po určité době k rozpuštění sraženiny a obnovení cirkulace tekuté krve v krevním řečišti. Hemostáza je dynamickým procesem, který se v průběhu života mění a v závislosti na věku prochází různými stádii. Hlavními složkami, které se na hemostáze podílí, jsou cévy, krevní destičky, plazmatické faktory a látky přítomné uvnitř cév, kam patří bílé krvinky, červené krvinky, minerály, bílkoviny, lipidy atd. (1,2,3) Procesy srážení krve rozdělujeme do dvou základních fází. Primární hemostáza zahrnuje kontakt cévní stěny s krevními destičkami, do sekundární hemostázy řadíme koagulační faktory a povrchy aktivovaných buněk. V první fázi dojde ke vzniku tzv. destičkové zátky, ve druhé fázi je zátka stabilizována fibrinem. Přirozené inhibitory usměrňují aktivaci a amplifikaci koagulační kaskády. Procesem fibrinolýzy dochází k rozpuštění vzniklého trombu a obnovení kompaktní cévní stěny. (4) Celý proces zástavy krvácení se skládá ze čtyř hlavních částí, které se navzájem ovlivňují a doplňují. (5)

### 1.1.1. Reakce cévy

Vazokonstrikce je první obranou reakcí organismu. Jedná se o přímou reakci na poškození cévní stěny. K obliteraci cévy dochází mechanicky a chemicky. Mechanické stažení proběhne v situaci, kdy je poškozená céva utlačována krví, která se vylévá do krevního řečiště. Výjimkou jsou místa, kde tkáň při zvýšeném tlaku sama ustupuje (typické pro cirkumorbitální oblast). Za chemickou kontrakci svalové vrstvy cévní stěny jsou odpovědné látky, které produkují aktivované trombocyty. Z aktivovaných destiček jsou uvolňovány vazokonstrikční látky tromboxan A<sub>2</sub>, serotonin, epinefrin a fibrinopeptid B. Chemický mechanismus je souhrnně označován jako působení lokálních autakoidních faktorů. K uplatňování tohoto mechanismu nejvíce dochází v cévách s velkým množstvím hladké svaloviny, ve kterých není příliš vysoký tlak krve. Mechanismus stahu ztrácí na významu, pokud se jedná o cévu elastického typu, kde nenacházíme svalovou část. Na kontrakci svaloviny se dále podílejí nervové reflexy, které reagují v závislosti na bolestivé podněty. (6,7)

### 1.1.2. Reakce trombocytů

Trombocyty jsou buněčné fragmenty, která vznikly odštěpením cytoplazmy megakaryocytů. Jedná se o bezjaderná tělíska, která sehrávají důležitou roli ve vzniku provizorní monostatické zátky v místě poranění cévy. K zajištění procesu primární hemostázy musí trombocyty obsahovat granula, která se z pravidla nachází v centrální části. Rozlišujeme dva základní typy granul –  $\alpha$  a  $\delta$ , lišící se svým obsahem. Tvorba primární zátky začíná adhezí trombocytů na receptory kolagenních vláken v bazální membráně cévní stěny. Adheze je možná díky glykoproteinu Ib a VWF, k jemuž uvolňování dochází v největším množství z endotelu. Adhezí se trombocyty aktivují. Následkem aktivace dochází ke změně jejich tvaru, tvorbě pseudopodií a vzájemnému shlukování, agregaci. Reakce membránového receptoru glykoproteinu IIb/IIIa, fibrinogenu a VWF vyžaduje veliké množství endogenního ADP pocházejícího z granul trombocytů. Na vyvolání agregace se podílí řada dalších chemických látek-adrenalin, trombin, kolagen, kyselina arachionová, tromboxan  $A_2$  atd. Výsledkem agregace je vznik shluků krevních destiček. Vlivem působení ADP pocházejícího z okolní perivaskulární tkáně vznikne stabilní bílý trombus jednodité struktury. Trombocyty mají schopnost retraktibility. Přítomnost bílkovin v membráně krevních destiček umožňuje stahování a smršťování destičkového trombu. Tyto děje napomáhají reparativním procesům. (3,5,6)



Obrázek 1: Aktivace trombocytu v klidovém stádiu, vytvoření pseudopodií. (13) Trombocyt má v klidovém stádiu tvar oválného disku s hladkými okraji. Na membráně jsou přítomny receptory pro koagulační faktory. Cytoplazma je tvořena řadou granul obsahující autokrinní a parakrinní látky, které se následně uplatňují při hemokoagulaci, během procesu hojení a fibrinolýze. Aktivovaný trombocyt na svém povrchu vytváří membránové výběžky-pseudopodie a dojde k uvolnění obsahu granul.

### 1.1.3. Hemokoagulace

Cílem hemokoagulace je stabilizace dočasně vzniklé sraženiny z agregujících destiček pomocí fibrinu za vzniku definitivního, stabilního, červeného trombu. Klíčová reakce pro srážení krve je přeměna rozpustného fibrinogenu (plazmatické bílkoviny) na nerozpustný fibrin. Během přeměny dochází k odštěpení dvou párů polypeptidů z každé molekuly fibrinogenu. Fibrin vzniká polymerizací zbývajících částí, monomeru fibrinu, s ostatními monomery. Z počátku se jedná o vzájemně propletenou síť vláken. Vlivem vznikajících kovalentních vazeb dochází ke vzniku hustého, pevného a stabilního agregátu. (8) Srážení krve se účastní řada koagulačních faktorů.

*Tabulka I: Přehled hemokoagulačních faktorů. Koagulační faktory jsou látky přirozeně se vyskytující v krvi v neaktivní formě. K jejich aktivaci dochází poškozením cévního endotelu (vnitřní cesta aktivace) nebo poškozením tkáně (vnější cesta aktivace). Srážecích faktorů je popsáno dvanáct a jsou číslovány římskými číslicemi v pořadí, jakém byly objeveny. Aktivace faktoru se značí malým písmenem „a“ za římskou číslicí.*

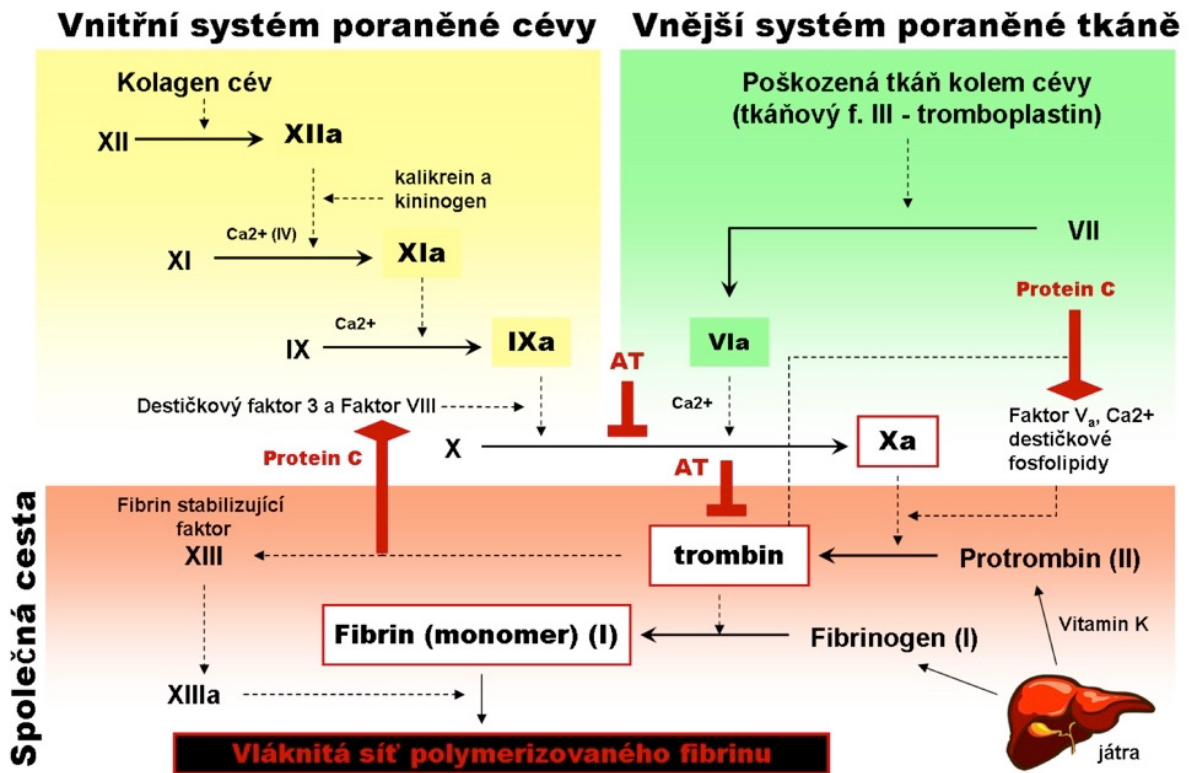
Koagulační faktor	Synonyma
Fibrinogen	Faktor I
Protrombin	Faktor II
Tkáňový faktor	Faktor III, tkáňový tromboplastin
Vápenaté ionty	Faktor IV
Proakcelerin, labilní faktor	Faktor V
Prokonvertin, stabilní faktor	Faktor VII
Antihemofilický faktor A	Faktor VIII
Antihemofilický faktor B	Faktor IX
Stuartův-Powerův faktor	Faktor X
Antihemofilický faktor C	Faktor XI
Hagemanův faktor	Faktor XII
Fibrin-stabilizující faktor	Faktor XIII
Prekalikrein	Fletcherův faktor
Vysokomolekulární kininogen	HMWK, Fitzgeraldův faktor

Jedná se o bílkoviny (kromě  $\text{Ca}^{2+}$ ), k jejichž syntéze dochází v játrech. Vitamin K je důležitou látkou, potřebnou pro tvorbu řady koagulačních faktorů (II, VII, X). Většina z nich se nachází v krvi v podobě zimoformu, tedy neaktivním stavu. (9) K jejich vzájemné aktivaci dochází kaskádovitě vlivem enzymového štěpení v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ . Podle faktorů, které se na srážení podílejí a prvotního stimulu dělíme hemokoagulaci do dvou systémů – vnitřního a vnějšího (zevního). (10)

Reakce vnitřní cesty aktivace začíná kontaktem kolagenu (negativně nabitým povrchem) s faktorem XII. Tento krok vede k aktivaci Hagemanova faktoru a krevní destičky začnou uvolňovat svůj obsah, konkrétně fosfolipidy obsahující destičkový faktor 3. Faktor XI je štěpen aktivovaným faktorem XII za přítomnosti HMWK a prekalkreinu, jehož hlavní funkcí je urychlení reakce. Aktivací antihemofilického faktoru C dochází k aktivaci faktoru IX. Destičková fosfolipidy, aktivovaný faktor VIII a antihemofilický faktor B aktivuje výchozí faktor X.

Aktivace vnějšího systému nastává při kontaktu tkáňového faktoru, nacházejícího se na povrchu buněk, s faktorem VII (za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ ). Spouštěčem této reakce je poškození integrity cévní stěny způsobené poraněním tkáně. Vazba faktoru III a VII vede ke vzniku VIIa, který následně aktivuje faktor X. (7)

Společná cesta začíná vznikem enzymového komplexu tvořeného aktivovaným faktorem Xa, faktorem Va (za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ ). Vzniklý komplex umožňuje přeměnu protrombinu na trombin. Trombin odštěpí z fibrinogenu polypeptidy a vzniká nerozpustný fibrin. Při této reakci se uplatňuje fibrin-stabilizující faktor a dojde ke vzniku definitivní fibrinové sítě, zachycující další krevní elementy bránící úniku krve. (5,6,9)



Obrázek 2: Schéma hemokoagulační kaskády. (13) Koagulační kaskáda je tvořena dvěma základními systémy, které jsou navzájem propojeny. Vnější cesta je aktivována tkáňovým faktorem, k jehož uvolnění dojde z poškozené tkáně. Vnitřní cestu stimuluje poškození endotelu a obnažení cévy. Výsledkem je aktivace protrombinu na trombin, který umožňuje přeměnu rozpustného fibrinu na nerozpustný fibrin. Na základě vláknitého fibrinu je vytvořena fibrinová síť, která spolu se zachycenými látkami zabrání krvácení uzavřením zraněné cévy pomocí vzniklého definitivního trombu.

Vápenaté ionty jsou nedílnou součástí koagulační kaskády. Vyvázáním na citráty nebo EDTA vzniká dekalciifikovaná plazma, která se nesráží. Metoda vyvázání může být použita pouze mimo organismus. (10)

#### 1.1.4. Fibrinolýza

Po splnění hlavní funkce trombu – zástavě krvácení, dochází k jeho postupnému odstraňování. V prvním kroku se trombocyty začínají smršťovat a aktivně zmenšovat svůj povrch, tudíž se zmenšuje i velikost trombu. Tento krok umožněný aktinovými a myozinovými vlákny krevních destiček se nazývá retrakce trombocytů. (10) Za samotné rozpuštění fibrinového koagula je odpovědný fibrinolytický systém. Krevní tok je koagulem výrazně omezen a může docházet k nekontrolovatelné cévní aktivaci nebo jejímu uzavření. Aktivace fibrinolýzy probíhá současně s aktivací krevních destiček a hemokoagulace.

Celý proces trvá v porovnání s ostatními kroky hemostázy déle (48 až 72 hodin). U gravidních žen se aktivita fibrinolýzy snižuje. Plazminogen, prekurzor plazminu, je hlavní složkou fibrinového systému. Plazminogen se v trombu nachází od samého začátku jeho vzniku. K jeho aktivaci dochází uvolňováním tzv. tkáňovým aktivátorem plazminogenu (t-Pa) a urokinázou (u-Pa) z poškozené tkáně. Aktivovaný plazmin je schopen rozpouštět fibrinová vlákna, faktor V, VIII a XII. Proud krve a systém přirozených inhibitorů plazminu zabraňují rozšíření reakce do jiných částí organismu. Z tohoto důvodu nemůžeme v plazmě za fyziologických podmínek fibrinolýzu běžnými testy prokázat. (1)

## 1.2. Změny hemostázy v graviditě

V těhotenství dochází k fyziologickým změnám v hemostáze a hemokoagulaci z důvodu adaptace na zvýšené metabolické nároky organismu. Celkový počet trombocytů se v těhotenství mírně snižuje, a to zejména ve III. trimestru. Během těhotenství dochází k hyperkoagulačnímu stavu, kdy se koncentrace koagulačních faktorů zvyšuje (s výjimkou faktoru XI a VIII). Koncentrace faktoru XIII roste na začátku těhotenství, ve druhém trimestru začíná jeho koncentrace klesat a v trimestru třetím nabývá původní hodnoty. Koncentrace faktorů XII, X a IX stoupá v průběhu celého těhotenství. Aktivita faktoru VII výrazně stoupá, dosahuje až 300 % své původní aktivity. Hodnoty fibrinogenu dosahují ve III. trimestru dvojnásobku až trojnásobku hodnot původních (z 3 g/l na přibližně 6 g/l). Koncentrace látek, které inhibují koagulaci se snižují, spolu s nimi i fibrinolytická aktivita.

Cílem hyperkoagulace je zamezit nadměrné krevní ztrátě během porodu. V graviditě se vlivem progesteronu, který je odpovědný za relaxaci hladké svaloviny snižuje žilní návrat z dolních končetin. „Hyperkoagulační stav vytváří předpoklady pro vznik hluboké žilní trombózy, zejména u žen s predispozicí (geneticky podmíněný hyperkoagulační stav, obezita, imobilizace, antifosfolipidový syndrom, paroxysmální noční hemoglobinurie, hyperhomocysteinémie, myeloproliferativní onemocnění, malignita, hyperviskozita).“ (11) Devadesát procent HŽT v těhotenství nacházíme v levé dolní končetině, z důvodu útlaku dělohy. Hemostatické parametry se vrací do normálního stavu během čtyř až šesti týdnů po porodu. (11,12)



### 1.3. Trombofilie

Pojmem trombofilie označujeme stav, kdy zaznamenáváme zvýšenou predispozici k vytvoření krevní sraženiny – trombu. (14) Trombóza snadno vzniká v místech, kde dochází ke snížení rychlosti proudění krve. K tomuto jevu dochází hojně například v žilách dolních končetin po operaci nebo porodu. Aktivované srážecí faktory se hromadí a nejsou dostatečně rychle odplavovány. (8) Trombus se ve většině případů přichytí na stěnu cévy. Pokud dojde k jeho odtržení, céva ztratí původní lesk a hladký povrch.

Podle vzhledu rozlišujeme tři základní typy krevní sraženiny:

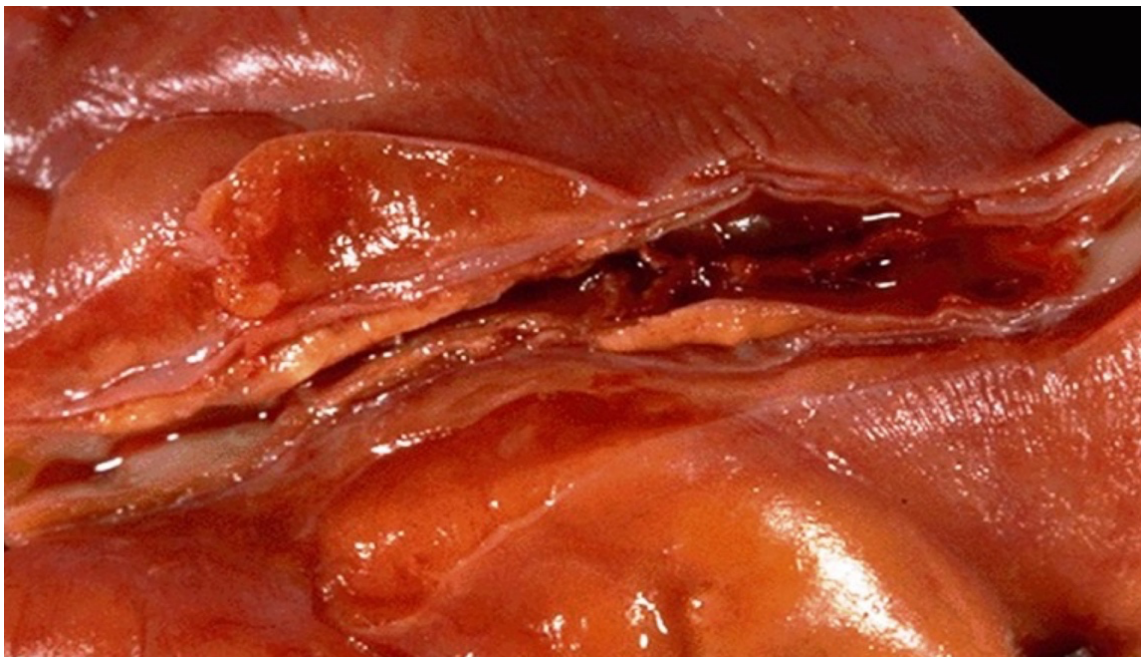
Červený trombus, vznikající převážně v žilách, tvořený erytrocyty, trombocyty a fibrinem.

Bílý trombus, objevující se v tepnách, obsahující leukocyty, trombocyty a fibrin.

Smíšený trombus, pro který je typické střídání nažloutlých a červených vrstev. Tento druh trombu se nejčastěji vyskytuje ve výdutích (aneuryzmatech).

Předpoklady pro vznik trombu charakterizuje tzv. Virchowova triáda, která se skládá ze tří základních faktorů podmiňující vznik trombu. První je porušení výstelky cévy, ke které dochází například toxickým poškozením endotelu, zaváděním kanyl, vlivem zánětu nebo při ateroskleróze. Druhou nežádoucí situací je zpomalení toku krve. Vlivem vírovitého proudění dochází k usazování červených krvinek. Ve třetím případě se jedná o poruchy srážlivosti krve, doprovázející například nádorová onemocnění, těhotenství, dlouhé dálkové cesty letadlem nebo genetické predispozice. Průzkumy ukazují, že ke vzniku trombózy musí být přítomny alespoň dva ze tří výše zmíněných faktorů. (15)

Konečným důsledkem uvolnění trombu může být chorobný stav (tromboembolická příhoda), kdy dochází k ucpání životně důležité cévy krevní sraženinou. Jedním z nejzávažnějších případů je infarkt myokardu nebo plicní embolie. (1)



*Obrázek 3: Trombóza koronární arterie. (16) Trombóza může vzniknout ve kterékoliv části těla. Pokud dojde k postižení jedné ze srdečních (koronárních) tepen objevuje se velké riziko vzniku srdečního infarktu. Pokud je poškozena například mozková tepna, může dojít k mozkové mrtvici.*

#### 1.4. Rozdělení trombofilních stavů

Trombofilní stavy dělíme na vrozené (primární) a získané (sekundární).

Vrozená trombofilie je geneticky spojována s výskytem tromboembolické nemoci u mladších jedinců, rodinných příslušníků. Nejvýznamnější je mutace FV Leiden (G1691A), která je v populaci zastoupena nejpočetněji. Mutací dochází k rezistenci na aktivovaný protein C (APCR). Mutace nacházející se u pacienta v heterozygotní formě zvyšuje riziko vzniku trombózy pětikrát. Homozygotní forma je vzácnější a pacient postižený touto formou mutace má padesátkrát větší pravděpodobnost vzniku tromboembolické nemoci. Dále mezi vrozené trombofilní stavy řadíme mutaci protrombinu (G20210A), která má významný vliv při vzniku trombóz v graviditě. Geneticky podmíněná je i deficience inhibitorů – proteinu C, S a antitrombinu. K manifestaci těchto stavů dochází již v dětství a jsou velice závažné. Získané trombofilní stavy jsou často ovlivněny kvalitou života a prostředím. Řadíme mezi ně malignity, nefrotický syndrom, antifosfolipidový syndrom, septické stavy, chirurgické zákroky, které jsou spojeny s dlouhou imobilizací pacienta.

Hormonální léčba, konkrétně užívání hormonální antikoncepce nebo hormonální substituce, je jednou z hlavních příčin získané tromboembolické nemoci. Obezita je dalším faktorem majícím vliv na rozvinutí trombózy.

Řada mutací nebo polymorfismů (pro gen MTHFR, PAI-I, EPCR, fibrinogen) má nejednoznačný potenciál vzniku, proto o nich hovoříme jako o tzv. trombofilních stavech smíšeného původu. Do této skupiny řadíme také jedince s krevní skupinou AB (dvakrát až čtyřikrát vyšší riziko trombózy), zvýšenou hladinu koagulačních faktorů VIII, IX, XI a sníženou hladinu faktoru XII.

Riziko vzniku tromboembolické nemoci je u postižených těhotných žen asi osmkrát vyšší ve srovnání se zdravými těhotnými ženami. Gravidní ženy trpící některými z výše uvedených stavů jsou vystaveny signifikantně vyššímu riziku úmrtí plodu nebo růstové retardaci plodu. (14, 17, 18)

## 2. Trombofilní mutace v těhotenství

Riziko vzniku tromboembolických příhod během těhotenství roste jak z důvodu fyziologicky vzniklého hyperkoagulačního stavu, tak vlivem dědičných a získaných trombofilií. Z nejnovějších studií vyplývá, že četnost tromboembolické nemoci je 200 na 100 000 porodů. Riziko vzniku trombózy porodem nekončí, naopak se v poporodním období zhruba 2,5× zvyšuje. Trombofilní defekty mají negativní vliv na průběh těhotenství a zvyšují riziko opakovaných potratů, abrupce placenty a omezení růstu plodu, které je v řadě případů způsobené omezenou výměnou kyslíku a živin skrze placentu. Mezi jednu z nejobávanějších příčin neonatální morbidity a mortality řadíme preeklampsii. Preeklampsie je závažné onemocnění vedoucí k poškození orgánů (ledviny, placenta, játra, mozek) na bázi změny endotelu arterií. V případě, že nedojde k invazi trofoblastu do spirálních arterií placenty, dochází k vazokonstrikci placentárních cév (fyziologicky dochází k dilataci), která se následně rozšiřuje po celé periférii. Mezi hlavní příznaky provázející preeklampsii patří hypertenze, proteinurie, hyperurikémie, otoky (nejčastěji na dolních končetinách) a trombocytopenie. Onemocnění ve střední Evropě postihuje 3,5 % až 8,5 % gravidních žen. Mutace koagulačních faktorů, jejichž koncentrace se během těhotenství vlivem uvolňování hormonů zvyšuje, hladina proteinů C, S a hladiny inhibitorů fibrinolýzy zvyšují výše zmíněná rizika. Z tohoto důvodu je nutná zvýšená kontrola průběhu těhotenství a vývoje plodu. (24, 41, 42, 43)

### 2.1. MUTACE FAKTORU II

Protrombin je glykoprotein vznikající v játrech za přítomnosti vitamínu K. Protrombinový biologický poločas je tři až pět dní. Jedná se o serinovou proteázu, která je prekurzorem trombinu. Přírozený inhibitor, zejména antitrombin, kontroluje a reguluje enzymatickou aktivitu trombinu. Protrombin má prokoagulační i antikoagulační účinky. Jeho hlavním úkolem je štěpení rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin, dále aktivuje řadu koagulačních faktorů (XIII, IX) a kofaktorů (V, VIII) pomocí proteolýzy. (19) Mutace v genu pro faktor II se řadí mezi jednu ze tří nejčastějších mutací v genech ovlivňující krevní srážlivost. Tato mutace byla poprvé popsána Poortem a spol. v roce 1996. Jedná se o polymorfismus genu pro tvorbu protrombinu v pátém exonu. Podstatou defektu je záměna guaninu za adenin na pozici (20210A>G).

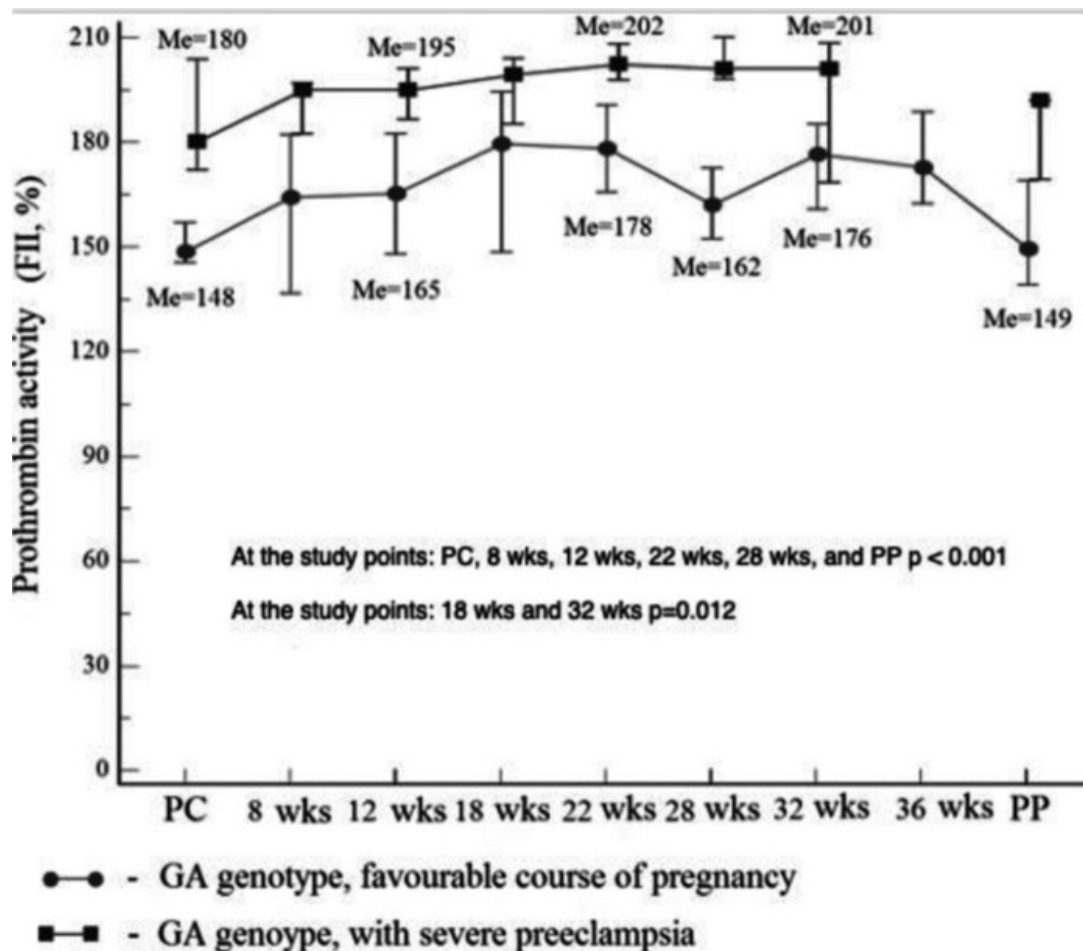
TCCCAATAAAAGTGACTCTCAGCGAGCC

↓mutace↓

TCCCAATAAAAGTGACTCTCAGCAAGCC

Tato bodová mutace v nepřepisované části genu má za následek zvýšení koncentrace protrombinu v plazmě (1,5-2×). Postihuje dvě až čtyři procenta evropské populace (hodnota je závislá na etnickém původu). Nejčastěji se vyskytuje v heterozygotní formě a představuje třikrát vyšší riziko vzniku tromboembolické nemoci. (1, 20, 21)

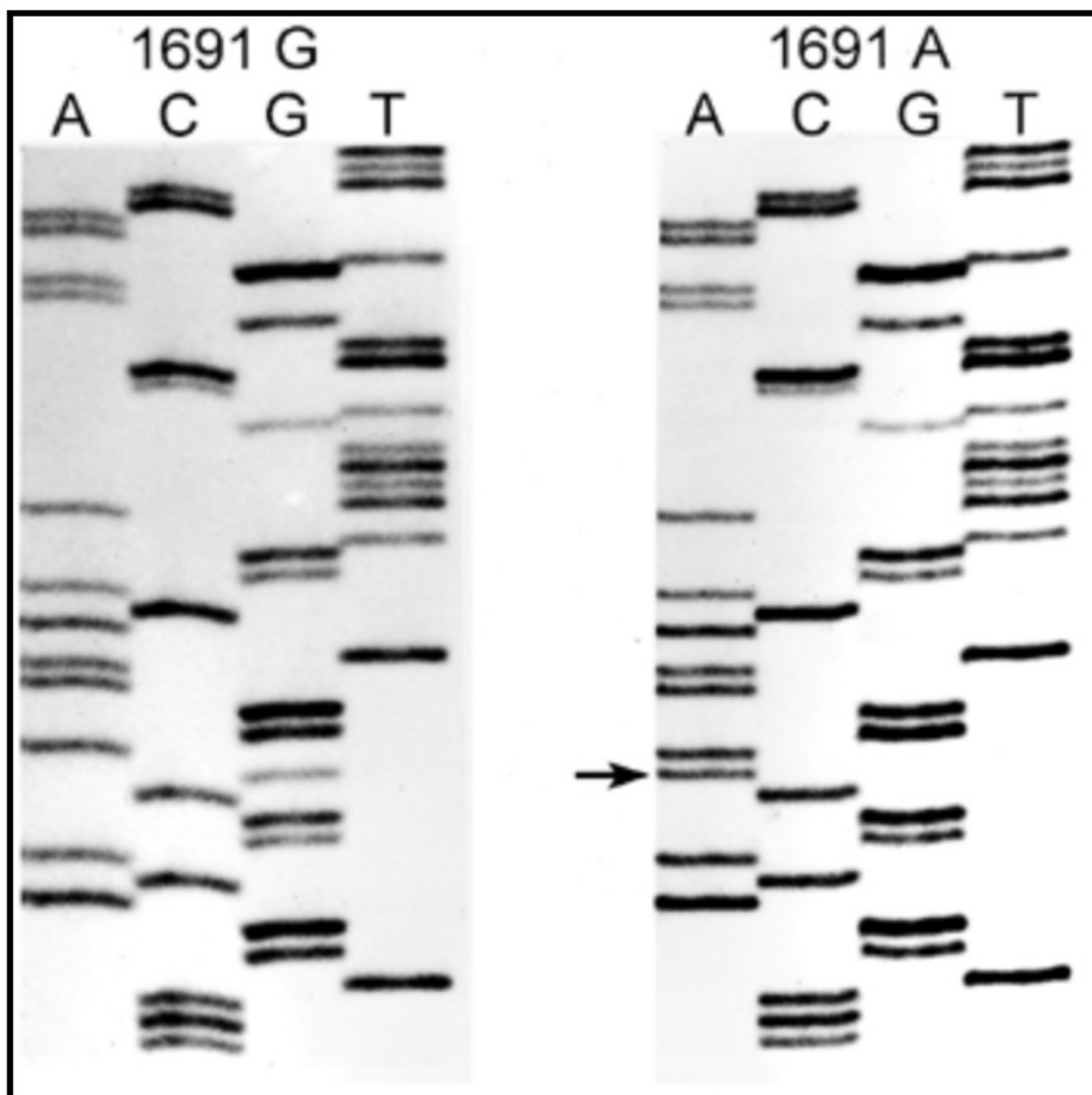
Mutace protrombinu je druhou nejčastěji se vyskytující mutací u žen trpících dědičnou trombofilií (vyskytuje se ve 20,9 % těchto případů). Studie prokazují, že riziko komplikací je závislé na věku pacientky a aktivitě protrombinu, který se po mutaci genu vyskytuje v krvi ve vyšším množství. Pokud se aktivita faktoru II pohybuje v rozmezí 148,5 až 180,6 %, nedochází v průběhu těhotenství ke komplikacím, ani jejich zvýšeným rizikům. Pokud aktivita překročí maximální bezpečnou hladiny aktivity, jsou zaznamenána rizika preeklampsie a retardace růstu plodu. Dále bylo metaanalýzou zjištěno, že u gravidních žen nad 29 let se zvyšuje pravděpodobnost opakovaných potratů. Mutace protrombinu zvyšuje pravděpodobnost abrupce placenty 9×, ke které dochází nejčastěji v posledním stádiu těhotenství a ohrožuje na životě rodičku i plod. Minimálně se zvyšuje riziko potratu po 28.týdnu těhotenství (21, 22, 23, 24).



Obrázek 4: Vývoj aktivity protrombinu v průběhu normálního těhotenství (●) a v průběhu rizikového těhotenství s těžkou preeklamsií (■). (16) Studium aktivity protrombinu při gestačních komplikacích umožňuje nový náhled na prognózu těhotenských komplikací u žen trpících mutací protrombinu G20210A. Hladina protrombinu byla signifikantně vyšší u žen, které jsou nositelky GA fenotypu a došlo u nich k rozvinutí časně nebo těžké preeklampsie v porovnání s ženami, které mají bezproblémový průběh těhotenství. Studie ukazují, že aktivitu protrombinu lze s největší pravděpodobností považovat za prognostický marker rozvoje preeklampsie.

## 2.2. MUTACE FAKTORU V

Mutace faktoru V, neboli Leidenská mutace, je autosomálně dominantně dědičné onemocnění. Název byl odvozen od nizozemského města Leiden, kde došlo v roce 1993 k jejímu objevení. Jedná se o bodovou mutaci genu F5 v exonu 10 kódující faktor V. Záměnou pořadí nukleotidů (G za A) dojde v pozici 506 ke vzniku jiných aminokyselin. Místo argininu vzniká glutamin.



Obrázek 5: Záměna guaninu za adenin. (25) Elektroforetickým zkoumáním vzorků od celkem 356 jedinců byla Leidenská mutace detekována u 19 z nich. U všech 19 byla sekvenováním DNA zjištěna heterozygotní forma. Byla potvrzena G-A mutace v nukleotidu 1691 genu faktoru V Leiden. Alelicky specifická oligonukleotidová hybridizace provedená na všech 356 vzorcích potvrdila výsledky štěpení restričními enzymy.

Důsledkem této záměny je zvýšená rezistence na aktivovaný protein C, který se na proakcelerin v této pozici váže. Špatnou antikoagulační odpovědí na APC nedojde k proteolytickému štěpení faktoru V. Sníží se kofaktorová aktivita, inaktivace faktoru Va a VIIa je pomalejší. Aktivovaný faktor V se podílí na zvyšování hladiny trombinu, čímž je výrazně zvýšeno riziko vzniku žilního tromboembolismu.

Mutace se objevuje v homozygotní a heterozygotní formě. Běžnější, heterozygotní, forma zvyšuje riziko vzniku trombózy přibližně desetkrát. U vzácnější, homozygotní, formy je riziko vzniku přibližně osmdesátkrát vyšší oproti zdravé populaci jedinců. Klinický projev této mutace je ovlivněn řadou dalších faktorů, jako jsou například souběžné genetické poruchy, které mají vliv na celkové riziko vzniku trombózy nebo získané trombofilní poruchy, kam patří například syndrom antifosfolipidových protilátek, myeloproliferativní poruchy atd. Vznik TEN je ovlivněn i vnějšími faktory a okolnostmi (např. obezita, cestování, úraz, užívání hormonální antikoncepce). (1, 26, 27, 29) Faktor V Leiden je nejčastěji se vyskytujícím faktorem pro vznik TEN.

Nacházíme ho u 20 až 25 % pacientů, kteří trpí trombofilií. Prevalence této mutace u evropské a americké populace se pohybuje v rozmezí tří až osmi procent. U asijských, afrických a domorodých australských populací nacházíme Leidenskou mutaci velice zřídka. (28) V ojedinělých případech (2 až 3 % mutací faktoru V) se objevuje Cambridge mutace – záměna argininu za threonin na pozici 306 nebo homozygotní HR<sub>2</sub> mutace, pro kterou je typická záměna histidinu za arginin. Důsledkem této konverze je pokles hladiny faktoru V, který má za následek omezení kofaktorové aktivity při štěpení aktivovaného faktoru VIII. (1, 26, 29)

Leidenská mutace má na průběh těhotenství velice podobný vliv jako mutace protrombinu. Nejčastěji dochází k pozdním těhotenským komplikacím, kam řadíme například růstovou retardaci plodu, ztrátu plodu, preeklampsii nebo abrupci placenty. (30)

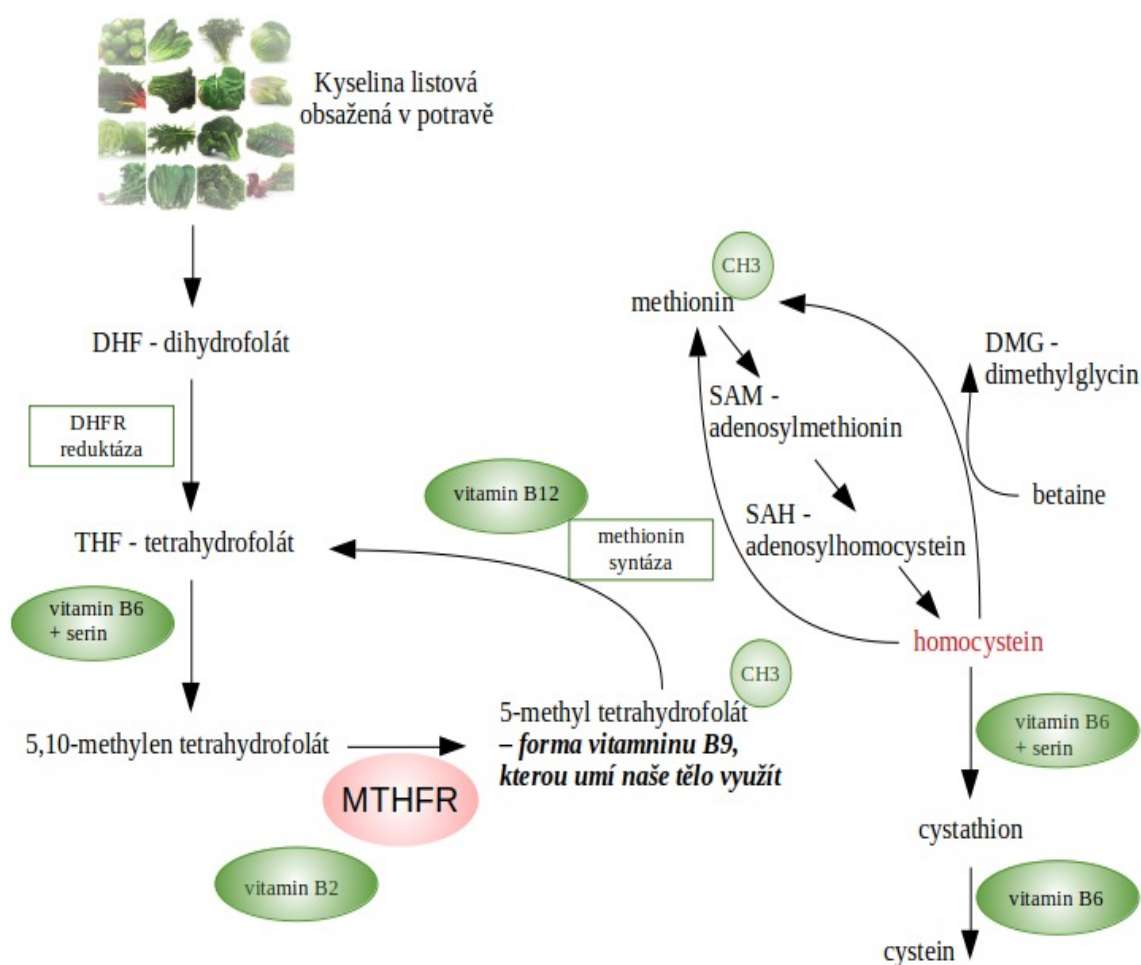


### 2.3.MUTACE GENU PRO MTHFR

Gen MTHFR kóduje enzym 5-methyltetrahydrofolátreduktázu. Jedná se o esenciální látku vyskytující se v krvi, jejíž hlavním úkolem je konverze 5,10- methyltetrahydrofolátu na aktivní formu 5-methyltetrahydrofolát, kterou dokáže naše tělo využít. Aktivní folát vzniká při metabolismu vitamínu B9. Foláty plní důležitou funkci při metylaci hemocysteinu. Mutací MTHFR dojde ke snížené tvorbě folátů, a v tomto důsledku se v krvi hromadí cytotoxický hemocystein. V těle jsou přítomny dva geny MTHFR (každý zděděn po jednom z rodičů). Onemocnění je v populaci hojně zastoupeno (výskyt v populaci představuje až čtyřicet procent, onemocněním je postižena až každá druhá žena). Pokud pozorujeme mutaci jednoho ze dvou genů, jedná se o heterozygotní formu mutace. V případě mutace obou genů se jedná o formu homozygotní. U mírnější, heterozygotní, formy je riziko přenosu na potomky padesáti procentní. Tento druh onemocnění není závažný a život ohrožující. Doporučuje se pouze omezit rizikové faktory pro vznik trombózy jako např. užívání hormonální antikoncepce, kouření, atd. Ve vážnějším případě, mutaci obou genů, dochází v každém případě k přenosu na potomky a riziko vzniku trombózy je vysoké. V těchto dvou formách můžeme pozorovat několik typů mutací. Nejzávažnějšími a nejvíce probádanými jsou typy C677T, kdy na pozici 677 dojde k záměně nukleotidů – cytosin za thymin a vzniku valinu. Druhým typem je A1298C. V tomto případě dochází k záměně adeninu za cytosin a vzniku alaninu. Následkem těchto abnormalit dochází ke snížené aktivitě enzymu u heterozygotní formy přibližně o třicet pět procent a u formy homozygotní až o sedmdesát procent. Snížením aktivity enzymu je z těla hůře odbouráván hemocystein.

Pro jeho recyklaci jsou nezbytné následující látky: folát (vitamin B9, kyselina listová), vitamin B12 a B6. Fyziologické hodnoty hemocysteinu, měřené krevními testy, se mírně liší v závislosti na referenčních mezích konkrétní laboratoře. Typicky je hladina pod 15  $\mu\text{mol/l}$  považována za normální. Někdy se horní hranice normálu uvádí jako 14, někdy jako 13  $\mu\text{mol/l}$ . Hladina mezi 15 a 30  $\mu\text{mol/l}$  je považována za mírně zvýšenou, mezi 30 a 60  $\mu\text{mol/l}$  je považována za středně zvýšenou a vyšší než 60  $\mu\text{mol/l}$  je považována za silně zvýšenou. V těhotenství spotřeba vitamínu B9 silně vzrůstá (až 3 $\times$ ). Uvádí se, že až šedesát procent žen v těhotenství trpí nedostatkem této látky, která se běžně vyskytuje v potravinách jako je například listová zelenina, játra, luštěniny, citrusové plody. Vitamin B9 lze do těla také doplňovat pomocí doplňků stravy, které jsou dostupné nejčastěji ve formě tablet. K předávkování kyselinou listovou nedochází, vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o vitamin běžně rozpustný ve vodě, tudíž je jeho nadbytek vyloučen snadno a rychle močí. Zvýšená hladina hemocysteinu v krvi je spojena až s třikrát zvýšeným rizikem vzniku žilní

i tepenné trombózy nebo aterosklerózy. V graviditě jsou vyšší hladiny zaznamenány v případě, že žena trpí komplikacemi během těhotenství (preeklampsie, abrupce placenty). Pokud žena čeká dítě s defektem neurální trubice, je hladina homocysteinu také zvýšená. Když je u těhotné ženy prokázána mutace genu pro MTHFR pozorujeme vyšší riziko vzniku vývojových vad, zejména rozštěpů páteře. Při nedostatku metylfolátu může s větší pravděpodobností docházet ke zpomalení růstu plodu, předčasnému porodu nebo opakovaným potratům. (30, 31, 32, 33)

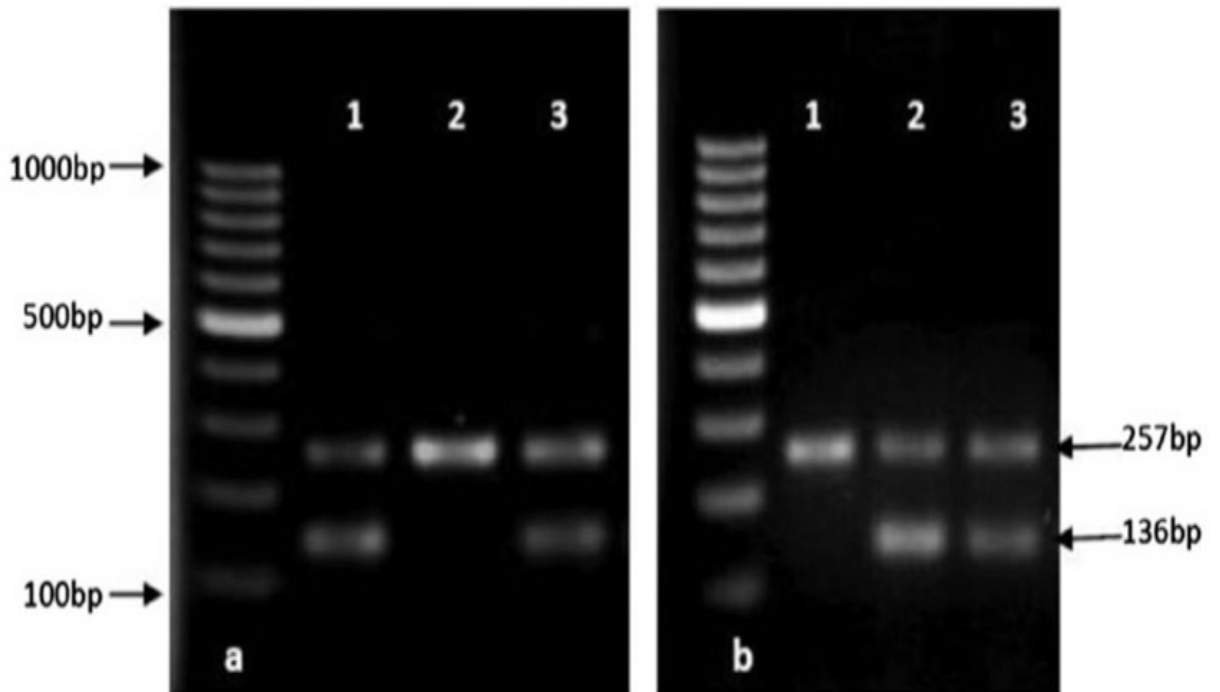


Obrázek 6: Metabolismus kyseliny listové. (31) Vitamin B9, folát neboli kyselina listová patří mezi vitamíny rozpustné ve vodě. Souhrnný název pro látky, které mají vlastnosti vitamínu B9 a jsou přirozeně obsaženy v potravinách nazýváme foláty. Pojmeme kyselina listová označujeme syntetickou formu, která je využívána například v doplňcích stravy nebo v potravinách obohacených o vitamíny. Metabolismus vitamínu B9 je úzce spojen s metabolismem vitamínu B12. Uplatňuje se redukce na dihydrofolát a tetrahydrofolát.

## 2.4. MUTACE GENU PRO PAI

Fibrinolytický systém je základním endogenním ochranným mechanismem zabráňujícím vzniku trombu. Aktivátor plazminogenu (PA) působí na neaktivní prekurzor – plazminogen, za vzniku plazminu. Rozlišujeme dva základní typy aktivátorů plazminogenu: t-PA (tkáňový typ), u-PA (urokinázový typ). Aktivace plazminogenu je regulována specifickými a rychle působícími inhibitory aktivátorů plazminogenu (PAI). Nejznámějším inhibitorem PA je inhibitor aktivátoru plazminogenu-1 (PAI-1). Jedná se o bílkovinu přítomnou v plazmě. (35) PAI-1 (jiným názvem SERPINE1) obsahuje v promotoru genu 4G/5G inzerční/deleční polymorfismus. Alela 4G je více transkripčně aktivní, proto jedinci s 4G/4G genotypem mají hladinu PAI-1 vyšší než jedinci s 5G/5G genotypem. Při zvýšených hodnotách PAI-1 dochází k omezené přeměně plazminogenu na plazmin a negativnímu ovlivnění odstraňování krevních sraženin. PAI nacházíme i v děložní sliznici, což může způsobovat komplikace během těhotenství a porodu. Zvýšené riziko vzniku trombóz pozorujeme zejména v případech, kdy jsou u pacienta diagnostikována další onemocnění (Leidenská mutace nebo antifosfolipidový syndrom). Osoby, u nichž je přítomna alela 4G mají značně vyšší riziko infarktu myokardu, cévní mozkové příhody a aterosklerózy.

U těhotných žen dochází vlivem tohoto onemocnění k vyšší pravděpodobnosti komplikací, jako je například porucha růstu plodu, předčasný porod, spontánní potrat. Pokud je žena nositelkou mutace genu 4G/4G dosahuje riziko spontánního potratu až 38 %. Na základě metaanalýzy bylo u osmi z jedenácti studií zjištěno, že výrazně vyšší plazmatické hodnoty PAI-1 vykazují ženy trpící preeklampií, na rozdíl od žen, které tímto závažným cévním onemocněním netrpí. (36, 37, 38, 39)



Obrázek 7: Detekce polymorfismu PAI-1 4G/5G v agarózovém gelu. (40) Jedním ze známých polymorfismů genu PAI-1 je polymorfismus 4G/5G s jedním párem bází (bp) ve vzdálenosti 675 bp proti směru transkripce od místa startu v oblasti promotoru. Homozygotní 4G má 25% nárůst PAI-1 v plazmě ve srovnání s homozygotní 5G. Gel „a“ je pro 5G a gel „b“ je pro 4G. Číslo 1 reprezentuje 5G/G, číslo 2 je 4G/G a číslo 3 je vzorek 4G/5G. Pás 250 bp je určen jako kontrola a pás 136 bp je získán primery specifickými pro alelu 4G a 5G.

### 3. Diagnostika

#### 3.1. Trombózy a jejich diagnostika

Trombóza bývá diagnostikována mnoha způsoby. K prvotnímu podezření na rozvoj tromboembolického stavu může dojít na základě otoků, které jsou jedním ze základních příznaků trombózy. Dochází k bolesti a otékání zejména dolních končetin. U těhotných žen se často setkáváme s ilickou (kyčelní) trombózou, která je v 80 procentech levostranného typu. V tomto případě předchází otoku bolest spodní části zad, hýždě, břicha a třísla. (44) Základní metoda, sloužícími k diagnostice žilní trombózy, je posouzení rizika v závislosti na tzv. Welsovu klinickém skóre, kde bereme v potaz anamnézu a fyzikální vyšetření pacienta. Další stěžejní metodou je DUS – duplexní ultrasonografie, která je neinvazivní, vysoce specifická a senzitivní. Vyšetření využívá principu ultrazvuku a současně Dopplerova jevu. (44,45) V případě, že je sonografické vyšetření negativní, ale podezření lékaře přetrvává, je vhodné pacienta pozvat na kontrolní laboratorní vyšetření. Základní parametry, které pozorujeme při podezření na TEN je počet trombocytů a jejich další vlastnosti (MPW – střední objem trombocytů, PDW – šíře distribuce trombocytů), aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas) a hladina D-dimerů. Stanovení hladiny D-dimerů není validním ukazatelem vzniku trombózy u těhotných žen, vzhledem k progresivně rostoucím hodnotám v průběhu těhotenství. Ani Welsovo klinické skóre v graviditě neposkytuje spolehlivé výsledky, vzhledem k běžně se vyskytujícím otokům končetin, které jsou jedním z klinických kritérií tohoto skóre. (1, 46, 49) U gravidních žen se proto nejčastěji volí metoda duplexní sonografie. Pokud tato metoda poskytne nedignostický závěr, dochází k vyšetření pomocí magnetické rezonance, která přímo zobrazuje trombózu. (45)

Stěžejním a velmi spolehlivým vyšetřením trombofilních mutací je zkoumání lidského genomu – genetické vyšetření vybraných mutací. K tomuto vyšetření nejčastěji dochází v závislosti na rodinné anamnéze a nutnosti odhalení dědičných trombofilních mutací napříč generacemi. K detekci mutací a polymorfismů trombofilních faktorů je nejčastěji využívána metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce – PCR. Vzorek pro genetickou analýzu je získán z krve pacienta nebo stěrem z bukalní sliznice dutiny ústní. Odebrané vzorky se skladují v lednici při teplotě 2 až 8 °C po dobu jednoho až tří dnů.

K indikaci vyšetření dochází u pacientek (obvykle starších dvanácti let), jejichž rodinným příslušníkům byla diagnostikována dědičná trombofilní mutace, vzhledem k nutnosti

zvýšeného dohledu v průběhu těhotenství, při operacích a úrazech nebo např. při cestování. Nutností je včasné podání koagulační léčby (např. Clexane).

Dalšími důvody k indikaci genetického vyšetření je třikrát se opakující potrat v prvním trimestru gravidity nebo u každé ztráty plodu po tomto období, preeklampsie, růstová retardace plodu, dále při hledání příčiny vzniku idiopatické TEN a délce antikoagulační léčby. (47,48)

*Tabulka II: Welsovo klinické skóre. (45) Na základě Welsova klinického skóre je posuzováno riziko vzniku plicní embolie a flebotrombózy.*

Klinické kritérium	bodové hodnocení
1. aktivní maligní nádor	1
2. paréza, plegie, sádra, jiný druh imobilizace	1
3. klid na lůžku déle než 3 dny, větší operace v posledních 4 týdnech	1
4. lokalizovaná bolest DK	1
5. otok celé DK	1
6. obvod lýtky alespoň o 3 cm větší ve srovnání se zdravou DK	1
7. barevné změny otoku DK	1
8. dilatace podkožních žil	1
9. je pravděpodobnější jiná dg. než flebotrombóza?	-3

Bodové hodnocení (skóre): ≤ 0 bodů – nízká pravděpodobnost flebotrombózy (≤ 3%), 1–2 body – střední pravděpodobnost flebotrombózy (do 19%), ≥ 3 body – vysoká pravděpodobnost flebotrombózy (> 19%), u střední a vysoké pravděpodobnosti je nutné pacienta vždy odeslat na ultrazvukové vyšetření (podle Wellse, 1995)

## 3.2. Molekulárně-genetické diagnostické metody

### 3.2.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

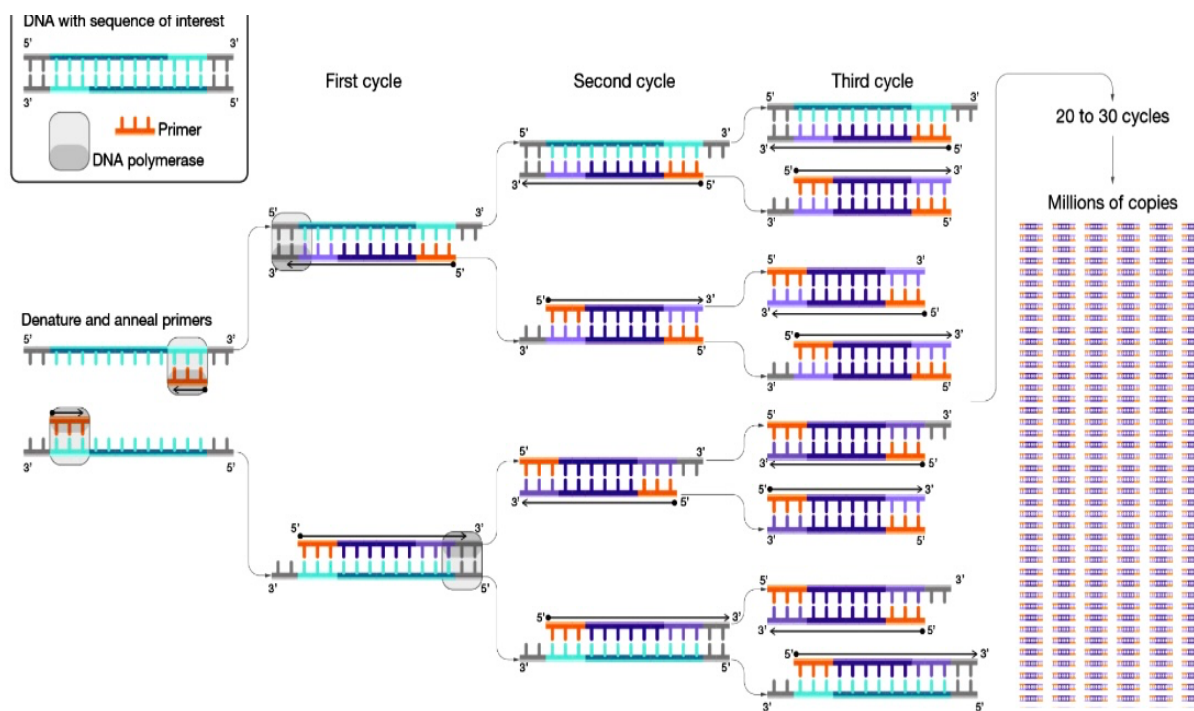
Polymerázová řetězová reakce je nejrozšířenější molekulárně biologickou metodou současnosti, kterou v roce 1985 zavedl Kary B. Mullis. Její název pochází z anglického **Polymerase Chain Reaction**. Podstata PCR je amplifikace (zmnožení) specifických úseků DNA (deoxyribonukleové kyseliny). Využívá tři základních procesů – denaturace, hybridizace a replikace DNA.

Ke zmnožení požadované části DNA jsou zapotřebí dva krátké úseky, které jsou komplementární k jejím koncům, vážou se na protilehlé řetězce tak, aby jejich 3' konce směřovaly proti sobě. Tyto specifické úseky nazýváme primery. Skládají se z 20 až 25 nukleotidů. Je nutné dbát na specifitu cílových sekvencí, s nimiž primery hybridizují, aby nebyly obsaženy v jiné části DNA, ale pouze v místě, které chceme amplifikovat. Primery jsou zodpovědné za určení a ohraničení oblasti, která se bude amplifikovat, tedy odpovídají

za specifitu reakce a zároveň fungují jako počátek nového vlákna, ke kterému DNA polymeráza připojuje další nukleotidy.

K syntéze (amplifikaci) DNA se využívá termostabilní enzym DNA-polymeráza. Jedná se o enzym získávaný z termofilních mikroorganismů (např. bakterií *Thermus aquaticus*). Reakce probíhá v přístroji zvaném termocykler, do kterého jsou vkládány mikrozkušavky obsahující vyšetřovanou DNA, primery, DNA-polymerázu a deoxyribonukleotidtrifosfát (dNTP), které jsou stavebními kameny nově vznikající DNA.

Prvním krokem cyklu je denaturace dvouřetězcových molekul vyšetřované DNA při teplotě 92 až 96 °C. Následuje připojení primerů na cílové sekvence oddělených řetězců vyšetřované DNA. Tento krok probíhá za snížené teploty (cca. do 65 °C). Vazba primerů vymezuje oblast genomu, u které dojde následně k amplifikaci. Posledním krokem je elogence, neboli prodlužování nukleotidových řetězců. K tomuto kroku je nezbytné působení DNA-polymerázy. Zmiňovaný enzym nasedne na 3' konce primerů a umožní připojování nových nukleotidů, čímž je řetězec prodlužován ve směru od 5' ke 3' konci. Teplota je v tomto kroku upravena na zhruba 72 °C. Doba potřebná k elogenci je přímo úměrná délce řetězce, který chceme amplifikovat. Reakce je cyklická, proto je nutné postup několikrát zopakovat. Po třetím opakování dochází ke vzniku amplikonů (fragmenty DNA o délce odpovídající amplifikovanému úseku). Pro získání dostatečného množství amplikonů provádíme zpravidla 15 až 40 po sobě jdoucích cyklů. Tímto způsobem můžeme z jednoho úseku DNA vytvořit až 10<sup>9</sup> kopií. Mezi hlavní výhody této široce rozšířené metody patří vysoká specifita, citlivost, rychlost, bezpečnost a možnost automatizace. Nevýhodami je nutnost znát sekvence ohraničující amplifikovaný úsek, aby byly správně zvoleny příslušné primery. Pomocí PCR nelze replikovat dlouhé sekvence DNA. Dalším problémem může být kontaminace vzorku, kdy jediná molekula cizorodé DNA způsobuje falešný signál, což komplikuje vyšetření zejména v klinické genetice. Polymerázovou řetězovou reakci lze použít v řadě modifikací a variant. (52,53)



Obrázek 8: Schéma PCR metody. (54) V prvním cyklu dochází k nasednutí primerů a tvorbě první kopie templátové DNA (asymetrická PCR). V dalších cyklech již vznikají PCR produkty, které jsou na obou koncích ohraničeny sekvencemi primerů. Po 30 cyklech dochází k namnožení původní templátové DNA o 9 řádů.

### 3.2.2. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR)

Výše popsaná PCR umožňuje detekci pouze vzniklého PCR produktu (amplikonu), která se provádí většinou elektroforeticky nebo sekvenčně, což prodlužuje samotnou analýzu a nevypovídá o samotném průběhu reakce.

Tento problém řeší metoda real-time PCR, u které je možnost monitorovat průběh amplifikace během probíhajícího procesu, nikoli až po jeho dokončení. Princip amplifikace je stejný jako u klasické PCR metody. Výsledky nejsou pozorovány na agarózovém gelu, ale v přístroji, kde je pomocí kamery a detektoru sledován průběh reakce (změna fluorescence). Termocykléry pro qPCR mají většinou funkci tepelného gradientu. Amplifikace DNA je spojená s generováním fluorescenčního záření, které je následně detekováno v průběhu každého probíhajícího cyklu. Ke vzorku se přidá detekční marker, který po vystavení halogenovému nebo wolframovému zdroji generuje záření. Fluorescence roste se zvyšujícím se počtem kopií genu. U real-time PCR se používá řada markerů pro detekci, mezi nejčastěji používané patří barvivo SYBR Green a TaqMan sonda.

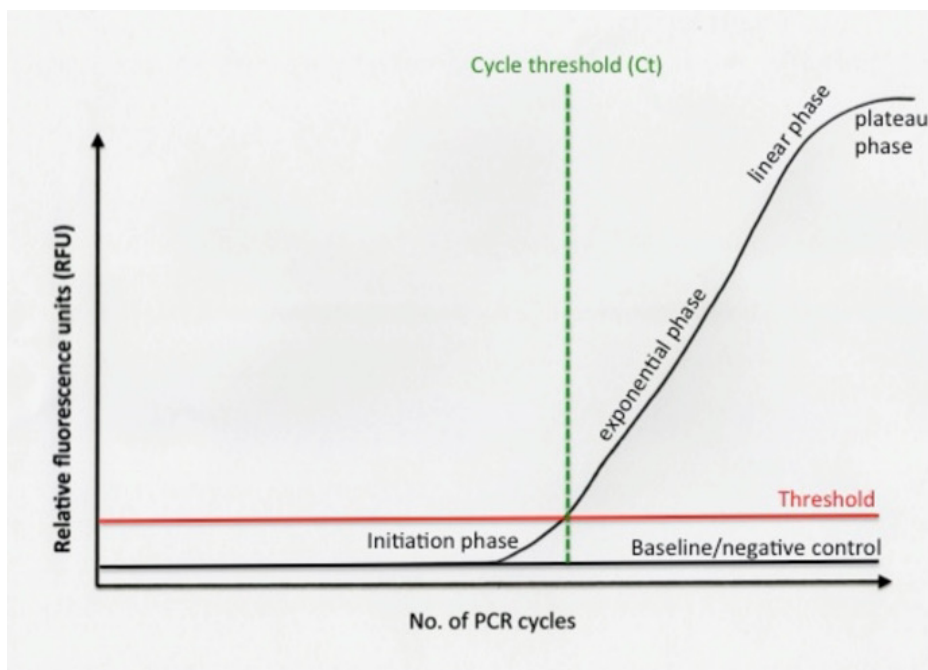


TaqMan jsou hydrolyzační sondy (oligonukleotidy) obsahující barvivo (nejčastěji fluorescein) na svém 5' konci a tzv. zhášec (např. tetramethylrhodamin) na svém 3' konci. Sonda se váže na část amplifikované sekvence DNA.

Při syntéze nového řetězce DNA dochází na 5' konci vlivem nukleázy k degradaci sondy, což způsobí oddělení fluoresceinu od zhášeče a generaci fluorescenčního záření. Tyto sondy využívají principu FRET (Försterův rezonanční přenos energie), kdy pokud je zhášec a fluorofor v blízkosti, nedochází k uvolňování fluorescence. Pokud dojde k oddálení (např. hydrolyzou sondy) dojde k uvolnění fluorescence.

SYBR Green je barvivo, které poskytuje výrazný fluorescenční signál po vazbě na dvouvláknovou DNA. Vzhledem k intenzitě signálu je nejčastěji používaným barvivem. K účelům real-time PCR lze dále využívat například ethidium bromid nebo akridinovou oranž. SYBR Green se uplatňuje i při analýze křivek teploty tání vzniklých amplikonů (high resolution melting analysis), kdy lze získat aditivní informace o detekovaných mutacích, případně nespecifických produktech. TaqMan sondy naproti tomu zvyšují specifitu detekčního systému pomocí specifické vazby na místo amplifikace (komplementarita).

Real-time PCR má řadu neopomenutelných výhod. Je rychlejší než klasická PCR metoda, lépe automatizovatelná a při jejím použití můžeme detekovat více mutací během jedné reakce. Produkt PCR není nutné vypouštět na agarózový nebo polyakrylamidový gel, k analýze dochází detekcí fluorescenčního signálu a případně analýze křivky tání. Data jsou využívána ke skutečně kvantitativní analýze genové exprese (end-point PCR metoda byla pouze semikvantitativní). Reakce je velmi účinnou metodou, kterou lze v závislosti na všech aspektech přesně vypočítat. (55) Výstupem reakce je amplifikační křivka. Ve většině případů provádíme qPCR na vícejamkových destičkách, proto dochází ke generaci velkého množství křivek. Na osu x se běžně vynáší počet cyklů reakce a na osu y fluorescence, která je úměrná množství amplifikovaného výchozího produktu ve zkumavce. (56,57) Real-time PCR umožňuje při správné volbě fluoroforů detekovat více analytů v průběhu jedné reakce.



Obrázek 9: Amplifikační křivka qPCR (57) se zvýrazněnou prahovou hodnotou – Threshold. Protnutí prahové hodnoty křivky v exponenciální fázi se na ose x odečte hodnota Ct (threshold cycle), která slouží pro určování koncentrace analytu.

### 3.2.3. Metoda restrikčních enzymů - RFLP

Při této metodě dochází ke štěpení DNA na specifických místech vlivem restrikčních enzymů (restrikční endonukleázy) po předchozí amplifikaci metodou PCR. Jedná se o její modifikaci, používanou pro typizaci sekvence obsahující polymorfismus. Restrikční enzymy se inkubují spolu s DNA při specifické teplotě pro optimální aktivitu restrikčního enzymu. Enzymy rozpoznají specifickou sekvenci DNA a následně štěpí dané nukleotidy. Výsledkem je vizualizace různě dlouhých fragmentů pomocí elektroforézy. Nejčastěji dochází k vizualizaci ultrafialovým světlem po obarvení ethidium bromidem nebo je využíváno barvivo SYBR Green. V případě detekování více než jedné mutace, musejí být fragmenty dostatečně dlouhé, aby došlo ke správné interpretaci výsledků. Hlavními výhodami je dostupnost (cena) a přesnost, na druhou stranu je metoda manuálně náročná. Další nevýhodou je použití látek, které mohou ohrožovat zdraví (ultrafialové světlo). Metoda byla hojně využívána v minulosti, než došlo k objevení a rozšíření real-time PCR metody. V současné době je stále využívána laboratořemi, které nejsou vybaveny real-time cyklérem. (51, 52, 53)

### 3.2.4. Amplifikační refrakční mutační systém (ARMS)

Amplifikační refrakční mutační systém je multiplexní technika testování, kterou v roce 1998 vyvinuli Bathelier, Champenois a Lucotte. Metoda je využívána k detekci mutací v malém rozsahu (záměny jednoho nukleotidu nebo malé delece). Dochází ke dvěma reakcím. První reakce je specifická pro zdravou DNA a druhá reakce je specifická pro mutagenní DNA. Dochází ke vzniku amplikonů specifických pro danou mutaci. V rámci ARMS testů musí být zařazena vnitřní PCR kontrola. Produkty reakce jsou detekovány elektroforeticky, případně se jedná o úpravu pro provedení real-time PCR.

Jedná se o jednoduchou a spolehlivou metodu, která je nejčastěji využívána k detekci mutací faktorů II a V. Podle zakladatelů je tato metoda jednodušší než metoda s restrikčními enzymy, ale představuje stejná zdravotní rizika. (50,58)

### 3.2.5. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

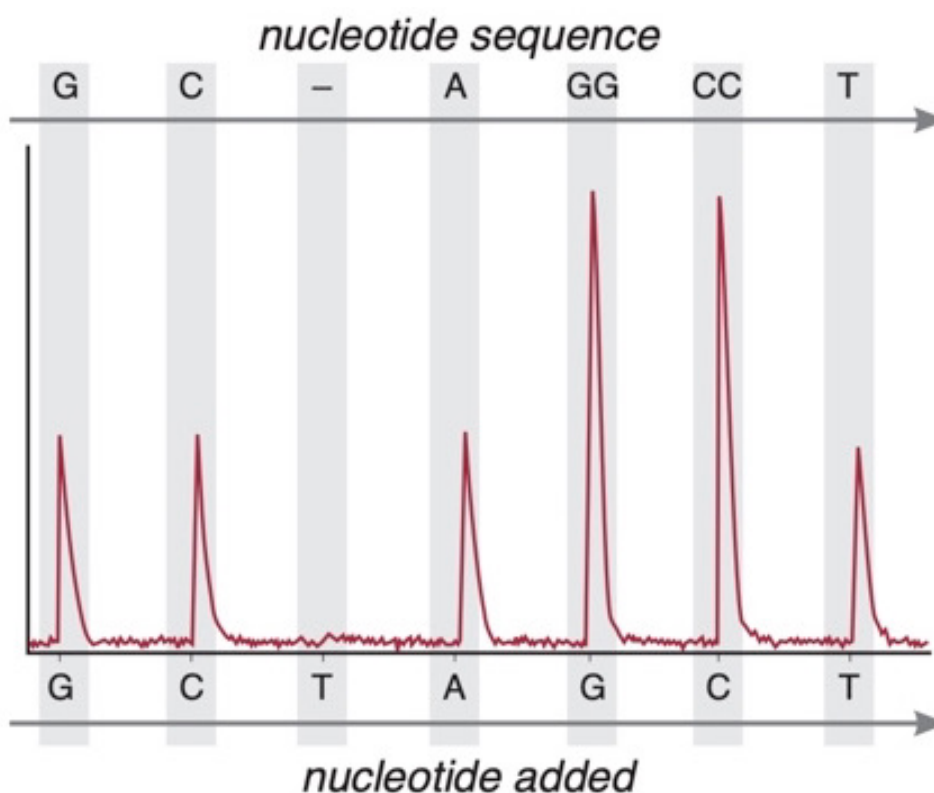
Pro detekci mutací se využívá ELISA test Strip A, který funguje na principu reverzní hybridizace. Dochází k vazbě reaktantů na mikrotitrační destičky (v tomto konkrétním případě spíše na detekční proužek). Cílová sekvence DNA je amplifikována a vzniká amplikon značený biotinem, který je hybridizován na detekční proužek. Amplikon je detekován pomocí streptavidin-alkalické fosfatázy se substrátem tvořícím barvu. Na základě sond, které porovnávají hustotu barev je určen příslušný genotyp. Test založený na specifické oligonukleotidové hybridizaci popsali Kowalski, Radu a Gold v roce 2000. Nejpresnější interpretace výsledků lze dosáhnout pomocí spektrofotometrického čtení ELISA destičky. V porovnání s metodami využívající gelovou technologii jsou enzymově vázané imunosorbentní testy bezpečnější. (50)

### 3.2.6. Přímé sekvenování

Technologie pyrosekvenování je snadno použitelná, slouží pro přesnou analýzu kratších sekvencí DNA. Tato metoda patří mezi tzv. sekvenování nové generace (NGS).

V prvním kroku se sekvenční primer hybridizuje s templátem DNA. Probíhá inkubace s enzymy (DNA polymerázou, ATP sulfurylázou, luciferázou a apyrázou) a substráty (adenosin 5' fosfosulfátem a luciferinem). Do reakce je přidán dNTP. Deoxyribonukleotid trifosfát se působením DNA polymerázy začleňuje do řetězce DNA, pokud splňuje

podmínku komplementárnosti k bázi v templátovém řetězci. V průběhu dochází k uvolňování pyrofosfátu. ATP sulfuryláza kvantitativně převede pyrofosfát na adenosintrifosfát (ATP). ATP umožní přeměnu luciferinu na oxyluciferin, který produkuje světlo. Množství světelného záření je přímo úměrné množství ATP. Uvolněné světlo je detekováno kamerou. Enzym degradující nukleotidy (apyráza) nepřetržitě degraduje ATP a nevyužitý dNTP. Z tohoto důvodu dochází k přerušení produkce světla a regeneraci roztoku. Následně se postupně přidává dNTP. Vytvoří se komplementární řetězec DNA a na základě signálních píků závislých na množství světelného signálu pozorujeme v pyrogramu nukleotidovou sekvenci. (59)



Obrázek 10: Pyrogram (59) Přidávání dNTP se provádí postupně. Deoxyadenosin alfa-thiotrifosfát (dATPaS) se používá jako náhrada přirozeného deoxyadenosintrifosfátu (dATP), protože je účinně využíván DNA polymerázou, ale není rozpoznáván luciferázou. Jak proces pokračuje, vytváří se komplementární řetězec DNA a ze signálních píků v pyrogramu se určuje nukleotidová sekvence.

Případně lze samozřejmě využít tzv. Sangerovo sekvenování, které má sice nižší kapacitu, ale je stále dostačující pro sekvenování krátkých úseků. Jeho vhodnost pro detekci homozygotních je vyšší než pro detekci heterozygotních mutantů.

### 3.3. Biochemické diagnostické metody

Biochemické vyšetření prováděné za účelem diagnostiky TEN by mělo kromě standardního koagulačního vyšetření zahrnovat i vyšetření na antitrombin III, protein C a protein S, u kterého zkoumáme volnou i vázanou formu a výsledné hodnoty srovnáváme s výsledky typickými pro těhotné ženy. Ke stanovení je používán např. koagulační test ProC Global (funkční globální screeningový test). Test slouží k diagnostice vrozených i získaných poruch systému proteinu C. Po přidavku aktivátoru dojde k aktivaci endogenního proteinu C a dochází k prodloužení koagulačního času (aPTT), které je sledováno. Cílem je získat hodnotu koagulačního času před i po přidání aktivátoru proteinu C. Výsledek je vyjádřen jako normalizovaný poměr (NR) obou změřených časů vynásobený faktorem kalibrace. Klinický význam má snížení hodnoty NR, k němuž může dojít v přítomnosti Leidenské mutace nebo při vrozeném či získaném nedostatku proteinu C a S. Test je velice citlivý k faktoru V Leiden a poskytuje prakticky stoprocentní výsledek. Jeho citlivost k proteinům C a S je nižší (obzvláště k proteinu S), z tohoto důvodu není vhodné se spoléhat v případě diagnostiky trombofilních pacientů pouze na toto vyšetření. Pokud pacient užívá koagulační léčbu, budou výsledky nepřesné. Užíváním heparinu dochází ke snížení hladiny antitrombinu III. Užíváním kumarinů se snižuje aktivita proteinu C a S. Po vyšetření hemocysteinu nalačno můžeme vyloučit hyperhemocysteinemii. V případě podezření na antifosfolipidový syndrom je indikováno vyšetření základních koagulačních parametrů, celkového krevního obrazu, lupus antikoagulans a antifosfolipidových protilátek. V současné době je díky testu ProC Global v kombinaci se stanovením koncentrace fibrinogenu, aktivity antitrombinu, aPTT, PT, počtem trombocytů a hladiny D-dimerů pokryta většina známých trombofilních defektů. (17, 60, 61)

Tabulka III: Referenční meze krevního obrazu a koagulace zdravého jedince (61)

<b>REFERENČNÍ MEZE KREVNÍHO OBRAZU</b>		
erytrocyty	muži	4,0-5,9×10 <sup>12</sup> /l
	ženy	3,8-5,4×10 <sup>12</sup> /l
hemoglobin	muži	130-176 g/l
	ženy	120-160 g/l
hematokrit	muži	0,39-0,51
	ženy	0,35-0,46
střední objem erytrocytů		84-96 fl
hemoglobin v erytrocytu		28-34 pg
distribuční šíře erytrocytů		10,0-15,2 %
trombocyty		150-350×10 <sup>9</sup> /l
střední objem trombocytů		7,8-11,0 fl
leukocyty		4,0-10,0×10 <sup>9</sup> /l
neutrofilní segmenty	50-70 %	2-6,5×10 <sup>9</sup> /l
neutrofilní tyče	0-4 %	0,6-1,2×10 <sup>9</sup> /l
lymfocyty	20-45 %	1,2-3,4×10 <sup>9</sup> /l
monocyty	2-12 %	0,11-0,59×10 <sup>9</sup> /l
eozinofily	0-5 %	0,00-1,45×10 <sup>9</sup> /l
bazofily	0-1 %	0,00-0,10×10 <sup>9</sup> /l
<b>REFERENČNÍ MEZE KOAGULACE</b>		
protrombinový čas (PT)	10,0 - 17,0 s	
PT R	0,80 - 1,20	
PT INR	0,80 - 1,20	
fibrinogen	1,8 - 3,5 g/l	
aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)	28,0 - 42,0 s	
aPTT R	0,80 - 1,20	
tromboplastinový čas	<21 s	
antitrombin	80-120 %	
D-dimery	<0,5 mg/l F.E.U.	

### 3.3.1. Vyšetření proteinu C a S

Protein C je glykoprotein disponující výraznou antikoagulační schopností, která je dána inaktivací kofaktorů za účasti vápenatých iontů, proteinu S a fosfolipidů. Ke tvorbě proteinu C dochází zejména v hepatocytech za přítomnosti vitamínu K. Hladinu neovlivňuje pohlaví, ale jeho hodnota úměrně roste v závislosti na věku. Aktivace neaktivní formy (zymogenu) na účinnou – aktivní formu probíhá na povrchu fosfolipidů. Odhalením efektorové domény pro kofaktory V a VIII dojde ke štěpení neaktivní formy komplexem trombomodulinu s trombinem a vzniká účinná forma. Navázané neenzymové plazmatické faktory na membráně jsou aktivovaným proteinem C proteolyticky štěpeny, čímž dojde k jejich inaktivaci. Tento děj způsobuje zpomalení aktivovaného koagulačního procesu. Protein S sehrává důležitou roli v lokalizaci proteinu C na fosfolipidové povrchy. (72)

Před vyšetřením funkční aktivity musí být protein aktivován. Pro vyšetření proteinu C jsou využívány dvě základní metody – koagulační a fotometrická. Koagulační metoda spočívá ve schopnosti proteinu C inaktivovat kofaktory Va a VIIIa (v přítomnosti proteinu S). Fotometrická metoda je založena na specifickém štěpení chromogenního substrátu proteinem C. Výsledek se uvádí v procentech. Referenční meze se pohybuje v rozmezí 70 až 140 %.

Protein S je plazmatický glykoprotein, jehož syntéza probíhá, stejně jako u proteinu C, v největším množství v játrech. Zhruba 40 % se nachází v plazmě ve volné formě, zbylá část se váže s C4BbP (složka komplementu). Protein S je hlavním neenzymovým kofaktorem aktivovaného proteinu C. V jeho přítomnosti dochází ke dvojnásobnému zvýšení účinnosti štěpení Va a VIIIa. Kromě funkcí spojených s proteinem C má i svou vlastní – inhibuje faktor Xa a váže se na faktor V a Va. Svou vazbou na faktor VIII ovlivňuje aktivaci faktoru X, konkrétně ji dokáže zpomalit. Od proteinu C se liší biologickým poločasem, který má protein S několikanásobně delší (až 60 hodin). K vyšetření je využívána koagulační metoda. Pro stanovení antigenu, nejčastěji metodou ELISA, je zjištěna hodnota volného i celkového proteinu S. Referenční meze jsou odlišné v závislosti na pohlaví. U žen se aktivita pohybuje v rozmezí 50 až 140 %, u mužů je přibližně o 10 až 15 % vyšší. U obou pohlaví dochází ke zvyšování aktivity s věkem jedince. V graviditě fyziologicky dochází k výraznému snížení aktivity volné i vázané formy obou proteinů (o 30 až 60 %). (61, 73)

## 4. Terapie

Cílem antitrombotické léčby je zabránění růstu krevní sraženiny a prevence proti vzniku posttrombotického syndromu a plicní embolie. Terapii můžeme z funkčního hlediska rozdělit následovně:

- **Antikoagulační léčba** – ovlivňuje účinky trombinu, který sehraává roli v přeměně fibrinogenu na fibrin, dochází k prodlužování koagulačních časů, snížení koagulačního potenciálu a doprovází ji zvýšené riziko krvácení
- **Antitrombotická léčba** – zabraňuje vznikání nadbytečného množství trombinu, nedochází ke snížení hemokoagulačního potenciálu a prodlužování časů koagulace
- **Antiagregační (antitrombocytární) léčba** – ovlivňuje procesy primární hemostázy, sehraává důležitou roli zejména u tepenných okluzí
- **Trombolytická léčba** – jejím hlavním cílem je rychlý a efektivní zásah u masivních trombotických uzávěrů nebo embolizačních příhod, kdy dochází k rozpuštění krevní sraženiny, které s sebou nese riziko krvácení
- **Substituční léčba** – podstatou je náhrada sníženého objemu antitrombinu nebo proteinu C
- **Kombinovaná léčba** – skládá se ze dvou a více výše zmíněných léčebných postupů
- **Reologická léčba** – ovlivňuje průtok krve, v závislosti na okolnostech může mít antiagregační i sekundární antikoagulační účinky, jedná se o okrajovou oblast terapie



#### 4.1. Nefrakcionovaný heparin

Heparin řadíme mezi nejstarší a nejrozšířenější antikoagulantia. Antikoagulační léčba spočívá v podávání zvýšených dávek nefrakcionovaného heparinu (UFH) ve formě zejména intravenózní infuze. Cílem je prodloužit aPTT (1,5 až 2×). Podání heparinu vede nepřímo k rozpuštění krevních sraženin a předchází jejich vzniku. Nástup účinku vysokomolekulárního heparinu je velice rychlý. Při zvolení nesprávného dávkování může docházet ke zvýšené krvácivosti. Protamin je hlavním antidotem heparinu, pokud dojde k podání 1 mg této látky, je zneutralizováno přibližně stejné množství heparinu (1 mg/100 jednotek). Heparinizace může probíhat krátkodobě či dlouhodobě. V průběhu je kontrolována hladina antitrombinu. Pokud by aktivita klesla na nízkou hodnotu, může dojít k tzv. heparinové rezistenci, kdy při podání vysoké dávky léčiva nedochází k požadované odezvě.

Hlavními vedlejšími účinky heparinu je zvýšená krvácivost, ve vzácnějších případech byla pozorována trombocytopenie, osteoporóza, alopecie a v neposlední řadě může docházet k alergickým reakcím. Mezi krátkodobé nežádoucí účinky, které se mohou vyskytnout po aplikaci, řadíme pálení v místě vpichu nebo bolest hlavy. UFH neprochází placentární bariérou, proto je jeho použití ve správném množství pro plod bezpečné. Léčivo je eliminováno zejména v játrech a v menším množství dochází k jeho vylučování ledvinami. (61, 62, 63)

#### 4.2. Nízkomolekulární hepariny

V těhotenství je možné zahájit léčbu nefrakcionovanými hepariny nebo nízkomolekulárními frakcionovanými hepariny (LMWH). V současné době jsou častěji využívány nízkomolekulární hepariny, vzhledem k většímu komfortu subkutánního podání injekcí 1× nebo 2× denně, u kterého není nutná každodenní monitorizace účinnosti terapie. V případě nutnosti ověření účinnosti léčby lze sledovat hladinu anti-Xa v krvi. Další neopomenutelnou výhodou je méně nežádoucích účinků (zejména nižší riziko krvácení). V porovnání s UFH jsou nízkomolekulární hepariny ekonomicky výhodnější. Méně se vážou na plazmatické bílkoviny a endotelie, tudíž mají lepší biologickou využitelnost než nefrakcionované hepariny, které se vážou na makrofágy a buňky endotelu, čímž dochází k jejich rychlejšímu vymizení z krevní cirkulace. Dávkování závisí na výšce, hmotnosti pacientky, průběhu těhotenství a renální funkci.

Pokud jsou nízkomolekulární hepariny podávány z preventivních důvodů, je terapeutická dávka 2× až 4× nižší, než v případě, že jsou indikovány k léčbě. Nízkomolekulárních heparinových preparátů je známo mnoho, liší se molekulovou hmotností, dostupností při podkožní aplikaci, plazmatickým poločasem atd. Mezi jedny z nejrozšířenějších nízkomolekulárních heparinů patří například dalteparin, enoxaparin, nadroparin, tinzaparin, reviparin, bemiparin. (61, 63, 64, 65)

*Tabulka IV: Přehled a dávkování nízkomolekulárních heparinů (61) Nízkomolekulární neboli frakcionované hepariny působí v rané fázi srážení krve. Principem je vazba spolu s antitrombinem na faktor Xa. Podávají se nejčastěji subkutánně do břicha. Střídá se vpich na levé a pravé straně, vyhýbáme se oblasti pupku. Dávkování se může v závislosti na dalších přidružených faktorech, popřípadě dalších zdravotních komplikacích lišit, proto je vždy nutná konzultace s ošetřujícím lékařem.*

Generikum	Obchodní název	Dávka	Četnost
dalteparin	Fragmin	200 anti-Xa j./kg	1x denně
enoxaparin	Clexane	100 anti-Xa j./kg	2x denně
nadroparin	Fraxiparine	90 anti-Xa j./kg	2x denně
tinzaparin	Innohep	175 anti-Xa j./kg	1x denně
reviparin	Clivarin	75 anti-Xa j./kg	2x denně
bemiparin	Zibor	175 anti-Xa j./kg	1x denně

### 4.3. Kumariny

Po porodu je pacientce často předepisován warfarin. Jedná se o kumarinový derivát přímo zasahující v cyklu vitamínu K. Působí jako kompetitivní inhibitor vitamin-K-2,3 epoxid reductázy.

Kumariny dělíme na krátkodobě a dlouhodobě působící. Dlouhodobě působící látky jsou výhodnější, kvůli menšímu kolísání účinků a méně komplikovanému způsobu dávkování. Kumariny jsou předepisovány po předchozí heparinizaci nebo souběžně s ní, kdy obě léčiva užíváme současně po dobu pěti dnů. Při jeho užívání může žena bez omezení kojit, jelikož látka přechází do mateřského mléka v minimálním množství. Účinnost terapie monitorujeme pomocí protrombinového času. Kromě nejznámějšího kumarinového přípravku – warfarinu (Warfarin) je na trhu k dispozici například: acenokumarol (Sintrom), fluindion (Previscan) nebo fenprokumon (Marcoumar). (66, 3)

#### 4.4.Porod

U rodiček s trombofilním stavem, u kterých byla v rámci diagnostiky předepsána antitrombotická terapie, je nutná zvýšená kontrola a péče během těhotenství, porodu, i šestinedělí. Nad sestavováním porodního plánu by se měl podílet a spolupracovat tým tvořený odborníky z oblasti porodnictví, anesteziologie a hematologie. Těhotná žena je vystavena situaci, kdy její život může ohrozit závažné krvácení během porodu, v případě, že užívá antikoagulační léčbu, zároveň je zde riziko vzniku tromboembolických komplikací, pokud je léčba vysazena. Ve většině případů dochází k umělému vyvolání vaginálního porodu (indukci) nebo plánovanému císařskému řezu. Postup, který je zvolen se liší v závislosti na jednotlivých pracovištích a individuálnímu přístupu k pacientce a její komplexní diagnóze.

Dle dostupných studií se u 3 % operovaných žen, které podstoupily císařský řez vyskytuje žilní trombóza. U vaginálního porodu je riziko výskytu nižší (0,08-1,2 %). Anesteziolog předem s rodičkou prodiskutuje porodní anestezii a analgezií, zároveň by ji měl poučit o možných komplikacích, jako je například vznik epidurálního hematomu po aplikaci epidurálního anestetika. Tato komplikace se vyskytuje v malém počtu případů (1 případ ze 150 000 aplikovaných anestezí), ovšem v případě, že ke vzniku hematomu dojde, jedná se o velice závažný problém, který má trvalé neurologické následky. Pokud dojde ke spontánnímu porodu, žena musí okamžitě přerušit antikoagulační léčbu. U plánovaných porodů je podávání terapeutických dávek LMWH přerušeno 24 hodin před porodem (před případným podáním epidurální anestezie). U profylaktických dávek LMWH stačí přerušit užívání 10-12 hodin před porodem. Užívání UHF intravenózně stačí přerušit 4-6 hodin před porodem, pokud jsou dávky podávány subkutánní cestou, je vhodné přerušit podávání 12 hodin před porodem (při plánování využití epidurální anestezie by měl být časový odstup dvakrát delší). Před samotným porodem a po vysazení antitrombotické terapie dochází ke kontrole hodnot aPTT, jehož hodnota musí být v normě. Pokud není jisté, kdy došlo k poslední dávce antikoagulancie, stanovuje se hladina heparinu, podle které je následně zvolen nebo upraven porodní plán. U porodu ženy trpící trombotickými stavy by měl být přítomen hematolog. 6-12 hodin po porodu jsou opět nasazeny profylaktické dávky LMWH. K obnovení terapeutických dávek dochází 24 hodin po porodu. Časové údaje se mohou lišit v důsledku průběhu porodu (vaginální porod/císařský řez, aplikace epidurální anestezie). (67,68)

#### 4.5. Péče během šestinedělí

Po porodu je žena podrobena častým lékařským kontrolám z důvodu mnohonásobně zvýšeného rizika TEN během šestinedělí. Po porodu dochází 2× až 5× častěji ke vzniku TEN než před porodem. Riziko vzniku ovlivňují zejména komplikace, které při porodu mohly nastat (např. poporodní krvácení, rozsáhlé poranění porodních cest, mrtvorozenost, imobilizace delší než 72 hodin, poporodní infekce), dále také věk rodičky, zvýšený index tělesné hmotnosti, kouření nebo hypertenze. Tromboembolická nemoc je nejčastější příčinou mateřské mortality. Vzhledem k manifestaci TEN nejčastěji jako hluboké žilní trombózy obvykle postihující levou dolní končetinu je doporučeno po celou dobu šestinedělí pokračovat s užíváním antikoagulační léčby (LMWH) nebo převedení pacientky na Warfarin. Obnovení dávek heparinů je možné zahájit tři hodiny po porodu.

Dalším preventivním opatřením, které může lékař doporučit je mechanická profylaxe – bandáž pomocí elastických kompresních punčoch. (69, 70, 71)

## 5. Závěr

Bakalářská práce se zaměřuje na problematiku trombofilních mutací a jejich vliv na průběh těhotenství. Práce je složena z teoretické části, která se zabývá fyziologií krevního srážení a následně i patologickými změnami, které u mutantních jedinců nastávají. Popisuje nejrozšířenější trombofilní mutace, které postihují řadu lidí napříč generacemi, rasami i kontinenty. Detailně se věnuje zejména diagnostice za pomoci genetických vyšetřovacích metod, které se dostávají do popředí. Dále je věnována pozornost terapii, která prokazatelně přispívá k bezpečnějšímu průběhu těhotenství i porodu. Závěrečná část se zabývá péčí během porodu a šestinedělí. Poukazuje na fakt, že porodem riziko vzniku trombózy nemizí, naopak se může vlivem zvolených postupů v průběhu porodu zvyšovat.

Cílem mé bakalářské práce bylo popsat problematiku trombofilie během gravidity. Zabývat se studii a výzkumy, které se zaměřují na míru zvýšení rizika pro těhotné ženy s diagnostikovanou trombofilní mutací. V průběhu rešerše na toto téma jsem dospěla k názoru, že řada žen není o trombofilii a rizicích, které s sebou přináší dostatečně informována. Dle mých osobních zkušeností mohou být důvodem rozporuplné názory lékařů na tuto problematiku. I přestože je plicní embolie jednou z nejčastějších příčin mateřské mortality během porodu, genetické vyšetření není stále běžně podstupováno. Míra rizika vzniku trombů je ovlivněna řadou faktorů, jedním z nejvýznamnějších je hormonální antikoncepce, kterou v současné době užívá téměř polovina žen, aniž by o tomto faktu věděla a podstoupila by před nasazením antikoncepce genetické vyšetření. V případě včasné diagnostiky žen trpících trombofilní mutací, by mohl být uplatňován specifický přístup, který během těhotenství, porodu a šestinedělí vyžadují nebo nasazena terapie, která i přes možné nežádoucí účinky, zahrnující i riziko krvácení během porodu, je prokazatelně účinná. Je užitečné o tomto riziku vědět, brát jej v potaz a podstoupit včas genetické vyšetření, ale porod s sebou přináší řadu dalších, často i závažnějších komplikací, a dle mého názoru není dobré se celé těhotenství stresovat případnými obtížemi, které mohou nastat. Samotné psychické rozpoložení a míra stresu má dle dostupných studií na průběh porodu značný vliv. V současné době se zájem žen o informace týkající se porodu rapidně zvyšuje. Zároveň se zájmem o informace se zvyšuje i množství výzkumů zabývajících se trombofilii. Věřím, že v budoucnu podstoupí mnohem více lidí genetické vyšetření a budou tak moci předcházet rizikům, které trombóza, nejen pro těhotné ženy, představuje. Rychlá a dostupná diagnostika může pomoci s profylaxí, dokonce ve spojení se správně zvolenou terapií zachránit život, v případě těhotné ženy i životy.

## 6. Použitá literatura a internetové zdroje

- (1) PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN 80-86682-03-X
- (2) ŠLECHTOVÁ, Jitka. Hemostáza - jak ji možná neznáme. *Klinická biochemie a metabolismus*[online]. 2007, 2007(2), 97-101 [cit. 2022-11-17]. Dostupné z: [http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/2-07/KBM0702\\_Slechtova\\_97.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/2-07/KBM0702_Slechtova_97.pdf)
- (3) PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0
- (4) HRACHOVINOVÁ, Ingrid. Diagnostika poruch hemostázy. *Vnitřní lékařství* [online]. 2018, 2018(64), 537 - 544 [cit. 2022-11-17]. Dostupné z: <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2018/05/11.pdf>
- (5) ROUŠAR, Tomáš. *Laboratorní cvičení z hematologie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012. ISBN 978-80-7395-462-8
- (6) LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0
- (7) KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2020. ISBN 978-80-247-1963-4
- (8) GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie: dvacáté vydání*. Praha: Galén, c2005. ISBN 80-7262-311-7
- (9) SILBERNAGL, Stefan a Agamemnon DESPOPOULOS. *Atlas fyziologie člověka: překlad 8. německého vydání*. 4. české vydání. Přeložili Kateřina JANDOVÁ, Miloš LANGMEIER, Otomar KITTNAR, Eduard KURIŠČÁK, Pavla MLČKOVÁ, Martina NEDBALOVÁ, Vladimír RILJAK, Michal WITTNER. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 978-80-247-4271-7
- (10) ROKYTA, Richard. *Fyziologie*. Třetí, přepracované vydání (první vydání v nakladatelství Galén). Praha: Galén, [2016]. ISBN 978-80-7492-238-1
- (11) BEZDÍČKOVÁ, Ludmila. Fyziologické změny krevního obrazu a hemokoagulace během těhotenství. *Moderní babictví* [online]. 2007, 2007(14), 1-4 [cit. 2022-11-17]. Dostupné z: <https://www.levret.cz/publikace/casopisy/mb/2007-14/?pdf=23>
- (12) SUDROVÁ, KVASNIČKA, LINHARTOVÁ a MAZUCH. Trombofilie v těhotenství – fyziologie a patofyziologie hemokoagulačních změn v normální graviditě a při některých patologických těhotenských stavech. *Časopis lékařů českých* [online]. 2007, 2007(11), 853-857 [cit. 2022-11-17]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2007-11/download?hl=cs>
- (13) FELLNEROVÁ, Ivana. Hemostáza a její poruchy. *PřF UPOL* [online]. 2013 [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://zoologie.upol.cz/old/osoby/fellnerova/patofyziologie\\_pdf/2\\_Hemostaza\\_a\\_Poruchy\\_IF\\_2014\\_03\\_17.pdf](https://zoologie.upol.cz/old/osoby/fellnerova/patofyziologie_pdf/2_Hemostaza_a_Poruchy_IF_2014_03_17.pdf)
- (14) INDRÁK, Karel, ed. *Hematologie a transfuzní lékařství*. V Praze: Triton, 2014. Lékařské repetitorium. ISBN 978-80-7387-722-4
- (15) MAČÁK, Jiří, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3530-6

- (16) VELECKÝ, Lukáš. Místní a celkové poruchy oběhu: Hemodynamické příčiny nemocí. *Masarykova univerzita* [online]. 2017 [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/jaro2018/VLPA0622c/um/Hemodynamicke\\_priciny\\_nemoci\\_mistni\\_a\\_celkove\\_poruchy\\_obehu.pdf](https://is.muni.cz/el/med/jaro2018/VLPA0622c/um/Hemodynamicke_priciny_nemoci_mistni_a_celkove_poruchy_obehu.pdf)
- (17) PROCHÁZKA, PROCHÁZKOVÁ, ĽUBUŠKÝ a SLAVÍK. Trombofilní stavy v porodnictví. *Praktická gynekologie* [online]. 2004, 12 - 16 [cit. 2022-11-17]. Dostupné z: <https://www.lubusky.com/clanky/11.pdf>
- (18) Interní medicína pro praxi - konference ambulantních internistů: Olomouc: Solen, [2006]. ISSN 1803-5868
- (19) Faktor II (Protrombin). *Fakultní nemocnice Královské Vinohrady* [online]. 2018 [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://www.fnkv.cz/lab/lp\\_uld/\\_LP\\_16188.htm](https://www.fnkv.cz/lab/lp_uld/_LP_16188.htm)
- (20) Mutace G20210A v genu pro protrombin. *Institut klinické a experimentální medicíny* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://www2.ikem.cz/plm\\_lp/\\_LP\\_15223-L0000006.htm](https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_15223-L0000006.htm)
- (21) SMEJKAL, Petr. Vrozené trombofilní stavy. *Masarykova univerzita* [online]. 2012 [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/jaro2012/BLKKH0411p/Bc-hyperkoagulace\\_2012.pdf](https://is.muni.cz/el/med/jaro2012/BLKKH0411p/Bc-hyperkoagulace_2012.pdf)
- (22) Nikolaeva MG, Momot AP, Zainulina MS, Yasafova NN, Taranenko IA. Pregnancy complications in G20210A mutation carriers associated with high prothrombin activity. *Thromb J.* 2021 Jun 5;19(1):41. PMID: 34090458; PMCID: PMC8180167. Dostupné z: doi: 10.1186/s12959-021-00289-4
- (23) Gao H, Tao FB. Prothrombin G20210A mutation is associated with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis update. *Thromb Res.* 2015 Feb;135(2):339-46. Epub 2014 Dec 5. PMID: 25528068. Dostupné z: doi: 10.1016/j.thromres.2014.12.001
- (24) VOICU, Diana, Octavian MUNTEANU, Florentina GHERGHICEANU, Luciana ARSENE, Roxana BOHILTEA, Delia GRADINARU a Monica CIRSTOIU. Maternal inherited thrombophilia and pregnancy outcomes. *Experimental and Therapeutic Medicine* [online]. 2020 [cit. 2022-11-17]. ISSN 1792-0981. Dostupné z: doi:10.3892/etm.2020.8747
- (25) LEE, David H., Penny A. HENDERSON a Morris A. BLAJCHMAN. Prevalence of factor V Leiden in a Canadian blood donor population. *Canadian Medical Association Journal* [online]. 1996(155, 3) [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://epe.lac-bac.gc.ca/100/201/300/cdn\\_medical\\_association/cmaj/vol-155/issue-3/0285.htm#fig2](https://epe.lac-bac.gc.ca/100/201/300/cdn_medical_association/cmaj/vol-155/issue-3/0285.htm#fig2)
- (26) KVASNIČKA, Jan. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-7169-993-4
- (27) Kujovich JL. Factor V Leiden Thrombophilia. 1999 May 14 [updated 2018 Jan 4]. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022. PMID: 20301542
- (28) Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med.* 2011 Jan;13(1):1-16. PMID: 21116184. Dostupné z: doi: 10.1097/GIM.0b013e3181faa0f2

- (29) DULÍČEK, Petr. Trombofilní stavy. *Vnitřní lékařství* [online]. Brno, 2005, **2005**, 819 - 825 [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: <https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2005/07/09.pdf>
- (30) MANNOVÁ, J., M. PENKA a P. ŠŤOURAČ. Trombofilní stavy v těhotenství. *Anesteziologie a intenzivní medicína* [online]. **2016**(6), 380-389 [cit. 2022-11-21]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/anesteziologie-intenzivni-medicina/2016-6/trombofilni-stavy-v-tehotenstvi-60209>
- (31) Gen MTHFR. *Analyza DNA* [online]. 2020 [cit. 2022-11-21]. Dostupné z: <https://www.analyza-dna.cz/cz/vse-o-dna/clanek/gen-mthfr>
- (32) Mutace genu MTHFR a těhotenství. *Analyza DNA* [online]. 2021 [cit. 2022-11-21]. Dostupné z: <https://www.analyza-dna.cz/cz/vse-o-dna/clanek/mutace-genu-mthfr-a-tehotenstvi>
- (33) MTHFR: methylenetetrahydrofolátreduktáza (C677T, A1298C). *Vaše laboratoře* [online]. [cit. 2022-11-21]. Dostupné z: <https://www.vaselaboratore.cz/seznam-vysetreni/molekularni-biologie/item/mthfr-methylenetetrahydrofolatreduktaza-c677t-a1298c>
- (34) Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation*. 2015 Jul 7;132(1):e6-9. PMID: 26149435. Dostupné z: doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013311
- (35) VAUGHAN, D. E. PAI-1 and atherothrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis* [online]. 2005, (3), 1879-1883 [cit. 2022-11-22]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01420.x>
- (36) Genetické testy indikované lékařem: Hematogenetika/kardiogenetika. *GHC GENETICS* [online]. [cit. 2022-11-22]. Dostupné z: <https://www.ghcgenetics.cz/klinicka-diagnostika/geneticke-testy-indikovane-lekarem/>
- (37) PAI-1: inhibitor plazminogenného aktivátoru (4G/5G). *Vaše laboratoře* [online]. [cit. 2022-11-22]. Dostupné z: <https://www.vaselaboratore.cz/seznam-vysetreni/molekularni-biologie/item/pai-1-inhibitor-plazminogennoveho-aktivatoru-4g-5g>
- (38) PGT těhotenský. *Genomac* [online]. [cit. 2022-11-22]. Dostupné z: <https://genomac.cz/pgt-tehotensky>
- (39) Agersnap I, Nissen PH, Hvas AM. The Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) in Placenta-Mediated Pregnancy Complications: A Systematic Review. *Semin Thromb Hemost*. 2022 Jul;48(5):607-624. Epub 2022 Jan 12. PMID: 35021249. Dostupné z: doi: 10.1055/s-0041-1742082
- (40) SAKHTEH, Maryam, Behzad POOPAK, Naser AMIRIZADEH, Ahmadreza SHAMSHIRI, Abdolhamid BAGHERI a Mohammad FARANOUSH. Polymorphism and synergism of angiotensin-converting enzyme ( ACE ) and plasminogen activator inhibitor-1 ( PAI-1 ) genes in coronary artery disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* [online]. 2015, **16**(4), 1168-1174 [cit. 2022-11-22]. ISSN 1470-3203. Dostupné z: doi:10.1177/1470320314561247
- (41) Abbate R, Sofi F, Gensini F, Fatini C, Sticchi E, Fedi S. Thrombophilias as risk factors for disorders of pregnancy and fetal damage. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002 Sep-Dec;32(5-6):318-21. Dostupné z: doi: 10.1159/000073589. PMID: 13679665.



- (42) Battinelli EM, Marshall A, Connors JM. The role of thrombophilia in pregnancy. *Thrombosis*. 2013;2013:516420. Epub 2013 Dec 18. PMID: 24455235; PMCID: PMC3880751. Dostupné z: doi: 10.1155/2013/516420.
- (43) JANKŮ, Petr. Hypertenze v těhotenství. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2007(2), 91-95 [cit. 2022-12-04]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/int/2007/02/09.pdf>
- (44) KARETOVÁ, Debora, Agáta JENÍŠOVÁ a Lenka SKALICKÁ. Venózní tromboembolismus v těhotenství. *Kapitoly z kardiologie* [online]. 2019, (11), 52-57 [cit. 2022-12-13]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/archiv/venozni-tromboembolismus-v-tehotenstvi/>
- (45) MUSIL, Dalibor. Diagnostika a léčba tromboembolické nemoci v ambulanci praktického lékaře. *Medicína pro praxi* [online]. 2011, (8), 238-241 [cit. 2022-12-13]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/05/09.pdf>
- (46) Referenční meze D-dimery (FEU). *Fakultní nemocnice Bulovka* [online]. 2021 [cit. 2022-12-13]. Dostupné z: <https://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/laboratore/laboratorni-prirucka/HVEZDAKAKP.htm>
- (47) Genetická vyšetření lidského genomu. *IFCOR klinické laboratoře* [online]. [cit. 2022-12-13]. Dostupné z: <https://www.ifcor.cz/files/LP/priloha-c.3-lp-v04-md.pdf>
- (48) Pravidla pro nasmlouvání a úhradu vyjmenovaných metod autorské odbornosti 816 – laboratoř lékařské genetiky. *Laboratoř lékařské genetiky- VZP ČR*. [cit. 2022-12-13].
- (49) Khan F, Vaillancourt C, Bourjeily G. Diagnosis and management of deep vein thrombosis in pregnancy. *BMJ*. 2017 May 31;357:j2344. PMID: 28566284. Dostupné z: doi: 10.1136/bmj.j2344.
- (50) Cooper PC, Rezende SM. An overview of methods for detection of factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutations. *Int J Lab Hematol*. 2007 Jun;29(3):153-62. PMID: 17474891. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1751-553X.2007.00892.x.
- (51) What Is Restriction Enzyme Digestion?. *GenScript* [online]. [cit. 2022-12-14]. Dostupné z: <https://www.genscript.com/what-is-restriction-digestion.html>
- (52) KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 978-80-7013-450-4.
- (53) ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- (54) POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). *National Human Genome Research Institute* [online]. 2022 [cit. 2022-12-14]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>
- (55) ARYAL, Sagar. *Real Time PCR- Principle, Process, Markers, Advantages, Uses* [online]. 2022 [cit. 2022-12-19]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/>
- (56) Celá pravda o Real-Time PCR – 1. část. *Baria* [online]. 2021 [cit. 2022-12-19]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/cela-pravda-o-real-time-pcr-1-cast/>
- (57) What is Real-Time PCR (qPCR)?. *BIORAD* [online]. [cit. 2022-12-19]. Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>

- (58) Amplifikační metody. *Multimediální učebnice DNA diagnostiky* [online]. [cit. 2022-12-19]. Dostupné z: <https://kolweb.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>
- (59) The Principle of Pyrosequencing™ Technology. *Pyrosequencing* [online]. 2002 [cit. 2022-12-19]. Dostupné z: <https://www.cragenomica.es/sites/default/files/pyrosequencingtechnology.pdf>
- (60) MATÝŠKOVÁ, M., J. ZAVŘELOVÁ a M. MÉHEŠOVÁ. ProC Global - laboratorní screeningový test pro trombofilii. *Praktický lékař* [online]. 2001, (12), 697-700 [cit. 2023-03-10]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/prakticky-lekar/2001-12/proc-global-laboratorni-screeningovy-test-pro-trombofilii-25024>
- (61) PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.
- (62) Nefrakcionovaný heparin (UFH). *IKEM* [online]. [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: [https://www2.ikem.cz/plm\\_lp/\\_LP\\_11644-L0000006.htm](https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_11644-L0000006.htm)
- (63) PROCHÁZKA, M., J. PROCHÁZKOVÁ a L. SLAVÍK. Antitrombotická terapie v graviditě. *Vnitřní lékařství* [online]. 2010, (56), 130-137 [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2010/02/09.pdf>
- (64) MALÝ, Jaroslav. Nízkomolekulární hepariny. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2004(9), 442-449 [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://www.internimediceina.cz/pdfs/int/2004/09/05.pdf>
- (65) BULTAS, Jan a Debora KARETOVÁ. Nízkomolekulární hepariny – jejich význam v současné praxi. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2011(13), 440-444 [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://www.internimediceina.cz/pdfs/int/2011/11/06.pdf>
- (66) MATÝŠKOVÁ, Miloslava. Warfarin, potrava a potravinové doplňky. *Medicína pro praxi* [online]. 2011(8), 194-197 [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/04/11.pdf>
- (67) MANNOVÁ, J., M. PENKA a P. ŠTOURAC. Trombofilní stavy v těhotenství. *Anestezie v gynekologii a porodnictví* [online]. 2016, (27), 380-389 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: <https://aimjournal.cz/pdfs/aim/2016/06/06.pdf>
- (68) KUDRNOVÁ, Zuzana. *Trombofilie v graviditě: Trombotické centrum a CHL VFN* [online]. 2008 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/28076471-Trombofilie-v-gravidite.html>
- (69) Trombózy v gynekologii a porodnictví [online]. 7. 12. 2015 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: [https://www.prolekare.cz/kreditovane-kurzy/trombozy-v-gynekologii-a-porodnictvi-61/trombozy\\_v\\_gynekologii\\_a\\_porodnictvi-58](https://www.prolekare.cz/kreditovane-kurzy/trombozy-v-gynekologii-a-porodnictvi-61/trombozy_v_gynekologii_a_porodnictvi-58)
- (70) PESCHOUT, Roman. Žilní onemocnění v těhotenství a šestinedělí. *Medicína pro praxi* [online]. 2018, (15), 139-144 [cit. 2023-03-29]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2018/03/05.pdf>
- (71) HIRMEROVÁ, J., D. KARETOVÁ, R. MALÝ, D. MUSIL a K. ROZTOČIL. *Akutní žilní trombóza 2014: Současný stav prevence, diagnostiky a léčby: Doporučený postup české angiologické společnosti ČLS JEP* [online]. 2014 [cit. 2023-03-29]. Dostupné z: [https://csth.cz/soubory/Zilni\\_tromboza\\_doporuceni.pdf](https://csth.cz/soubory/Zilni_tromboza_doporuceni.pdf)
- (72) *Protein C* [online]. [cit. 2023-04-12]. Dostupné z: <https://www.dastacr.cz/DS3/hypertext/FIAES.htm>

(73) *Protein S: Fakultní nemocnice Bulovka* [online]. 2021 [cit. 2023-04-12]. Dostupné z: <https://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/laboratore/laboratorni-prirucka/HVEZDAJAGL.htm>