

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Antifosfolipidový syndrom a vliv přímých inhibitorů na stanovení lupus  
antikoagulant a možnosti jejich neutralizace

Diplomová práce

2024

Bc. Nikola Hemplová

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Antiphospholipid syndrome and the effect of direct inhibitors on the  
determination of lupus anticoagulants and its potential for neutralisation

Diploma thesis

2024

Bc. Nikola Hemplová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Nikola Hemplová**  
Osobní číslo: **C22480**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Antifosfolipidový syndrom a vliv přímých inhibitorů na stanovení lupus antikoagulans a možnosti jejich neutralizace**  
Téma práce anglicky: **Antiphospholipid Syndrome and the Influence of Direct Inhibitors on the Determination of Lupus Anticoagulant and the Possibility of their Neutralization**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

1. Vypracovat literární rešerši zaměřenou na antifosfolipidové protilátky, zejména lupus antikoagulans, a na antifosfolipidový syndrom.
2. Popsat klinické projevy pacientů, kterým byla diagnostikována přítomnost lupus antikoagulans.
3. V práci také uvést možnosti terapie a laboratorní diagnostiku, včetně porovnání s doporučením diagnostiky lupus antikoagulans od České hematologické společnosti.

### Experimentální část:

1. Porovnat jednotlivé vzorky před a po adsorpci DOAC-stop tabletami. Zhodnotit, zda došlo k co nejvíce možnému vyvážení přímých inhibitorů ze vzorku.
2. Porovnat hodnoty Normalizovaného poměru lupus antikoagulans před a po adsorpci.
3. Určit pozitivitu, negativitu nebo falešnou pozitivitu na přítomnost protilátek lupus antikoagulans.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **MUDr. Eva Fenclová**  
Klinická laboratoř, Oblastní nemocnice Kladno a.s.  
Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 29. února 2024

## Čestné prohlášení

Prohlašuji:

Tuto práci s názvem Antifosfolipidový syndrom a vliv přímých inhibitorů na stanovení lupus antikoagulans a možnosti jejich neutralizace 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

Bc. Nikola Hemplová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych chtěla poděkovat mojí vedoucí práce, paní Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za pomoc, odborné konzultace, čas a laskavý přístup při psaní práce. Velké poděkování patří také paní MUDr. Evě Fenclové, která mi věnovala svůj volný čas při praktickém výzkumu, k odborným konzultacím a trpělivému přístupu. Poděkování patří i Oblastní Nemocnici Kladno, a.s., kde mi byl umožněn výzkum k diplomové práci.

V poslední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří byli nedocenitelnou podporou v průběhu celého mého studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce shrnuje v teoretické části informace o antifosfolipidovém syndromu, včetně antifosfolipidových protilátek a jejich možnému patologickému účinku v organismu. Kromě laboratorní diagnostiky zahrnuje teoretická část ještě informace o perorálních antikoagulanciích, jelikož jejich léčba může komplikovat diagnostiku antifosfolipidových protilátek. Ve výsledkové části jsou tabulky, které jsou přiřazené jednotlivým pacientům. Každá tabulka znázorňuje výsledky jednotlivých testů a hladiny přímých inhibitorů před a po adsorpci pomocí DOAC-Stop tabletek.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Antifosfolipidový syndrom, antifosfolipidové protilátky, projevy, diagnostika, perorální antikoagulancia

## **TITLE**

Antiphospholipid syndrome and the effect of direct inhibitors on the determination of lupus anticoagulants and its potential for neutralisation

## **ANNOTATION**

In the theoretical part this thesis summarizes information about antiphospholipid syndrome, including antiphospholipid antibodies and their possible pathological effect in the organism. In addition to the laboratory diagnosis, the theoretical part includes information about oral anticoagulants, as their treatment may complicate the diagnosis of antiphospholipid antibodies. In the results section there are tables that are assigned to individual patients. Each table shows individual test results and direct inhibitor levels before and after adsorption with the DOAC-Stop tablets.

## **KEYWORDS**

Antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, manifestations, diagnostics, oral anticoagulants

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Ovlivnění hemostatického systému vlivem aPL .....	21
Obr. 2: Ovlivnění koagulační kaskády a fibrinolýzy vlivem aPL .....	22
Obr. 3: Livedo reticularis u těhotné pacientky s APS.....	30
Obr. 4: Livedo vaskulopaty před léčbou.....	31
Obr. 5: Livedo vaskulopaty po léčbě rivaroxabanem .....	31
Obr. 6: Chemická struktura dabigatranu etexilátu .....	41
Obr. 7: Chemická struktura rivaroxabanu.....	43
Obr. 8: Chemická struktura betrixabanu .....	44
Obr. 9: Chemická struktura apixabanu .....	45
Obr. 10: Chemická struktura edoxabanu .....	46
Obr. 11: Sysmex CS 2500 (pohled zepředu) .....	49
Obr. 12: Sysmex CS 2500 (pohled ze strany).....	50
Obr. 13: Sysmex CS 2500 (pohled dovnitř) .....	50



## SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Pacient č. 20-4045 .....	62
Tab. 2: Pacient č. 10-4094 .....	63
Tab. 3: Pacient č. 9-4128 .....	63
Tab. 4: Pacient č. 6-4139 .....	64
Tab. 5: Pacient č. 9-4176 .....	65
Tab. 6: Pacient č. 9-4195 .....	66
Tab. 7: Pacient č. 21-4107 .....	67
Tab. 8: Pacient č. 25-4158 .....	67
Tab. 9: Pacient č. 23-4090 .....	68
Tab. 10: Pacient č. 23-4069 .....	69
Tab. 11: Pacient č. 24-4082 .....	70
Tab. 12: Pacient č. 5-358 .....	70
Tab. 13: Pacient č. 11-4048 .....	71
Tab. 14: Pacient č. 14-4036 .....	72
Tab. 15: Pacient č. 10-408 .....	72
Tab. 16: Pacient č. 4-4073 .....	73
Tab. 17: Pacient č. 3-4027 .....	74
Tab. 18: Pacient č. 2-0050 .....	74
Tab. 19: Pacient č. 4-4114 .....	75
Tab. 20: Pacient č. 12-4065 .....	76
Tab. 21: Pacient č. 28-4094 .....	77
Tab. 22: Pacient č. 26-0083 .....	78
Tab. 23: Pacient č. 5-4001 .....	78
Tab. 24: Pacient č. 4-415 .....	79
Tab. 25: Pacient č. 2-212 .....	80
Tab. 26: Pacient č. 2-492 .....	81
Tab. 27: Pacient č. 4-365 .....	82
Tab. 28: Pacient č. 22-4081 .....	83
Tab. 29: Pacient č. 18-4089 .....	84
Tab. 30: Pacient č. 17-392 .....	85
Tab. 31: Pacient č. 23-4092 .....	86
Tab. 32: Pacient č. 13-0050 .....	87

Tab. 33: Pacient č. 27-5014 .....	88
Tab. 34: Pacient č. 5-4104 .....	89
Tab. 35: Pacient č. 28-4051 .....	90
Tab. 36: Pacient č. 3-0061 .....	91
Tab. 37: Pacient č. 3-0060 .....	92
Tab. 38: Pacient č. 2-0051 .....	93
Tab. 39: Pacient č. 25-4065 .....	94
Tab. 40: Pacient č. 16-4210 .....	95
Tab. 41: Pacient č. 19-4090 .....	96
Tab. 42: Pacient č. 19-4111 .....	97
Tab. 43: Pacient č. 25-55 .....	98
Tab. 44: Pacient č. 25-4015 .....	98
Tab. 45: Pacient č. 25-301 .....	99

## **SEZNAM PŘÍLOH**

Graf č. 1: Účinnost DOAC-Stop tabletek u rivaroxabanu. ....	112
Graf č. 2: Účinnost DOAC-Stop tabletek u dabigatranu. ....	112
Graf č. 3: Účinnost DOAC-Stop tabletek u apixabanu. ....	113

## SEZNAM ZKRATEK

ACL	antikardiolipinové protilátky (AntiCardiolipin Antibodies)
AIHA	autoimunní hemolytická anémie (AutoImmune Haemolytic anaemia)
ApixHLRT	apixaban (přímý inhibitor)
APL	antifosfolipidové protilátky (AntiPhosphoLipid antibodies)
APS	antifosfolipidový syndrom (AntiPhospholipid Syndrome)
APS–ACTION	APS Alliance for Clinical Trials and International Networking
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas (Activated Partial Thromboplastin Time)
APTT-FS	aktivovaný parciální tromboplastinový čas necitlivý na lupus antikoagulans
APTT LA	aktivovaný parciální tromboplastinový čas citlivý na lupus antikoagulans
$\beta_2$ GPI	protilátky proti $\beta_2$ glykoproteinu-1
CAPS	katastrofický antifosfolipidový syndrom (Catastrophic AntiPhospholipid Syndrome)
$c_{max}$	maximální plazmatická koncentrace
CYP	cytochrom P450
ČHS	Česká hematologická společnost
DAH	difuzní alveolární krvácení (Diffuse Alveolar Haemorrhage)
DOAC	přímá orální antikoagulancia (Direct Oral AntiCoagulants)
dRVVT	ředěný čas Russellovy zmiže (diluted Russell Viper Venom Time)
DTI	přímé inhibitory trombinu (Direct Thrombin Inhibitors)
DTI Dabi	dabigatran (přímý inhibitor)
ELISA	enzymová imunosorbční analýza (Enzyme-Linked ImunoSorbent Assay)
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FIIa	aktivovaný faktor II
FXa	aktivovaný faktor X
INR	mezinárodní normalizovaný poměr (International Normalized Ratio)
ITP	idiopatická trombocytopenická purpura (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura)

LA	lupus antikoagulans (Lupus Anticoagulant)
LA konf	konfirmační test na lupus antikoagulans (jed Russelovy zmije s vysokou hladinou fosfolipidů)
LA NormR	poměr screeningového a konfirmačního testu na lupus antikoagulans
LA scr	screeningový test na lupus antikoagulans (jed Russelovy zmije s nízkou hladinou fosfolipidů)
LMWH	nízkomolekulární heparin (Low Molecular Weight Heparin)
NOAC	nová perorální antikoagulancia (New Oral Anticoagulants)
P-gp	P-glykoprotein
pNA	paranitroanilin
RivaHLRT	rivaroxaban (přímý inhibitor)
SLE	systemový lupus erythematoses
TLR2	toll-like receptor 2
TLR4	toll-like receptor 4
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
uPA	urokináza
VKA	antagonista vitamínu K (Vitamin K Antagonist)
VTE	žilní tromboembolismus (Venous Thromboembolism)

# OBSAH

1 ÚVOD .....	17
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	18
2.1 ANTIFOSFOLIPIDOVÉ PROTILÁTKY .....	18
2.2 ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM .....	19
2.2.1 PATOFYZIOLOGIE.....	20
2.2.2 KATASTROFICKÝ ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM .....	23
2.3 HISTORIE.....	24
2.4 KLINICKÉ PROJEVY.....	25
2.4.1 KRITERIÁLNÍ PROJEVY .....	26
2.4.2 NEKRITERIÁLNÍ NEUROLOGICKÉ PROJEVY.....	27
2.4.2.1 MIGRÉNA.....	27
2.4.2.2 CHOREA.....	27
2.4.2.3 EPILEPSIE .....	28
2.4.3 NEKRITERIÁLNÍ SRDEČNÍ PROJEVY .....	28
2.4.4 NEKRITERIÁLNÍ PLICNÍ PROJEVY .....	28
2.4.5 NEKRITERIÁLNÍ HEMATOLOGICKÉ PROJEVY .....	29
2.4.6 NEKRITERIÁLNÍ RENÁLNÍ PROJEVY.....	29
2.4.7 NEKRITERIÁLNÍ KOŽNÍ PROJEVY .....	30
2.4.8 SYSTÉMOVÝ LUPUS ERYTHEMATODES .....	31
2.5 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA .....	32
2.5.1 ELISA PRO ANTI-KARDIOLIPIN A ANTI- $\beta$ -2-GLYKOPROTEIN .	33
2.5.2 LABORATORNÍ TESTY PRO LUPUS ANTIKOAGULANS .....	33
2.5.2.1 AKTIVOVANÝ PARCIÁLNÍ TROMBOPLASTINOVÝ ČAS .....	34
2.5.2.2 ZŘEDĚNÝ ČAS JEDU RUSSELOVY ZMIJE .....	35
2.6 TERAPIE.....	35
2.7 ČESKÁ HEMATOLOGICKÁ SPOLEČNOST.....	36
2.7.1 DOPORUČENÍ PRO DIAGNOSTIKU LUPUS ANTIKOAGULANS ....	37
2.8 PŘÍMÁ PERORÁLNÍ ANTIKOAGULANCIA.....	38
2.8.1 DABIGATRAN.....	40
2.9 INHIBITORY FAKTORU Xa .....	42

2.9.1 RIVAROXABAN.....	42
2.9.2 BETRIXABAN.....	43
2.9.3 APIXABAN.....	44
2.9.4 EDOXABAN.....	45
3 CÍL PRÁCE.....	47
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	48
4.1 PŘÍSTROJE.....	48
4.1.1 SYSMEX CS 2500 .....	48
4.2 LABORATORNÍ POMŮCKY .....	51
4.3 REAGENCIE.....	51
4.3.1 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ RIVAROXABANU CONTROL, KONTROLY I, II, 1 A 2 .....	52
4.3.2 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ HEPARINU, REAGENTU 1 A 2.....	53
4.3.3 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ APIXABAN CALIBRATOR, KALIBRÁTORY I, II, III A KALIBRÁTORY 1, 2, 3.....	53
4.3.4 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ APIXABAN CONTROL, KONTROLY I, II A KONTROLY 1, 2 .....	54
4.3.5 PŘÍPRAVA HEMOCLOT™ THROMBIN INHIBITORS, NORMÁLNÍ POOLOVÁ PLAZMA A LIDSKÝ TROMBIN S VÁPNIKEM .....	54
4.3.6 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ DABIGATRAN CALIBRATOR, KALIBRÁTORY I, II, III A KALIBRÁTORY 1, 2, 3 .....	55
4.3.7 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ DABIGATRAN CONTROL, KONTROLY I, II A KONTROLY 1, 2 .....	55
4.3.8 PŘÍPRAVA REAGNCIÍ PRO LA – HEMOCLOT™ LA-S A HEMOCLOT™ LA-C .....	56
4.3.9 PŘÍPRAVA LA KONTOROLY – SLABÁ (C1) A SILNÁ (C2).....	57
4.3.10 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ NORMÁLNÍ KONTROLNÍ PLAZMY .....	57
4.3.11 PŘÍPRAVA CEPHEN™ LS – APTT CITLIVÉ NA LA.....	57
4.3.12 PŘÍPRAVA APTT-FS – NECITLIVÉ NA LA.....	58
4.4 POSTUP .....	58
4.5 PRINCIP METODY – DOAC-STOP TABLETY (HAEMATEX RESEARCH, SYDNEY, AUSTRÁLIE) .....	59
5 VÝSLEDKY .....	61

6 DISKUSE .....	100
7 ZÁVĚR.....	103
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	104
9 PŘÍLOHY.....	112



# 1 ÚVOD

Antifosfolipidový syndrom (APS) jako takový byl prvně popsán v roce 1983 panem Dr. Grahamem Hughesem. Je to autoimunitní onemocnění, které je spojené s perzistentními antifosfolipidovými protilátkami (aPL). Existuje velké množství aPL, jenž různými způsoby interagují s negativně nabitými fosfolipidovými povrchy buněk a tkání. Mezi aPL patří protilátky kritériální pro APS, což je lupus antikoagulans, antikardiolipin a protilátky proti  $\beta_2$ -glykoproteinu-1. Další APS protilátky jsou nekritériální protilátky, kam se řadí anti $\beta_2$ -glykoprotein-1 domény-I, anti-annexin V, anti-annexin II, anti-protrombin, antifosfatidylserin/protrobin, antikardiolipin/vimentin, antiprotein S/proteinC a mnohé další.

Pokud je pacient testován s podezřením na přítomnost aPL je podstatné znát jeho současnou léčbu, pokud tomu tak je. Jestliže pacient v přechozích letech užíval přímá perorální antikoagulancia, je to velmi důležité sdělení pro pracovníky laboratoře, jelikož takováto léčiva významně prodlužují hodnoty jednotlivých testů, což by mohlo vést k falešně pozitivním výsledkům. Aby se zabránilo vydávání nesprávných výsledků, začaly některé laboratoře využívat DOAC-Stop tabletky, jejichž funkcí je vyvázání perorálních antikoagulancií ze vzorků pacienta, a tím také snížení falešně pozitivních případů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 ANTIFOSFOLIPIDOVÉ PROTILÁTKY

Antifosfolipidové protilátky jsou heterogenní skupinou autoprotilátek nebo aloprotilátek s různým významem pro jeho nositele. Některé z nich byly prokázány i u zcela zdravých jedinců, a proto se spekuluje o jejich významu v přirozených pochodech organismu a mezi takové pochody může patřit odstraňování reziduí apoptického procesu (*Bulíková, 2016*). Antifosfolipidové protilátky se běžně vyskytují u pacientů s antifosfolipidovým syndromem a u systémového lupus erythematoses (SLE) (*Huh et al., 2011*). Pacienti s aPL mají zvýšené riziko ischemické ataky, plicní embolie, hluboké žilní trombózy a jsou také spojeny s potraty, předčasným porodem nebo narozením mrtvého plodu (*Tong et al., 2015*).

Mezi aPL patří tyto tři nejvýznamnější protilátky: lupus antikoagulans (LA) a IgG a/nebo IgM antikardiolipinové protilátky (aCL) a protilátky proti  $\beta_2$ -glykoproteinu-1 (anti $\beta_2$ -GPI) (*Oliveira et al., 2020*). Antifosfolipidové protilátky se vyznačují vysokou afinitou k aniontovým fosfolipidům jako je fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin nebo kyselina lysobisfosfatidová. Mají také silnou vazbu k proteinům, jako je protein C, protein S,  $\beta_2$ -GPI a protrombin. Antifosfolipidové protilátky se rovněž mohou vázat na komplexy fosfolipid-protein, jako protrombin/fosfatidylserin a vimentin/kardiolipin (*Misasi et al., 2020*).

Nejvíce prozkoumaným antigenem je  $\beta_2$ -GPI, který se vyskytuje ve vysokých koncentracích v plazmě, 50–400  $\mu\text{g/ml}$  (*Chighizola et al., 2014*).  $\beta_2$ -glykoprotein-I musí být imobilizován na negativně nabitým povrchu, jakým je například aniontový fosfolipid, fosfatidylserin, a následně se může vázat s aPL. Za fyziologického stavu se fosfatidylserin vyskytuje na vnitřní straně plazmatické membrány, tudíž  $\beta_2$ -GPI a aPL nemohou reagovat. Pokud ovšem dojde k poškození buňky nebo k její apoptóze, dochází k vyloučení fosfatidylserinu na vnější stranu plazmatické membrány, což umožní vazbu  $\beta_2$ -GPI na negativní povrch fosfolipidu. Následně se může na buňku vázat aPL, což vede k patologickým účinkům. Antifosfolipidové protilátky mohou také reagovat s různými typy buněk prostřednictvím buněčných povrchových receptorů, včetně toll-like receptoru 2 (TLR2), toll-like receptoru 4 (TLR4) a receptoru apolipoproteinu E2 (*Tong et al., 2015*).

## 2.2 ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM

Antifosfolipidový syndrom, také známý jako Hughesův syndrom, je systémové hematologické autoimunitní onemocnění, které je charakterizované hyperkoagulačním stavem (*Bertolaccini a Sanna, 2016*). Tento stav je spojen s vaskulární trombózou a/nebo porodnickou morbiditou, tedy potratem nebo smrtí plodu v přítomnosti trvale pozitivních aPL, jako je LA, aCL a anti $\beta_2$ -GPI. Přetrvávající pozitivita aPL je definována jako dvě nebo více po sobě jdoucích měření s odstupem alespoň 12 týdnů (*Ghembaza a Saadoun, 2020*). Antifosfolipidový syndrom je klasifikován jako primární, pokud se u pacienta nenalezl žádný klinický nebo laboratorní důkaz jiného onemocnění. Sekundární APS je, pokud se u pacienta vyskytuje jiný klinický stav, jako jsou infekce, autoimunitní onemocnění (SLE), léky a/nebo rakovina. Sekundární APS se může vyskytnout ve spojení s hemolytickou anémií, imunitní trombocytopenickou purpurou, revmatoidní artritidou, systémovou sklerózou a u mnoha dalších poruch funkce organismu (*Arreola-Diaz et al., 2022*).

Diagnóza APS je založena na výskytu klinických znaků APS v přítomnosti přetrvávající positivity aPL. Klasifikační kritéria byla původně navržena v roce 1998 v Sapporu, a proto byla označována jako „sapporská kritéria“. Tato kritéria byla následně revidována v roce 2006 a jsou nyní známá jako „sydneyská kritéria“. Původně byla tato kritéria navržena pro kategorizaci pacientů za účelem výzkumu, ale dnes se také využívají ke stanovení definitivní diagnózy. Pro stanovení diagnózy APS je velmi důležitá přítomnost jednoho klinického a jednoho laboratorního kritéria (*Dhir a Pinto, 2014*).

Mezi klinická kritéria patří cévní trombóza, kdy pacient prodělal jednu nebo více epizod arteriální, žilní trombózy nebo trombózy malých cév v jakémkoli orgánu nebo tkáni. Jedinou výjimkou je trombóza povrchových žil. Prodělání trombózy musí být potvrzeno snímkem nebo histopatologií. U histopatologického vyšetření by měla být trombóza bez výrazného zánětu cévní stěny. Druhým klinickým kritériem je výše zmíněná porodnická morbidita. Jedná se o nevysvětlitelné úmrtí plodu během 10. týdne těhotenství nebo po něm, i přes to že plod má normální morfologii, která je dokumentována ultrazvukem nebo invazivní metodou vyšetření plodu. Dále to může být jeden nebo více předčasných porodů u morfologicky zdravého novorozence ve 34. týdnu gestace nebo i dříve v důsledku závažné preeklampsie, eklampsie nebo placentární insuficience (*Ardila-Suarez et al., 2016*). Jelikož tyto klinické projevy převládají v běžné populaci, jsou laboratorní vyšetření zcela zásadní pro diagnostiku APS. Mezi laboratorní

kritéria patří přítomnost aPL ve dvou nebo více případech s odstupem nejméně 12 týdnů, a ne více než 5 let před klinickými projevy. První aPL je LA, který je detekován podle pokynů Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu. Druhými protilátkami jsou aCL, které jsou detekovány ve formě IgG nebo IgM v séru v titrech nad 99. percentil a jsou měřeny metodou enzymové imunisorbční analýzy (ELISA). Posledními aPL jsou anti $\beta_2$ -GPI protilátky, které jsou opět ve formě IgG nebo IgM v séru v titrech nad 99. percentil a jsou opět měřeny metodou ELISA (*Khamashta et al. 2016*).

Prevalence aPL v populaci se pohybuje mezi 1–5 %. Pouze u menšiny těchto jedinců se však vyvine v APS. Hrubé odhady uvádějí incidenci APS kolem 5 nových případů na 100 000 osob za rok a prevalenci kolem 40–50 případů na 100 000 osob (*Gómez-Puerta a Cervera, 2014*).

### 2.2.1 PATOFYZIOLOGIE

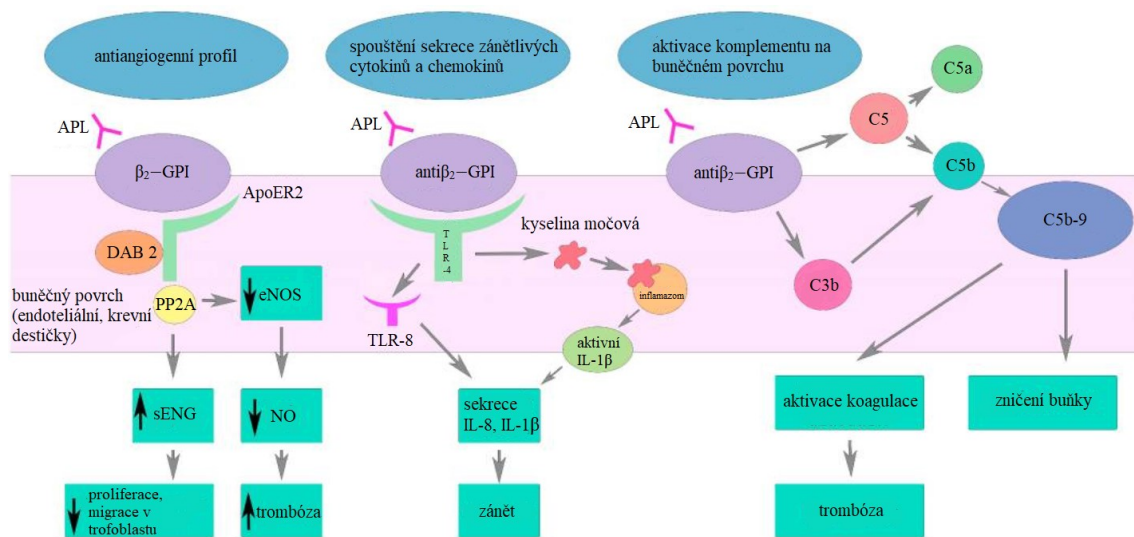
Antifosfolipidové protilátky ovlivňují velkou část hemostatického systému a nejdůležitější patogenetické principy lze rozdělit do čtyř skupin. První je buněčná aktivace, která může být endoteliální, imunitní nebo aktivace krevních destiček. Do druhé skupiny se řadí inhibice antikoagulačního potenciálu, do třetí inhibice fibrinolýzy a do poslední skupiny spadá aktivace komplementového systému (*Bitsadze et al., 2024*).

Antifosfolipidové protilátky vedou ke snížení aktivity endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS). Interakce s receptorem apolipoproteinu E2 vede aPL ke snížení produkce oxidu dusnatého. Nedostatek NO vede k poruše vazodilatace a podporuje adhezi trombocytů. Odolnost aPL ovlivňuje také inhibici endogenních antikoagulancií, jako je protein C, protein S, protrombin a annexin. K aktivaci proteinu C dochází vazbou trombomodulinu a trombinu na povrch endoteliálních buněk a krevních destiček. Antifosfolipidové protilátky dokáží inhibovat protein C tím, že snižují aktivitu sestavování komplexu trombomodulin/trombin, inhibují sestavování protein C komplexu, přímo potlačují činnost proteinu C anebo snižují clearance proteinu C (*Sacharidou et al., 2018*).

Annexin V má vysokou afinitu k fosfolipidům a je přirozeným antikoagulantem a markerem apoptózy. Fosfolipidové membrány buněk jsou vázány na annexin V, a ten zabraňuje tvorbě autoprotilátek a nadměrné prokoagulační reakci. Antifosfolipidové

protilátky mohou tuto annexinovou zábranu zničit v momentě, kdy soutěží o vazbu na fosfolipidy, a to vyvolá autoimunitní reakci (Aljotas-Reig et al., 2022).

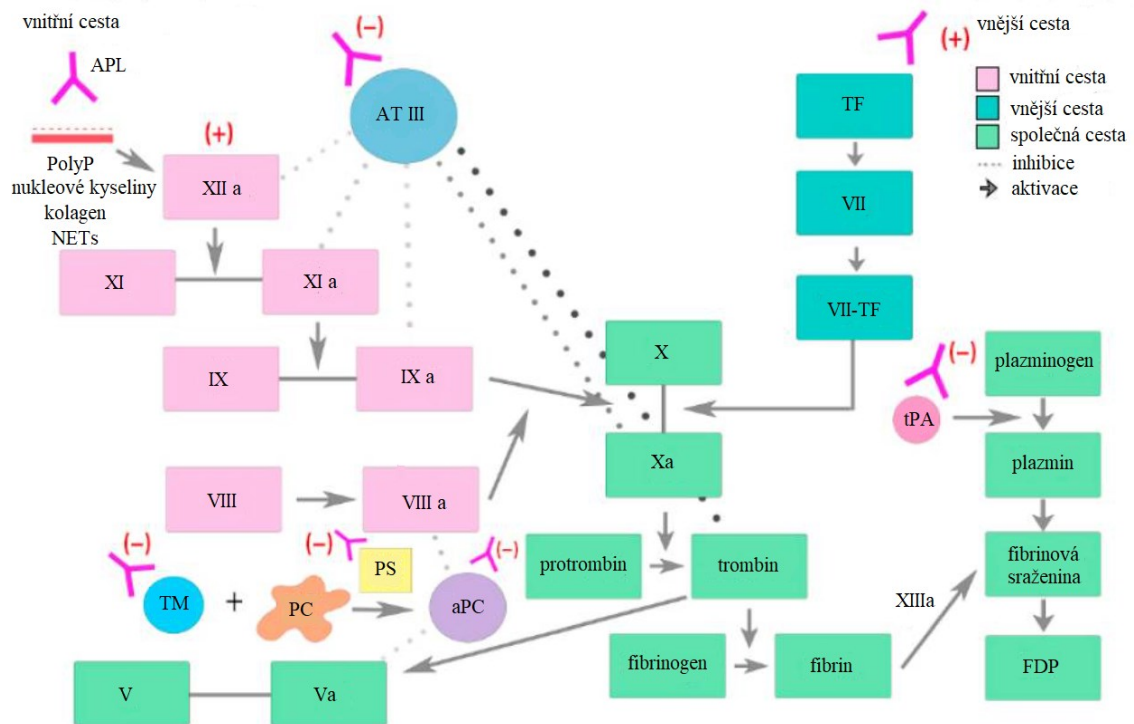
Do systému patogeneze je také zapojen systém komplementu. U pacientů s akutním onemocněním jsou hladiny komplementu C3 a C4 sníženy, ale C5b–9 je zvýšen. K aktivaci komplementu dochází hlavně klasickou cestou. V důsledku působení C3 konvertázy se složka C3 rozštěpí na C3a a C3b. Na povrchu trombocytů se C3a váže na svůj receptor, a tím dochází k aktivaci, adhezi a agregaci krevních destiček. C3b podporuje fagocytózu a podílí se na sestavování C5 konvertázy, která štěpí C5 na C5a a C5b. C5a stimuluje expresi tkáňového faktoru a plazminogenu–1 (Chatuverdi et al., 2021). C5b se podílí na sestavování komplexu C5b–9 a jeho ukládání na buněčný povrch, což vede k poškození buňky nebo ke zvýšené aktivitě koagulační kaskády, což vede k aktivaci endotelu a zvýšenému uvolňování tkáňového faktoru (Ambati et al., 2023). Na obr. 1 je znázorněno ovlivnění hemostatického systému působením aPL. Obrázek shrnuje, jak aPL mohou ovlivňovat hemostatický systém na buněčném povrchu – endoteliálním, trombocytárním a dalších. První část ukazuje antiangiogenní profil – snížení produkce NO, druhá část ukazuje spouštění sekrece zánětlivých cytokinů a chemokinů a poslední část, jak aPL ovlivňují dráhu komplementu.



Obr. 1: Ovlivnění hemostatického systému vlivem aPL

(ApoER2–receptor apolipoproteinu E2; DAB2–postižení; PP2A–proteinfosfatáza 2A; eNOS–syntáza oxidu dusnatého; sENG–rozpuštěný endoglin; TLR–4–toll–like receptor 4; TLR–8–toll–like receptor 8) (upraveno, převzato od Bitsadze et al., 2024).

Protilátky mohou také ovlivnit vnější a vnitřní cesty fibrinolýzy (obr. 2). Nadměrná aktivita koagulační kaskády je regulována komplexní souhrou aktivátorů a inhibitorů, kofaktorů a receptorů. Plazminogen je přeměněn na plazmin tkáňovým aktivátorem plazminogenu (tPA) a urokinázou (uPA). Inhibitor aktivátoru plazminogenu-1 inhibuje aktivitu tPA a uPA. Antifosfolipidové protilátky způsobují aktivaci endoteliálních buněk, což má za následek zvýšené uvolňování tPA a plazminogenu-1. Protilátky brání tPA ve vazbě na jeho endoteliální receptor interakcí s annexinem A2. Antifosfolipidové protilátky také zabraňují inaktivaci trombinu inhibicí antitrombinu III. Tím, že aPL zasahují do funkce fibrinolytických proteinů, dochází k hypofunkci fibrinolytického systému (Bitsadze et al., 2014).



Obr. 2: Ovlivnění koagulační kaskády a fibrinolýzy vlivem aPL (PC–protein C; PS–protein S; aPC–aktivovaný protein C; TF–tkáňová faktor; ATIII–antitrombin III; polyP–aniontové polyfosfáty; TM–trombomodulin (upraveno, převzato od Bitsadze et al., 2024).

## 2.2.2 KATASTROFICKÝ ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM

Katastrofický antifosfolipidový syndrom (CAPS) je vzácná varianta APS, jenž je charakterizován trombotickou mikroangiopatií v přítomnosti aPL a mnohačetným orgánovým selháním. Tento život ohrožující syndrom má úmrtnost 50 % a představuje méně než 1 % všech APS (*Adhikari et al, 2019*). Klasifikačními kritérii pro CAPS jsou:

1. poškození tří nebo více orgánů,
2. rychlý rozvoj klinických projevů (během 1 týdne),
3. okluze malých cév při histologickém vyšetření,
4. laboratorní potvrzení přítomnosti aPL (*Kazzaz et al. 2016*).

Přestože se syndrom vyvine u méně než 1 % pacientů s APS, je nutná včasná diagnostika a okamžité zahájení léčby (*Bitsadze et al., 2024*). Aby byl CAPS diagnostikován, musí být splněna všechna čtyři kritéria. Může být také stanovena diagnóza pravděpodobného CAPS, pokud:

- ◆ kritéria 2, 3 a 4 jsou přítomna, ale došlo pouze k poškození dvou orgánů, namísto tří a více,
- ◆ kritéria 1, 2 a 3 jsou přítomna, ale nedošlo k žádnému laboratornímu potvrzení přítomnosti aPL,
- ◆ jsou přítomna kritéria 1, 2 a 4,
- ◆ kritéria 1, 3 a 4 jsou sice přítomna, ale klinické projevy se rozvinuly během jednoho měsíce, i když je pacient na antikoagulační léčbě (*Kazzaz et al. 2016*).

Patofyziologie CAPS je nejasná, ale existuje hypotéza, že několik spouštěcích faktorů, jako je infekce, operace, trauma a malignita, mohou způsobit poškození endotelu, a to vede k nadprodukci cytokinů a trombotické bouři v mikrocirkulaci (*Wu et al., 2022*).

Vzhledem k vzácnosti tohoto syndromu byl v roce 2000 vytvořen evropským *fórem pro antifosfolipidové protilátky* mezinárodní registr pacientů s CAPS. Databáze se nazývá „CAPS Registry“ a v současné době dokumentuje klinická, laboratorní i terapeutická data pro více než 500 pacientů s CAPS. Právě díky tomuto registru mohly být vytvořeny popisy klinických a laboratorních charakteristik, ale také se vypracovaly klasifikační kritéria a možnosti terapie (*Cervera et al., 2018*).

## 2.3 HISTORIE

Ačkoli je APS obecně považován za relativně nové onemocnění, zmínky o APS sahají až do počátku 20. století s objevem Wassermannovy protilátky (Sammaritano, 2020). V roce 1905 August Paul von Wassermann uznal spirochetu *Treponema pallidum* za příčinu syfilis. K identifikaci protilátky, která se váže na povrch spirochet použil fixaci komplementu, což byl imunologický test, který byl dostupný v jeho letech. Vytvořil diagnostický test na syfilis, který přetrval dodnes. Ovšem brzy se ukázalo, že Wassermannova protilátka byla i u pacientů, jenž syfilis neměli, což vedlo k myšlence biologicky falešně pozitivního testu na syfilis. Ve 40. letech minulého století lékaři uznali, že tento falešně pozitivní test je znakem autoimunity, jelikož pacienti s falešnou pozitivitou na syfilis byli léčeni se SLE nebo souvisejícím autoimunitním onemocněním (*Arachchillage a Pericleous, 2023*).

V roce 1941 Mary Pangborn vyčistila antigen syfilis odpovědný za pozitivní Wassermannův test. Jelikož antigenem je fosfolipid, který byl extrahován z hovězího srdce, byl pojmenován kardiolipin. V 50. letech byla objevena souvislost mezi falešně pozitivním testem na syfilis a přenosným inhibitorem koagulace, který je dnes znám jako lupus antikoagulans. Původně byl LA považován za příčinu krvácení, ale v roce 1963 a 1967 byly publikovány práce, které prokázaly, že LA je jako protrombotický faktor (*Lockshin a Harris, 2017*). Jelikož byl test na LA nepraktický, protože byla potřeba čerstvá plazma a test na LA nebyl snadno standardizovaný, musel být nalezen jednodušší způsob identifikace. V roce 1983 byla použita k identifikaci aCL radioimunoanalýza, a po ní už byly k dispozici snadněji prováděné a standardizované testy ELISA, kterými se mohly detekovat aCL u pacientů se SLE (Sammaritano, 2020).

Návaznost mezi LA, SLE a trombózou byla známa již od 60. let 20. století, ovšem ztráta těhotenství byla v souvislosti s aPL publikována minimálně. S dostupností ELISA byl testován aCL, jelikož test byl rychlejší a spolehlivější než test na LA. Poněvadž se u mnoha pacientů se SLE potvrdila přítomnost aCL, vedlo to k poznání, že trombóza i ztráta těhotenství spolu souvisí a vykytují se u pacientů, kteří jsou nositeli aCL/LA. Tato forma SLE se dříve nazývala antikardiolipinovým syndromem nebo lupus antikoagulačním syndromem. Nejvíce preferovaným názvem byl ovšem antifosfolipidový syndrom. Použití ELISA testů na aCL vedlo k celosvětovému výzkumu a následně byly identifikovány další klinické příznaky APS (*Lockshin a Harris, 2017*).



Od té doby bylo během několika let popsáno mnoho pacientů, kteří neměli diagnostikovaný SLE, ale měli APS. V roce 1987 pan Harris popsal základní rysy APS a uvedl, že APS je nezávislá a odlišná od SLE. Tímto se také postupně APS rozdělil na primární, kde není přítomen SLE, a sekundární, kde je APS doprovázen SLE nebo jiným onemocněním. V roce 1987 byl také panem Ashersonem popsán život ohrožující APS, který se projevoval mnohočetnými trombózami a selháváním orgánů. Později byl použit termín katastrofický antifosfolipidový syndrom (*Jayakody Arachchillage a Greaves, 2014*).

V 90. letech 20. století bylo potvrzeno, že aPL se primárně vážou na cirkulující plazmatický protein,  $\beta_2$ -GPI, pokud je vázán na fosfolipid. Tedy další protilátka, anti $\beta_2$ -GPI, mohla být testována metodou ELISA pro detekci přítomnosti nových aPL. Primární aPL se tedy stává anti $\beta_2$ -GPI (*Sammaritano, 2020*).

Od roku 1984 se pravidelně každé 2–3 roky konají konference v Istanbulu (nyní přesunuty na severní Kypr) za účelem výzkumu aPL a APS. Evropské fórum vzniklo v roce 1996 a v roce 1998 byla v Sapporu navržena klinická a laboratorní kritéria pro diagnostiku APS. V roce 2004 proběhla revize kritérií v Sydney a v roce 2010 vznikla APS Alliance for Clinical Trials and International Networking (APS–ACTION), kterou tvoří skupina vědců, kteří se věnují klinickým studiím aPL a APS (*Lockshin a Harris, 2017*).

## 2.4 KLINICKÉ PROJEVY

Cévní trombóza a těhotenská morbidita jsou dva klinické znaky APS, ale klinické spektrum onemocnění zahrnuje i další, relativně běžné znaky, které nelze vysvětlit pouze protrombotickým stavem. Tyto projevy se nazývají nekriteriální, jelikož samy o sobě nemohou kvůli své nízké specifitě klasifikovat pacienta jako pacienta s APS. Z tohoto důvodu nebyly zahrnuty mezi současná klasifikační „sydneyská“ kritéria APS (*Negrini et al., 2017*).

Klinický nález APS může být charakterizován od postižení jedné cévy až po mnohočetné cévní okluze, což vede k široké škále klinických projevů. Spektrum nálezů sahá od přítomnosti trombocytopenie až po rozvoj hemolytické anémie a recidivující trombotické epizody, přičemž nejtěžší formou APS je katastrofický APS. U jednoho pacienta se může objevit jakákoli kombinace klinických projevů a časový interval mezi

nimi je variabilní. Může to být v rámci týdnů až po měsíce nebo i roky. Klinické příznaky tedy představují přímé nebo nepřímé důsledky hyperkoagulačního stavu, a s tím spojené trombózy (*Oliveira et al., 2020*).

#### 2.4.1 KRITERIÁLNÍ PROJEVY

Žilní tromboembolismus je nejčastějším projevem u pacientů s APS a na rozdíl od trombózy u vrozených trombofilií mohou být všechny části cévního řečiště, jak venózní, tak i arteriální, zapojeny do jakékoli kombinace okluzivních příhod. Žilní trombóza nejvíce zasahuje hluboké žíly dolních končetin, často doprovázené plicní embolií nebo chronickou tromboembolickou plicní hypertenzí. Ačkoli je arteriální trombóza méně častá, je mnohem závažnější a život ohrožující, jelikož se častěji vyskytuje v mozkové cirkulaci, jenž je příčinou cévní mozkové příhody (*Jayakody Arachchillage a Cohen, 2014*). U APS je velmi častá recidiva trombotických příhod, která se pohybuje mezi 19–29 % ročně. I přesto, že existují různé formy léčby, recidiva přetrvává i u pacientů léčených, zejména u těch, kteří mají přítomny trojitě pozitivní profil na aPL (*Nalli et al., 2014*).

Těhotenské morbidity jsou druhým hlavním rysem spojeným s APS. Nejčastější porodnickou komplikací je opakující se potrat, definovaný třemi nebo více po sobě jdoucími těhotenskými ztrátami. Ovšem souvislost mezi časným spontánním potratem a pozitivitou aPL je ztížena tím, že rané potraty jsou v běžné populaci časté a mohou mít mnoho příčin. Asi nejčastější příčinou jsou fetální chromozomální anomálie. Z tohoto důvodu se screening na aPL doporučuje pouze u žen se třemi nebo více časnými potraty. Dalším porodnickým nežádoucím jevem je omezení intrauterinního růstu po 10. týdnu gestace, kdy hmotnost plodu je pod 10. percentilem pro jeho gestační věk. Kromě toho může těhotenství u žen s APS komplikovat mateřská trombóza související s těhotenstvím nebo již výše zmíněné předčasné porody před 34. týdnem gestace (*Knight et al., 2023*).

## 2.4.2 NEKRITERIÁLNÍ NEUROLOGICKÉ PROJEVY

Část neurologických problémů byla spojena s přítomností aPL, včetně pohybových poruch, epilepsie, migrény, kognitivních vad, psychiatrických onemocnění, poruchy podobné roztroušené skleróze, sensorineurální nedoslýchavosti a Guillain–Barrého syndromu. U dětí jsou nejčastějšími neurologickými projevy bolesti hlavy, chorea a záchvaty. Mezi dospělými jedinci převládá migréna a epilepsie (*Negrini et al., 2017*).

### 2.4.2.1 MIGRÉNA

Migréna je nejčastěji uváděný typ bolesti hlavy u APS/aPL pozitivních pacientů. Je vyznačována těžkou, většinou jednostrannou nesnesitelnou bolestí spojenou s fotofobií, fonofobií, nauzeou a zvracením (*Miyamea a Kawabe, 2021*). Patofyziologie migrény není zcela objasněná, ale některé studie uvádějí, že dochází k dysfunkci krevních destiček během záchvatů migrény, a že vazba aPL na fosfolipidy destičkové membrány způsobuje aktivaci trombocytů (*Jayakody Arachchillage a Cohen, 2014*).

### 2.4.2.2 CHOREA

Chorea je definována jako hyperkinetická pohybová vada, která je charakterizována nadměrnými spontánními pohyby v důsledku poškození bazálních ganglií z odlišných příčin u dětí. Poruchy projevující se choreou zahrnují infekce, ischemii při kardiopulmonálním bypassu, mozkovou obrnu, toxické nebo akutní metabolické procesy, degenerativní stavy a vrozené poruchy metabolismu. Poprvé byla zmínka o souvislosti mezi choreou a aPL v roce 1983, kdy se vedla studie *European Phospholipid Project Group* a zkoumali 1000 pacientů. Chorea byla častěji pozorována u žen a dětí. I klinické studie potvrzují, že projevy chorey jsou spíše autoimunitního původu než vaskulárního. Při neurologickém postižení APS se aPL vážou na endotel cév v mozku, což vede k endoteliální dysfunkci, a to vede k mikrotrombóze a zánětu krevních cév. Je zde předpoklad, že tato vazba narušuje nebo částečně mění permeabilitu hematoencefalické bariéry, což brání cirkulující krvi neselektivně procházet do extracelulární tekutiny centrálního nervového systému, včetně aPL a aktivovaného trombinu. Následně aPL způsobují přímé poškození nervů vazbou na povrch neuronů (*Miyamea a Kawabe, 2021*).

### 2.4.2.3 EPILEPSIE

Epilepsie má u lidí s APS prevalenci mezi 6–9 %. Riziko záchvatů se liší mezi primárním a sekundárním APS, přičemž u sekundárního APS je prevalence epilepsie vyšší, skoro 14 %. Patogeneze záchvatů související s APS není známá, ale i tak existuje několik navrhovaných mechanismů včetně mikrotrombózou indukované ischemie, které vedou k vaskulární epilepsii a aPL zprostředkovaná inhibice receptorů kyseliny gama-aminomáselné. Jelikož je spojitost mezi aPL a epilepsií nejasná, ke studiím se využívají mladí pacienti s atypickými záchvaty nebo jedinci s mnohočetnými abnormalitami na magnetické rezonanci, pro které nebyla nalezena jiná pravděpodobná příčina (*Leal Rato et al., 2021*).

### 2.4.3 NEKRITERIÁLNÍ SRDEČNÍ PROJEVY

Chlopenní onemocnění, které se projevuje především ztluštěním chlopně, je nejčastějším srdečním projevem u APS. U jedné třetiny pacientů je detekován transtorakálním ultrazvukem, s vyšší mírou detekce při transezofageální echokardiografii. Kromě ztluštění chlopně je dalším projevem valvulopatie ztluštění aorty. Základní patogenetické mechanismy onemocnění chlopni nejsou u APS zcela známy. S největší pravděpodobností dochází k tomu, že aPL podporují intravalvulární kapilární endoteliální poškození, trombózu a vaskulární proliferaci, které vedou k chlopenním deformacím. Způsob léčby není momentálně jistý, jelikož perorální antikoagulace ani antiagregační léčba nezastaví rozvoj nebo progresi chlopenních lézí. U 4–6 % pacientů s APS je nutná operace chlopně. Ovšem náhradní chlopeň může pro pacienta představovat komplikace, jako jsou tromboembolické příhody nebo krvácení (*Xourgia a Tektonidou, 2020*).

### 2.4.4 NEKRITERIÁLNÍ PLICNÍ PROJEVY

Difuzní alveolární krvácení (DAH) je vzácná komplikace APS, jenž je charakterizována třemi hlavními histopatologickými vzorci: plicní kapilaritidou vyvolanou aktivací endoteliálních buněk zprostředkovanou aPL, intraalveolární a intersticiální krvácení a jako poslední, difuzní alveolární poškození (*Stoots et al., 2019*). Klinický obraz je většinou složen z hemoptýzy, dušnosti, kašle, pleurické bolesti na hrudi

a respiračního selhání. Jelikož přibližně jedna třetina pacientů s DAH umírá na respirační selhání je velmi důležité včasné zahájení léčby. Léčba spočívá ve vysokých dávkách kortikosteroidů. V případě výskytu DAH u CAPS je jako první volba léčby kombinace kortikosteroidů a plazmaferézy (*Xourgia a Tektonidou, 2020*).

#### **2.4.5 NEKRITERIÁLNÍ HEMATOLOGICKÉ PROJEVY**

Antifosfolipidové protilátky se často nacházejí u pacientů s diagnostikovanou idiopatickou trombocytopenickou purpurou (ITP), která může být prvním projevem u více než 20 % pacientů s APS. Mechanismus patogeneze, který indukuje trombocytopenii není zcela objasněn, ale vzhledem k tomu, že se trombocytopenie vyskytuje u 30–40 % pacientů s APS, tak se u pacientů s ITP doporučuje screening aPL. Trombocytopenie je většinou bez klinické manifestace a málokdy vyžaduje léčbu. Dalším hematologickým projevem může být autoimunitní hemolytická anémie (AIHA), jejíž incidence je nižší než u trombocytopenie. Prevalence u AIHA je zhruba mezi 6–10 %. Patogeneze je u AIHA opět nejasná, ale nejspíše se aPL podílejí přímo na destrukci erytrocytů. Mezi další hematologické komplikace se řadí nekróza kostní dřeně a trombotická mikroangiopatie (*Negrini et al., 2017*).

#### **2.4.6 NEKRITERIÁLNÍ RENÁLNÍ PROJEVY**

Ledviny jsou významnými cíli poškození u APS. Klinické renální projevy jsou definovány podle místa a velikosti postižení cév (*Miyamea a Kawabe, 2021*). Všechny cévy, žíly a tepny (od renálních tepen až po glomerulární kapiláry) mohou být zapojeny do renálních syndromů APS. Renální léze u APS, která souvisí s trombózou zahrnuje okluzi renální arterie nebo infarkt s výslednou hypertenzí a embolií renálních žil. Kromě toho, nekriteriální postižení ledvin zahrnuje intrarenální vaskulopatii, APS nefropatii a glomerulární onemocnění (*Pons-Estel a Cervera, 2014*). APS nefropatie může být akutní nebo chronická. Navíc u pacientů s APS a SLE může renální onemocnění koexistovat s lupusovou nefritidou, která je zprostředkovaná imunitním komplexem. U těchto pacientů je doporučeno provést biopsii za účelem rozlišení zánětlivých a trombotických lézí, protože tyto dva stavy vyžadují odlišnou léčbu (*Negrini et al., 2017*).

## 2.4.7 NEKRITERIÁLNÍ KOŽNÍ PROJEVY

Livedo reticularis (*obr. 3*) je nejčastější dermatologickou manifestací u APS přítomnou přibližně u jedné čtvrtiny pacientů. Livedo reticularis se projevuje symetrickým a jednotným síťovým vzorem. Dalším podobným vzorem je charakteristický „zlomený“ vzhled, pojmenovaný livedo racemosa, jenž byl také popsán ve spojení s aPL (*Xourgia a Tektonidou, 2020*).

Livedo vaskulopatie (*obr. 4 a 5*) je forma bolestivých žilních kožních lézí s porcelánově bílými atrofickými jizvami. Jeho histologické vyšetření odhaluje ukládání fibrinu s nebo bez koexistujících trombů. Pro livedo vaskulopatie bylo popsáno několik léčebných postupů s variabilní mírou úspěšnosti (*Xourgia a Tektonidou, 2020*).



*Obr. 3: Livedo reticularis u těhotné pacientky s APS  
(Radu et al., 2019)*



*Obr. 4: Livedo vaskulopatie před léčbou  
(Evans et al., 2015)*



*Obr. 5: Livedo vaskulopatie po léčbě rivaroxabanem  
(Evans et al., 2015)*

#### **2.4.8 SYSTÉMOVÝ LUPUS ERYTHEMATODES**

Systemový lupus erythematoses je možné definovat jako chronické multisystémové onemocnění se širokým spektrem systémových projevů postihujících skoro všechny orgány a tkáně s různými účinky. Projevy mohou být od drobného kožního postižení až po velká orgánová poškození (*Dar et al., 2023*).

Diagnóza SLE je stanovena na základě kombinace typických klinických projevů a pozitivní sérologie. Vzhledem k široké heterogenitě klinických projevů bylo v průběhu času zavedeno několik klasifikačních kritérií, přičemž ty nejpoužívanější jsou z roku 1982, revidovaná 1997, kritéria ACR (American College of Rheumatology). Mezi tato

kritéria patří i kožní lupus (*Fava a Petri, 2019*). Kožní postižení u SLE se vyskytuje zhruba u 90 % pacientů a mají specifické projevy, jako je akutní kožní lupus, subakutní kožní lupus a chronický kožní lupus. Mezi nespecifické kožní projevy spadá alopecie, vaskulitida, livedo reticularis a mnoho dalších projevů (*Jin et al., 2023*). Alopecie je běžná u SLE, ale může mít více příčin. Pravá lupusová alopecie neboli „lupusové vlásky“ je reverzibilní a vyznačuje se zkrácením frontálního ochlupení, které je nepravidelné a s lámanými chloupky. Dalším kritériem je postižení ledvin, které je přítomno asi u 50 % pacientů se SLE. V tomto případě je velmi důležitá včasná detekce, jelikož lupusová nefritida je hlavní příčinou morbidit a mortality u SLE. Posledními kritérii jsou onemocnění centrálního nervového systému a poruchy pohybového aparátu. Mezi ty specifičtější projevy poruchy centrální nervové soustavy patří: záchvaty, psychóza, myelitida, periferní nebo kraniální neuropatie a akutní stav zmatenosti (*Fava a Petri, 2019*).

Patogeneze SLE je velmi komplexní a není zcela známa. Při vzniku a rozvoji SLE je velmi zásadní porucha autotolerance. Vrozené a adaptivní imunitní reakce proti vlastnímu antigenu indukují produkci autoprotilátek a ukládání imunitních komplexů ve tkáních vede k aktivaci komplementu, akumulaci neutrofilů a monocytů a samovolně reagujících lymfocytů (*Pan et al., 2020*).

Účinnost tradičních metod léčby SLE je velmi malá. V současné době je u pacientů se SLE běžná rezistence na léčbu steroidy a imunosupresiva. Pacienti s nefritidou mají obecně závažnou toxicitu způsobenou léky, jenž přispívá k orgánové dysfunkci, i přes všechny dostupné terapie. Jako jediná schválená látka pro léčbu SLE je Belimumab, jelikož ostatní biologické látky nemají správný terapeutický účinek (*Joy et al., 2022*).

## 2.5 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Laboratorní testování aPL by se mělo provádět, pokud má pacient existující klinické projevy, které mohou být indikující pro APS. Pokyny pro celosvětové testování jsou od *Britské společnosti pro hematologii* a od *Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu*. V rámci České republiky jsou navržena doporučení pro postup testování aPL od *České hematologické společnosti* (ČHS). Kromě již výše zmíněných klinických projevů, by se mělo zvážit testování u pacientů mladších 50 let, kteří prodělali ischemickou cévní mozkovou příhodu nebo jinou mozkovou příhodu (*Sayar et al., 2021*).



Současná klasifikační kritéria dělí laboratorní parametry na tři skupiny aPL, a to na LA, aCL a anti $\beta_2$ -GPI IgG a IgM. Optimalizace laboratorní diagnostiky umožňuje působení i pro non-kriteriální aPL. V poslední době nabývá na významu komplex antifosfatidylserin–protrombin, který se v rámci klinických studií prokázal u trombotických a těhotenských komplikací (*Devreese et al., 2021*). U pacientů s vysokým klinickým podezřením na APS, ale bez přítomnosti kritérií aPL, se navrhuje „séronegativní APS“. Tito pacienti mohou být pozitivní na nekriteriální aPL nebo být negativní na kritéria aPL z důvodu nedostatečné citlivosti testů (*Vandeveldel a Devreese, 2022*).

### **2.5.1 ELISA PRO ANTI-KARDIOLIPIN A ANTI- $\beta_2$ -GLYKOPROTEIN**

Detekce anti $\beta_2$ -GPI a aCL IgG a IgM se provádí metodou ELISA. Antigen (kardiolipin nebo  $\beta_2$ -GPI) je potažen na pevné fázi, čímž mohou být polystyrenové kalíšky, magnetické částice, mikrokuličky nebo membrány. Pokud jsou přítomny protilátky ze vzorku plazmy nebo séra pacienta, mohou se vázat na pevnou fázi. Reagencie obsahují protilátky proti lidskému IgG nebo IgM, a ty jsou navázány na konjugát, který se může vázat na Fc část protilátek od pacienta na pevné fázi. V dalším kroku při přeměně substrátu přes konjugát dojde k reakci, která může být barevná, chemiluminiscenční nebo fluorescenční (*Vandeveldel a Devreese, 2022*). Daná reakce je zaznamenávána detekčním systémem, který může být chemiluminiscenční, multiplexní nebo na principu průtokové cytometrie. Tyto systémy mají výhodu lepších pracovních podmínek ve srovnání s manuálně prováděnou ELISou (*Devreese et al., 2021*). Podle mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu je stanovený cut-off pro pozitivitu anti $\beta_2$ -GPI >40 IgG antifosfolipidových podjednotek/ml nebo IgM antifosfolipidových podjednotek/ml (*Bradacova et al., 2021*).

### **2.5.2 LABORATORNÍ TESTY PRO LUPUS ANTIKOAGULANS**

Lupus Antikoagulans je jedním ze tří laboratorních kritérií pro diagnostiku APS. Detekce LA je založena na fosfolipidově dependentních koagulačních testech, které komplikují metodologii a ztěžují její interpretaci, jelikož může docházet k interferenci s antikoagulační terapií nebo s některými proteiny akutní fáze (*Devreese et al., 2020*).

Testování na přítomnost LA se nedoporučuje během akutní fáze zánětu, jelikož v krvi jsou vysoké hladiny faktoru VIII nebo C-reaktivního proteinu. Faktor VIII může maskovat přítomnost LA a reaktivní protein může poskytovat falešně pozitivní nebo negativní výsledky, stejně jako perorální antikoagulancia (Devreese, 2014). Lupus antikoagulans je nejlépe prokázaným rizikovým faktorem pro klinické projevy související s APS. Z tohoto důvodu je přesné stanovení LA zásadní pro diagnostiku a následnou léčbu pacientů s APS. Výsledky z externího hodnocení kvality ovšem stále vykazují vysokou míru falešně pozitivních nebo negativních výsledků. Toto je z důvodu ne zcela jasného realizovaného postupu, preanalytických podmínek a interpretace. Proto zůstává analýza LA velmi komplikovaná (Devreese et al., 2020).

### **2.5.2.1 AKTIVOVANÝ PARCIÁLNÍ TROMBOPLASTINOVÝ ČAS**

Test aktivovaného parciálního tromboplastinového času (APTT) je založen na aktivaci vnitřní koagulační kaskády. Analogicky k testu zředěného času jedu Russelovy zmiže (dRVVT), i u APTT aPL inhibují kroky vnitřní koagulační dráhy, které jsou závislé na fosfolipidech. Je velmi důležitý výběr vhodných činidel pro testování přítomnosti LA, jelikož jich je k dispozici velké množství s různou citlivostí pro detekci LA, hlavně pro test APTT. Při výběru APTT činidla je důležitý výběr aktivčního činidla a koncentrace fosfolipidů (Devreese et al., 2020). Doporučuje se zvolit APTT test s oxidem křemičitým, jakožto aktivátorem. Při tomto testu dochází k aktivaci faktoru XII oxidem křemičitým, čímž se následně aktivují faktory XI, IX, X, protrombin a také dochází ke konverzi fibrinogenu na fibrin. Právě aktivace faktorů IX a X závisí na fosfolipidech. Pokud jsou v těle pacienta přítomné aPL, dochází ke kompetici mezi aPL a koagulačními faktory o fosfolipidy prostřednictvím vazby s kofaktory vázanými na fosfolipidy, jako je  $\beta_2$ -GPI nebo aCL, a to má za následek prodlouženou dobu srážení (Vandeveldel a Devreese, 2022).

### 2.5.2.2 ZŘEDĚNÝ ČAS JEDU RUSSELOVY ZMIJE

Test pomocí zředěného času jedu Russelovy zmi je více specifitější pro detekci LA. Na druhou stranu, test APTT je citlivější, jestliže se použije správné činidlo. Test dRVVT je založen na přímé aktivaci faktoru X enzymem přítomným v jedu Russelovy zmi je (*Tumian a Hunt, 2022*). Následně se aktivuje protrombin na trombin způsobem, který je závislý na fosfolipidech, vápníku a aktivovaném faktoru V. Trombin potom přemění fibrinogen na fibrin, a ten se detekuje buď mechanicky nebo opticky. Antifosfolipidové protilátky reagují v plazmě pacienta s fosfolipidovými složkami činidla prostřednictvím kofaktorů. DRVVT se prodlouží snížením aktivity komplexu protrombinového aktivátoru (*Vandavelde a Devreese, 2022*).

## 2.6 TERAPIE

U primárního nebo sekundárního APS by měla léčba pacientů s APS zahrnovat dvě opatření. Za prvé, přísnou kontrolu kardiovaskulárních rizikových faktorů, včetně vysokého krevního tlaku, tělesné hmotnosti a zákazu kouření. Za druhé, screening pacientů s vysoce rizikovým profilem aPL, jenž zahrnuje trojitou pozitivitu aPL, trvale vysoké titry aPL, trombotické nebo gestační APS v anamnéze, či přítomnost jiných autoimunitních onemocnění (SLE) (*Ghembaza a Saadoun, 2020*).

U pacientů s trombotickým APS, kteří jsou asymptomatictí, ale jejich vzorek plazmy je pozitivní na přítomnost aPL, se řeší primární profylaxe aspirinem. V případě aspirinu se ovšem snižuje pouze riziko u arteriální, nikoli u venózní příhody. Také se vede diskuze, zda účinky aspirinu jsou tak významné, jelikož může hrozit riziko krvácení, zvláště pokud je pacient starší >65 let, mužského pohlaví, má diabetes mellitus nebo zvýšený krevní tlak. U pacientů, kteří jsou diagnostikováni s pozitivitou na aPL se SLE, převažuje přínos primární profylaxe aspirinem nad rizikem krvácení. U pacientů s vysokým rizikovým faktorem se doporučuje denní dávka aspirinu 75–100 mg. U pacientů se SLE se také může využít tromboprofylaxe pomocí hydroxychlorochinu v denních dávkách 200–400 mg. Další možností, jak předejít trombotickým příhodám, je nasazení VKA, hlavně warfarinu. Warfarin by se měl podávat pacientům, kteří mají výsledky mezinárodního normalizovaného poměru (INR) 2–3 (*Khamashta et al., 2016*). Dochází ke snížení rizika recidivujícího žilního tromboembolismu o 80–90 %. Ovšem u pacientů, kteří prodělali cévní mozkovou příhodu, jsou výhodnější léčbou vyšší dávky

aspirinu než warfarin, jelikož by mohlo docházet k dalšímu krvácení (*Ghembaza a Saadoun, 2020*).

Přímá perorální antikoagulantia jsou mnohem atraktivnější variantou k VKA. Hlavními výhodami jsou fixní denní dávky, rychlejší a předvídatelnější antikoagulační účinek bez nutnosti laboratorního sledování koagulačních testů a snížení velkého a intrakraniálního krvácení. Čtyři DOAC, dabigatran, rivaroxaban, apixaban a edoxaban, jsou schváleny pro prevenci cévní mozkové příhody u pacientů s nevalvulární fibrilací síní a jako profylaxe hluboké žilní trombózy. I přes tyto výhody DOAC dochází stále u některých pacientů k tvorbě trombotických příhod. V porovnání s VKA není jisté, zda by to mohlo být způsobeno inhibicí vnější i vnitřní koagulační kaskády pomocí VKA, což vede k nižší tvorbě trombinu ve srovnání s DOAC. Nebo by mohlo docházet k nižšímu souladu s DOAC při absenci terapeutického monitorování, či požadavek na vyšší účinnou dávku DOAC k prevenci arteriální trombózy (*Ghembaza a Saadoun, 2020*).

Nízkomolekulární hepariny (LMWH) by mohly představovat vhodnou alternativu k VKA, jelikož mají dobrou biologickou dostupnost, předvídatelnou reakci na dávku, clearance nezávislou na dávce a inhibují hyperkoagulační stav APS. Velkou nevýhodou LMWH jsou ovšem těžké vedlejší účinky, jako je indukovaná trombocytopenie nebo osteoporóza (*Radin et al., 2020*).

U pacientek s čistě porodnickým APS a bez předchozí trombózy se doporučuje profylaktická dávka LMWH a aspirinu do 6 týdnů po porodu. Vedle rutinního monitorování plodu se během 3. trimestru těhotenství doporučují měsíční ultrazvuková vyšetření, aby se mohly hledat známky placentární insuficience. Tímto opatřením se zlepšila míra porodnosti u pacientek s APS ze 40 % na 85 % (*Rodziewicz a D'cruz, 2020*).

## 2.7 ČESKÁ HEMATOLOGICKÁ SPOLEČNOST

Česká hematologická společnost je definována jako laboratorní sekce, jenž sdružuje odborníky s rozsáhlými zkušenostmi v klinické a laboratorní hematologii věnující se zlepšování kvality a růstu hematologických laboratoří všech typů a velikostí. Ve spolupráci s výborem České lékařské společnosti České hematologické společnosti Jana Evangelisty Purkyně se podílejí na:

- doporučení pro tvorbu a aktualizaci standartních laboratorních postupů,

- vytvoření a aktualizaci minimálních požadavků na kvalifikaci laboratorního personálu, provozu a vybavení laboratoře,
- vytváření a aktualizaci interních a externích doporučení kontrol kvality pro práci v hematologické laboratoři,
- tvorbě spolupráce s plátcí zdravotní péče,
- vytváření a aktualizaci obsahu pregraduálního vzdělávání pro bakalářské a magisterské programy pro budoucí pracovníky hematologických laboratoří,
- postgraduálním vzdělání pro lékaře, VŠ nelékaře a zdravotní laboranty v oborech hematologie a transfúzního lékařství,
- spolupráci s národním akreditačním orgánem ČR a společnostmi zajišťujícími certifikaci a akreditaci hematologických laboratoří (*Laboratorní sekce ČHS ČLS JEP, 2019*).

## 2.7.1 DOPORUČENÍ PRO DIAGNOSTIKU LUPUS ANTIKOAGULANS

U preanalytického zpracování vzorku je k vyšetření LA nutné použít bezdestičkovou plazmu (počet trombocytů  $<10 \cdot 10^9$  /l), jež je připravena dvojitou centrifugací ihned po odběru. Nejprve centrifugovat při 2000 g po dobu alespoň 15 minut a následně plazmu stáhnout. Druhá centrifugace probíhá při  $\geq 2500$  g po dobu alespoň 15 minut a po odstředění se opět stáhne plazma. K odstranění trombocytů se nepoužívá ultracentrifugace ( $>5000$  g), ani přefiltrování přes destičkový filtr. Plazma bez krevních destiček může být využita čerstvá nebo rychle zmrazená při  $-20$  °C s upotřebením maximálně do 2 týdnů. Plazma může být uchovávána i dlouhodobě při  $-70$  °C. Bezdestičková plazma se před vyšetřením rozmrazuje při 37 °C.

Samotnému vyšetření LA musí vždy předcházet základní koagulační testy, jako je test na protrombinový čas, APTT citlivé na LA a trombinový test pro vyloučení jiných koagulopatií nebo antitrombické léčby. Diagnostika LA zahrnuje několik kroků:

- průkaz prodloužení testu závislého na fosfolipidech (screening),
- potvrzení přítomnosti inhibitoru (korekční testy),
- důkaz fosfolipidové závislosti inhibitoru (konfirmace),
- vyloučení jiné koagulopatie.

Při diagnostice LA je nutné použít alespoň 2 různé testy závislé na fosfolipidech s různými principy, aby se pokryly všechny části koagulační kaskády. Nejprve se dělají screeningové testy, a pokud je nejméně jeden test pozitivní, následuje korekce a konfirmace.

U screeningu LA musí být alespoň 2 testy s nízkým obsahem fosfolipidů. Zvýšený obsah fosfolipidů s sebou nese riziko falešně pozitivních testů. Doporučuje se kombinace testování pomocí dRVVT, APTT a/nebo další testy. Mezi ostatní testy patří test s aktivátorem silica (směs křemičitanů) a s nízkým obsahem fosfolipidů, které nejsou tkáňového původu. Tento test je také znám jako upravený APTT. Další možností je test s rekombinantním lidským tromboplastinem. A kromě Russelovy zmije se také může využívat i jiných hadích jedů, jako je taipan nebo textarin.

Korekční testy se provádí u těch testů, které byly ve screeningu prodloužené. Provádí se smícháním pacientovy plazmy a normální plazmy v poměru 1:1 bez jakékoli inkubace.

Konfirmace se provádí, pokud jsou prodloužené testy u screeningu, tedy hodnoty poměrů jsou nad hodnotami cut-off. Využívá se testů s nadměrným množstvím fosfolipidů. Reagencie použité na screeningové a konformační testy by měly být od jednoho výrobce a také by měly být validované pro použití k diagnostice LA. Pokud daná laboratoř využívá reagentů od jiných výrobců, musí mít vše náležitě otestované a validované.

Testování LA u pacientů, u kterých je podezření na APS nebo mají nevysvětlitelně prodloužené testy APTT by vyšetření mělo být provedeno mimo akutní zdravotní stavy a před nebo po přerušení antitrombotické léčby, aby nedocházelo ke zkreslování výsledků. Samotná interpretace výsledků testů provedených na LA musí být provedena odborným lékařem. Pokud se u pacienta potvrdí pozitivita LA, mělo by se toto vyšetření opakovat s odstupem nejméně 12 týdnů (*Zavřelová et al., 2019*).

## **2.8 PŘÍMÁ PERORÁLNÍ ANTIKOAGULANCIA**

Antagonisté vitamínu K (VKA) byly hlavním pilířem antikoagulační léčby téměř 60 let. Léčba VKA, jako je warfarin, vyžaduje úpravu dávky podle výsledků laboratorního sledování mezinárodního normalizovaného poměru (INR). Warfarin je mezi jednotlivci velmi variabilní v závislosti na předepsané dávce. Má velmi úzké terapeutické okno, jelikož hodnota INR by se měla pohybovat mezi 2–3 (*Carlin*

*et Eikelboom, 2021*). Monitorování hladin warfarinu je velmi důležité pro bezpečné a účinné užívání antikoagulační léčby, protože VKA patří mezi léčiva, která interagují s mnoha potravinami, léky a bylinnými doplňky. Například warfarin v kombinaci s nízkou dávkou aspirinu nebo s nesteroidními antirevmatiky se kumuluje, a tím se zvyšuje riziko krvácení. Z tohoto důvodu musí být pacient vždy řádně poučen, pokud z preventivních důvodů užívá VKA (*Di Minno et al. 2017*).

V roce 2008 byly na trh v USA a Evropě uvedeny nové řady léků, jakožto alternativa VKA k prevenci embolických komplikací u nevalvulární fibrilace síní (*Grzešk et al., 2021*). Léky měly také sloužit jako prevence cévní mozkové příhody, léčba žilního tromboembolismu a jako sekundární prevence pro arteriální ischemické příhody u pacientů s chronickým onemocněním koronárních nebo periferních tepen (*Cuker et al., 2019*). Jednalo se o novou generaci perorálních antikoagulancií, původně nazývaných jako nová perorální antikoagulancia (NOAC). V současné době jsou známá jako přímá perorální antikoagulancia (DOAC) (*Grzešk et al., 2021*). DOAC jsou rozdělena do 2 tříd, a to na perorální přímé inhibitory faktoru Xa, což jsou rivaroxaban, apixaban, edoxaban a betrixaban. Druhou třídou jsou přímé inhibitory trombinu, a tím je dabigatran, který byl schválen vůbec jako první DOAC, a to v roce 2010 americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). V pozdějších letech byly tímto úřadem schváleny i inhibitory pro faktor Xa (*Chen et al., 2020*).

Výhodou užívání DOAC je, že se neprovádí rutinní monitorování hladin léčiva jako je tomu u VKA, jelikož DOAC mají antikoagulační účinek předvídatelnější a stabilnější. Jsou méně ovlivňovány interakcemi s potravinami, bylinkami, předepsanými a volně dostupnými léky. Nedostatek rutinního sledování má ovšem za následek, že pacienti mají menší interakci s lékaři. To znamená, že u některých pacientů může docházet ke krvácivým problémům. Monitorování hladin DOAC by se mělo provádět z důvodu lékové interakce s cytochromem P450 a induktory P-glykoproteinu (P-gp). Také by se měla kontrolovat pravidelnost užívání fixní dávky léku, jelikož při požití vyšší dávky může nastat zvýšená krvácivost u pacienta. Ovšem podle doporučení European Heart Rhythm Association by se pacienti užívající DOAC měli sledovat každých 1–6 měsíců. Prozatím neexistuje žádné doporučení pro monitorování koagulačních výsledků u pacientů, kteří jsou léčeni DOAC (*Conway et al., 2017*).

DOAC jsou léky, které svými účinky ovlivňují koagulační kaskádu, konkrétně snižují tvorbu fibrinu. Z tohoto důvodu dochází k ovlivňování testů hemostázy na bázi tvorby sraženiny, včetně APTT a TT. Dabigatran, jakožto přímý inhibitor trombinu

nejvíce ovlivňuje TT a APTT, oproti PT, na který má menší vliv. Naproti tomu, inhibitory působící proti faktoru Xa ovlivňují mnohem výrazněji výsledky PT, ale mají jenom malý vliv na výsledky APTT. Na TT nemají dokonce žádný vliv. Vlivem rozdílné citlivosti testů dochází k prodlužování časů, a to by mohlo vést k falešně pozitivním výsledkům (*Margetić et al., 2022*). Zjištění koncentrace léčiva je také ovlivněno použitými komerčními činidly, jelikož DOAC vykazují proměnlivou citlivost i u stejných screeningových testů. DOAC mají navíc v krevním oběhu krátký poločas rozpadu (12–15 hodin), z toho důvodu také záleží na době odběru vzorků po požití léku. Proto je velmi obtížné kvantifikovat hladiny léčiva pomocí koagulačních testů. Tyto testy slouží pouze pro kvalitativní stanovení. Pro zjištění koncentrací DOAC v plazmě byly vyvinuty specifické metody. Jedná se o chromogenní a koagulační testy pro dabigatran a chromogenní anti-Xa testy s lékově specifickými kalibrátory pro přímé inhibitory faktoru Xa (*Margetić et al., 2022*). Při chromogenním testu anti-FXa se detekuje přítomnost látky inhibující FXa. Do vzorku získaného od pacienta se přidá FXa a nechá se inkubovat. Během inkubace se FXa vyváže v plazmě přítomným inhibitorem. V dalším kroku se přidá substrát specifický pro FXa, a ten je zbylým FXa štěpen za vzniku barevné přeměny, která je přímo úměrná koncentraci FXa v plazmě.

Chromogenní test anti-FIIa je založen na měření inhibice trombinu po přidání trombinového činidla do vzorku plazmy. Pro každý antikoagulant musí být tyto testy kalibrovány zvlášť (*Conway et al., 2017*).

Pro stanovení hladin přímého inhibitoru, dabigatranu, v plazmě, se využívá i koagulačních testů. Koagulace je zahájena přidáním lidského trombinu k ředěnému vzorku plazmy. Získaný koagulační čas závisí na koncentraci dabigatranu v měřeném vzorku.

### **2.8.1 DABIGATRAN**

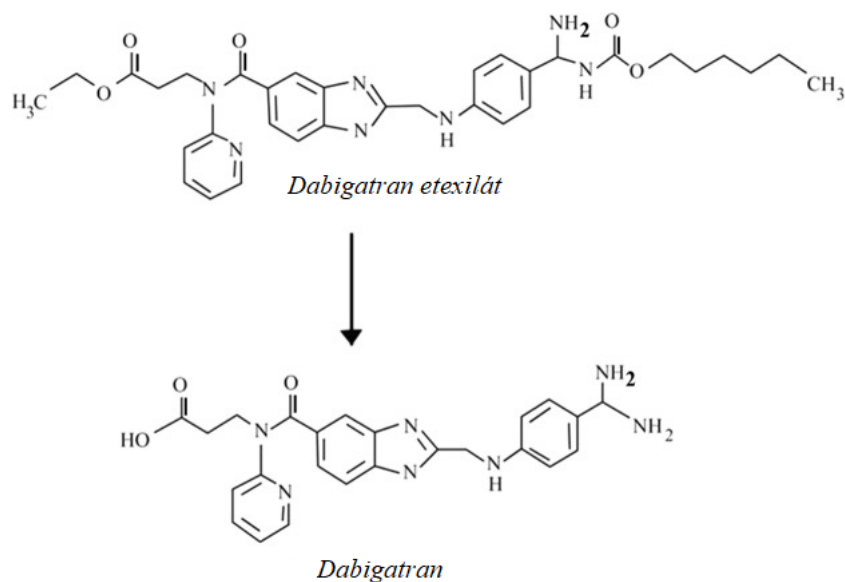
Dabigatran etexilát je proléčivo Dabigatranu, který reverzibilně inhibuje volný i na trombus vázaný trombin. K této interakci dochází v aktivním místě trombinu. Jelikož je samotný dabigatran hodně polární, tak po perorálním požití není biologicky dostupný. Z tohoto důvodu se vyvinulo proléčivo dabigatranu, dabigatran etexilát, který má zlepšenou gastrointestinální absorpci a biologickou dostupnost zhruba 3–7 % (*Dunois, 2021*). Proléčivo může podléhat změnám absorpce, jelikož je substrátem



pro P-gp, jenž je důležitý při regulaci příjmu proléčiva ve střešní stěně. Inhibitory P-gp mohou způsobit zvýšení, a naopak induktory P-gp snížení absorpce proléčiva (Grzešk et al., 2021).

Dabigatran etexilát prochází dvěma po sobě jdoucími aktivačními kroky za vzniku farmakologicky aktivního dabigatranu (viz obr. 6). Nejprve je proléčivo metabolizováno na intermediární metabolit, dabigatran ethyl ester, prostřednictvím karboxylesterázy-2 ve střevě. Následně je ethyl ester přeměněn na konečný aktivní metabolit, dabigatran, karboxylesterázou-1 v játrech (Shi et al., 2016). Dabigatran se podává ve fixních dávkách, 75 mg, 110 mg nebo 150 mg dvakrát denně, v závislosti na renální funkci (Ng et al., 2022). Někteří pacienti mohou trpět zvýšenou krvácivostí po požití dabigatranu, proto se využívá Idarucizumab pro rychlé zvrácení antikoagulačního účinku dabigatranu (Van Der Horst et al., 2023). Idarucizumab se také používá jako antidotum při krvácení předávkovaných pacientů.

Předepsaná dávka závisí na indikaci, věku pacienta, indexu tělesné hmotnosti a renální funkci. Nejvyšší plazmatická koncentrace léčiva je měřena 1,5–3 hodiny po aplikaci dávky s biologickým poločasem v oběhu 12–14 hodin při fyziologické funkci ledvin. Snížená funkčnost ledvin může ovlivnit plazmatické koncentrace dabigatranu. Z tohoto důvodu by se clearance kreatininu měla kontrolovat vždy, než se zahájí léčba. Nezmeněný dabigatran je z 80 % eliminován ledvinami a je jediný DOAC, který může být odstraněn hemodialýzou (Margetić et al., 2022).



Obr. 6: Chemická struktura dabigatranu etexilátu (následná přeměna na aktivní léčivo, dabigatran) (Aljohani et al., 2018).

## 2.9 INHIBITORY FAKTORU Xa

Inhibitory faktoru Xa jsou oproti ostatním serinovým proteázám pro faktor Xa velmi selektivní, jelikož ke svému účelu nepotřebují kofaktor, jakým je například antitrombin pro heparin. Na tomto principu fungují všechny přímé inhibitory koagulačního systému. Ve vnější a vnitřní koagulační dráze má faktor Xa důležitý cíl, a to přeměňovat neaktivní protrombin na aktivní trombin a následnou tvorbu sraženiny. Přímě působící inhibitory faktoru Xa snižují tvorbu trombinu, a tím se zabraňuje tvorbě sraženiny (*Huisman et Klok, 2018*).

### 2.9.1 RIVAROXABAN

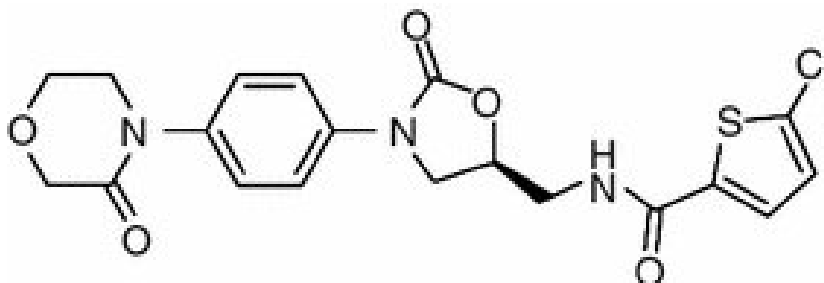
Rivaroxaban je vysoce selektivní přímý inhibitor faktoru Xa. Inhibuje volný faktor Xa a faktor Xa vázaný na protrombin (*Kreutz, 2012*). Rivaroxaban je malá molekula o molekulové hmotnosti 436 g/mol a je prakticky nerozpustná ve vodě (*Mueck, 2014*). Struktura rivaroxabanu je znázorněná na obr. 7.

Absorpce rivaroxabanu je téměř úplná, s perorální biologickou dostupností 80–100 % při dávce 10 mg. Maximální plazmatické koncentrace ( $c_{\max}$ ) je dosaženo během 2–4 hodin po požití s  $c_{\max}$  přibližně 250 ng/ml pro dávku 20 mg. Biologická dostupnost je také závislá na místě, kde se léčivo v gastrointestinálním traktu uvolňuje. Pokud dochází k uvolnění v proximálním tenkém střevě, tak dochází ke snížení  $c_{\max}$  až o 56 %. Uvolnění v distálním tenkém střevě nebo ve vzestupném tračníku tlustého střeva vede k dalšímu snížení  $c_{\max}$  (*Grzesk et al., 2021*). Hodnoty plazmatické koncentrace rivaroxabanu mohou být také ovlivněny extrémními hodnotami tělesné hmotnosti, a to <50 kg anebo >120 kg (*Dunois, 2021*).

Po perorálním podání je nezměněný rivaroxaban převládající formou v plazmě bez významnějších metabolitů. Rivaroxaban má dvojí cestu eliminace. Lék může být vylučován močí anebo hepatobiliární cestou (*Dunois, 2021*). Vzhledem k jaternímu metabolismu by neměl být tento lék užíván pacienty, kteří se léčí s jaterními problémy spojenými s koagulopatií (*Margetić et al., 2022*).

V současnosti má rivaroxaban nejvyšší počet regulačních schválení ze všech DOAC. V Evropské Unii a USA je rivaroxaban schválen k prevenci žilního tromboembolismu u dospělých, kteří podstupují operace náhrady kyčelního kloubu nebo u pacientů s cévní mozkovou příhodou, jenž mají jeden nebo více rizikových faktorů.

Mezi tyto faktory patří městnavé srdeční selhání, hypertenze, věk nad 75 let, předchozí cévní mozková příhoda nebo pacienti trpící diabetem. Rivaroxaban se také indikuje u pacientů s nevalvulární fibrilací síní jako antikoagulační prevence před cévní mozkovou příhodou (Ageno, 2015).



Obr. 7: Chemická struktura rivaroxabanu (Mueck et al., 2014).

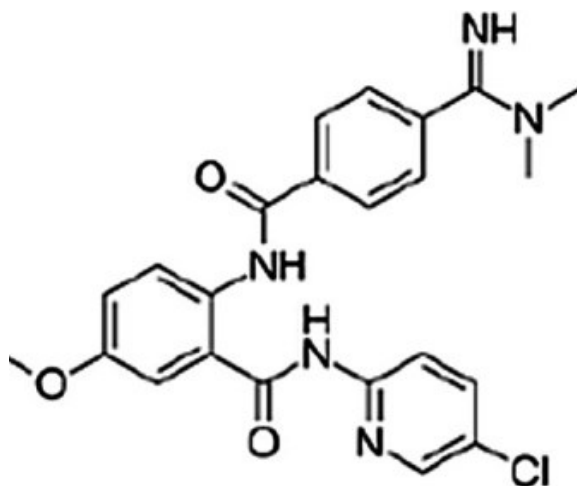
## 2.9.2 BETRIXABAN

Betrixaban, jehož chemická struktura je znázorněna na obr. 8, kompetitivně a reverzibilně inhibuje volný i na protrombinázu vázaný faktor Xa (Huisman et Klok, 2018).

Betrixaban se užívá jednou denně a jeho  $c_{\max}$  je okolo 46 ng/ml 3–4 hodiny po perorálním podání při dávce 80 mg (Murphy et al., 2018). Perorální biologická dostupnost po aplikované dávce 80 mg je 34 %. Absorpce léčiva je hodně ovlivněna tučným jídlem, kdy  $c_{\max}$  klesá až o 70 % (Baker, 2018). Mezi DOAC má betrixaban nejdelší poločas rozpadu, s terminálním poločasem 35–45 hodin a efektivním poločasem 19–27 hodin (Dunois, 2021). Vylučuje se převážně nezměněný žlučí. Renální clearance je nízká, a proto se asi 11 % dávky objeví v moči (Murphy et al., 2018). Primární formou eliminace je tedy cesta hepatobiliární, kterou se eliminuje 82–89 % léčiva (Baker, 2018).

Na rozdíl od apixabanu nebo rivaroxabanu není betrixaban metabolizován enzymy cytochromu P450 (CYP) a tudíž neindukuje ani neinhibuje aktivitu CYP, což by mohlo vést k nežádoucím účinkům. Vzhledem k tomu, že léčiva, která mění aktivitu enzymu CYP mohou změnit farmakokinetiku souběžně podávaných léků, jenž jsou metabolizovány enzymy CYP, může docházet k nežádoucí lékové interakci (Huisman et Klok, 2018).

Betrixaban byl schválen FDA v roce 2017 pro prevenci žilního tromboembolismu (VTE) u dospělých pacientů hospitalizovaných pro akutní onemocnění, kteří jsou ohroženi tromboembolickými komplikacemi. Využívá se také k prevenci VTE po náhradě kyčelního nebo kolenního kloubu (Beyer-Westendorf et al., 2018).



Obr. 8: Chemická struktura betrixabanu (Jasemizad et Padhye, 2019).

### 2.9.3 APIXABAN

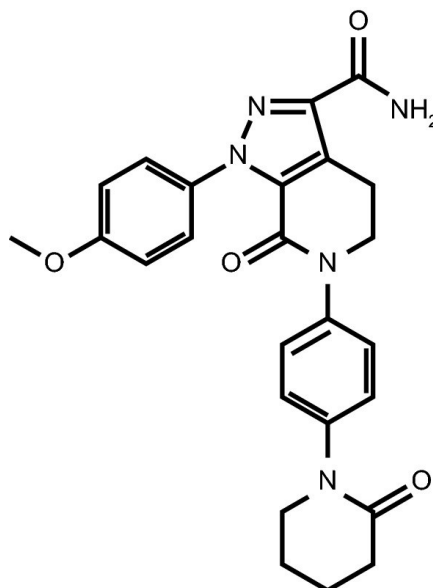
Apixaban také patří mezi DOAC, která přímo inhibují faktor Xa, a to buď prostřednictvím inhibice protrombinázy nebo faktorem Xa vázaný na sraženinu (Dunois, 2021). Toto léčivo je důležitou alternativou k antikoagulačním terapiím, jako jsou VKA nebo nízkomolekulární heparin (Byon et al., 2019). Chemická struktura apixabanu je znázorněná na obr. 9.

Maximální plazmatická koncentrace apixabanu, která je 170 ng/ml při dávce 5 mg, nastává 3–4 hodiny po perorálním podání. Biologická dostupnost léčiva je přibližně 60 % při dávce 2,5 mg a asi 50 % při dávce 10 mg (Dunois, 2021). Lék se primárně absorbuje v horní části gastrointestinálního traktu, tedy duodenu, jejunu a ileu. Absorpce se snižuje v distálnějších místech, jako je tlusté střevo (Grzešek et al., 2021). Po perorálním podání je hlavní formou apixabanu v lidské plazmě nezměněné léčivo bez přítomnosti vedlejších metabolitů. Apixaban má u zdravých jedinců terminální poločas v plazmě 10–14 hodin (Dunois, 2021).

K eliminaci léčiva může docházet zhruba ze 2,5 % hepatobiliární sekrecí. Významnější cesta eliminace je renální clearance, kde dojde k eliminaci zhruba 27 %

původního nezměněného léčiva. Poslední cestou vyloučení je přímá střevní exkrece, která tvoří asi 56 % (Hurst et al., 2017).

Původně byl apixaban schválen v roce 2012 pro prevenci cévní mozkové příhody u pacientů s nevalvulární fibrilací síní a pro prevenci VTE v roce 2014. U pacientů s nevalvulární fibrilací síní se podává dávka 5 mg perorálně dvakrát denně. Pokud je ale pacient starší 80 let anebo je jeho hmotnost nižší než 60 kg, tak je dávka apixabanu snížena na 2,5 mg dvakrát denně. Pacienti s VTE užívají dávku 10 mg dvakrát denně perorálně po dobu 7 dnů a následně se dávka snižuje na 5 mg (Vu et al., 2021). Léčba apixabanem musí být přehodnocena, pokud pacient užívá induktory cytochromu P450 3A4, jelikož tyto léky mohou vést ke zvýšení rizika výskytu cévní mozkové příhody nebo embolie (Hurst et al., 2017).



Obr. 9: Chemická struktura apixabanu  
(Byon et al., 2019)

## 2.9.4 EDOXABAN

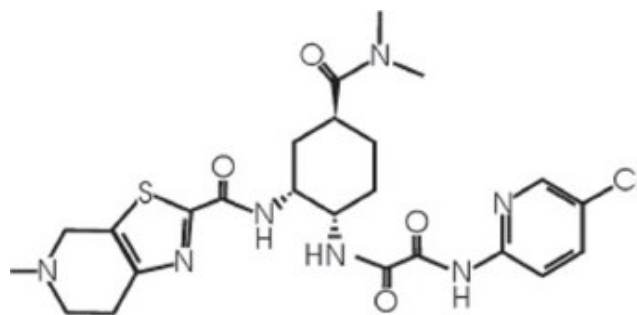
Edoxaban je perorální, selektivní, přímý a reverzibilní inhibitor aktivovaného koagulačního faktoru X, který je zodpovědný za přeměnu protrombinu na trombin. Lék se váže přímo na aktivní místo faktoru Xa, a tím dochází k blokaci interakce s protrombinem (Corsini et al., 2020).

Absolutní perorální biologická dostupnost je u zdravých jedinců zhruba 62 % při dávce 60 mg. Oproti jiným DOAC, jako je rivaroxaban, není expozice edoxabanu

ovlivněna jídlom ani tělesnou hmotností (Ramacciotti et al., 2018). Po perorálním podání se edoxaban vstřebává ve formě tosylátu edoxabanu (viz obr. 10). Maximální plazmatické koncentrace je dosaženo po 1–2 hodinách, která při podané dávce 60 mg odpovídá plazmatické koncentraci 170 ng/ml (Dunois, 2021). K největší absorpci dochází v horní části gastrointestinálního traktu a přibližně 13 % se absorbuje v tlustém střevě. Terminální poločas edoxabanu je asi 9–11 hodin (Parasrampurua et Truitt, 2016).

Po podání je edoxaban transformován karboxylesterázou-1 na metabolit M4, který tvoří v plazmatické koncentraci asi 10 % původního léčiva. Metabolismus cytochromu P450 3A4/5 zprostředkovává tvorbu metabolitů M5, M6 a M8, které tvoří v plazmě necelé 4 % (Dunois, 2021). Léčivo je primárně vylučováno v nezměněné podobě močí. Renální clearance tvoří zhruba 50 % celkové clearance. Za zbylých 50 % zodpovídá žlučová sekrece a jaterní metabolismus (Parasrampurua et Truitt, 2016).

Edoxaban byl schválen v Japonsku v roce 2012 pro prevenci VTE u pacientů, kteří podstupují endoprotézu kolenního kloubu, náhradu kyčelního kloubu nebo operaci zlomeniny kyčelního kloubu (Chan et Pisano, 2015). O dva roky později, v roce 2014 byl edoxaban také schválen pro prevenci cévní mozkové příhody. FDA následně schválila edoxaban v roce 2015 pro léčbu hluboké žilní trombózy a plicní embolie (Margetić et al., 2022).



Obr. 10: Chemická struktura edoxabanu (Nakamura et al., 2017).

### **3 CÍL PRÁCE**

1. Porovnat jednotlivé vzorky před a po adsorpci DOAC-Stop tabletkami
2. Zhodnotit míru vyvázání přímých inhibitorů ze vzorků pacientů
3. Porovnat hodnoty Normalizovaného poměru před a po adsorpci
4. Zhodnotit pozitivitu, negativitu nebo falešnou pozitivitu na přítomnost lupus antikoagulans u jednotlivých vzorků

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 PŘÍSTROJE

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 1) Centrifuga     | Consult 21, Španělsko                     |
| 2) Vodní lázeň    | Gesellschaft für Labortechnik,<br>Německo |
| 3) Sysmex CS 2500 | Sysmex, Japonsko                          |
| 4) Třepačka       | Phoenix Instrument RS-TR05,<br>Německo    |

#### 4.1.1 SYSMEX CS 2500

Sysmex CS 2500, který je znázorněn na *obr. 11–13*, je plně automatizovaný koagulační analyzátor, který funguje na principu optické detekce s možností měření chromogenních a turbidimetrických metod. Zdrojem světla je halogenová lampa, která se využívá pro měření při vlnových délkách 340 nm, 405 nm, 575 nm, 660 nm a 800 nm.

Analyzátor pracuje se zkumavkami o objemu 4 ml, ale je možné pracovat i s mikrozkušavkami o menších objemech. Přístroj je doplněn podavačem zkumavek, které jsou vloženy obsluhou do specifického stojanu. Stojany se vzorky, které se vkládají do tohoto analyzátoru mají kapacitu pro 10 zkumavek, přičemž stroj může být naplněn maximálně 5 stojany po 10 vzorcích. Stroj vzorky pipetuje vzorkovou jehlou, a i sám si zkontroluje, zda v daném vzorku není přítomná hemolýza, lipemie či ikterus. Také zjistí správnou hladinu naplnění primární zkumavky obsahující vzorek (*Siemens Healthcare Diagnostics Inc., 2022*).

Přístroj má část pro uložení reagensů, která je chlazená na 10 °C a reagensie jsou zde vkládány ve stojanech v originálních lahvičkách nebo ve speciálních reagenčních nádobkách-kepech. Pokud mají čárové kódy, jsou přístrojem rozpoznány. Pokud čárové kódy nemají, musí je nadefinovat obsluha. Do přístroje se vkládají reagensie, kontroly a promývací pufry manuálně, přičemž pro reagensie a kontroly je zde 40 volných míst a pro promývací roztoky 5 pozic. Přes počítač, který je vždy napojený na analyzátor lze kontrolovat, jaké množství od dané reagensie či kontroly ještě zbývá, a na kolik následujících testů postačí. Reagenční pipetová jehla je vyhřívána pro správné předeřtání pipetovaného objemu reagensie před přidáním do reakční směsi. Pipeta pro dávkování



reagencií má možnost dávkování od 20–200 µl a pipeta, jenž dávkuje vzorek má rozmezí od 20–250 µl. K reakci reagentie a vzorku dochází v reakční zkumavce. Samotné měření probíhá v měřící části přístroje za teploty 37 °C. Tato část je zakrytá z důvodu eliminace rušivých světelných interferencí a není přístupná běžné obsluze.

Při výměně reagentií nebo kontrol se provádí kalibrace. Analyzátor zhotoví až 12bodovou kalibrační křivku s maximálně 5 opakováním analýz každého bodu. Vše se ukládá do počítače a lze hledat nejasnosti i několik let zpátky, pokud nejsou výsledky aktivně vymazány.

Jako většina analyzátorů, má i Sysmex CS 2500 systém promývacích roztoků na čištění a proplachování a odpadní systém (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., 2022).



Obr. 11: Sysmex CS 2500 (pohled zepředu)  
(1 – kryt v oblasti pohybu reagenční jehly, 2 – zásobník reakčních kyvet a panel umožňující spuštění a nouzové zastavení stroje, 3 – oblast pro vkládání stojanů se vzorky, 4 – zásuvka pro použité reakční kyvety, 5–6 – kryt měřící části)



*Obr. 12: Sysmex CS 2500 (pohled ze strany)  
 (3 – oblast pro vkládání stojanů se vzorky, 7 – boční strana krytu oblasti pohybu reagenční jehly, 8 – kryt s ventilem systému a ovladačem pohotovostního nastavení vakua)*



*Obr. 13: Sysmex CS 2500 (pohled dovnitř)  
 (2 – zásobník reakčních kyvet a panel umožňující spuštění a nouzové zastavení stroje, 3 – oblast pro vkládání stojanů se vzorky, 6 – kryt měřící části, 10 – kryt vstupu do reagenční části, 11 – krycí část pro diluenty)*

## 4.2 LABORATORNÍ POMŮCKY

- 1) Pipety (Eppendorf, Německo)
- 2) Špičky (Eppendorf, Německo)
- 3) Rukavice (Halyard, USA)
- 4) Zkumavky s citronanem sodným (0,106 M) (Sarstedt, Německo)
- 5) Reakční kyvety (Sysmex, Japonsko)

## 4.3 REAGENCIE

- 1) BIOPHEN<sup>TM</sup> Rivaroxaban Control, kontrola I (firma HYPHEN BioMed)
- 2) BIOPHEN<sup>TM</sup> Rivaroxaban Control, kontrola II (firma HYPHEN BioMed)
- 3) BIOPHEN<sup>TM</sup> Rivaroxaban Control, kontrola 1 (firma HYPHEN BioMed)
- 4) BIOPHEN<sup>TM</sup> Rivaroxaban Control, kontrola 2 (firma HYPHEN BioMed)
- 5) BIOPHEN<sup>TM</sup> Heparin, reagent 1 (firma HYPHEN BioMed)
- 6) BIOPHEN<sup>TM</sup> Heparin, reagent 2 (firma HYPHEN BioMed)
- 7) BIOPHEN<sup>TM</sup> Apixaban Calibrator, kalibrátor I (firma HYPHEN BioMed)
- 8) BIOPHEN<sup>TM</sup> Apixaban Calibrator, kalibrátor II (firma HYPHEN BioMed)
- 9) BIOPHEN<sup>TM</sup> Apixaban Calibrator, kalibrátor III (firma HYPHEN BioMed)
- 10) BIOPHEN<sup>TM</sup> Apixaban Calibrator, kalibrátor 1 (firma HYPHEN BioMed)
- 11) BIOPHEN<sup>TM</sup> Apixaban Calibrator, kalibrátor 2 (firma HYPHEN BioMed)
- 12) BIOPHEN<sup>TM</sup> Apixaban Calibrator, kalibrátor 3 (firma HYPHEN BioMed)
- 13) BIOPHEN<sup>TM</sup> Apixaban Control, kontrola I (firma HYPHEN BioMed)
- 14) BIOPHEN<sup>TM</sup> Apixaban Control, kontrola II (firma HYPHEN BioMed)
- 15) BIOPHEN<sup>TM</sup> Apixaban Control, kontrola 1 (firma HYPHEN BioMed)
- 16) BIOPHEN<sup>TM</sup> Apixaban Control, kontrola 2 (firma HYPHEN BioMed)
- 17) HEMOCLOT<sup>TM</sup>Thrombin inhibitors, normální poolová plazma (firma HYPHEN BioMed)
- 18) HEMOCLOT<sup>TM</sup>Thrombin inhibitors, lidský trombin s vápníkem (firma HYPHEN BioMed)
- 19) BIOPHEN<sup>TM</sup> Dabigatran Calibrator, kalibrátor I (firma HYPHEN BioMed)
- 20) BIOPHEN<sup>TM</sup> Dabigatran Calibrator, kalibrátor II (firma HYPHEN BioMed)
- 21) BIOPHEN<sup>TM</sup> Dabigatran Calibrator, kalibrátor III (firma HYPHEN BioMed)
- 22) BIOPHEN<sup>TM</sup> Dabigatran Calibrator, kalibrátor 1 (firma HYPHEN BioMed)

- 23) BIOPHEN™ Dabigatran Calibrator, kalibrátor 2 (firma HYPHEN BioMed)
- 24) BIOPHEN™ Dabigatran Calibrator, kalibrátor 3 (firma HYPHEN BioMed)
- 25) BIOPHEN™ Dabigatran Control, kontrola I (firma HYPHEN BioMed)
- 26) BIOPHEN™ Dabigatran Control, kontrola II (firma HYPHEN BioMed)
- 27) BIOPHEN™ Dabigatran Control, kontrola 1 (firma HYPHEN BioMed)
- 28) BIOPHEN™ Dabigatran Control, kontrola 2 (firma HYPHEN BioMed)
- 29) HEMOCLOT™ LA-S (firma HYPHEN BioMed)
- 30) HEMOCLOT™ LA-C (firma HYPHEN BioMed)
- 31) LA kontrolní plazma, slabá (C1) (firma HYPHEN BioMed)
- 32) LA kontrolní plazma, silná (C2) (firma HYPHEN BioMed)
- 33) BIOPHEN™ Normální kontrolní plazma (firma HYPHEN BioMed)
- 34) CEPHEN™ LS – APTT citlivé na LA (firma HYPHEN BioMed)
- 35) CaCl<sub>2</sub> – startovací reagentie pro APTT (firma SIEMENS Healthineers)
- 36) APTT-FS – necitlivé na LA (firma SIEMENS Healthineers)
- 37) Aqua pro injectione Braun, 500 ml (firma B. Braun)
- 38) DOAC-STOP tablety (firma Haematex Research)

Některé reagentie obsahují materiál lidského nebo zvířecího původu, proto jsou tyto látky testovány na přítomnost protilátek HIV 1, HIV 2, HCV a na antigeny hepatitidy B. Všechny reagentie jsou považovány za potenciálně infekční, a proto se s nimi musí zacházet obezřetně.

Reagentie, které se uchovávají zamrazené, se rozmrazují pouze jednou, a to při teplotě 37 °C.

#### **4.3.1 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ RIVAROXABANU CONTROL, KONTROLY I, II, 1 A 2**

Souprava obsahuje lyofilizovanou lidskou plazmu s přidaným rivaroxabanem o odlišných koncentracích a používá se pro kontrolu kvality měření přímého inhibitoru, rivaroxabanu. Koncentrace reagentií jsou optimalizovány pro anti-Xa chromogenní test.

Kontrola I obsahuje hladinu rivaroxabanu kolem 25 ng/ml, kontrola II obsahuje zhruba 75 ng/ml, kontrola 1 obsahuje okolo 100 ng/ml a kontrola 2 obsahuje zhruba 300 ng/ml. Nejdříve se opatrně odstraní víčko a následně byl obsah každé lahvičky kontroly rozpuštěn v 1 ml destilované vody. Obsah každé lahvičky byl promíchán

a dle návodu výrobce stabilizován při pokojové teplotě 18–25 °C po dobu 30 minut. Stabilita rozpuštěných uzavřených reagensů v případě zabránění kontaminace a odpařování, je následující: 7 dní při 2–8 °C, 48 hodin při 18–25 °C a 6 měsíců při teplotě nižší než –20 °C.

#### **4.3.2 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ HEPARINU, REAGENTU 1 A 2**

Tato souprava se využívá pro anti-Xa chromogenní test *in vitro* kvantitativní stanovení koncentrace heparinu. Reagencie je vhodná pro stanovení anti-Xa aktivity přímých inhibitorů, jako je rivaroxaban, ale i nepřímých, kam patří hepariny. Heparin má vysokou afinitu k antitrombinu a spolu působí jako inhibitory serinových proteáz: IXa, Xa, XIa, IIa a trombinu. Souprava se také využívá pro stanovení přímých inhibitorů anti-Xa, rivaroxabanu, apixabanu a edoxabanu.

Metoda je založená na inhibici konstantního množství FXa testovaným heparinem v přítomnosti endogenního antitrombinu. Zbylý FXa hydrolyticky štěpí FXa specifický substrát za vzniku paranitroanilinu (pNA). Množství uvolněného pNA, který absorbuje při 405 nm je nepřímo úměrné koncentraci heparinu. Vytvoří se komplex heparin–antitrombin, a ten se následně váže na FXa, který inhibují.

Reagent 1 je chromogenní substrát specifický k faktoru Xa a reagent 2 je bovinní faktor Xa. Jelikož jsou reagencie tekuté, tak jejich příprava spočívá v homogenizaci obsahu. Následně byly stabilizovány po dobu 10 minut při teplotě 18–25 °C a vloženy do analyzátoru. Stabilita těchto reagensů je 6 měsíců při 2–8 °C a 14 dní při 18–25 °C.

#### **4.3.3 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ APIXABAN CALIBRATOR, KALIBRÁTORY I, II, III A KALIBRÁTORY 1, 2, 3**

Tato souprava obsahuje sadu lyofilizovaných lidských plazem s přidaným apixabanem s různými koncentracemi. Kalibrátor I neobsahuje žádné množství apixabanu, je to čistá lidská plazma. Kalibrátor II obsahuje přibližně 50 ng/ml a kalibrátor III má koncentraci zhruba 100 ng/ml. Koncentrace v kalibrátoru 1 je méně než 50 ng/ml, kalibrátor 2 má přibližnou koncentraci 300 ng/ml a kalibrátor 3 obsahuje kolem 600 ng/ml apixabanu. Jednotlivé lahvičky jsou plněny po 1 ml, a jelikož jsou lyofilizovány pod vakuem, je třeba dbát na bezpečnost při otevírání zátky. Obsahy všech lahviček byly

rozpuštěny v 1 ml destilované vody a míchaly se do úplného rozpuštění obsahu. Kalibrátory se nechaly stabilizovat po dobu 30 minut při teplotě 18–25 °C a následně byly vloženy do analyzátoru. Pokud u některých plazmatických reagensů došlo k zakalení, vlivem působení plazmatických lipidů, nechaly se lahvičky po dobu 10 minut stabilizovat a před vložením do analyzátoru se opět promíchaly.

Stabilita rozpuštěných reagensů je při 2–8 °C 7 dní, 48 hodin při pokojové teplotě (18–25 °C) a 6 měsíců, pokud jsou zamrazeny na méně než –20 °C.

#### **4.3.4 PŘÍPRAVA BIOPHEN<sup>TM</sup> APIXABAN CONTROL, KONTROLY I, II A KONTROLY 1, 2**

Sada obsahuje lyofilizované lidské plazmy, které obsahují apixaban o různých koncentracích a jsou určeny pro kontrolu kvality měření. Kontrola I obsahuje hladinu apixabanu okolo 25 ng/ml, kontrola II má přibližnou koncentraci 75 ng/ml, kontrola 1 má hladinu apixabanu zhruba 200 ng/ml a kontrola 2 obsahuje přibližně 400 ng/ml apixabanu. Jednotlivé lahvičky mají objem 1 ml a obsah se rozpouští v 1 ml destilované vody. Je třeba dbát zvýšené bezpečnosti před otevřením lahviček, jelikož jsou lyofilizovány pod vakuem. Před vložením do analyzátoru byly kontroly řádně promíchány, a pokud u některých došlo k zakalení, nechaly se podle potřeby stabilizovat zhruba 10 minut a znovu se promíchaly.

Stabilita rozpuštěných reagensů je 7 dní při 2–8 °C, 48 hodin při pokojové teplotě (18–25 °C) a 6 měsíců, pokud jsou zamrazeny na méně než –20 °C.

#### **4.3.5 PŘÍPRAVA HEMOCLOT<sup>TM</sup> THROMBIN INHIBITORS, NORMÁLNÍ POOLOVÁ PLAZMA A LIDSKÝ TROMBIN S VÁPNIKEM**

Souprava slouží jako anti-II koagulační metoda pro *in vitro* kvantitativní měření přímých inhibitorů trombinu (DTI) v lidské citrátové plazmě. Lze ji využít jak pro manuální, tak i pro automatickou metodu. Měření koncentrací přímých inhibitorů trombinu, jako je dabigatran, se využívá u pacientů s antikoagulační léčbou, s trombotickými či krvácivými příhodami nebo při podezření na předávkování.

Principem metody je koagulační test (měřený trombinový čas) pro zjištění koncentrací DTI. Koagulace je zahájena přidáním vysoce purifikovaného lidského

trombinu v  $\alpha$ -trombin podobě a test probíhá v přítomnosti vápníku. Získaný srážecí čas je závislý na koncentraci DTI v měřeném vzorku.

Z reagií se nejdříve opatrně odstranilo víčko, aby nedošlo ke ztrátě produktu. Obsah každé lahvičky byl naředěn 2,5 ml destilované vody a následně byly řádně promíchány, dokud se obsah lahviček zcela nerozpustil. Reagencie se nechaly stabilizovat po dobu 30 minut při teplotě 18–25 °C a po promíchání byly reagencie vloženy do analyzátoru. Zbylé rozpuštěné reagencie mohou být zamraženy na méně než –20 °C a využity v průběhu 2 měsíců.

#### **4.3.6 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ DABIGATRAN CALIBRATOR, KALIBRÁTORY I, II, III A KALIBRÁTORY 1, 2, 3**

Toto jsou soupravy lyofilizovaných lidských kalibračních plazem, doplněných dabigatranem, které se využívají pro stanovení koncentrace dabigatranu v lidské plazmě. Kalibrátor I neobsahuje žádné množství dabigatranu, kalibrátor II je doplněn dabigatranem na hladinu okolo 50 ng/ml a kalibrátor III obsahuje zhruba 100 ng/ml dabigatranu. Kalibrátor 1 také neobsahuje žádný dabigatran, kalibrátor 2 je suplementován dabigatranem na hladinu kolem 250 ng/ml a kalibrátor 3 má koncentraci dabigatranu okolo 500 ng/ml.

Z lahviček bylo opatrně odstraněno víčko, aby se zabránilo ztrátám, jelikož jsou reagencie lyofilizovány pod vakuem. Každá lahvička byla naředěna 1 ml destilované vody a byly promíchávány do doby, než se obsah lahviček rozpustil. Potom se reagencie nechaly stabilizovat po dobu 30 minut při teplotě 18–25 °C a následně se vložily do analyzátoru.

Stabilita kalibrátorů je následující: 7 dní při 2–8 °C, 48 hodin při pokojové teplotě (18–25 °C) a 6 měsíců, pokud jsou zamraženy na méně než –20 °C.

#### **4.3.7 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ DABIGATRAN CONTROL, KONTROLY I, II A KONTROLY 1, 2**

Souprava obsahující lyofilizované lidské plazmy, které jsou suplementovány dabigatranem a slouží ke kontrole kvality stanovení dabigatranu v lidské plazmě. Kontrola I obsahuje koncentraci dabigatranu okolo 25 ng/ml, kontrola II zhruba 75 ng/ml. Kontrola 1 má koncentraci dabigatranu kolem 100 ng/ml a kontrola 2 asi 300 ng/ml.

Opět bylo z lahviček šetrně odstraněno víčko, jelikož jsou reagentie lyofilizovány pod vakuem. Každá lahvička byla naředěna 1 ml destilované vody a důkladně promíchána, dokud se obsah lahviček nerozpustil. Následně byly kontroly vloženy do analyzátoru.

Stabilita uzavřených reagentií je 7 dní při 2–8 °C, 48 hodin při pokojové teplotě (18–25 °C) a 6 měsíců při –20 °C i méně.

#### **4.3.8 PŘÍPRAVA REAGENCIÍ PRO LA – HEMOCLOT™ LA-S A HEMOCLOT™ LA-C**

Tyto soupravy jsou ředěné jedy Russellovy zmije pro specifickou detekci LA v lidské citrátové plazmě. LA-S je zjednodušená reagentie dRVV s nízkým obsahem fosfolipidů pro screening LA a LA-C je reagentie dRVV s vysokým obsahem fosfolipidů k potvrzení přítomnosti LA.

Citrátem ošetřené plazmy bez vápníku a s FX obsaženým v testovaném vzorku je FX přímo aktivován na FXa hadím jedem. Za účasti FV, vápníku a fosfolipidů pak FXa štěpí FII na FIIa, což vede rychle k vytvoření koagula. Jelikož LA-S má nízkou koncentraci fosfolipidů, tak je reagentie velmi citlivá na přítomnost protilátek proti těmto fosfolipidům. Jejich přítomnost vede k prodloužení koagulačního času oproti vzorkům, které protilátky neobsahují. Naopak, LA-C, obsahuje vyšší koncentrace fosfolipidů, které vyváží přítomné protilátky LA ve vzorku a dochází tedy ke zkrácení času oproti screeningovému testu. Tyto reagentie obsahují heparin neutralizující látku (koncentrace heparinu do 1 IU/ml), a pro vzorky obsahující heparin jsou tyto testy o něco specifitější než APTT, jehož prodloužení může heparin způsobit.

K minimalizaci možnosti vzájemné záměny reagentií je reagentie LA-S lyofilizována se zeleným barvivem a LA-C s růžovým barvivem. Víčko z lahviček bylo opatrně odstraněno a do obou reagentií se přidal 1 ml destilované vody. Lahvičky byly promíchány a nechaly se stabilizovat 30 min při teplotě 18–25 °C. Před vložením do analyzátoru byly znovu promíchány. Stabilita těchto reagentií je 7 dní při teplotě 2–8 °C, 24 hodin při 18–25 °C a 2 měsíce při teplotě nižší než –20 °C.



### **4.3.9 PŘÍPRAVA LA KONTROLY – SLABÁ (C1) A SILNÁ (C2)**

Souprava obsahuje kontrolní lyofilizované plazmy pro kontrolu slabého a silného pozitivního výsledku. Kontrolní plazma C1 má indikativní poměr k fyziologické plazmě okolo 1,40 a kontrolní plazma C2 kolem 2,40. Zároveň se sleduje čas kontroly, jejíž rozmezí definuje výrobce pro konkrétní analyzátor, v tomto případě pro CS řadu analyzátorů Sysmex.

Z lahviček bylo opatrně odstraněno víčko a každá lahvička byla naředěna 0,5 ml destilované vody. Byly promíchávány, dokud se obsah nerozpustil. Následně byly stabilizovány po dobu 30 minut při teplotě 18–25 °C. Před vložením do analyzátoru byly opět promíchány, aby došlo k homogenizaci. Stabilita těchto reagensů je 24 hodin při 2–8 °C, 8 hodin při 18–25 °C a 7 dní při teplotě nižší než -20 °C.

### **4.3.10 PŘÍPRAVA BIOPHEN™ NORMÁLNÍ KONTROLNÍ PLAZMY**

Tato souprava obsahuje lyofilizované fyziologické lidské plazmy v citrátu, které jsou určeny pro měření kontroly kvality koagulačních faktorů a výrobce garantuje nepřítomnost protilátek proti fosfolipidům.

Z lahvičky bylo opatrně odstraněno víčko a následně se obsah rozpustil smícháním s 1 ml destilované vody. Lahvička se promíchá, aby došlo k rozpuštění obsahu. Následně se nechala stabilizovat po dobu 30 minut při teplotě 18–25 °C. Před vložením do analyzátoru se lahvička znovu promíchala. Stabilita této reagensie se liší v závislosti na použitém testu, ale pro LA platí: 24 hodin při 2–8 °C, 8 hodin při 18–25 °C a 2 měsíce při teplotě nižší než -20 °C.

### **4.3.11 PŘÍPRAVA CEPHEN™ LS – APTT CITLIVÉ NA LA**

Souprava se využívá ke stanovení aktivovaného parciálního tromboplastinového času v citrátové lidské plazmě.

Dochází k aktivaci vnitřní cesty koagulace v testovaném vzorku pomocí směsí rostlinné sóji, syntetických fosfolipidů a aktivátoru. To vše se měří za přítomnosti Ca<sup>2+</sup>. Podobně jako reagensie na APTT FS je tekutá a uložena v lednici.

Nemusí se tedy stabilizovat při pokojové teplotě, ale ihned se vkládá do analyzátoru. Stabilita této reagensie je 3 měsíce při 2–8 °C a 7 dní při 18–25 °C.

#### **4.3.12 PŘÍPRAVA APTT-FS – NECITLIVÉ NA LA**

Souprava se využívá ke stanovení aktivovaného parciálního tromboplastinového času v citrátové lidské plazmě.

Faktory vnitřního koagulačního systému jsou aktivovány inkubací plazmy s optimálním množstvím rostlinných fosfolipidů a povrchovým aktivátorem. Po přidání  $\text{Ca}^{2+}$  se spustí proces koagulace a měří se čas do vytvoření koagula.

Tato reagensie se nemusí inkubovat, jelikož teplota v lednici a v analyzátoru je stejná.

#### **4.4 POSTUP**

Nejdříve byly připraveny jednotlivé reagensie a kontroly, které byly naředěny příslušnými objemy destilované vody a nechaly se inkubovat. Po inkubaci byly do analyzátoru vloženy všechny reagensie, včetně destilované vody a  $\text{CaCl}_2$ . Jednotlivé kontroly se následně přelily do plastových zkumavek a byly proměřeny. Jedna kontrola byla fyziologická citrátová plazma, další kontroly byly pro zjištění slabého a silného pozitivního výsledku.

Po zjištění optimálních výsledků kontrol byly z mrazáku vyndány plazmy jednotlivých pacientů, kde byly uchovávány při teplotě  $-72$  °C. Vzorky plazmy byly vloženy na 5 minut do vodní lázně, která byla nastavena na teplotu 37 °C. Po rozpuštění plazmy byly jednotlivé vzorky přepipetovány do plastových zkumavek. Je důležité, aby všechny vzorky plazmy byly bezdestičkové. To bylo zajištěno dvojnásobnou centrifugací. První centrifugace probíhala 15 minut při 2000 g a plazma se stáhla. Druhá centrifugace probíhala 15 minut při 2 500 g, plazma se opět stáhla, vložila do plastových zkumavek s identifikačními údaji pacienta a zamrazila při teplotě  $-72$  °C.

Vzorky rozmrazené a promíchané plazmy byly následně vloženy do analyzátoru a byly testovány na APTT necitlivé na LA (APTT-FS) a APTT citlivé na LA, hladinu přímých inhibitorů, LA screening a LA konfirmační. Jejich vzájemným poměrem je pak vypočten Normalizovaný poměr, tedy LA normalizovaný. Po analýze byla k jednotlivým

vzorkům plazmy přidána tableta DOAC-Stop a vzorky se nechaly inkubovat minimálně 10 minut při teplotě 18–25 °C. Po 10 minutách byly vzorky vloženy do centrifugy na 15 minut při 2 300 g k odstranění materiálu DOAC-Stop s navázaným inhibítorem. Po stočení byla plazma přepipetována do nových zkumavek. Takto připravené vzorky byly opět proměřeny na APTT-FS, hladinu přímých inhibitorů, LA screening a LA konfirmační. LA normalizovaný byl opět dopočten z poměru LA screening/LA konfirmační. Sledovala se změna hladin, časů a poměrů před a po neutralizaci tabletami DOAC-Stop.

#### **4.5 PRINCIP METODY – DOAC-STOP TABLETY (HAEMATEX RESEARCH, SYDNEY, AUSTRÁLIE)**

Přímá perorální antikoagulancia (DOAC) se velmi hojně používají k léčbě a prevenci žilního trombu. U DOAC není vyžadováno rutinní laboratorní monitorování, ale hodnocení hladin DOAC může být v různých klinických situacích nezbytné (*Platton et Hunt, 2018*). Účinek DOAC na koagulační testy je různý v závislosti na jejich cíl. Buď jsou zaměřené na faktor Xa nebo na trombin. Je známo, že DOAC v různé míře interferují s téměř všemi testy srážlivosti. Proto pacienti, kteří jsou testováni na základní koagulační poruchy mohou být testováni i na přítomnost DOAC, aby se odhalila příčina prodlužování testů (*Kopatz et al., 2018*).

Reverzní látky pro jednotlivé DOAC jsou vyvíjeny pro terapeutické použití, ale zatím nejsou široce dostupné pro laboratorní testy. Jednou z možností je Idarucizumab (Boehringer-Ingelheim, Německo), který se ukázal jako účinný při neutralizaci účinků dabigatranu ve vzorcích citrátové plazmy. Další látkou je Andaxanet alfa (Portola Pharmaceuticals, USA), jenž působí *in vivo* na inhibitory faktoru Xa. U této látky však nastává problém, že by jakýkoli její přebytek mohl interferovat s následnými testy. Pro neutralizaci DOAC v testovaných vzorcích je jednou z nejpoužívanějších látek DOAC-Stop (Haematex Research, Sydney), které mohou vázat DOAC ve vzorcích plazmy *in vitro* (*Exner et al., 2018*).

DOAC-Stop je schopný vyvázat všechny typy DOAC, a to dabigatran, apixaban, rivaroxaban a edoxaban. Tyto tabletky mohou zmíněné inhibitory vyvázat, aniž by došlo k ovlivnění plazmatických proteinů, které jsou zapojené do koagulační kaskády. Proto je možné po použití DOAC-Stop dále využívat vzorek plazmy pro koagulační vyšetření včetně stanovení deficitu faktorů, přítomnosti heparinu, LA nebo jiné interferující

protilátky. Čas zkrácení indukovaný DOAC-Stop v testu závisí na koncentraci a druhu DOAC, ale i na testované plazmě. Nevýhodou těchto tabletek je, že mohou vyvazovat molekuly o nízké molekulové hmotnosti, jako je aprotinin, analoga hirudinu, polymixin a příbuzné kationtové sloučeniny (*Favresse et al., 2018*).

Použití DOAC-Stop tabletek je následovné. Nejdříve se přenese požadovaný objem citrátové plazmy určené k vyšetření do plastové zkumavky. Ideální objem plazmy je 1 ml, ale přijatelné rozmezí je od 0,5–1,5 ml. Potom se přidá jedna tabletky DOAC-Stop a opatrně se promíchá, dokud se tableta nerozpustí. Dalších pět minut se zkumavka promíchává na třepačce. Po dalších 5 minutách se provede centrifugace po dobu 15 minut při 2 300 g, aby se oddělily partikule. Supernatant, který je nyní zbavený DOAC, tak může být použit k testování nebo může být zamrazen. Jedna tabletky v 1 ml plazmy s koncentrací 500 ng/ml dabigatranu, apixabanu, rivaroxabanu nebo edoxabanu je schopná odstranit více než 95 % DOAC během 5 minut. Pomocí těchto tabletek je možné zabránit vydávání falešně pozitivních nebo negativních testů. (*Baker et al., 2021*).

DOAC-Stop je určen pro použití u vzorků plazmy podezřelých z vlivu DOAC na výsledky testů. Pokud se tedy výsledek po adsorpci DOAC-Stop nemění a podezření na přítomnost DOAC stále přetrvává, je vhodné udělat specifické testy na anti-Xa a anti-IIa aktivitu (*Favresse et al., 2018*).

## 5 VÝSLEDKY

Ve výzkumné části byly testovány jednotlivé vzorky plazmy od 45 pacientů, kteří ke své léčbě užívají přímé inhibitory. Pro každý vzorek byla vytvořena tabulka (Tab. 1–45) s výsledky testů před a po neutralizaci DOAC-Stop tabletkami. U všech vzorků se vždy dělaly testy na APTT-FS, APTT LA, LA scr, LA konf, LA NormR a hladiny přímých inhibitorů. Všechny poměry, které byly testovány u jednotlivých vzorků, se vzhledem k individuální variabilitě v aktivitě koagulačních faktorů hodnotí jako fyziologické v rozmezí 0,8–1,2.

APTT-FS je reagensie, která není ovlivněna přítomností protilátek LA, jelikož obsahuje rostlinné, sójové, fosfolipidy. Sójové fosfolipidy jsou antigeně odlišné od živočišných, a proto by nemělo docházet ke změnám časů či poměrů u pacientů, kteří mají přítomné LA protilátky.

APTT LA je naopak reagensie, která je zcitlivělá pro diagnostiku LA. Tato reagensie obsahuje snížený obsah fosfolipidů, a z tohoto důvodu dochází k prodlužování časů u vzorku pacienta, jenž má s největší pravděpodobností přítomné LA protilátky.

LA scr je screeningový test a tato reagensie obsahuje jako aktivátor ředěný jed Russelovy zmiže, snížený obsah fosfolipidů a Ca ionty. Zmijí jed aktivuje FX, tudíž je vynechána aktivační cesta APTT, kam patří faktory XII, XI, IX, VIII a prekalkrein.

Tři výše zmíněné testy jsou využívány jako screeningové testy a jejich výsledky se udávají jako čas vyšetřovaného vzorku a jako poměr – čas vzorku pacienta/průměrný čas od 20 fyziologicky zdravých jedinců. Pokud je výsledný poměr vyšší nebo roven 1,2 je zde podezření na přítomnost protilátek LA a indikuje se konfirmační test. Pokud se udělá poměr screeningového a konfirmačního poměru, vznikne hodnota pro normalizovaný poměr, který by také neměl překročit hranici 1,2. Pokud je poměr vyšší, pak je takový vzorek dále vyšetřován podle doporučení ČHS.

LA konf je konfirmační test, který se od screeningové reagensie liší vyšším obsahem fosfolipidů. Tím, že se provede konfirmační test se dokazuje, že protilátka přítomná ve vyšetřovaném vzorku má specifitu proti fosfolipidům. Jelikož tato reagensie obsahuje více fosfolipidů než screeningová reagensie, mělo by dojít k vyvázání části nebo všech protilátek proti fosfolipidům a ke zkrácení nebo normalizaci času.

Hladina přímých inhibitorů se měřila z toho důvodu, jelikož přítomnost antikoagulačních léčiv může svým vlivem na jednotlivé testy vést k prodlužování časů

vyšetřovaných plazem. Toto by pak mohlo vést k falešně pozitivnímu hodnocení. Proto je dobré mít informaci o přítomnosti léčiva. Pokud informace není uvedena, je zde možnost vlivu léčiva na výsledky testů a špatná interpretace výsledku.

Tab. 1: Pacient č. 20-4045

Pacient č. 20-4045			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,08	APTT-FS, R	0,99
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>25,00</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>22,80</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>67,00</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>5,00</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>37,80</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>25,00</b>
LA scr, R	1,21	LA scr, R	0,80
<b>LA konf, sec</b>	<b>34,20</b>	<b>LA konf, sec</b>	/
LA konf, R	1,07	LA konf, R	/
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,13</b>	<b>LA NormR, R</b>	/
<b>APTT LA, sec</b>	<b>29,40</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>27,60</b>
APTT LA, R	0,96	APTT LA, R	0,85

U pacienta č. 20-4045 byl výsledek poměru LA scr, R lehce zvýšený. Ostatní poměry testů, APTT necitlivé a citlivé na přítomnost LA a LA konf, R byly před neutralizací negativní. Normalizovaný poměr je před adsorpcí 1,13, a proto lze přítomnost protilátek vyloučit.

Po vyvázání přímého inhibitoru, rivaroxabanu (RivaHLRT), došlo k výraznějšímu poklesu i u již dříve negativních testů a lze si také povšimnout, že screeningový test je po neutralizaci už negativní. Jelikož byl LA NormR, R před adsorpcí negativní, tak se konfirmace neindikovala.

U pacienta č. 20-4045 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 92,54 %.

Tab. 2: Pacient č. 10-4094

Pacient č. 10-4094			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,06	APTT-FS, R	0,95
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>24,60</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>21,90</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>283,50</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>11,10</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>54,50</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>27,70</b>
LA scr, R	1,75	LA scr, R	0,89
<b>LA konf, sec</b>	<b>52,80</b>	<b>LA konf, sec</b>	/
LA konf, R	1,65	LA konf, R	/
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,06</b>	<b>LA NormR, R</b>	/
<b>APTT LA, sec</b>	<b>33,20</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>32,30</b>
APTT LA, R	1,09	APTT LA, R	0,99

V testu před neutralizací u pacienta č. 10-4094 byly výsledky testů LA scr, R a LA konf, R prodlouženy. Ovšem hladina LA NormR, R je před adsorpcí 1,06 a poměr screeningového testu LA je po adsorpci 0,89, což značí negativní výsledek, a z tohoto důvodu také nebyla indikována konfirmace po adsorpci. Po neutralizaci DOAC došlo k významnému poklesu časů testu LA scr, R. Také si lze povšimnout významného rozdílu hladin rivaroxabanu před a po adsorpci. Došlo k téměř 26násobnému vyvázání inhibitoru.

U pacienta č. 10-4094 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 96,09 %.

Tab. 3: Pacient č. 9-4128

Pacient č. 9-4128			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	0,97	APTT-FS, R	0,91
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>22,50</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>21,60</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>252,40</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>10,30</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>61,70</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>34,60</b>
LA scr, R	1,98	LA scr, R	1,11
<b>LA konf, sec</b>	<b>55,10</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>32,70</b>
LA konf, R	1,72	LA konf, R	1,02
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,15</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,09</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>30,60</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>30,08</b>
APTT LA, R	1,00	APTT LA, R	0,97

Pacient č. 9-4128 má před adsorpcí vysoké hodnoty RivaHLRT, 252,4 µg/l. Toto číslo pouze ukazuje na přítomnost přímého inhibitoru v těle pacienta, konkrétně rivaroxabanu. U takto vyšších hodnot lze předpokládat, že pacient užil lék chvíli před

odběrem, jelikož maximální plazmatické koncentrace přímých inhibitorů se pohybují od 2–4 hodin po požití.

Hodnoty testů LA scr, R a LA konf, R jsou před adsorpcí též zvýšeny, ale hodnota LA NormR, R před neutralizací je 1,15, což vylučuje přítomnost LA. Po následném vyvázání přímého inhibitoru došlo k poklesu hladin u všech zmíněných testů, a proto můžeme u pacienta č. 9-4128 potvrdit nepřítomnost protilátek LA.

U pacienta č. 9-4128 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 95,92 %.

Tab. 4: Pacient č. 6-4139

Pacient č. 6-4139			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,11	APTT-FS, R	0,92
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>25,70</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>21,80</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>193,70</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>9,60</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>62,70</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>27,90</b>
LA scr, R	2,01	LA scr, R	0,89
<b>LA konf, sec</b>	<b>47,90</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>29,70</b>
LA konf, R	1,50	LA konf, R	0,93
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,34</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,96</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>29,30</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>28,50</b>
APTT LA, R	0,96	APTT LA, R	0,89

Pacient č. 6-4139 má před neutralizací zvýšené hodnoty LA NormR, R, které by mohly falešně pozitivně potvrdit přítomnost protilátek LA. Jsou také zvýšené hodnoty LA scr, R a LA konf, R. Výsledky poměrů APTT-FS, R a APTT LA, R jsou před adsorpcí v mezích normy.

Po provedení neutralizace DOAC-Stop tabletkami došlo ke snížení hodnot všech testů na fyziologické rozmezí. Jelikož nejsou po adsorpci zvýšené hodnoty LA NormR, R nad 1,2, tak byla přítomnost protilátek LA vyloučena. Pacient byl léčen rivaroxabanem.

U pacienta č. 6-4139 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 95,04 %.



Tab. 5: Pacient č. 9-4176

Pacient č. 9-4176			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,55	APTT-FS, R	1,02
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>35,70</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>24,20</b>
RivaHLRT, µg/l	6,20	RivaHLRT, µg/l	/
<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>149,90</b>	<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>0,00</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>96,20</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>33,60</b>
LA scr, R	3,08	LA scr, R	1,08
<b>LA konf, sec</b>	<b>66,70</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>35,40</b>
LA konf, R	2,08	LA konf, R	1,11
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,48</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,97</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>43,30</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>33,30</b>
APTT LA, R	1,42	APTT LA, R	1,04

Před neutralizací se pacient č. 9-4176 jeví jako pozitivní, jelikož hladina LA NormR, R je 1,48 a poměry ostatních testů jsou také prodloužené. Po provedení neutralizace došlo ke zkrácení časů a hladina LA NormR, R klesla na 0,97, což může být označeno jako negativní výsledek pro přítomnost protilátek LA. V případě přetrvání pozitivivity by byly následně provedeny testy podle metodiky ČHS.

Jako první test na přímý inhibitor byly použity reagenty na stanovení rivaroxabanu, jelikož je to nejčastěji využívaný DOAC. Jelikož byly hladiny před adsorpcí nízké, byl proveden test na přítomnost dabigatranu (DTI Dabi), což se následně potvrdilo. Pacient tedy užívá přímý inhibitor proti trombinu. Také je zajímavé, že u tohoto přímého inhibitoru došlo k úplnému vyvázání z plazmy, a tudíž nemůže dojít k žádnému zkreslení výsledků.

U pacienta č. 9-4176 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 100 %.

Tab. 6: Pacient č. 9-4195

Pacient č. 9-4195			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,30	APTT-FS, R	0,87
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>30,00</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>20,60</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>326,30</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>4,60</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>145,90</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>46,30</b>
LA scr, R	4,68	LA scr, R	1,48
<b>LA konf, sec</b>	<b>81,10</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>38,80</b>
LA konf, R	2,53	LA konf, R	1,21
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,85</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,25</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>49,80</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>37,90</b>
APTT LA, R	1,63	APTT LA, R	1,19

U pacienta č. 9-4195 jsou velmi vysoké hodnoty u všech testů, které byly provedeny před neutralizací. LA NormR, R je 1,85, což by mohlo značit pozitivní výsledek. Následně byla provedena neutralizace, kdy došlo k vyvázání velkého množství přímého inhibitoru, rivaroxabanu. Hodnota klesla z 326,3 µg/l na 4,6 µg/l. Ovšem hodnota LA NormR, R zůstává nad hranicí 1,2. I přesto, že je tato hodnota na dolní hranici, tak je tento pacient označen jako hraničně pozitivní pro přítomnost protilátek LA.

Při hraničně pozitivních výsledcích bývá ošetřujícímu lékaři doporučeno opakovat vyšetření LA s odstupem minimálně 12 týdnů. Zvýšené hodnoty normalizovaného poměru mohou být způsobeny i probíhajícím onemocněním, které není nijak spojeno s antifosfolipidovým syndromem, jelikož dochází ke zvýšení hladin u všech protilátek v těle, včetně LA.

U pacienta č. 9-4195 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 98,59 %.

Tab. 7: Pacient č. 21-4107

Pacient č. 21-4107			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,27	APTT-FS, R	0,89
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>29,40</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>20,50</b>
<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>186,70</b>	<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>15,60</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>148,70</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>41,60</b>
LA scr, R	4,44	LA scr, R	1,24
<b>LA konf, sec</b>	<b>85,00</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>35,70</b>
LA konf, R	2,66	LA konf, R	1,12
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,67</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,11</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>37,80</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>27,20</b>
APTT LA, R	1,28	APTT LA, R	0,92

U pacienta č. 21-4107 jsou zvýšené hodnoty testů APTT citlivých i necitlivých na LA před adsorpcí. Poměry LA scr, R a LA konf, R jsou také vyšší oproti fyziologickým mezím, 0,8–1,2. Nejdůležitější parametr, normalizovaný poměr, má hodnoty před neutralizací 1,67, což může značit přítomnost protilátek LA. Po provedení neutralizace došlo k poklesu u všech stanovovaných testů a LA NormR, R klesl pod hranici positivity na 1,11. U tohoto pacienta tedy můžeme vyloučit protilátky LA. Pacient byl léčen dabigatranem.

U pacienta č. 21-4107 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 91,64 %.

Tab. 8: Pacient č. 25-4158

Pacient č. 25-4158			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,94	APTT-FS, R	1,02
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>44,70</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,50</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>739,70</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>18,40</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>148,80</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>38,50</b>
LA scr, R	4,44	LA scr, R	1,15
<b>LA konf, sec</b>	<b>92,30</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>33,50</b>
LA konf, R	2,88	LA konf, R	1,05
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,54</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,10</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>51,50</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,90</b>
APTT LA, R	1,75	APTT LA, R	1,08

Pacient č. 25-4158 užívá jako přímý inhibitor rivaroxaban a lze vidět, že hodnota před neutralizací byla 739,7 µg/l a po neutralizaci 18,4 µg/l. Došlo tedy k téměř

40násobnému vyvázání inhibitoru. Pokud by se neprovedla neutralizace přímých inhibitorů, mohlo by dojít k mylnému označení výsledků jako falešně pozitivních.

Hodnota LA NormR, R je před přidavkem DOAC-Stop tablet 1,54, což by vedlo k potvrzení protilátek LA v těle pacienta. Kromě LA NormR, R jsou také zvýšené testy APTT citlivé i necitlivé na přítomnost LA. Vysoké poměry jsou i u testů LA scr, R a LA konf, R. Po provedení neutralizace došlo k poklesu hladin u všech testů na fyziologické rozmezí, tedy 0,8–1,2 a byla vyloučena přítomnost protilátek LA.

U pacienta č. 25-4158 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 97,51 %.

Tab. 9: Pacient č. 23-4090

Pacient č. 23-4090			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,06	APTT-FS, R	0,85
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>24,60</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>19,70</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>184,30</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>9,20</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>80,00</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>37,50</b>
LA scr, R	2,39	LA scr, R	1,12
<b>LA konf, sec</b>	<b>54,00</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>32,60</b>
LA konf, R	1,69	LA konf, R	1,02
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,41</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,10</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>33,90</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>28,00</b>
APTT LA, R	1,15	APTT LA, R	0,95

Pacient č. 23-4090 má zvýšené poměry testů LA scr, R a LA konf, R, ale hodnoty testů APTT-FS, R a APTT LA, R jsou negativní. Výsledek LA NormR, R je před neutralizací 1,41, což by bez vyvázání přímého inhibitoru vedlo k potvrzení falešné positivity na přítomnost protilátek LA.

Po provedení neutralizace pomocí DOAC-Stop tabletek došlo k vyvázání přímého inhibitoru, rivaroxabanu, z 184,3 µg/l na 9,2 µg/l, čímž se limituje chybné určení diagnózy. Poměry screeningových a konfirmačních testů klesly na fyziologickou hladinu a hodnota LA NormR, R klesla na 1,1, což vylučuje přítomnost protilátek LA.

U pacienta č. 23-4090 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 95,01 %.

Tab. 10: Pacient č. 23-4069

Pacient č. 23-4069			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,90	APTT-FS, R	1,13
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>44,00</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>26,00</b>
<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>204,20</b>	<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>25,90</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>97,50</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>33,00</b>
LA scr, R	2,91	LA scr, R	0,99
<b>LA konf, sec</b>	<b>79,40</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>33,60</b>
LA konf, R	2,48	LA konf, R	1,05
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,17</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,94</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>51,00</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,70</b>
APTT LA, R	1,73	APTT LA, R	1,07

U pacienta č. 23-4069 jsou před neutralizací zvýšené hladiny testů APTT citlivé i necitlivé na přítomnost LA. Nad fyziologické rozmezí jsou také poměry testů LA scr, R a LA konf, R. Ovšem nejdůležitější hodnota, LA NormR, R, jejíž poměr je 1,17 je pod hranicí positivity, a proto se může vyloučit přítomnost protilátek LA už před provedením adsorpce.

Po vyvázání přímého inhibitoru došlo k poklesu hodnot u všech provedených testů a nepřítomnost protilátek se potvrdila. Pacient používá jako přímý inhibitor proti trombinu, dabigatran. Lze vidět, že po provedení neutralizace sice došlo k vyvázání většiny inhibitoru, ale číslo je stále vyšší, 25,9 µg/l. Není jisté, proč zde nedošlo k většímu vyvázání léčiva. Jedna z možností je, že nedošlo k dostatečné inkubaci vzorku pacienta s DOAC-Stop tabletkami.

U pacienta č. 23-4069 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 87,32 %.

Tab. 11: Pacient č. 24-4082

Pacient č. 24-4082			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,05	APTT-FS, R	1,00
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>24,20</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,10</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>38,40</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>8,40</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>48,10</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>36,90</b>
LA scr, R	1,44	LA scr, R	1,10
<b>LA konf, sec</b>	<b>39,70</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>32,90</b>
LA konf, R	1,24	LA konf, R	1,03
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,16</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,07</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>27,90</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>27,20</b>
APTT LA, R	0,95	APTT LA, R	0,92

Hodnoty přímého inhibitoru, rivaroxabanu, u tohoto pacienta, č. 24-4082, nebyly před neutralizací příliš vysoké. Aby se ale potvrdilo správné fungování tablet DOAC-Stop byla provedena neutralizace a hodnota rivaroxabanu klesla z 38,4 µg/l na 8,4 µg/l.

Poměry testů APTT-FS, R a APTT LA, R jsou před neutralizací negativní. Lehce zvýšené jsou hodnoty testů LA scr, R a LA konf, R. Hodnota LA NormR, R byla před použitím tablet DOAC-Stop 1,16, což je hraničně negativní výsledek. Provedením neutralizace byly původní hladiny testů LA scr, R a LA konf, R sníženy na fyziologické rozmezí a hodnota LA NormR, R klesla na 1,07. Nepřítomnost protilátek byla tedy provedením neutralizace potvrzena.

U pacienta č. 24-4082 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 78,12 %.

Tab. 12: Pacient č. 5-358

Pacient č. 5-358			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,02	APTT-FS, R	0,85
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,50</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>19,70</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>151,40</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>10,10</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>89,60</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>42,50</b>
LA scr, R	2,67	LA scr, R	1,27
<b>LA konf, sec</b>	<b>54,20</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>33,00</b>
LA konf, R	1,69	LA konf, R	1,03
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,58</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,23</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,30</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>27,90</b>
APTT LA, R	1,06	APTT LA, R	0,95

Pacient č. 5-358 má zvýšené hodnoty poměrů u testů LA scr, R a LA konf, R. Hodnoty poměrů u testů APTT citlivých i necitlivých na LA jsou negativní. Před provedením neutralizace je také zvýšený poměr LA NormR, R, jehož hodnota je 1,58.

Po vyvázání rivaroxabanu zůstává stále zvýšená hladina LA scr, R, ale také LA NormR, R, jejíž výsledek je 1,23. Takto slabě zvýšené hodnoty mohou vést k potvrzení přítomnosti protilátek LA, ale je třeba udělat podrobnější testy. Ošetřujícímu lékaři je poslána zpráva s informací, aby byl pacient znovu zkontrolován minimálně po 12 týdnech. Zvýšené hodnoty LA NormR, R mohou být ale i pacientů, které prodělávají jiné onemocnění, a z tohoto důvodu došlo ke zvýšeným hladinám protilátek. Proto je důležité, aby byl pacient průběžně monitorován a aby se případná léčba zahájila v čas.

U pacienta č. 5-358 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 93,33 %.

Tab. 13: Pacient č. 11-4048

Pacient č. 11-4048			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,26	APTT-FS, R	1,12
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>29,20</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>25,90</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>138,90</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>18,10</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>57,60</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>33,40</b>
LA scr, R	1,72	LA scr, R	1,00
<b>LA konf, sec</b>	<b>48,50</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>32,70</b>
LA konf, R	1,52	LA konf, R	1,02
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,13</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,98</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>33,10</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>30,50</b>
APTT LA, R	1,12	APTT LA, R	1,03

Pacient č. 11-4048 má před neutralizací zvýšené hodnoty APTT-FS, R, LA scr, R a LA konf, R. Hodnoty testů APTT LA, R, a hlavně LA NormR, R jsou negativní, což vylučuje přítomnost protilátek.

Po vyvázání přímého inhibitoru, rivaroxabanu, došlo k poklesu u všech již výše zmíněných testů. Hladina LA NormR, R je po adsorpci 0,98 a tudíž se může potvrdit nepřítomnost protilátek LA.

I u tohoto pacienta si lze všimnout, že sice došlo k vyvázání přímého inhibitoru, hodnota klesla z 138,9 µg/l na 18,1 µg/l, ale hodnota po neutralizaci by mohla být nižší.

U pacienta č. 11-4048 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 86,97 %.

Tab. 14: Pacient č. 14-4036

Pacient č. 14-4036			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,00	APTT-FS, R	1,03
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,10</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,80</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>80,90</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>11,60</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>46,10</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>38,70</b>
LA scr, R	1,38	LA scr, R	1,16
<b>LA konf, sec</b>	<b>39,90</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>34,90</b>
LA konf, R	1,25	LA konf, R	1,09
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,10</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,06</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>30,30</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>29,90</b>
APTT LA, R	1,03	APTT LA, R	1,01

Pacient č. 14-4036 má před neutralizací negativní výsledky testů APTT-FS, R, APTT LA, R, a především LA NormR, R, která vylučuje přítomnost protilátek na LA. Mírně jsou zvýšené hodnoty poměrů screeningových a konfirmačních. Po provedení adsorpce došlo ke snížení hodnot u všech testů na fyziologické rozmezí, a tudíž je vyloučena přítomnost protilátek.

Hodnoty rivaroxabanu, stejně jako u předchozího vzorku, jsou i po neutralizaci vyšší.

U pacienta č. 14-4036 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 85,66 %.

Tab. 15: Pacient č. 10-408

Pacient č. 10-408			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	0,88	APTT-FS, R	0,93
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>20,40</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>21,50</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>18,00</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>9,70</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>40,70</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>37,00</b>
LA scr, R	1,21	LA scr, R	1,10
<b>LA konf, sec</b>	<b>34,10</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>33,00</b>
LA konf, R	1,07	LA konf, R	1,03
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,13</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,07</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>27,70</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>27,70</b>
APTT LA, R	0,94	APTT LA, R	0,94

Hodnoty všech testů jsou u pacienta č. 10-408 před neutralizací negativní. Lehce je zvýšen pouze poměr LA scr, R, jelikož obsahuje malé množství



fosfolipidů. Z těchto výsledků lze vyloučit přítomnost protilátek LA. Po provedení adsorpce byla nepřítomnost protilátek potvrzena. Došlo i poklesu u původně zvýšeného screeningového testu.

Hodnoty APTT citlivých i necitlivých na LA jsou po neutralizaci stejné nebo vyšší než před adsorpcí. Toto může být způsobeno dlouhým čekáním mezi jednotlivými analýzami nebo také tím, že se pracuje se zamraženými vzorky a hodnoty v jednotlivých alikvotech nemusí být stejné. Přímý inhibitor, rivaroxaban, byl vyvázan pouze z poloviny.

U pacienta č. 10-408 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 46,11 %.

Tab. 16: Pacient č. 4-4073

Pacient č. 4-4073			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,35	APTT-FS, R	0,97
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>31,20</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>22,30</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>331,00</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>8,80</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>101,50</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>36,80</b>
LA scr, R	3,03	LA scr, R	1,10
<b>LA konf, sec</b>	<b>67,60</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>32,20</b>
LA konf, R	2,11	LA konf, R	1,01
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,44</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,09</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>34,80</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>27,50</b>
APTT LA, R	1,18	APTT LA, R	0,93

U pacienta č. 4-4073 jsou před vyvážením přímého inhibitoru zvýšené hodnoty poměrů APTT-FS, R LA scr, R a LA konf, R. Normalizovaný poměr je před adsorpcí 1,44, což by bez vyvážení vedlo k potvrzení falešně pozitivního výsledku. Po provedení neutralizace došlo k poklesu hladin u všech testů včetně LA NormR, R. Jeho hladina je po adsorpci 1,09, tudíž může být přítomnost protilátek LA vyloučena.

Také došlo k velkému vyvážení přímého inhibitoru, rivaroxabanu, za využití DOAC-Stop tablet, kdy hladina před neutralizací byla 331,0 µg/l, a po adsorpci klesla na 8,8 µg/l.

U pacienta č. 4-4073 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 97,34 %.

Tab. 17: Pacient č. 3-4027

Pacient č. 3-4027			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,06	APTT-FS, R	0,96
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>24,40</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>22,20</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>79,00</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>12,20</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>55,20</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>35,00</b>
LA scr, R	1,65	LA scr, R	1,04
<b>LA konf, sec</b>	<b>42,90</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>30,80</b>
LA konf, R	1,34	LA konf, R	0,96
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,23</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,08</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>29,60</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>27,90</b>
APTT LA, R	1,00	APTT LA, R	0,95

U pacienta č. 3-4027 lze pozorovat lehce zvýšené hodnoty testů LA scr, R a LA konf, R před neutralizací. Vyšší hodnoty jsou také u LA NormR, R, která je 1,23. Stejně jako u předchozího pacienta by mylně mohlo dojít k potvrzení falešné positivity na přítomnost protilátek LA. Ovšem po provedení neutralizace je hodnota normalizovaného poměru 1,08 a u pacienta byl vyloučen výskyt protilátek. Screeningové a konfirmační testy jsou po adsorpci také negativní.

Hodnoty přímého inhibitoru, rivaroxabanu, byly po neutralizaci 12,20 µg/l.

U pacienta č. 3-4027 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 84,56 %.

Tab. 18: Pacient č. 2-0050

Pacient č. 2-0050			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,75	APTT-FS, R	1,16
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>38,80</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>25,70</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>263,10</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>10,50</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>85,50</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>35,10</b>
LA scr, R	2,50	LA scr, R	1,03
<b>LA konf, sec</b>	<b>62,90</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>34,10</b>
LA konf, R	1,97	LA konf, R	1,07
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,27</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,96</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>41,50</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,10</b>
APTT LA, R	1,41	APTT LA, R	1,04

Pacient č. 2-0050 má zvýšené hodnoty APTT-FS, R a APTT LA, R před provedením neutralizace. Jsou také zvýšené poměry screeningového a konfirmačního testu. Pozitivní je také normalizovaný poměr, který může ukazovat na přítomnost LA.

Po vyvázání přímého inhibitoru ze vzorku došlo k poklesu hodnot u všech výše zmíněných testů. LA NormR, R je po neutralizaci 0,96, což u tohoto pacienta vylučuje přítomnost protilátek.

Původní hladina přímého inhibitoru, rivaroxabanu, byla 263,1 µg/l, a po adsorpci klesla hladina na 10,5 µg/l. Došlo tedy k 26násobnému vyvázání inhibitoru.

U pacienta č. 2-0050 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 96,01 %.

Tab. 19: Pacient č. 4-4114

Pacient č. 4-4114			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	0,93	APTT-FS, R	0,91
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>20,60</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>20,10</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>265,50</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>8,90</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>60,10</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>37,00</b>
LA scr, R	1,76	LA scr, R	1,08
<b>LA konf, sec</b>	<b>42,40</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>29,50</b>
LA konf, R	1,33	LA konf, R	0,92
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,32</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,17</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>30,00</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>28,60</b>
APTT LA, R	1,00	APTT LA, R	0,95

U pacienta č. 4-4114 si lze povšimnout, že provedené testy APTT, citlivé i necitlivé na přítomnost LA, byly před neutralizací negativní. Vyšší poměry byly u testů LA scr, R a LA konf, R. Jako pozitivní se také jevil výsledek normalizovaného poměru, který byl před vyvázáním inhibitoru 1,32.

Po adsorpci došlo ke snížení hladin poměrů screeningového a konfirmačního testu. LA NormR, R klesl na 1,17, čímž by se měla vyloučit přítomnost protilátek. Ovšem takový výsledek je hraničně negativní, a z důvodu prevence by měl ošetřující lékař pacienta poslat na kontrolu minimálně po 12 týdnech, aby se nepřítomnost protilátek potvrdila.

Stejně jako u předchozích pacientů, i zde jsou vysoké hodnoty rivaroxabanu před neutralizací, 265,5 µg/l. Po vyvázání inhibitoru pomocí DOAC-Stop tabletek došlo k 29násobnému vyvázání a hodnoty rivaroxabanu klesly na 8,9 µg/l.

U pacienta č. 4-4114 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 96,65 %.

Tab. 20: Pacient č. 12-4065

Pacient č. 12-4065			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	3,92	APTT-FS, R	1,00
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>87,00</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>22,10</b>
<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>510,00</b>	<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>20,90</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>214,30</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>32,80</b>
LA scr, R	6,27	LA scr, R	0,96
<b>LA konf, sec</b>	<b>190,20</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>35,50</b>
LA konf, R	5,94	LA konf, R	1,11
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,06</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,86</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>90,20</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>28,70</b>
APTT LA, R	3,01	APTT LA, R	0,96

Zde, u pacienta č. 12-4065 si lze všimnout vysokých poměrů u testů APTT citlivých i necitlivých na LA. Vysoké hodnoty jsou u poměrů screeningových a konfirmačních testů. Velmi vysoké číslo je také u přímého inhibitoru, dabigatranu, 510 µg/l. Takto vysoké hodnoty mohou být způsobené tím, že pacient šel na odběr chvíli potom, co užil lék. Nejvyšší hladiny přímých inhibitorů lze měřit během 2–4 hodin po požití. Z tohoto důvodu mohou být prodloužené i ostatní testy, oproti fyziologicky zdravým pacientům. Ovšem hladina normalizovaného poměru je před vyvázáním inhibitoru 1,06, což vylučuje přítomnost protilátek LA.

Po provedení neutralizace lze vidět značný pokles u všech prováděných testů, kdy se výsledky dostaly až na fyziologické rozmezí. LA NormR, R klesl ještě více, na 0,86, čímž se potvrdila nepřítomnost protilátek. Také si lze povšimnout velkého rozdílu koncentrací dabigatranu před a po neutralizaci, kdy došlo k téměř 25násobnému vyvázání.

U pacienta č. 12-4065 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 95,90 %.

Tab. 21: Pacient č. 28-4094

Pacient č. 28-4094			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	2,19	APTT-FS, R	1,18
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>48,60</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>26,10</b>
<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>92,00</b>	<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>16,00</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>67,00</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>40,50</b>
LA scr, R	1,96	LA scr, R	1,18
<b>LA konf, sec</b>	<b>64,90</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>39,80</b>
LA konf, R	2,03	LA konf, R	1,24
<b>LA NormR, R</b>	<b>0,97</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,95</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>51,90</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>37,70</b>
APTT LA, R	1,73	APTT LA, R	1,26

Pacient č. 28-4094 má před neutralizací zvýšené poměry u testů APTT-FS, R, APTT LA, R, LA scr, R a LA konf, R. Ovšem normalizovaný poměr je negativní, a tudíž lze vyloučit přítomnost protilátek LA už před adsorpcí.

Po vyvázání přímého inhibitoru došlo k poklesu u dvou zmíněných testů na fyziologické rozmezí, a to u APTT necitlivého na LA a u screeningového testu. Konfirmační test a APTT citlivý na LA zůstávají po neutralizaci lehce nad hladinou fyziologických hodnot. LA NormR, R zůstává i po adsorpci stále negativní, takže lze vyloučit protilátky LA.

U přímého inhibitoru, dabigatranu, došlo pouze k necelému 6násobnému vyvázání. Toto může být způsobeno krátkou dobou inkubace DOAC-Stop tabletek ve vzorku pacienta.

U pacienta č. 28-4094 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 82,61 %.

Tab. 22: Pacient č. 26-0083

Pacient č. 26-0083			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,66	APTT-FS, R	1,04
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>36,90</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,00</b>
<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>226,00</b>	<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>15,10</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>98,60</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>37,00</b>
LA scr, R	2,88	LA scr, R	1,08
<b>LA konf, sec</b>	<b>93,20</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>37,10</b>
LA konf, R	2,91	LA konf, R	1,16
<b>LA NormR, R</b>	<b>0,99</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,93</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>41,10</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>29,10</b>
APTT LA, R	1,37	APTT LA, R	0,97

U pacienta č. 26-0083 jsou zvýšené poměry u testů APTT citlivých i necitlivých na přítomnost LA. Vyšší hladiny jsou také u poměrů screeningového a konfirmačního testu před neutralizací. I přes všechny pozitivní hodnoty testů zůstává LA NormR, R na hladině 0,99, což znamená, že LA protilátky nejsou přítomné.

Po adsorpci klesly všechny hodnoty provedených testů pod hranici positivity a hodnota normalizovaného poměru se snížila na 0,93, čímž se může potvrdit nepřítomnost protilátek LA.

Koncentrace dabigatranu klesla z 226 µg/l na 15,1 µg/l. U pacienta č. 26-0083 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 93,32 %.

Tab. 23: Pacient č. 5-4001

Pacient č. 5-4001			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,72	APTT-FS, R	1,32
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>38,10</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>29,30</b>
<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>48,70</b>	<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>11,10</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>70,20</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>37,20</b>
LA scr, R	2,05	LA scr, R	1,09
<b>LA konf, sec</b>	<b>55,20</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>35,50</b>
LA konf, R	1,73	LA konf, R	1,11
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,18</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,98</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>43,40</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>34,20</b>
APTT LA, R	1,45	APTT LA, R	1,14

Pacient č. 5-4001 má zvýšené hodnoty poměrů u testů APTT citlivých i necitlivých na přítomnost LA, screeningových a konfirmačních testů. LA NormR, R je 1,18, což je hraničně negativní výsledek a bez vyvázání přímého inhibitoru by mohl být tento pacient mylně testován pro přítomnost LA. Jelikož hodnota normalizovaného poměru po neutralizaci je 0,98, a tudíž lze vyloučit přítomnost protilátek.

Po adsorpci došlo také k poklesu poměrů u všech předchozích testů, kromě APTT-FS, R, u něhož zůstává hodnota lehce zvýšena. Přímý inhibitor, dabigatran, byl vyvázán pouze 4násobně.

U pacienta č. 5-4001 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 77,21 %.

Tab. 24: Pacient č. 4-415

Pacient č. 4-415			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	3,63	APTT-FS, R	1,33
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>80,60</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>29,60</b>
<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>470,30</b>	<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>10,20</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>208,60</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>37,70</b>
LA scr, R	6,10	LA scr, R	1,10
<b>LA konf, sec</b>	<b>141,50</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>36,00</b>
LA konf, R	4,42	LA konf, R	1,13
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,38</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,97</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>87,00</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>35,00</b>
APTT LA, R	2,90	APTT LA, R	1,17

Pacient č. 4-415 má velmi vysoké poměry u testů APTT-FS, R, LA scr, R, LA konf, R a APTT LA, R. Zvýšeným poměrům také odpovídají prodloužené časy. Před neutralizací je velmi vysoká koncentrace přímého inhibitoru, dabigatranu, která je 470,3 µg/l. Takto vysoká koncentrace může být způsobená tím, že pacient požíval lék 2–4 hodiny předtím, než mu byl proveden odběr, jelikož v tomto časovém rozmezí nastává nejvyšší plazmatická koncentrace inhibitorů. Toto může být také důvod prodloužených časů a vysokých hladin poměrů u všech provedených testů. I výsledek normalizovaného poměru je před adsorpcí pozitivní a bez vyvázání přímého inhibitoru by mohlo dojít k potvrzení falešné positivity na přítomnost LA protilátek.

Po neutralizaci došlo ke snížení hladin poměrů u screeningového, konfirmačního i APTT testu citlivého na přítomnost LA. Jenom test APTT necitlivý na LA zůstává lehce nad fyziologickým rozmezím. LA NormR, R je po vyvázání inhibitoru 0,97, a proto může být vyloučena přítomnost protilátek LA.

U tohoto pacienta také došlo k velmi výraznému vyvázání dabigatranu, z 470,3 µg/l na 10,2 µg/l.

U pacienta č. 4-415 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 97,83 %.

Tab. 25: Pacient č. 2-212

Pacient č. 2-212			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,64	APTT-FS, R	1,06
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>36,40</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,60</b>
<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>109,90</b>	<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>6,20</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>91,60</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>35,10</b>
LA scr, R	2,68	LA scr, R	1,03
<b>LA konf, sec</b>	<b>69,20</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>35,60</b>
LA konf, R	2,16	LA konf, R	1,11
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,24</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,93</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>44,40</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>30,20</b>
APTT LA, R	1,48	APTT LA, R	1,01

Pacient č. 2-212 má před neutralizací zvýšené hladiny APTT testu citlivého i necitlivého na přítomnost LA. Před adsorpcí jsou také vyšší poměry u screeningového a konfirmačního testu. LA NormR, R je 1,24, což by bez vyvázání přímého inhibitoru mohlo vést k falešně pozitivní diagnóze na přítomnost protilátek LA.

Po adsorpci došlo ke snížení poměrů u všech provedených testů včetně normalizovaného poměru. Výskyt LA protilátek byl tedy vyloučen.

Koncentrace dabigatranu před neutralizací byla 109,9 µg/l a po adsorpci klesla na 6,2 µg/l. Inkubace DOAC-Stop tabletek byla ve vzorku tohoto pacienta dostatečná.

U pacienta č. 2-212 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 94,36 %.



Tab. 26: Pacient č. 2-492

Pacient č. 2-492			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	2,37	APTT-FS, R	1,06
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>52,60</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,60</b>
<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>304,40</b>	<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>9,40</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>153,70</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>34,60</b>
LA scr, R	4,49	LA scr, R	1,01
<b>LA konf, sec</b>	<b>110,80</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>35,40</b>
LA konf, R	3,46	LA konf, R	1,11
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,30</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,91</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>60,80</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>30,80</b>
APTT LA, R	2,03	APTT LA, R	1,03

U pacienta č. 2-492 si lze povšimnout poměrně vysokých hodnot poměrů, jak u testů APTT citlivých i necitlivých na přítomnost LA, tak i u screeningových a konfirmačních testů. I LA NormR, R je před neutralizací 1,3, což by mohlo mylně vést k potvrzení přítomnosti protilátek LA, pokud by nedošlo k vyvázání přímého inhibitoru. Po adsorpci došlo k poklesu poměrů u všech provedených testů na fyziologické rozmezí. Hladina normalizovaného poměru je po neutralizaci 0,91, a tudíž se může vyloučit přítomnost protilátek LA.

Koncentrace dabigatranu před adsorpcí byla 304,4 µg/l, a po vyvázání inhibitoru byla koncentrace 9,4 µg/l.

U pacienta č. 2-492 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 96,91 %.

Tab. 27: Pacient č. 4-365

Pacient č. 4-365			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	2,77	APTT-FS, R	1,33
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>61,50</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>29,50</b>
<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>247,20</b>	<b>DTI Dabi, µg/l</b>	<b>9,40</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>162,20</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>37,90</b>
LA scr, R	4,74	LA scr, R	1,11
<b>LA konf, sec</b>	<b>103,30</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>36,10</b>
LA konf, R	3,23	LA konf, R	1,13
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,47</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,98</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>65,50</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>34,20</b>
APTT LA, R	2,18	APTT LA, R	1,14

Před vyvázáním přímého inhibitoru má pacient č. 4-365 zvýšené poměry testů APTT citlivého i necitlivého na přítomnost LA. Vysoké jsou také poměry u testů LA scr, R a LA konf, R. Normalizovaný poměr je před neutralizací 1,47, což by bez vyvázání inhibitoru mohlo vést k falešně pozitivním výsledkům.

Po adsorpci klesly hodnoty poměrů screeningového a konfirmačního testu na fyziologické rozmezí. APTT LA, R také klesl na hodnotu 1,14, ale APTT-FS, R zůstává nadále lehce zvýšen. LA NormR, R klesl po neutralizaci na 0,98, a tudíž může být přítomnost protilátek LA vyloučena.

Koncentrace dabigatranu klesla z 247,2 µg/l na 9,4 µg/l, takže se přímý inhibitor vyvázal 27krát.

U pacienta č. 4-365 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 96,20 %.

Tab. 28: Pacient č. 22-4081

Pacient č. 22-4081			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,07	APTT-FS, R	1,19
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,80</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>26,50</b>
<b>ApixHLRT, µg/l</b>	<b>663,60</b>	<b>ApixHLRT, µg/l</b>	<b>33,40</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>58,80</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>56,40</b>
LA scr, R	1,72	LA scr, R	1,65
<b>LA konf, sec</b>	<b>44,00</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>44,00</b>
LA konf, R	1,38	LA konf, R	1,38
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,25</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,20</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,90</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>33,90</b>
APTT LA, R	1,06	APTT LA, R	1,13

Pacient č. 22-4081 má před neutralizací zvýšené hladiny poměrů screeningového a konfirmačního testu. Poměry APTT-FS, R a APTT LA, R zůstávají v rámci fyziologických hodnot. Normalizovaný poměr je před adsorpcí 1,25, což může značit přítomnost protilátek LA. Také si lze povšimnout, že pacient užívá apixaban (ApixHLRT) namísto rivaroxabanu. Apixaban, stejně jako rivaroxaban, je přímý inhibitor, který ovlivňuje aktivitu faktoru X. Koncentrace inhibitoru je před vyvázáním 663,6 µg/l.

Po provedení neutralizace nedošlo k žádnému poklesu u provedených testů. Naopak, u některých došlo k mírnému zvýšení nebo poměry zůstávají stejné. Takto lehce zvýšené hodnoty testů po neutralizaci, jako tomu je například APTT-FS, R jsou zanedbatelné, jelikož mezi neutralizací mohlo dojít k větší časové prodlevě, a tím mohl být vzorek ovlivněn. Hodnoty mohou být také ovlivněny i zamrazováním vzorků.

Pozitivní zůstává nadále i normalizovaný poměr. LA NormR, R je po adsorpci 1,2 a takovýto pacient je označen jako pozitivní. Ošetřujícímu lékaři je následně sdělen výsledek s tím, že by se pacient měl dostavit na kontrolu minimálně za 12 týdnů, aby se diagnóza potvrdila, či vyvrátila.

Koncentrace apixabanu klesla z 663,6 µg/l na 33,4 µg/l. Došlo tedy k 20násobnému vyvázání přímého inhibitoru.

U pacienta č. 22-4081 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 94,97 %.

Tab. 29: Pacient č. 18-4089

Pacient č. 18-4089			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,43	APTT-FS, R	1,10
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>31,70</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>24,50</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>322,60</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>15,30</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>106,90</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>45,40</b>
LA scr, R	3,13	LA scr, R	1,33
<b>LA konf, sec</b>	<b>67,10</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>38,00</b>
LA konf, R	2,10	LA konf, R	1,19
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,49</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,12</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>37,70</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,30</b>
APTT LA, R	1,26	APTT LA, R	1,04

U pacienta č. 18-4089 byly před neutralizací zvýšené poměry u testů APTT citlivých i necitlivých na přítomnost LA. Vyšší poměry byly také u LA scr, R a LA konf, R. Normalizovaný poměr je před adsorpcí 1,49, což by mohlo vést k mylné diagnóze, že protilátky LA jsou přítomné.

Po vyvázání rivaroxabanu došlo ke snížení poměrů u APTT-FS, R a APTT LA, R. Poměr u konfirmačního testu je hraniční a poměr u screeningového testu je stále lehce zvýšený. LA NormR, R je po neutralizaci 1,12, což vylučuje přítomnost protilátek LA.

Koncentrace rivaroxabanu byla před vyvázáním 322,6 µg/l a po adsorpci byla 15,3 µg/l, tudíž došlo k 21násobnému vyvázání přímého inhibitoru.

U pacienta č. 18-4089 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 95,26 %.

Tab. 30: Pacient č. 17-392

Pacient č. 17-392			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	0,95	APTT-FS, R	1,01
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>21,10</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>22,40</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>28,00</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>15,40</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>43,70</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>44,10</b>
LA scr, R	1,28	LA scr, R	1,29
<b>LA konf, sec</b>	<b>36,10</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>38,70</b>
LA konf, R	1,13	LA konf, R	1,21
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,13</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,07</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>30,40</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>32,40</b>
APTT LA, R	1,01	APTT LA, R	1,08

Před neutralizací má pacient č. 17-392 zvýšené poměry u testů LA scr, R. APTT-FS, R, APTT LA, R a La konf, R jsou negativní. Normalizovaný poměr je před adsorpcí také negativní, čímž lze vyloučit přítomnost protilátek LA.

Po vyvázání přímého inhibitoru se nepřítomnost protilátek potvrdila, jelikož normalizovaný poměr byl po neutralizaci 1,07. Hodnoty poměru u ostatních provedených testů jsou také negativní, kromě screeningového testu. LA scr, R je po adsorpci 1,29, což je ještě lehce vyšší než před neutralizací. Mírně zvýšené hodnoty po vyvázání inhibitoru mohou být způsobené časovou prodlevou mezi analýzami.

Koncentrace rivaroxabanu byla před adsorpcí 28,0 µg/l a po vyvázání byla 15,4 µg/l. Inkubace DOAC-Stop tabletek by tedy měla být delší, aby došlo k výraznějšímu vyvázání přímého inhibitoru.

U pacienta č. 17-392 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 45,00 %.

Tab. 31: Pacient č. 23-4092

Pacient č. 23-4092			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,08	APTT-FS, R	1,28
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,90</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>28,40</b>
<b>ApixHLRT, µg/l</b>	<b>165,90</b>	<b>ApixHLRT, µg/l</b>	<b>36,60</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>52,00</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>49,00</b>
LA scr, R	1,52	LA scr, R	1,43
<b>LA konf, sec</b>	<b>43,60</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>41,30</b>
LA konf, R	1,36	LA konf, R	1,29
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,12</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,11</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>34,20</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>35,70</b>
APTT LA, R	1,14	APTT LA, R	1,19

Pacient č. 23-4092 má před neutralizací zvýšené hodnoty poměrů u screeningového a konfirmačního testu. APTT-FS, R a APTT LA, R mají hodnoty poměrů v normě. Normalizovaný poměr je před adsorpcí 1,12, a proto lze vyloučit přítomnost protilátek LA.

Po vyvázání přímého inhibitoru, apixabanu, si lze povšimnout, že některé výsledky testů jsou vyšší než před neutralizací. Konkrétně je to zvýšený poměr a prodloužený čas u APTT-FS a APTT LA. Takto prodloužené výsledky po adsorpci mohou být způsobené delšími časovými prodlevami mezi jednotlivými analýzami. Zvýšené hladiny APTT mohou také poukazovat na sníženou aktivitu koagulačních faktorů, ale takové závěry by musely být potvrzeny provedením směsných testů.

Důležité je, že hladina normalizovaného poměru po neutralizaci klesla na 1,11, proto se může potvrdit nepřítomnost protilátek LA.

U pacienta č. 23-4092 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 77,94 %.

Tab. 32: Pacient č. 13-0050

Pacient č. 13-0050			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,25	APTT-FS, R	1,19
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>27,7</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>26,40</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>241,70</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>15,90</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>64,20</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>41,80</b>
LA scr, R	1,88	LA scr, R	1,22
<b>LA konf, sec</b>	<b>52,40</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>39,10</b>
LA konf, R	1,64	LA konf, R	1,22
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,15</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,00</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>33,50</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>33,90</b>
APTT LA, R	1,12	APTT LA, R	1,13

Pacient č. 13-0050 má před vyvázáním přímého inhibitoru zvýšené hodnoty poměrů APTT-FS, R, LA scr, R a LA konf, R. Hodnota poměru u testu APTT citlivého na přítomnost LA je 1,12, tudíž je ve fyziologickém rozmezí. Normalizovaný poměr je před neutralizací 1,15, a proto může být přítomnost protilátek LA vyloučena.

Po adsorpci zůstávají lehce zvýšené hodnoty u screeningového a konfirmačního testu. APTT-FS, R je negativní. LA NormR, R je po vyvázání rivaroxabanu 1,0, což potvrzuje nepřítomnost protilátek.

Koncentrace rivaroxabanu byla před neutralizací 241,7 µg/l a po adsorpci 15,9 µg/l. U tohoto pacienta tedy došlo k 16násobnému vyvázání přímého inhibitoru.

U pacienta č. 13-0050 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 93,42 %.

Tab. 33: Pacient č. 27-5014

Pacient č. 27-5014			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	0,99	APTT-FS, R	1,07
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>22,00</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,70</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>47,60</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>11,80</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>43,70</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>36,90</b>
LA scr, R	1,28	LA scr, R	1,08
<b>LA konf, sec</b>	<b>40,50</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>37,60</b>
LA konf, R	1,27	LA konf, R	1,18
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,01</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,92</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>29,30</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>27,90</b>
APTT LA, R	0,98	APTT LA, R	0,93

Před neutralizací jsou u pacienta č. 27-5014 lehce zvýšené poměry u screeningového a konfirmačního testu. Hodnota LA NormR, R je 1,01, čímž se může vyloučit přítomnost protilátek LA.

Po vyvázání přímého inhibitoru si lze povšimnout zvýšených hodnot poměrů a prodloužených časů u APTT necitlivého na přítomnost LA. Toto může být způsobeno opakovaným zamrazováním vzorku nebo časovou prodlevou mezi provedením neutralizace u vzorku. Hodnoty poměru u LA scr, R a LA konf, R po adsorpci poklesly na fyziologické rozmezí. Normalizovaný poměr je 0,92, a tím lze potvrdit nepřítomnost protilátek LA.

Koncentrace rivaroxabanu byla před neutralizací 47,6 µg/l a po byla koncentrace 11,8 µg/l. Inkubace DOAC-Stop tabletek by mohla ve vzorku pacienta probíhat déle, aby došlo k výraznějšímu vyvázání.

U pacienta č. 27-5014 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 75,21 %.



Tab. 34: Pacient č. 5-4104

Pacient č. 5-4104			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,05	APTT-FS, R	1,03
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,20</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>22,90</b>
<b>ApixHLRT, µg/l</b>	<b>276,80</b>	<b>ApixHLRT, µg/l</b>	<b>35,80</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>62,40</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>43,10</b>
LA scr, R	1,82	LA scr, R	1,26
<b>LA konf, sec</b>	<b>53,50</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>39,40</b>
LA konf, R	1,67	LA konf, R	1,23
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,09</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,02</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>30,80</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,00</b>
APTT LA, R	1,03	APTT LA, R	1,03

Pacient č. 5-4104 má před vyvázáním zvýšené hodnoty screeningového a konfirmačního testu. APTT-FS, R a APTT LA, R jsou ve fyziologickém rozmezí. Normalizovaný poměr je 1,09, tudíž lze vyloučit přítomnost protilátek LA.

Po provedení neutralizace zůstávají poměry LA scr, R a LA konf, R nadále lehce zvýšeny. Poměry testů APTT citlivých a necitlivých na přítomnost LA jsou nadále fyziologické. LA NormR, R je po adsorpci 1,02, což potvrzuje nepřítomnost protilátek.

Pacient užívá místo rivaroxabanu, apixaban, který rovněž ovlivňuje aktivitu faktoru X. Koncentrace apixabanu byla před neutralizací 276,8 µg/l, po vyvázání přímého inhibitoru klesla koncentrace na 35,8 µg/l.

U pacienta č. 5-4104 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 87,07 %.

Tab. 35: Pacient č. 28-4051

Pacient č. 28-4051			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,19	APTT-FS, R	1,17
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>26,40</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>25,90</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>106,30</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>15,90</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>60,90</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>36,60</b>
LA scr, R	1,78	LA scr, R	1,07
<b>LA konf, sec</b>	<b>50,70</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>38,10</b>
LA konf, R	1,58	LA konf, R	1,19
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,13</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,90</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>41,60</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>32,10</b>
APTT LA, R	1,39	APTT LA, R	1,07

Poměr u testu APTT-FS, R byl před neutralizací u pacienta č. 28-4051 1,19, což je hraničně negativní. Ostatní poměry testů, screeningový, konfirmační a APTT LA, R test byly lehce zvýšené. Normalizovaný poměr byl před adsorpcí 1,13, což vylučuje přítomnost protilátek LA.

Po vyvázání přímého inhibitoru, rivaroxabanu, došlo k poklesu hodnot u všech provedených testů. Pouze poměr u testu APTT necitlivého na přítomnost LA a LA konf, R zůstávají hraniční. LA NormR, R klesl na hodnotu 0,9, což potvrzuje nepřítomnost protilátek.

Původní koncentrace rivaroxabanu byla 106,3 µg/l a po neutralizaci klesla koncentrace na 15,9 µg/l. Došlo tedy pouze k 7násobnému vyvázání.

U pacienta č. 28-4051 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 85,04 %.

Tab. 36: Pacient č. 3-0061

Pacient č. 3-0061			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	2,21	APTT-FS, R	1,12
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>49,10</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>24,90</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>530,00</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>7,70</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>119,50</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>34,60</b>
LA scr, R	3,49	LA scr, R	1,01
<b>LA konf, sec</b>	<b>82,70</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>35,50</b>
LA konf, R	2,58	LA konf, R	1,11
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,35</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,91</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>49,20</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,30</b>
APTT LA, R	1,67	APTT LA, R	1,04

Před neutralizací byly u pacienta č. 3-0061 prodlouženy všechny poměry testů, tedy testy APTT-FS, R, LA scr, R, LA konf, R a APTT LA, R. Normalizovaný poměr byl před adsorpcí 1,35, což by mohlo mylně vést k falešné pozitivitě na přítomnost protilátek LA. Velmi vysoká je také koncentrace rivaroxabanu, která je před vyvázáním 530,0 µg/l. Toto může být způsobeno tím, že pacient prozřel lék 2–4 hodiny předtím, než mu byla odebrána krev. Maximální plazmatická koncentrace nastává u přímých inhibitorů právě 2–4 hodiny po pozření léku.

Po adsorpci došlo k poklesu hodnot u všech provedených testů. Normalizovaný poměr klesl na 0,91, čímž může být vyloučena přítomnost protilátek LA.

Koncentrace rivaroxabanu klesla po neutralizaci na 7,7 µg/l, takže došlo k téměř 76násobnému vyvázání přímého inhibitoru.

U pacienta č. 3-0061 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 98,55 %.

Tab. 37: Pacient č. 3-0060

Pacient č. 3-0060			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,67	APTT-FS, R	1,10
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>37,00</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>24,50</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>278,40</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>8,90</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>83,90</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>34,90</b>
LA scr, R	2,45	LA scr, R	1,02
<b>LA konf, sec</b>	<b>63,00</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>35,30</b>
LA konf, R	1,97	LA konf, R	1,10
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,24</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,93</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>41,00</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,00</b>
APTT LA, R	1,39	APTT LA, R	1,03

Pacient č. 3-0060 měl před neutralizací zvýšené poměry u testů APTT-FS, R, LA scr, R, LA konf, R a APTT LA, R. Normalizovaný poměr byl před adsorpcí 1,24, což by mohlo vést k falešné pozitivitě na přítomnost protilátek LA.

Po vyvázání přímého inhibitoru došlo k poklesu hodnot poměrů u všech provedených testů. Normalizovaný poměr klesl na 0,93, a tudíž může být vyloučena přítomnost protilátek.

Koncentrace rivaroxabanu byla před neutralizací 278,4 µg/l a po adsorpci klesla na 8,9 µg/l. Došlo tedy k 34násobnému vyvázání. Inkubace DOAC-Stop tabletek byla ve vzorku pacienta dostatečná.

U pacienta č. 3-0060 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 96,80 %.

Tab. 38: Pacient č. 2-0051

Pacient č. 2-0051			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	2,27	APTT-FS, R	1,11
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>50,50</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>24,60</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>520,10</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>10,30</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>121,40</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>34,80</b>
LA scr, R	3,55	LA scr, R	1,02
<b>LA konf, sec</b>	<b>81,50</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>35,50</b>
LA konf, R	2,55	LA konf, R	1,11
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,39</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,92</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>50,00</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,50</b>
APTT LA, R	1,69	APTT LA, R	1,05

Pacient č. 2-0051 měl před neutralizací zvýšené hodnoty u testů APTT citlivých i necitlivých na přítomnost LA. Zvýšený byl také screeningový a konfirmační poměr. LA NormR, R byl před adsorpcí 1,39, což by mohlo vést k mylnému potvrzení přítomnosti protilátek LA, pokud by nedošlo k vyvázání přímého inhibitoru.

Po neutralizaci došlo k poklesu u všech provedených testů. Normalizovaný poměr klesl na 0,92, tudíž lze přítomnost protilátek vyloučit.

Původní koncentrace rivaroxabanu byla 520,1 µg/l a po adsorpci klesla koncentrace na 10,3 µg/l. Přímý inhibitor se tedy vyvázal 52krát, čímž se potvrzuje dostatečná inkubace DOAC-Stop tabletek ve vzorku pacienta.

U pacienta č. 2-0051 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 98,02 %.

Tab. 39: Pacient č. 25-4065

Pacient č. 25-4065			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,15	APTT-FS, R	1,05
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>25,50</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,40</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>215,60</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>3,10</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>49,50</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>33,10</b>
LA scr, R	1,45	LA scr, R	0,97
<b>LA konf, sec</b>	<b>49,40</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>33,80</b>
LA konf, R	1,54	LA konf, R	1,06
<b>LA NormR, R</b>	<b>0,94</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,92</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>33,90</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>30,70</b>
APTT LA, R	1,13	APTT LA, R	1,02

Pacient č. 25-4065 měl před neutralizací testy APTT citlivé i necitlivé na přítomnost LA negativní. LA scr, R bylo před neutralizací 1,45 a LA konf, R bylo 1,54. Tyto zvýšené hodnoty by mohly ukazovat na přítomnost LA protilátek, ale vzhledem k negativitě normalizovaného poměru, který byl před adsorpcí přímého inhibitoru 0,94, mohou být protilátky vyloučeny.

Po vyvázání rivaroxabanu došlo k poklesu u screeningového i konfirmačního testu na fyziologické rozmezí a LA NormR, R klesl na 0,92. Nepřítomnost protilátek LA je tedy potvrzena.

Koncentrace rivaroxabanu byla před neutralizací 215,60 µg/l, a po adsorpci klesla hladina na 3,10 µg/l. Došlo tedy k 70násobnému vyvázání přímého.

U pacienta č. 25-4065 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 98,56 %.

Tab. 40: Pacient č. 16-4210

Pacient č. 16-4210			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,43	APTT-FS, R	1,08
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>31,70</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>23,90</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>642,90</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>41,30</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>95,30</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>39,60</b>
LA scr, R	2,79	LA scr, R	1,16
<b>LA konf, sec</b>	<b>80,50</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>37,00</b>
LA konf, R	2,52	LA konf, R	1,16
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,11</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,00</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>39,90</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,90</b>
APTT LA, R	1,33	APTT LA, R	1,06

Před neutralizací byly u pacienta č. 16-4210 zvýšené poměry u testů APTT citlivých i necitlivých na přítomnost LA protilátek a zvýšené poměry byly také u testů LA scr, R a LA konf, R. Normalizovaný poměr byl před adsorpcí 1,11, čímž může být přítomnost protilátek LA vyloučena. Hladina přímého inhibitoru, rivaroxbanu, byla před vyvázáním 642,90 µg/l, což může být způsobeno tím, že pacient užil lék 2–4 hodiny před odběry krve. Takto vysoké plazmatické koncentrace přímých inhibitorů nastávají právě po 2–4 hodinách po požití léku.

Po neutralizaci lze vidět, že testy APTT-FS, R a APTT LA, R klesly na fyziologické rozmezí. Screeningový a konfirmační test jsou negativně hraniční, ale jelikož poměr normalizovaného testu byl před i po adsorpci negativní, můžeme přítomnost protilátek vyloučit.

Koncentrace rivaroxabanu klesla po vyvázání na 41,30 µg/l, tudíž došlo k 15násobnému vyvázání přímého inhibitoru.

U pacienta č. 16-4210 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 93,58 %.

Tab. 41: Pacient č. 19-4090

Pacient č. 19-4090			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,30	APTT-FS, R	1,11
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>28,90</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>24,70</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>347,40</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>21,60</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>66,90</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>39,30</b>
LA scr, R	1,96	LA scr, R	1,15
<b>LA konf, sec</b>	<b>61,10</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>36,60</b>
LA konf, R	1,91	LA konf, R	1,14
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,03</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>1,01</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>37,30</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,90</b>
APTT LA, R	1,24	APTT LA, R	1,06

U pacienta č. 19-4090 lze vidět, že poměry testů APTT citlivých i necitlivých na přítomnost protilátek LA byly před neutralizací zvýšeny. Stejně tak i poměry testů LA scr, R a LA konf, R. Poměr normalizovaného poměru byl před adsorpcí 1,03, což nijak neukazuje na přítomnost protilátek v těle pacienta.

Po vyvázání přímého inhibitoru došlo k poklesu u všech výše zmíněných testů. Poměr LA NormR, R zůstává stále negativní, 1,01, a proto můžeme přítomnost protilátek LA vyloučit.

Koncentrace přímého inhibitoru byla před neutralizací 347,40 µg/l a po adsorpci byla hladina rivaroxabanu 21,60 µg/l. Došlo tedy k 16násobnému vyvázání.

U pacienta č. 19-4090 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 92,78 %.



Tab. 42: Pacient č. 19-4111

Pacient č. 19-4111			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,64	APTT-FS, R	1,08
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>36,30</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>24,00</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>293,70</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>8,80</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>92,00</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>36,50</b>
LA scr, R	2,69	LA scr, R	1,07
<b>LA konf, sec</b>	<b>66,90</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>36,20</b>
LA konf, R	2,09	LA konf, R	1,13
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,29</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,95</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>39,40</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,00</b>
APTT LA, R	1,31	APTT LA, R	1,03

Před neutralizací byly u pacienta č. 19-4111 zvýšené poměry testů APTT-FS, R, APTT LA, R a screeningové i konfirmační poměry. LA NormR, R má poměr před adsorpcí 1,29, což by bez vyvázání přímého inhibitoru mohlo vést k falešné pozitivitě na přítomnost protilátek LA.

Po neutralizaci došlo k poklesu hladin poměrů u testů APTT citlivých i necitlivých na přítomnost protilátek LA, LA scr, R a LA konf, R. Normalizovaný poměr byl po adsorpci 0,95, čímž mohou být protilátky LA vyloučeny.

Koncentrace přímého inhibitoru, rivaroxabanu, byla před vyvázáním 293,70 µg/l a po neutralizaci 8,80 µg/l. Rivaroxaban byl tedy ze vzorku plazmy pacienta vyvázán 36krát. U pacienta č. 19-4111 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 97,00 %.

Tab. 43: Pacient č. 25-55

Pacient č. 25-55			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,23	APTT-FS, R	1,08
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>28,60</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>25,20</b>
<b>ApixHLRT, µg/l</b>	<b>135,80</b>	<b>ApixHLRT, µg/l</b>	<b>4,40</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>51,90</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>35,40</b>
LA scr, R	1,52	LA scr, R	1,04
<b>LA konf, sec</b>	<b>48,70</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>34,20</b>
LA konf, R	1,52	LA konf, R	1,07
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,00</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,97</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>36,00</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>32,10</b>
APTT LA, R	1,20	APTT LA, R	1,07

U pacienta č. 25-55 byly před neutralizací zvýšeny poměry u testů APTT citlivých i necitlivých na přítomnost LA. Stejně tak jsou i vyšší poměry u LA scr, R a LA konf, R. Normalizovaný poměr byl před adsorpcí 1,00, což ovšem vylučuje přítomnost protilátek LA.

Po vyvázání přímého inhibitoru došlo k poklesu všech poměrů u již výše zmíněných testů a LA NormR, R byl 0,97, čímž je potvrzena nepřítomnost protilátek.

Koncentrace apixabanu byla před neutralizací 135,80 µg/l a po vyvázání klesla na 4,40 µg/l. Přímý inhibitor byl tedy vyvázán 33krát.

U pacienta č. 25-55 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 96,76 %.

Tab. 44: Pacient č. 25-4015

Pacient č. 25-4015			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,30	APTT-FS, R	1,12
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>30,30</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>26,00</b>
<b>ApixHLRT, µg/l</b>	<b>212,10</b>	<b>ApixHLRT, µg/l</b>	<b>21,90</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>68,40</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>38,30</b>
LA scr, R	2,00	LA scr, R	1,12
<b>LA konf, sec</b>	<b>60,00</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>36,50</b>
LA konf, R	1,88	LA konf, R	1,14
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,06</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,98</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>38,20</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>33,30</b>
APTT LA, R	1,27	APTT LA, R	1,11

Pacient č. 25-4015 má před adsorpcí zvýšené hodnoty poměrů a screeningových a konfirmačních testů. Také jsou zvýšené poměry u testů APTT-FS, R a APTT LA, R. Normalizovaný poměr byl před neutralizací 1,06, což nijak nenaznačuje přítomnost protilátek LA.

Po vyvázání přímého inhibitoru, apixabanu, došlo k poklesu hodnot u všech provedených testů. LA NormR, R byl po adsorpci 0,98, a tím se může vyloučit přítomnost protilátek LA.

Množství apixabanu bylo před vyvázáním 212,10 µg/l, a po adsorpci klesla koncentrace na 21,90 µg/l.

U pacienta č. 25-4015 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 89,67 %.

Tab. 45: Pacient č. 25-301

Pacient č. 25-301			
Před neutralizací		Po neutralizaci	
APTT-FS, R	1,53	APTT-FS, R	1,09
<b>APTT-FS, sec</b>	<b>35,70</b>	<b>APTT-FS, sec</b>	<b>25,30</b>
<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>274,00</b>	<b>RivaHLRT, µg/l</b>	<b>3,90</b>
<b>LA scr, sec</b>	<b>79,20</b>	<b>LA scr, sec</b>	<b>36,50</b>
LA scr, R	2,32	LA scr, R	1,07
<b>LA konf, sec</b>	<b>60,20</b>	<b>LA konf, sec</b>	<b>36,80</b>
LA konf, R	1,88	LA konf, R	1,15
<b>LA NormR, R</b>	<b>1,23</b>	<b>LA NormR, R</b>	<b>0,93</b>
<b>APTT LA, sec</b>	<b>38,00</b>	<b>APTT LA, sec</b>	<b>31,50</b>
APTT LA, R	1,27	APTT LA, R	1,05

Před neutralizací byly u pacienta č. 25-301 zvýšeny hodnoty poměrů u testů APTT citlivých i necitlivých na přítomnost protilátek LA. Také byly zvýšeny poměry u testů LA scr, R a LA konf, R. Normalizovaný poměr byl před adsorpcí 1,23, což by bez vyvázání přímého inhibitoru mohlo falešně poukazovat na přítomnost protilátek LA.

Po vyvázání rivaroxabanu došlo k poklesu hodnot poměrů u všech výše zmíněných testů, především LA NormR, R. Normalizovaný poměr klesl na 0,93, čímž se přítomnost protilátek LA může vyloučit.

Koncentrace rivaroxabanu byla před adsorpcí 274,00 µg/l a po neutralizací byla hodnota přímého inhibitoru 3,90 µg/l. Došlo tedy k 91násobnému vyvázání.

U pacienta č. 25-301 je procentuální pokles vyvázaného DOAC 98,58 %.

## 6 DISKUSE

Pro výzkumnou část byly získány vzorky lidské plazmy od 45 pacientů, které byly zpracovány v Oblastní Nemocnici Kladno, a.s. Všechny vzorky byly testovány na aktivovaný parciální tromboplastinový čas, jednou citlivý na přítomnost lupus antikoagulans a po druhé necitlivý na přítomnost lupus antikoagulans. Také byly provedeny testy screeningové a konfirmační, z nichž se následně vypočítával normalizovaný poměr, jakožto hlavní indikátor pozitivity. Jako poslední parametr se měřila koncentrace přímých inhibitorů (rivaroxabanu, dabigatranu a apixabanu). Všechny testy byly provedeny před a po adsorpci přímých inhibitorů pomocí DOAC-Stop tabletek. Hlavním cílem bylo ze získaných výsledků zjistit, k jak velké interferenci, vlivem přímých inhibitorů dochází, jestliže jsou pacienti testováni na lupus antikoagulans a zároveň jsou dočasně léčeni právě přímými inhibitory. Ve skupině 45 pacientů byl jako přímý inhibitor nejvíce zastoupený rivaroxaban, který byl užíván 29 pacienty. Následoval dabigatran, jenž užívalo 11 pacientů a nejméně zastoupený byl apixaban, se kterým se v době výzkumu léčilo 5 pacientů. Hladina rivaroxabanu se před neutralizací pohybovala v rozmezí od 18,00  $\mu\text{g/l}$  do 739,70  $\mu\text{g/l}$ . Po vyvázání rivaroxabanu kolísala koncentrace od 3,10  $\mu\text{g/l}$  do 41,30  $\mu\text{g/l}$ . U dabigatranu byla hladina před adsorpcí mezi 48,70–510,00  $\mu\text{g/l}$ . Po neutralizaci DOAC-Stop tabletkami kleslo rozmezí koncentrací na 0,00–25,90  $\mu\text{g/l}$ . Hladina apixabanu byla před vyvázáním v rozmezí od 135,80  $\mu\text{g/l}$  do 663,60  $\mu\text{g/l}$ . Po adsorpci došlo k poklesu rozmezí koncentrací od 4,40  $\mu\text{g/l}$  do 36,60  $\mu\text{g/l}$ . Z těchto čísel je velmi zřetelný pokles hladin přímých inhibitorů, když došlo k jejich vyvázání pomocí DOAC-Stop tabletek. Pro jednotlivé tabulky byly vypočítány i procentuální poklesy vyvázání, jejichž průměr byl 90,31 %. Výsledky procentuálních poklesů jsou navíc také podpořeny grafickým znázorněním měřených hodnot koncentrací přímých inhibitorů před a po adsorpci s využitím DOAC-Stop tabletek u všech 45 pacientů, jak je znázorněno v *přílohách 1–3*. U všech testů před adsorpcí vycházely prodloužené hodnoty, které znemožňovaly potvrzení diagnózy pacienta. Po vyvázání je znatelný pokles u všech provedených testů a většina z nich klesla na negativní hodnoty. Před adsorpcí je normalizovaný poměr u 22 pacientů nad hranicí positivity, tedy  $>1,2$ . To je skoro 50 % testovaných pacientů, kteří mohli být diagnostikováni jako falešně pozitivní. Po vyvázání přímých inhibitorů zůstala hodnota normalizovaného poměru pozitivní pouze u 3 pacientů. Poměry u těchto pacientů byly lehce nad 1,2, takže nelze usuzovat na přítomnost lupus antikoagulans. U pacientů, jejichž

hladina normalizovaného poměru zůstává pozitivní i po neutralizaci, se doporučuje další testování minimálně po 12 týdnech, případně provedení směsných testů, aby se vyloučily jiné koagulopatie. Přítomnost antifosfolipidových protilátek musí být následně potvrzena provedením testů jako ELISA, APTT citlivé na LA nebo dRVVT.

Ve studii vedenou *Kesel a Devreese, 2020* byly koncentrace apixabanu před ošetřením DOAC-Stop tabletkami v rozmezí od 43 µg/l do 688 µg/l, rivaroxabanu od 35 µg/l do 604 µg/l a dabigatranu od 30 µg/l do 250 µg/l. Všechny 3 DOAC způsobily prodloužení screeningových testů a APTT, a z celkových 43 pacientů byly pozitivní výsledky nalezeny u 29 pacientů a pouze u 14 zůstaly negativní. Využitím DOAC-Stop tabletek došlo k výraznému zkrácení doby srážení, hlavně u screeningových testů, a z původních 29 pozitivních pacientů zůstalo jenom 6, takže 19 vzorků se po vyvázání stalo negativními. Pozitivní vzorky přetrvaly u pacientů, kteří se léčí s APS nebo měli mnohočetné nevyprovokované trombózy, či měli jiné autoimunitní onemocnění (*De Kesel a Devreese, 2020*).

Studie vedená *Linskens et al., 2022* zkoumala 35 pacientů, kteří byli léčeni pomocí DOAC a zároveň byli testováni na přítomnost aPL. U 33 z 35 pacientů byly testy na LA pozitivní. Po využití DOAC-Stop tabletek se u 28 z původních 33 pozitivních vzorků projevíly testy jako negativní. Zůstalo tedy pouze 5 pacientů pozitivních, jeden léčen dabigatranem, tři léčení rivaroxabanem a poslední léčen edoxabanem. Jeden vzorek byl od pacienta, který se již léčí s APS a zbylé vzorky byly od pacientů, kteří mají malou pravděpodobnost na výskyt APS, jelikož hladiny provedených testů byly na dolní hranici a pacienti neprošli trombózou nebo těhotenskými komplikacemi. Po >12 týdnech byli tito 4 pacienti znovu testováni s negativními výsledky na přítomnost aPL (*Linskens et al., 2022*).

Ve studii od *Savola et al., 2022* bylo ze všech 50 analyzovaných vzorků 48 pozitivních ve screeningovém testu na přítomnost LA před odstraněním DOAC. Všechny vzorky pacientů v této studii byly vybrány na základě možné interference DOAC. Došlo k prodloužení jak u screeningového testu, tak i u testů aPTT. Po využití DOAC-Stop tabletek došlo ke snížení času srážení u obou testů. Ze 48 původně pozitivních vzorků zůstal pouze 1 pozitivní. Tento pacient měl normalizovaný poměr 1,25, a tudíž neleze vyloučit možnost přítomnosti aPL. DOAC-Stop tabletky snížily po vyvázání rozmezí koncentrací přímých inhibitorů na 0–15 µg/l (*Savola et al., 2022*).

V následující studii od *Favresse et al., 2018* bylo získáno 135 vzorků plazmy od pacientů, kteří jsou léčeni DOAC. Z celkového množství se 38 pacientů léčí

apixabanem, 40 dabigatranem, 15 edoxabanem a 42 rivaroxabanem. Plazmatické koncentrace se před použitím DOAC-Stop pohybovaly u apixabanu mezi 10–316 µg/l, u dabigatranu mezi 2–406 µg/l, u edoxabanu mezi 21–354 µg/l a u rivaroxabanu mezi 7–456 µg/l. Po použití DOAC-Stop došlo k významnému poklesu koncentrací jednotlivých přímých inhibitorů. Zbytkové hladiny každého DOAC byly nižší než limit kvantifikace odpovídajících testů pro přímé inhibitory. Ve studii potvrdili, že u všech DOAC byly zjištěny falešně pozitivní výsledky na testování LA a že k vyvázání DOAC použili právě DOAC-Stop tabletky, ale bohužel nejsou ve studii uvedené přesné hodnoty pozitivních vzorků před a po adsorpci (*Favresse et al., 2018*).

V další studii, *Baker et al., 2021*, shromáždili 73 vzorků testovaných na přítomnost LA od 71 pacientů. Z celkového počtu pacientů se 38 z nich léčilo s apixabanem, 26 s rivaroxabanem, 6 s argatrobanem a 3 s dabigatranem. Před neutralizací bylo 35 pozitivních vzorků, ale po vyvázání přímých inhibitorů DOAC-Stop tabletkami se odstranilo 29 falešně pozitivních vzorků na základě normalizovaného poměru. Zůstalo pouze 6 pozitivních pacientů (*Baker et al., 2021*).

Je důležité zmínit, že metoda využívající DOAC-Stop je komerční reagentie, která je spojena s náklady pro klinickou laboratoř. Tato reagentie by měla být používána pouze u vzorků pacientů, kde je zdokumentovaná probíhající terapie pomocí DOAC, a to jednak za účelem snížení výdajů pro laboratoř, tak i ke snížení možnosti falešných výsledků přítomnosti LA ve vzorcích neléčených DOAC. DOAC-Stop je účinný při snižování interference DOAC a nijak významně neovlivňuje testy běžně používané při testování LA a umožňují identifikaci pacientů splňující kritéria pro APS, včetně trojnásobně pozitivních pacientů (*Baker et al., 2021*).

## 7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zaměřit se na antifosfolipidový syndrom, jeho historii, možnou terapii a klinické projevy, které mají velmi široké působení, od bolesti hlavy, trombózy až po těhotenské komplikace či cévní mozkové příhody. Klinické projevy jsou často projevem přítomnosti antifosfolipidových protilátek, které se mohou detekovat koagulačními testy nebo metodou ELISA, v závislosti na charakteru protilátek.

Část pacientů, která se léčí s různými koagulačními problémy, může být léčena přímými inhibitory, což ovšem při diagnóze lupusu může být velká komplikace. Při testování takovýchto vzorků se využívá DOAC-Stop tabletek, které mají za úkol vyvázat co největší množství přímého inhibitoru, bez ohledu na to, zda jsou to inhibitory proti faktoru X nebo faktoru II. Po neutralizaci inhibitorů se vzorky testují znovu a tentokrát už by výsledky testů neměly být prodloužené a pracovníci laboratoře mají větší šanci zamezit falešné pozitivitě. Pokud by u pacientů i nadále přetrvávala pozitivita, musí se hodnotit aktuální stav pacienta (tedy případná přítomnost akutního onemocnění), kdy dochází ke zvyšování všech protilátek v těle, včetně lupus antikoagulans. Také se vzorek testuje směsnými testy, aby se mohla zachytit například snížená aktivita některého z faktorů koagulační kaskády. Pokud se tyto možnosti vyloučí, je ošetřujícímu lékaři předána zpráva s doporučením opakovaného testování po >12 týdnech. Přítomnost antifosfolipidových protilátek je následně potvrzena testy APTT citlivé na lupus nebo dRVVT pro lupus antikoagulans, či metodou ELISA pro protilátky proti kardiolipinu nebo  $\beta_2$ -glykoproteinu-1.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ADHIKARI A, CHISTI MM, BASTOLA S et al.: Rare case of catastrophic antiphospholipid syndrome with spontaneous intracranial haemorrhage. *BMJ Case Reports*. **2019**, 12(3), e227171.
2. AGENO W: Rivaroxaban: An Evaluation of its Cardiovascular Benefit–Risk Profile Across Indications Based on Numbers Needed to Treat or Harm, and on Clinically Meaningful Endpoint Comparisons. *Drugs in R&D*. **2015**, 15(4), 295-306.
3. ALIJOTAS-REIG J, ESTEVE-VALVERDE E, ANUNCIACIÓN-LLUNELL A et al.: Pathogenesis, Diagnosis and Management of Obstetric Antiphospholipid Syndrome: A Comprehensive Review. *Journal of Clinical Medicine*. **2022**, 11(3), 675.
4. ALJOHANI MM, CHINNAPPAN R, EISSA S et al.: In Vitro Selection of Specific DNA Aptamers Against the Anti-Coagulant Dabigatran Etexilate. *Scientific Reports*. **2018**, 8(1), 13290.
5. AMBATI A, ZUO Y a KNIGHT JS: An update on inflammation in antiphospholipid syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*. **2023**, 35(2), 89-97.
6. ARACHCHILLAGE DRJ a PERICLEOUS Ch: Evolution of Antiphospholipid Syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. **2023**, 49(03), 295-304.
7. ARDILA-SUAREZ O, GÓMEZ-PUERTA JA a KHAMASHTA MA: Diagnosis of antiphospholipid syndrome: From an historical perspective to the emergence of new autoantibodies. *Medicina Clínica (English Edition)*. **2016**, 146(12), 555-560.
8. ARREOLA-DIAZ R, MAJLUF-CRUZ A, SANCHEZ-TORRES LE et al.: The Pathophysiology of The Antiphospholipid Syndrome: A Perspective From The Blood Coagulation System. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. **2022**, 28.
9. ASHERSON RA, CERVERA R, DE GROOT PG et al.: Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus*. **2003**, 12(7), 530-534.
10. BAKER DE: Formulary Drug Review: Betrixaban. *Hospital Pharmacy*. **2018**, 53(1), 29-37.



11. BAKER SA, JIN J, PFAFFROTH Ch et al.: DOAC-Stop in lupus anticoagulant testing: Direct oral anticoagulant interference removed in most samples. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. **2021**, 5(2), 314-325.
12. BERTOLACCINI ML a SANNA G: Recent advances in understanding antiphospholipid syndrome. *F1000Research*. **2016**, 5, 2908.
13. BEYER-WESTENDORF J, VERHAMME P a BAUERSACHS R: Betrixaban for prevention of venous thromboembolism in acute medically ill patients. *European Heart Journal Supplements*. **2018**, 20, E16-E22.
14. BITSADZE V, YAKUBOVA F, KHIZROEVA J et al.: Catastrophic Antiphospholipid Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. **2024**, 25(1), 668.
15. BRADACOVA P, SLAVIK L, ULEHLOVA J et al.: Current Promising Biomarkers and Methods in the Diagnostics of Antiphospholipid Syndrome: A Review. *Biomedicines*. **2021**, 9(2).
16. Buliková A: Antifosfolipidový syndrom – klinické projevy, diagnostika a možnosti léčby, komplikace. *Remedia*. **2016**, 26(5), 439-445.
17. BYON W, GARONZIK S, BOYD RA et al.: Apixaban: A Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Review. *Clinical Pharmacokinetics*. **2019**, 58(10), 1265-1279.
18. CARLIN S a EIKELBOOM JW: Direct oral anticoagulant dose selection: Challenging cases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2021**, 19(11), 2680-2686.
19. CERVERA R, RODRÍGUEZ-PINTÓ I a ESPINOSA G: The diagnosis and clinical management of the catastrophic antiphospholipid syndrome: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*. **2018**, 92, 1-11.
20. CONWAY S E, HWANG A Y, PONTE ChD et al.: Laboratory and Clinical Monitoring of Direct Acting Oral Anticoagulants: What Clinicians Need to Know. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. **2017**, 37(2), 236-248.
21. CORSINI A, FERRI N, PROIETTI M et al.: Edoxaban and the Issue of Drug-Drug Interactions: From Pharmacology to Clinical Practice. *Drugs*. **2020**, 80(11), 1065-1083.

22. CUKER A, BURNETT A, TRILLER D et al.: Reversal of direct oral anticoagulants: Guidance from the Anticoagulation Forum. *American Journal of Hematology*. **2019**, 94(6), 697-709.
23. DAR S, KOIRALA S, KHAN A et al.: A Comprehensive Literature Review on Managing Systemic Lupus Erythematosus: Addressing Cardiovascular Disease Risk in Females and Its Autoimmune Disease Associations. **2023**, 15(8).
24. DE KESEL PM a DEVREESE KMJ: Direct oral anticoagulant adsorption: Impact on lupus anticoagulant testing—Review of the literature and evaluation on spiked and patient samples. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2020**, 18(8), 2003-2017.
25. DEVREESE KMJ: Antiphospholipid antibody testing and standardization. *International Journal of Laboratory Hematology*. **2014**, 36(3), 352-363.
26. DEVREESE KMJ, DE GROOT PG, DE LAAT B et al.: Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2020**, 18(11), 2828-2839.
27. DEVREESE KMJ, ZUILY S a MERONI PL: Role of antiphospholipid antibodies in the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Journal of Translational Autoimmunity*. **2021**, 4.
28. DHIR V a PINTO B: Antiphospholipid syndrome: A review. *Journal of Mahatma Gandhi Institute of Medical Sciences*. **2014**, 19(1), 19–27.
29. DI MINNO A, FRIGERIO B, SPADARELLA G et al.: Old and new oral anticoagulants: Food, herbal medicines and drug interactions. *Blood Reviews*. **2017**, 31(4), 193-203.
30. DUNOIS C: Laboratory Monitoring of Direct Oral Anticoagulants (DOACs). *Biomedicines*. **2021**, 9(5), 445.
31. EXNER T, MICHALOPOULOS N, PEARCE J et al.: Simple method for removing DOACs from plasma samples. *Thrombosis Research*. **2018**, 163, 117-122.
32. EVANS JM, JENSEN JD a SAMI N: Successful treatment of livedoid vasculopathy with rivaroxaban. *JAAD Case Reports*. **2015**, 1(6), 340-341.
33. FAVA A a PETRI M: Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. *Journal of Autoimmunity*. **2019**, 96, 1-13.

34. FAVRESSE J, LARDINOIS B, SABOR L et al.: Evaluation of the DOAC-Stop® Procedure to Overcome the Effect of DOACs on Several Thrombophilia Screening Tests. *TH Open*. **2018**, 2(2), 202-209.
35. GHEMBAZA A a SAADOUN D: Management of Antiphospholipid Syndrome. *Biomedicines*. **2020**, 8(11), 508.
36. GÓMEZ-PUERTA JA a CERVERA R: Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *Journal of Autoimmunity*. **2014**, 48-49, 20-25.
37. GRZEŚK G, ROGOWICZ D, WOŁOWIEC Ł et al.: The Clinical Significance of Drug–Food Interactions of Direct Oral Anticoagulants. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, 22(16), 8531.
38. HUH JY, YI DY, HWANG SG et al.: Characterization of antiphospholipid antibodies in chronic hepatitis B infection. *The Korean Journal of Hematology*. **2011**, 46(1), 36-40.
39. HUISMAN MV a KLOK FA: Pharmacological properties of betrixaban. *European Heart Journal Supplements*. **2018**, 20, E12-E15.
40. HURST K, O'CALLAGHAN JM a HANDA A: Quick reference guide to apixaban. *Vascular Health and Risk Management*. **2017**, 13, 263-267.
41. CHAN L a PISANO M: Edoxaban (Savaysa): A Factor Xa Inhibitor. *Pharmacy and Therapeutics*. **2015**, 40(10), 651-655.
42. CHATURVEDI S, BRAUNSTEIN EM a BRODSKY RA: Antiphospholipid syndrome: Complement activation, complement gene mutations, and therapeutic implications. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2021**, 19(3), 607-616.
43. CHEN A, STECKER E a WARDEN AB. Direct Oral Anticoagulant Use: A Practical Guide to Common Clinical Challenges. *Journal of the American Heart Association*. **2020**, 9(13), e017559.
44. CHIGHIZOLA CB, GEROSA M a MERONI PL: New Tests to Detect Antiphospholipid Antibodies: Anti-Domain I Beta-2-Glycoprotein-I Antibodies. *Current Rheumatology Reports*. **2014**, 16(2), 402.
45. JAYAKODY ARACHCHILLAGE D a COHEN H: Antiphospholipid syndrome. *Medicine*. **2014**, 42(3), 156-161.
46. JAYAKODY ARACHCHILLAGE D a GREAVES M: The chequered history of the antiphospholipid syndrome. *British Journal of Haematology*. **2014**, 165(5), 609-617.

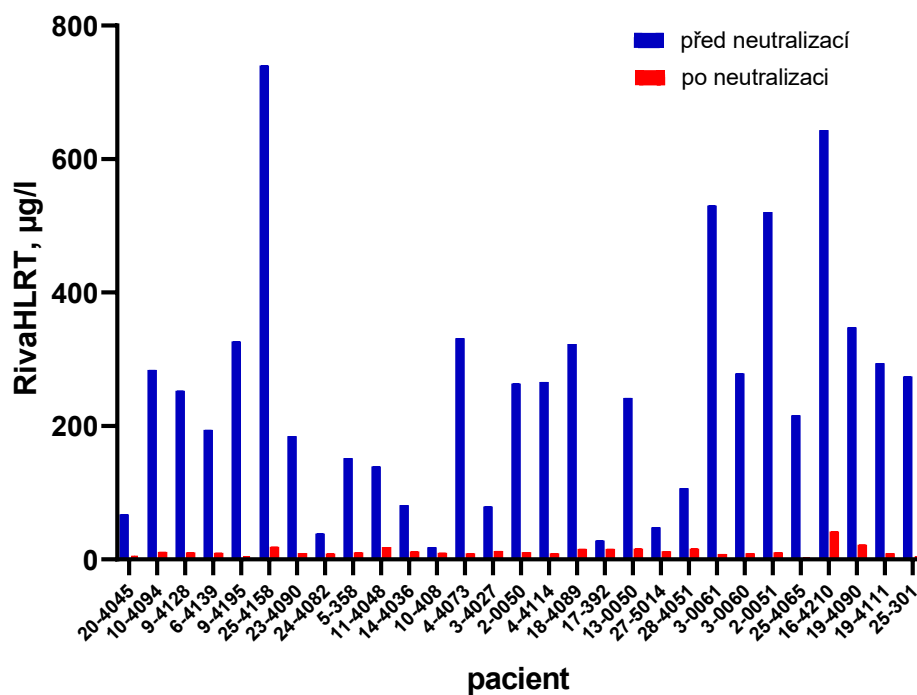
47. JASEMIZAD T a PADHYE LP: Simultaneous analysis of betrixaban and hexazinone using liquid chromatography/tandem mass spectrometry in aqueous solutions. *MethodsX*. **2019**, 6, 1863-1870.
48. JIN H, ZHOU S, YU Y et al.: Panoramic view of clinical features of lupus erythematosus: a cross-sectional multicentre study from China. *Lupus Science & Medicine*. **2023**, 10(1).
49. JOY A, MURALIDHARAN A, ALFARAJ M et al.: The Role of Belimumab in Systemic Lupus Erythematosus: A Systematic Review. *Cureus*. **2022**, 14(6).
50. KAZAZZ NM, MCCUNE WJ a KNIGHT JS: Treatment of catastrophic antiphospholipid syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*. **2016**, 28(3), 218-227.
51. KHAMASHTA M, TARABORELLI M, SCIASCIA S et al.: A. Antiphospholipid syndrome. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. **2016**, 30(1), 133-148.
52. KNIGHT JS, BRANCH DW a ORTEL TL: Antiphospholipid syndrome: advances in diagnosis, pathogenesis, and management. *BMJ*. **2023**, 380:e069717.
53. KOPATZ WF, BRINKMAN HJM a MEIJERS JCM: Use of DOAC Stop for elimination of anticoagulants in the thrombin generation assay. *Thrombosis Research*. **2018**, 170, 97-101.
54. KREUTZ R: Pharmacodynamic and pharmacokinetic basics of rivaroxaban. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. **2012**, 26(1), 27-32.
55. Laboratorní sekce ČHS ČLS JEP. Laboratorní sekce ČHS ČLS JEP. **2019**. Dostupné z: <https://labsekce.hematology.cz/>.
56. LEAL RATO M, BANDEIRA M, ROMÃO VC et al.: Neurologic Manifestations of the Antiphospholipid Syndrome — an Update. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. **2021**, 21(8).
57. LINSKENS EA, DE KESEL P a DEVREESE KMJ: Direct Oral Anticoagulant removal by a DOAC filter: Impact on lupus anticoagulant testing – Evaluation on spiked and patient samples. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. **2022**, 6(2).
58. LOCKSHIN MD a HARRIS EN: History of Antiphospholipid Antibody. In: ERKAN, Doruk a LOCKSHIN, Michael D. (ed.). *Antiphospholipid Syndrome*. Cham: Springer International Publishing, **2017**, 3-11.
59. MARGETIĆ S, GORETA SŠ, ČELAP I et al.: Direct oral anticoagulants (DOACs): From the laboratory point of view. *Acta Pharmaceutica*. **2022**, 72(4), 459-482.

60. MISASI R, LONGO A, RECALCHI S et al.: Molecular Mechanisms of “Antiphospholipid Antibodies” and Their Paradoxical Role in the Pathogenesis of “Seronegative APS.” *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**, 21(21), 8411.
61. MIYAMAE T a KAWABE T: Non-Criteria Manifestations of Juvenile Antiphospholipid Syndrome. *Journal of Clinical Medicine*. **2021**, 10(6), 1240.
62. MUECK W, STAMPFUSS J, KUBITZA D et al.: Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Rivaroxaban. *Clinical Pharmacokinetics*. **2014**, 53(1), 1-16.
63. MURPHY G, GRACE Y, CHAUDRY S et al.: Betrixaban: A Novel Oral Anticoagulant With a New Niche. *Journal of Pharmacy Technology*. **2018**, 34(3), 123-133.
64. NAKAMURA M, YAMADA N a ITO M: Direct Oral Anticoagulants for the Treatment of Venous Thromboembolism in Japan. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. **2017**, 24(6), 560-565.
65. NALLI C, ANDREOLI L, CASU C et al.: Management of Recurrent Thrombosis in Antiphospholipid Syndrome. *Current Rheumatology Reports*. **2014**, 16(3), 405.
66. NEGRINI S, PAPPALARDO F, MURDACA G et al.: The antiphospholipid syndrome: from pathophysiology to treatment. *Clinical and Experimental Medicine*. **2017**, 17(3), 257-267.
67. NG J-W, MOHD TAHIR NA, CHIN PKL et al.: A systematic review and meta-analysis of dabigatran peak and trough concentration in adults. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **2022**, 88 (10), 4443-4459.
68. OLIVEIRA DC, CORREIA A a OLIVEIRA C: The Issue of the Antiphospholipid Antibody Syndrome. *Journal of Clinical Medicine Research*. **2020**, 12(5), 286-292.
69. PAN L, LU M-P, WANG J-H et al.: Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *World Journal of Pediatrics*. **2020**, 16(1), 19-30.
70. PARASRAMPURIA DA. a TRUITT KE: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Edoxaban, a Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant that Inhibits Clotting Factor Xa. *Clinical Pharmacokinetics*. **2016**, 55(6), 641-655.
71. PLATTON S a HUNT Ch: Influence of DOAC Stop on coagulation assays in samples from patients on rivaroxaban or apixaban. *International Journal of Laboratory Hematology*. **2018**, 41(2), 227-233.

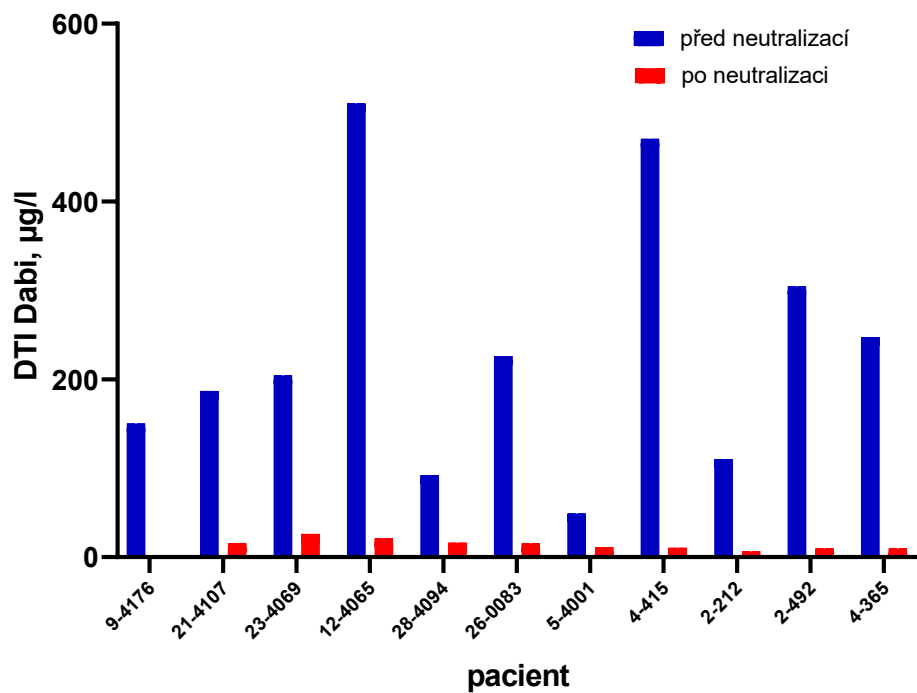
72. PONS-ESTEL GJ a CERVERA R: Renal Involvement in Antiphospholipid Syndrome. *Current Rheumatology Reports*. **2014**, 16(2).
73. RADIN M, CECCHI I, RUBINI E et al.: Treatment of antiphospholipid syndrome. *Clinical Immunology*. **2020**, 221.
74. RADU A, DUDU SC, CIOBANU A et al.: Pregnancy Management in Women with Antiphospholipidic Syndrome. *Maedica (Bucur)*. **2019**, 14(2), 148-160.
75. RAMACCIOTTI E, AGUIAR VCR, JÚNIOR VC et al.: Edoxaban for Venous Thromboembolism Treatment—The New Kid on The Block for Latin America. A Practical Guide. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. **2018**, 24(9), 340-349.
76. RODZIEWICZ M a D'CRUZ DP: An update on the management of antiphospholipid syndrome. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. **2020**, 12.
77. SACHARIDOU A, CHAMBLISS KL, ULRICH V et al.: Antiphospholipid antibodies induce thrombosis by PP2A activation via apoER2-Dab2-SHC1 complex formation in endothelium. *Blood*. **2018**, 131(19), 2097-2110.
78. SAMMARITANO LR: Antiphospholipid syndrome. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. **2020**, 34(1).
79. SAYAR Z, MOLL R, ISENBERG D et al.: Thrombotic antiphospholipid syndrome: A practical guide to diagnosis and management. *Thrombosis Research*. **2021**, 198, 213-221.
80. SAVOLA P, LEMPONEN M, JOUTSI-KORHONEN L et al.: Novel Ex Vivo DOAC Removal Methods Reduce Interference in Lupus Anticoagulant Testing. *Diagnostics*. **2022**, 12(10).
81. SHI J, WANG X, NGUYEN J-H, et al.: Dabigatran etexilate activation is affected by the CES1 genetic polymorphism G143E (rs71647871) and gender. *Biochemical Pharmacology*. **2016**, 119, 76-84.
82. SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS Inc. Sysmex CS-2500 Hemostasis System: Excel with Confidence. Siemens Healthineers. New York, USA: Siemens Healthcare Diagnostics, Dostupné z: <https://marketing.webassets.siemens-healthineers.com/63369b8cda5d18c6/469311628698/LD-Sysmex-CS-2500-OUS-Brochure-11-2022.pdf>, **2022**, 8.

83. STOOTS SA, LIEF L a ERKAN D: Clinical Insights into Diffuse Alveolar Hemorrhage in Antiphospholipid Syndrome. *Current Rheumatology Reports*. **2019**, 21(10).
84. TONG M, VIALI CA a CHAMLEY LW: Antiphospholipid antibodies and the placenta: a systematic review of their in vitro effects and modulation by treatment. *Human Reproduction Update*. **2015**, 21(1), 97-118.
85. TUMIAN NR a HUNT BJ: Clinical Management of Thrombotic Antiphospholipid Syndrome. *Journal of Clinical Medicine*. **2022**, 11(3).
86. VAN DER HORST SFB, MARTENS ESL, DEN EXTER PL et al.: Idarucizumab for dabigatran reversal: A systematic review and meta-analysis of indications and outcomes. *Thrombosis Research*. **2023**, 228, 21-32.
87. VANDEVELDE A a DEVREESE KMJ: Laboratory Diagnosis of Antiphospholipid Syndrome: Insights and Hindrances. *Journal of Clinical Medicine*. **2022**, 11(8), 2164.
88. VU A, QU TT, RYU R et al.: Critical Analysis of Apixaban Dose Adjustment Criteria. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. **2021**, 27.
89. WU T, HUANG W, QI J et al.: Research trends and frontiers on antiphospholipid syndrome: A 10-year bibliometric analysis (2012–2021). *Frontiers in Pharmacology*. **2022**, 13.
90. XOURGIA E a TEKTONIDOU MG: Management of Non-criteria Manifestations in Antiphospholipid Syndrome. *Current Rheumatology Reports*. **2020**, 22(9).
91. ZAVŘELOVÁ J, HRACHOVINOVÁ I, MALÍKOVÁ I et al.: Diagnostika lupus antikoagulans. Doporučení Laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP. **2019**, 1, 1-9.

## 9 PŘÍLOHY

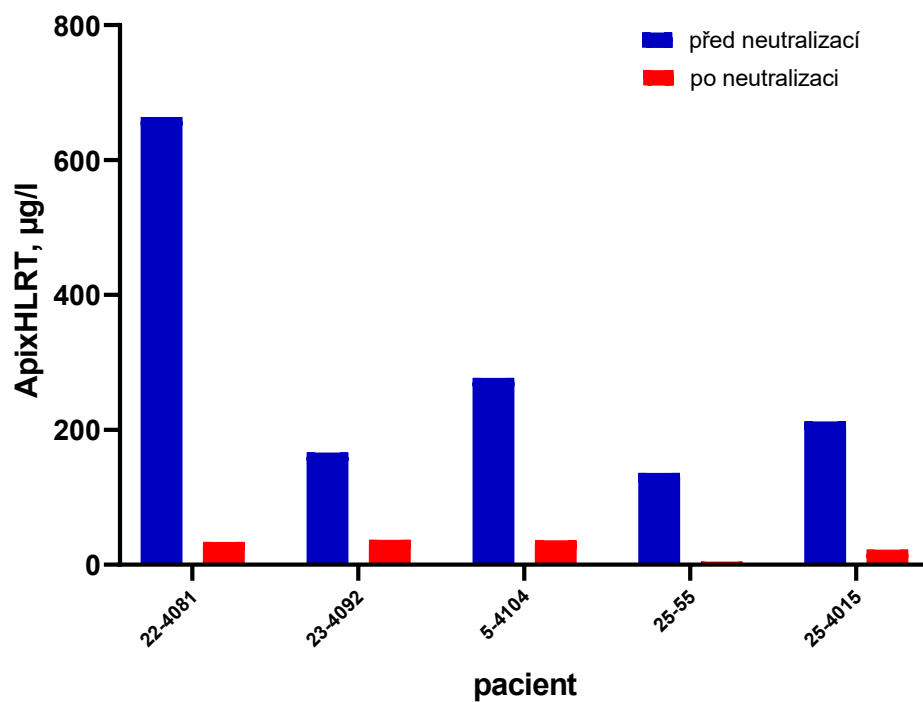


Graf č. 1: Účinnost DOAC-Stop tabletek u rivaroxabanu.  
( $p < 0,0001$ )



Graf č. 2: Účinnost DOAC-Stop tabletek u dabigatranu.  
( $p < 0,0006$ )





Graf č. 3: Účinnost DOAC-Stop tabletek u apixabanu.  
( $p < 0,0478$ )