

**LABORATORNÍ HEMATOLOGIE  
2006**

**M. Pecka a J. Malý**

**HK CREDIT**

**H r a d e c   K r á l o v é**

**2006**

© Miroslav Pecka, Jaroslav Malý, 2006  
Copyright © jednotliví autoři, 2006  
© Graphics Sitta Josef, 2006  
© HK CREDIT, 2006

**ISBN 80-86780-29-5**

# OBSAH

## PŘEDNÁŠKY

<b>KE KARYOMETRII KREVNÍCH BUNĚK.....</b>	<b>19</b>
K. Smetana, H. Klamová, I. Jirásková, D. Mikulenková, M. Pluskalová, Z. Hrkal <i>Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha</i>	
<b>HEMOFÍLIA A TROMBOFÍLIA: PORUCHA TOHO ISTÉHO GÉNU S ROZDIELNOU KLINICKOU MANIFESTÁCIOU.....</b>	<b>20</b>
P. Kubisz, M. Dobrotová, J. Ivanková, J. Staško, P. Hollý <i>Klinika hematológie a transfuziológie JLF UK a MFN, Martin</i>	
<b>REZISTENCE NA KYSELINU ACETYLOSALICYLOVOU .....</b>	<b>21</b>
J. Malý, M. Pecka, P. Duliček, M. Blažek, M. Bláha <i>II. interní klinika LF a FN Hradec Králové</i>	
<b>ANÉMIE PRI ONKOLOGICKÝCH OCHORENIACH.....</b>	<b>27</b>
T.Lipšic <i>HTO-Klinika laboratórnej medicíny – OÚSA, LFUK, TU, VŠZaSP, Bratislava</i>	
<b>CO STANOVUJÍ TESTY NA D-DIMER? .....</b>	<b>28</b>
J. E. Dyr <i>Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha</i>	
<b>HEREDITÁRNÍ HEMOCHROMATÓZA.....</b>	<b>29</b>
J. Novotný, Z. Čech, M. Penka <i>Oddělení klinické hematologie FN Brno</i>	
<b>CLINICAL POTENTIAL OF EMERGING ANTICOAGULANTS .....</b>	<b>31</b>
P. Klement <sup>1,2</sup> , H. Klement <sup>2</sup> , J. Rak <sup>1,3</sup> <i><sup>1</sup> Henderson Research Centre and McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada, <sup>2</sup> University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic, <sup>3</sup> McGill University, Montreal Children`s Hospital Research, Institute, Montreal, Quebec, Canada</i>	
<b>PROGRESS AND CHALLENGES IN ANTIANGIOGENIC THERAPY OF CANCER.....</b>	<b>40</b>
J. Rak <i>McGill University, Montreal Children`s Hospital Research Institute, Montreal, Quebec, Canada, H3Z 2Z3</i>	

<b>LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA A DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA KONGENITÁLNÍCH DYSERYTROPOETICKÝCH ANÉMÍÍ .....</b>	<b>43</b>
L. Chrobák	
<i>Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice, Hradec Králové, II. interní klinika, Oddělení klinické hematologie</i>	
<b>K DIAGNOSTICE VON WILLEBRANDOVY CHOROBY .....</b>	<b>46</b>
M. Penka, P. Smejkal, M. Matýšková, A. Buliková, M. Šlechtová, J. Kissová, J. Blatný, O. Zapletal	
<i>OKH FN Brno, Univerzitní centrum pro trombózu a hemostázu MU</i>	
<b>TROMBÍNOM AKTIVOVATELNÝ INHIBÍTOR FIBRINOLÝZY A DIABETES MELLITUS 2.TYPU S MIKROALBUMINÚRIOU .....</b>	<b>49</b>
J. Staško <sup>1</sup> , P. Hollý <sup>1</sup> , J. Ivanková <sup>1</sup> , B. Holman <sup>2</sup> , P. Galajda <sup>2</sup> , M. Dobrotová <sup>1</sup> , P. Kubisz <sup>1</sup>	
<i><sup>1</sup>Národní centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematologie a transfuziologie JLF UK a MFN, Martin, <sup>2</sup>I. interná klinika JLF UK a MFN, Martin</i>	
<b>TROMBOFÍLIA A HOMOCYSTEIN .....</b>	<b>50</b>
Hulíková M., Hudáková D.	
<i>RCHaT FNsP Košice</i>	
<b>BLOKÁTORY FUNKCE KREVNÍ DESTIČKY A MOŽNOSTI JEJICH MONITOROVÁNÍ .....</b>	<b>51</b>
M. Pecka, J. Malý, P. Dulíček, M. Blažek, E. Pešková, R. Malý	
<i>I. a II. interní klinika – OKH FN a katedra interních oborů LF UK, Hradec Králové</i>	
<b>POUŽITÍ TROMBIN GENERAČNÍHO TESTU U PACIENTŮ S HETEROZYGOTNÍ FORMOU FV LEIDEN .....</b>	<b>53</b>
L. Slavík, A. Hluší, V. Krčová, P. Novák, J. Mališková	
<i>Hemato-onkologická klinika FN Olomouc</i>	
<b>EXTERNÍ KONTROLA KVALITY V MORFOLOGII .....</b>	<b>54</b>
M. Matýšková	
<i>OKH FN Brno</i>	
<b>INTERNÍ KONTROLA KVALITY V KOAGULAČNÍ LABORATOŘI.....</b>	<b>55</b>
J. Zavřelová, M. Matýšková, M. Penka	
<i>Oddělení klinické hematologie, FN Brno</i>	
<b>EXTERNÍ KONTROLA KVALITY VÝŠETŘENÍ INR NA POCT PŘÍSTROJI – VÝSLEDKY PILOTNÍ STUDIE.....</b>	<b>56</b>
P. Kessler	
<i>Odd. hematologie a transfuziologie Nemocnice Pelhřimov, p.o.</i>	

<b>ERYTROCITY Z AFERÉZY – MARKERY VITALITY BUNĚK PŘI HODNOCENÍ PARAMETRU JAKOSTI .....</b>	<b>57</b>
R. Procházková <sup>1</sup> , L. Hubáčková <sup>1</sup> , C. Andrýs <sup>2</sup> , J. Krejsek <sup>2</sup> , M. Bláha <sup>3</sup> , L. Řehořová <sup>1</sup>	
<i><sup>1</sup>Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Liberec,</i>	
<i><sup>2</sup>Ústav klinické imunologie a alergologie, FN Hradec Králové,</i>	
<i><sup>3</sup>Oddělení klinické hematologie, FN Hradec Králové</i>	
 <b>MANAGEMENT SYSTÉMU ZABEZPEČENÍ KVALITY V HEMATOLOGICKÉ LABORATOŘI „OKRESNÍHO“ TYPU .....</b>	<b>59</b>
M. Drgoňová	
<i>Odd. hematologie a transfuziologie, Nemocnice Pelhřimov</i>	
 <b>KLASIFIKÁCIA A KATALOGIZÁCIA VÝKONOV – TĚZY .....</b>	<b>60</b>
T. Lipšic <sup>1</sup> , P. Findo, R. Zajac	
<i><sup>1</sup>Klinika laboratórnej medicíny – OÚSA, LFUK, TU, VŠZaSP Bratislava</i>	
 <b>HARMONIZÁCIA VÝSLEDKOV VYŠETRENÍ: KLINICKÝ PRÍNOS.....</b>	<b>61</b>
P. Bartek, T. Lipšic	
<i>Hematologické a transfuziologické oddelenie KLM TU,</i>	
<i>Onkologický ústav sv. Alžbety, s.r.o. Bratislava</i>	
 <b>PROČ JDOU KOAGULAČNÍ TESTY ŠPATNĚ? .....</b>	<b>61</b>
I. Hrachovinová, M. Zemanová, P. Kudláčková, H. Novotná, J. Prelllová, I. Železná	
<i>Ústav hematologie a krevní transfúze Praha</i>	
 <b>PLASTICITA HEMATOPOETICKÉHO SYSTÉMU .....</b>	<b>62</b>
S. Filip <sup>1</sup> , J. Mokry <sup>2</sup> , M. Bláha <sup>3</sup>	
<i><sup>1</sup>Klinika onkologie a radioterapie LFUK a FN, Hradec Králové</i>	
<i><sup>2</sup>Ústav histologie a embryologie LFUK, Hradec Králové</i>	
<i><sup>3</sup>Oddělení klinické hematologie LFUK a FN, Hradec Králové</i>	
 <b>ANALÝZA KULTIVOVANÝCH DB U ZDRAVÝCH DÁRCŮ A PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM PO STIMULACI CD40L, CI A TNF alfa.....</b>	<b>64</b>
L. Kovářová <sup>1</sup> , J. Michálek <sup>1</sup> , D. Očadlíková <sup>1</sup> , L. Pour <sup>1,2</sup> ,	
S. Dudová <sup>1</sup> , J. Vigášová <sup>1</sup> , L. Zahradová <sup>1,2</sup> , M. Penka <sup>1</sup> , R. Hájek <sup>1,2</sup>	
<i><sup>1</sup>LEHABI-OKH, FN Brno-PMDV</i>	
<i><sup>2</sup>Interní hematoonkologická klinika, FN Brno-PMDV</i>	

<b>PŘÍPRAVA PROTINÁDOROVÉ VAKCÍNY S VYUŽITÍM DENDRITICKÝCH BUNĚK AKTIVOVANÝCH MONOKLONÁLNÍM IMUNOGLOBULINEM: PRVNÍ VÝSLEDKY KLINICKÉ STUDIE FÁZE II.....</b>	<b>65</b>
D. Očadlíková <sup>1</sup> , L. Zahradová <sup>1,2</sup> , L. Kovářová <sup>1</sup> , J. Smejkalová <sup>1</sup> , L. Pour <sup>1,2</sup> , P. Vidláková <sup>1</sup> , D. Kyjovská <sup>1</sup> , H. Novotná <sup>3</sup> , I. Jelínková <sup>4</sup> , M. Penka <sup>1</sup> , J. Michálek <sup>1</sup> , R. Hájek <sup>1,2</sup>	
<i><sup>1</sup>Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, OKH, FN Brno, pracoviště Bohunice, <sup>2</sup>Interní hematologická klinika, FN Brno, pracoviště Bohunice, <sup>3</sup>Oddělení klinické biochemie, FN Brno, pracoviště Bohunice, <sup>4</sup>Firma Genex CZ s.r.o., Brno</i>	
<b>HODNOCENÍ ANGIOGENETICKÉHO PROFILU VE DŘENĚ A PERIFERNÍ KRVÍ U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM .....</b>	<b>67</b>
L. Pour <sup>1</sup> , L. Smolej <sup>2</sup> , Hájek R., Maisnar V., Adam Z., Krejčí M., Penka M. <i><sup>1</sup> LEHABI FN Brno, <sup>2</sup> OKH FN Hradec Králové, <sup>3</sup> IHOK FN Brno, <sup>4</sup> LF MU Brno</i>	
<b>MORFOLOGIE ERYTHROCYTŮ.....</b>	<b>68</b>
L. Bourková, M. Matýšková, J. Hoblová, J. Novotný, M. Penka <i>Oddělení klinické hematologie FN Brno Bohunice, Česká republika</i>	
<b>CO LZE A CO NELZE VYČÍST U MYELOYDYSPLASTICKÉHO SYNDROMU Z CYTOLOGIE DŘENĚ ZÍSKANÉ ASPIRACÍ.....</b>	<b>69</b>
R. Neuwirtová <sup>1</sup> , E. Vodičková <sup>2</sup> , H. Hochová <sup>2</sup> , J. Housková <sup>2</sup> <i><sup>1</sup> I. interní klinika VFN, Praha, <sup>2</sup> Odd. klinické hematologie FN Motol, Praha</i>	
<b>MOŽNOSTI STANOVENÍ NOVÝCH PARAMETRŮ NA ANALYZÁTORECH KREVŇÍCH BUNĚK A MOŽNÉ INTERFERENCE .....</b>	<b>70</b>
I. Fátorová, F. Vrbacký, J. Hošková, M. Pecka <i>II. interní klinika – OKH, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové</i>	
<b>NÁŠ POHLED NA ANALYZÁTOR KREVŇÍCH ČÁSTIC COULTER LH 755... 72</b>	
P. Šigutová, A. Štambachová, Z. Hajšmanová, R. Perlík <i>Ústav klinické biochemie a hematologie, hematologický úsek, FN a LF UK Plzeň,</i>	
<b>ZKUŠENOSTI S POUŽITÍM ANALYZÁTORU ADVIA-120 V DIAGNOSTICE AKUTNÍ LEUKÉMIE .....</b>	<b>73</b>
D. Mikulenková, R. Šimečková, T. Prchal, M. Moravcová, H. Černíková, A. Papáčeková, L. Bergerová, V. Horáčková, I. Jirásková <i>Ústav hematologie a krevní transfúze Praha</i>	
<b>PŘÍPRAVA BAKALÁŘŮ PRO KLINICKÉ LABORATOŘE .....</b>	<b>74</b>
P. Štern <sup>1,2,3</sup> , K. Kotaška <sup>2</sup> , J. Kukačka <sup>2</sup> , R. Průša <sup>2,3</sup>	

<i><sup>1</sup> I.LF UK, Praha, <sup>2</sup> 2.LF UK, Praha, <sup>3</sup> IPVZ Praha</i>	
<b>SOUČASNÝ STAV VE VZDĚLÁVÁNÍ PRACOVNÍKŮ V KLINICKÝCH LABORATORÍCH.....</b>	<b>75</b>
<i>S. Lexová</i>	
<i>NCO NZO, Brno</i>	
<b>BAKALÁŘSKÉ A MAGISTERSKÉ STUDIUM ZDRAVOTNICKÁ BIOANALYTIKA NA HRADECKÉ FARMACEUTICKÉ FAKULTĚ .....</b>	<b>76</b>
<i>J. Dršata <sup>1</sup>, R. Karlíček <sup>1</sup>, M. Pecka <sup>2</sup> M.Tichý <sup>2</sup></i>	
<i><sup>1</sup>Farmaceutická fakulta UK, <sup>2</sup>FN a LFUK v Hradci Králové</i>	
<b>BAKALÁŘSKÉ STUDIUM ZDRAVOTNICKÁ BIOANALYTIKA NA FARMACEUTICKÉ FAKULTĚ V HRADCI KRÁLOVÉ .....</b>	<b>77</b>
<i>J. Blažková, L. Haklová, I. Jokešová, V. Palička</i>	
<i>Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové</i>	
<b>VÝSLEDKY STANOVENÍ BCL-2/IGH PŘESTAVBY U NEMOCNÝCH S NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÝM FOLIKULÁRNÍM B-NEHODGKINSKÝM LYMFOMEM ZA OBDOBÍ 2002-2004 .....</b>	<b>77</b>
<i>D. Belada <sup>1</sup>, M. Beránek <sup>2</sup>, V. Palička <sup>2</sup>, D. Dvořáková <sup>3</sup>, J. Malý <sup>1</sup></i>	
<i><sup>1</sup> II.interní klinika, oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská Fakulta UK Hradec Králové, <sup>2</sup> Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové, <sup>3</sup> - Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, FN Brno - Bohunice</i>	
<b>„FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING“ – NAŠE ZKUŠENOSTI A MOŽNOSTI VYUŽITÍ V HEMATOONKOLOGII .....</b>	<b>79</b>
<i>M. Borský, D. Dvořáková, M. Klabusay, J. Mayer</i>	
<i>Laboratoř flow cytometrie a celulární terapie, Interní hematologická klinika, Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Brno</i>	
<b>MOLEKULOVO-BIOLOGICKÉ METODY POUŽÍVANÉ V MONITOROVÁNÍ LIEČBY CHRONICKEJ MYELOIDNEJ LEUKÉMIE .....</b>	<b>80</b>
<i>P. Rohoň <sup>1</sup>, E. Faber <sup>1</sup>, J. Nauková <sup>2</sup>, Š. Rožmanová <sup>1</sup>, R. Solná <sup>2</sup>, M. Jarošová <sup>1</sup>, V. Divoký <sup>2</sup>, K. Indrák <sup>1</sup></i>	
<i><sup>1</sup>Hemato-onkologická klinika FN Olomouc a LF UP v Olomouci, <sup>2</sup>Ústav biologie LF UP v Olomouci</i>	
<b>POROVNÁNÍ STANDARDNÍCH PROGNOSTICKÝCH FAKTORŮ U PACIENTŮ STUDIE CMG 2002 S DELECÍ 13Q14 STANOVENOU MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETICKÝMI METODAMI.....</b>	<b>82</b>
<i>J. Smejkalová <sup>1</sup>, P. Kuglík <sup>2</sup>, H. Filková <sup>3</sup>, A. Oltová <sup>3</sup>, Z. Adam <sup>4</sup>, L. Pour <sup>4</sup>, M. Krejčí <sup>4</sup>, M. Penka <sup>1</sup>, R. Hájek <sup>1,4</sup></i>	
<i><sup>1</sup>Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické hematologie, FN Brno, <sup>2</sup>Katedra genetiky a molekulární biologie, PŘF MU, <sup>3</sup>Oddělení lékařské genetiky, FN Brno, <sup>4</sup>Interní hematologická klinika, FN Brno</i>	

<b>STANOVENÍ FREKVENCE POLYMORFISMU -1639 G&gt;A V GENU VKORC1 V POPULACI ČR METODOU REAL-TIME PCR.....</b>	<b>83</b>
R. Richterová <sup>1</sup> , P. Riedlová <sup>1</sup> , A. Bóday <sup>1</sup> , P. Kessler <sup>2</sup> , H. Poul <sup>2</sup> , J. Gumulec <sup>1</sup> , M. Radina <sup>1</sup>	
<sup>1</sup> <i>Onkologické centrum J.G.Mendela, Nový Jičín</i>	
<sup>2</sup> <i>Odd. hematologie a transfuziologie, Nemocnice Pelhřimov</i>	
<b>AUTOMATIZACE V IMUNOHEMATOLOGICKÉ LABORATOŘI .....</b>	<b>84</b>
M. Bohoněk, D. Horčíčková	
<i>Ústřední vojenská nemocnice Praha, Oddělení hematologie, biochemie a krevní transfuze</i>	
<b>VISKOZITA KRVĚ, KREVNÍ PLAZMY A SÉRA – NOVÉ POZNATKY, MOŽNOSTI VYUŽITÍ A STANOVENÍ V KLINICKÉ PRAXI.....</b>	<b>84</b>
F. Vrbacký, I. Fátorová, M. Pecka, M. Bláha, J. Malý	
<i>II. interní klinika – Oddělení klinik hematologie, FN Hradec Králové a Lékařská fakulta UK v Hradci Králové</i>	
<b>TEST KRYOHEMOLÝZY – DIAGNOSTICKÝ NÁSTROJ U HEREDITÁRNÍ SFÉROCYTÓZY .....</b>	<b>85</b>
Š. Rožmanová <sup>1</sup> , M. Divoká <sup>1</sup> , D. Pospíšilová <sup>2</sup> , Z. Novák <sup>2</sup> , M. Jarošová <sup>1</sup> , V. Divoký <sup>3</sup> , K. Indrák <sup>1</sup> ,	
<sup>1</sup> <i>Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc,</i> <sup>2</sup> <i>Dětská klinika FN a LF UP Olomouc,</i> <sup>3</sup> <i>Ústav lékařské biologie LF UP Olomouc</i>	
<b>N6-BENZYLADENINE POTENTIATES CYTOTOXIC EFFECT OF OTHER BASES BY INDUCTION OF INCREASED ACTIVITY OF APRT ENZYME .....</b>	<b>86</b>
I. Frydrych, P. Mlejnek	
<i>Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Olomouc, Czech Republic</i>	
<b>MYELODYSPLASTICKÉ SYNDRÓMY A NADBYTOK ŽELEZA .....</b>	<b>88</b>
M. Nosál	
<i>Hematologická ambulance FN sP- Nemocnica Staré Mesto, Bratislava, SK</i>	
<b>GENERACE TROMBINU - KDE JE UŽITEČNÉ JEJ MĚŘIT A JAK .....</b>	<b>88</b>
I. Hrachovinová, M. Hladíková, J. Prelová, P. Salaj	
<i>Ústav hematologie a krevní transfúze Praha</i>	
<b>SOUČASNÉ VYŠETŘENÍ POLYMORFISMŮ CYP450C9 A VKORC1 U PACIENTŮ LÉČENÝCH WARFARINEM .....</b>	<b>89</b>
P. Kessler <sup>1</sup> , R. Richterová <sup>2</sup> , P. Riedlová <sup>2</sup> , H. Poul <sup>1</sup>	
<sup>1</sup> <i>Odd. hematologie a transfuziologie Nemocnice Pelhřimov,</i> <sup>2</sup> <i>P+R LAB, Laboratoř molekulární biologie, Nový Jičín</i>	



<b>FLOWCYTOMETRICKÁ ANALÝZA ENDOTELIÁLNÍCH A TROMBOCYTÁRNÍCH MIKROPARTIKULÍ – PRVNÍ ZKUŠENOSTI SE ZAVÁDĚNÍM METODIKY.....</b>	<b>91</b>
L. Kovářová, A. Buliková, M. Matýšková, M. Penka <i>Oddělení klinické hematologie, FN Brno-PMDV</i>	
<b>MOŽNOSTI LÉČBY HEPARINEM INDUKOVANÉ TROMBOCYTOPENIE TYPU II SYNTETICKÝMI PENTASACHARIDY .....</b>	<b>92</b>
J. Novotný <sup>1</sup> , P. Smejkal <sup>1</sup> , S. Králová <sup>2</sup> , J. Gumulec <sup>2</sup> , J. Završková <sup>1</sup> , M. Penka <sup>1</sup> <sup>1</sup> <i>Centrum pro trombózu a hemostázu - Oddělení klinické hematologie FN Brno</i> <sup>2</sup> <i>Centrum pro trombózu a hemostázu – Onkologické centrum JG Mendela, Nový Jičín</i>	
<b>VYUŽITÍ ULTRACENTRIFUGACE PRO KOAGULAČNÍ VYŠETŘENÍ.....</b>	<b>93</b>
L. Slavík, J. Mališková, M. Sýkorová, J. Ježáková, P. Chalupníková <i>Hemato-onkologická klinika FN Olomouc, ČR</i>	
<b>DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA KOAGULOPATIÍ SE ZAMĚŘENÍM NA VYŠETŘENÍ PŘED INVAZIVNÍM VÝKONEM – POHLED DĚTSKÉHO HEMATOLOGA .....</b>	<b>93</b>
K. Toušová <i>Klinika dětské onkologie, FN Brno</i>	
<b>RACIONALIZACE LÉČBY LDL-AFERÉZOU POMOCÍ SLEDOVÁNÍ FUNKČNÍCH ZMĚN PRIMÁRNÍ HEMOSTÁZY – MOŽNOSTI VYUŽITÍ ANALYZÁTORU PFA-100 A MODIFIKOVANÝCH VYŠETŘENÍ AGREGACE TROMBOCYTŮ .....</b>	<b>94</b>
M. Blažek, M. Bláha, V. Mašín, J. Malý, V. Bláha, M. Pecka <i>Univerzita Karlova v Praze – Lékařská fakulta v Hradci Králové, Fakultní nemocnice Hradec Králové – II. interní klinika, OKH, ČR</i>	

## POSTERY

<b>DETEKCE MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOCI U CHRONICKÉ B-LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE .....</b>	<b>100</b>
L. Bezdíčková <sup>1</sup> , S. Peková <sup>2</sup> , H. Šubrtová <sup>1</sup> , M. Hončíková <sup>1</sup> , T. Kozák <sup>1</sup> <sup>1</sup> <i>Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, <sup>2</sup>Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie, Nemocnice Na Homolce, Praha</i>	

**ENDOGLIN - A PROMISING LABORATORY MARKER FOR EVALUATION OF DECREASE IN ATHEROSCLEROSIS ACTIVITY ..... 102**

M. Bláha, M. Cermanová, V. Bláha, P. Karolín<sup>2</sup>, C. Andrys, M. Blažek, J. Malý, L. Smolej, R. Procházková<sup>3</sup>, J. Zajíc, R. Zimová<sup>4</sup>

*<sup>1</sup> Charles University, Faculty of Medicine and the Faculty Hospital, Hradec Kralove, CZ, <sup>2</sup> Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA, <sup>3</sup> Transfusion Dpt., Regional Hospital, Liberec, CZ, <sup>4</sup> State Institute for Drug Control, Prague, CZ*

**LABORATORY AND CLINICAL RESULTS OF HAEMORHEOPHERETIC PROCEDURES IN OPHTHALMOLOGY ..... 103**

M. Bláha, E. Rencová, V. Bláha, M. Blažek, D. Solichová, J. Malý, V. Řeháček

*Faculty Hospital and Medical Faculty, Charles University, Hradec Králové, CZ*

**TO THE DANGER OF INFECTION TRANSMISSION DURING GRAFT IN STEM CELL TRANSPLANTATION – OUR RESULTS..... 104**

M. Bláha, P. Měříčka, J. Malý, L. Jebavý, P. Žák, M. Cermanová, S. Filip,

M. Blažek, R. Malý, V. Řeháček

*Faculty Hospital and Medical Faculty, Charles University, Hradec Králové, CZ*

**VÝŠETŘENÍ POČTU PLT Z PLAZMY NA HEMATOLOGICKÝCH ANALYZÁTORECH..... 105**

M. Boudná, J. Hoblová, L. Bourková, S. Vytisková, J. Zavřelová,

S. Mičánková, H. Fišárková, Z. Veselá, M. Penka

*Oddělení klinické hematologie FN Brno*

**VÝKLAD K JEDNOTLIVÝM PARAMETRŮM KREVNÍHO OBRAZU Z HEMATOLOGICKÝCH ANALYZÁTORŮ ..... 106**

L. Bourková, M. Matýšková, M. Penka

*Oddělení klinické hematologie FN Brno Bohunice, Česká republika*

**MUTÁCIA METYLTETRAHYDROFOLÁT REDUKÁZY (MTHFR) C677T, HODNOTA HOMOCYSTEINU A RIZIKO VČASNÝCH ABORTOV ..... 107**

M. Dobrotová, J. Ivanková, I. Plameňová

*KHaT MFN a JLF UK, Martin*

**TRANSLOKACE t(12;20)(p13;q11.2) U PACIENTA S AML, NOVÝ TRANSLOKAČNÍ PARTNER ETV6 GENU, KAZUISTIKA..... 108**

B. Dřevojánková, S. Králová, L. Sokol, V. Holubová, M. Martinková,

M. Wrobel, J. Gumulec, J. Sobotka, M. Radina

*Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín*

**MONITOROVÁNÍ AGREGACE TROMBOCYTŮ PO INDUKCI KATIONICKÝM PROPYL GALÁTEM V RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH U NEMOCNÝCH LÉČENÝCH NÍZKÝMI DÁVKAMI ASA..... 109**

I. Fátorová, V. Dytrychová, G. Tučková, S. Kieslichová, M. Pecka  
*II. interní klinika – OKH, Fakultní nemocnice Hradec Králov a Lékařské fakulty, Univerzity Karlovy v Hradci Králové*

**VYŠETŘENÍ RISTOCETIN KOFAKTOROVÉ AKTIVITY VWF NA KOAGULAČNÍM AUTOMATU STA R..... 110**

P. Hájková, J. Zavřelová, M. Méhešová, M. Matýšková, P. Smejkal, M. Penka  
*Oddělení klinické hematologie, FN Brno*

**ÚSPĚŠNÁ ERADIKACE INHIBITORU U PACIENTKY SE ZÍSKANOU HEMOFILIÍ A..... 111**

H. Pavlíková, D. Petrmichlová, Z. Hajšmanová  
*Hematologický úsek ÚKBH FN a LF ÚK Plzeň*

**IMUNOFENOTYPIZAČNÍ STANOVENÍ EXPRESE ZAP-70 A KORELACE S MUTAČNÍM STAVEM IGVH U PACIENTŮ S DIAGNÓZOU B-CLL ..... 112**

M. Heidekerová, M. Doubek, M. Klabusay, Y. Brychtová  
*Laboratoř flow cytometrie a celulární terapie, Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Brno*

**ODCHYLKY V MORFOLOGII ERYTROCYTŮ Z POHLEDU PATOFYZIOLOGIE ..... 113**

J. Hoblová, L. Bourková, M. Matýšková, J. Novotný, M. Penka  
*Oddělení klinické hematologie FN Brno Bohunice, Česká republika*

**KOMBINOVANÁ VRODENÁ TROMBOFÍLIA U PACIENTA S OPAKOVANÝMI ISCHEMICKÝMI CIEVNÍMI MOZGOVÝMI PŘÍHODAMI – PREZENTÁCIA KAZUISTIKY ..... 114**

P. Hollý, J. Ivanková, M. Dobrotová, J. Staško, P. Kubisz  
*Klinika hematologie a transfuziologie JLF UK a MFN, Martin*

**CD ZNAKY KREVŇÍCH DESTIČEK..... 115**

J. Hřebacková, K. Koubek, A. Radovská  
*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

**CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE A VLIV TERAPIE NA VYBRANÉ IMUNOLOGICKÉ PARAMETRY..... 116**

Z. Humlová<sup>1,4</sup>, H. Klamová<sup>2</sup>, I. Janatová<sup>4</sup>, P. Šandová<sup>4</sup>, I. Šterzl<sup>1</sup>, V. Vonka<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN, Praha 2,  
<sup>2</sup>Ústav hematologie a krevní transfuze, Klinické oddělení, Praha 2,  
<sup>3</sup>Ústav hematologie a krevní transfuze, Oddělení experimentální virologie, Praha 2, <sup>4</sup>Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Laboratoř klinické imunologie a alergologie, Praha 2

<b>SLEDOVANIE ÚČINNOSTI LIEČBY ASA : VOĽBA VHODNÉHO INDUKTORA AGREGÁCIE TROMBOCYTOV .....</b>	<b>117</b>
J. Ivanková, M. Dobrotová, P. Kubisz <i>Národné centrum hemostázy a trombózy Klinika hematológie a transfuziológie, Martinská fakultná nemocnica, Martin</i>	
<b>PŘEHLED IZOLAČNÍCH METOD NUKLEOVÝCH KYSELIN S DŮRAZEM NA VYUŽITÍ V KLINICKÉ PRAXI .....</b>	<b>118</b>
H. Janýšková, M. Jursová, P. Kopecká, E. Zlámalíková, P. Riedlová, S. Tavandzis, E. Průšová, M. Teichmanová, A. Bodat, M. Radina <i>Onkologické centrum J.G. Mendela, Laboratoř molekulární biologie, Nový Jičín</i>	
<b>PRŮKAZ MYELOPEROXIDÁZY DIAMINOBENZIDINEM.....</b>	<b>119</b>
I. Jirásková, D. Mikulenková, K. Smetana <i>Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha</i>	
<b>VÝZNAM MUTÁCIE V617F V GÉNE JAK2 PRI DIAGNOSTIKE CHRONICKÝCH MYELOPROLIFERATÍVNYCH OCHORENÍ SO ZAMERANÍM NA DIFERENCIÁLNU DIAGNOSTIKU PRAVEJ POLYCYTÉMIE A OSTATNÝCH TYPOV POLYCYTÉMII.....</b>	<b>120</b>
B. Katrincsáková <sup>1</sup> , M. Horváthová <sup>2</sup> , J. Veselovská <sup>2</sup> , M. Pecúchová <sup>1</sup> , V. Divoký <sup>2</sup> , M. Jarošová <sup>1</sup> , K. Indrák <sup>1</sup> <i><sup>1</sup>Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc <sup>2</sup>Ústav lékařské biologie LF UP Olomouc</i>	
<b>STANOVENÍ MUTACÍ V GENU PRO ATP7B U PACIENTŮ S PODEZŘENÍM NA WILSONOVU CHOROBU METODOU SEKVENAČNÍ ANALÝZY.....</b>	<b>122</b>
H. Kolaříková, A. Bóday, P. Riedlová, J. Fišer, M. Radina <i>Onkologické centrum J.G.Mendela, Nový Jičín</i>	
<b>ZÍSKANÁ DYSFIBRINOGENEMIE V SOUVISLOSTI S MNOHOČETNÝM MYELOMEM .....</b>	<b>123</b>
R. Kotlín, M. Chytilová, P. Salaj, J. Suttnar, T. Riedel, J. E. Dyr <i>Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha 2</i>	
<b>EXPRESÉ CHEMOKINOVÝCH RECEPTORŮ NA LIDSKÝCH NORMÁLNÍCH A PATOLOGICKÝCH KREVNÍCH BUŇKÁCH .....</b>	<b>125</b>
K. Koubek, A. Radovská, J. Hřebačková <i>Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, ČR</i>	
<b>VLIV INHIBITORŮ P-GLYKOPROTEINU NA ÚČINNOST PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV U BUNĚČNÉ LINIE K562.....</b>	<b>126</b>
P. Krumpochová <sup>1</sup> , I. Frydrych <sup>2</sup> a P. Mlejnek <sup>2</sup> <i><sup>1</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc <sup>2</sup>Ústav biologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc</i>	

<b>MECHANISMUS AKTIVACE KREVNÍCH DESTIČEK OXIDOVANOU CELULOSOU.....</b>	<b>127</b>
P. Křížová, L. Chrastinová, E. Schönfeldová, J. E. Dyr <i>Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha</i>	
<b>THE COMPUTER CONTROLLED MODEL FOR OPTIMIZATION OF THE LDL-APHERESIS VERIFIED IN CLINICAL PRACTICE.....</b>	<b>128</b>
V. Mašín <sup>1</sup> , M. Bláha <sup>2</sup> , R. Malý <sup>2</sup> , V. Bláha <sup>3</sup> , J. Zajíc <sup>2</sup> , R. Zimová <sup>3</sup> , J. Malý <sup>2</sup> , Z. Zadák <sup>3</sup> <i><sup>1</sup>Dept. of Medical Biophysics, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic <sup>2</sup>2nd Dept. of Internal Medicine, <sup>3</sup>Dept. of Gerontology and Metabolism, Faculty Hospital in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic, <sup>3</sup>State Institute for Drug Control, Prague, Czech Republic</i>	
<b>STANOVENÍ VOLNÝCH LEHKÝCH ŘETĚZCŮ U PACIENTŮ S MONOKLONÁLNÍMI GAMAPATIEMI – NAŠE ZKUŠENOSTI. KAZUISTIKA.....</b>	<b>129</b>
L. Nováčková <sup>1</sup> , E. Šumná <sup>2</sup> <i><sup>1</sup>Ústav klinické biochemie , Fakultní nemocnice Ostrava a Zdravotně sociální fakulta Ostravské university, <sup>2</sup>Onkologické centrum J.G. Mendela, Hematologická ambulance, Vítkovice</i>	
<b>MOŽNOSTI STANOVENÍ ASPIRINOVÉ RESISTENCE PŘI POUŽITÍ ROZDÍLNÝCH INDUKTORŮ AGREGACE TROMBOCYTŮ.....</b>	<b>130</b>
P. Novák, V. Krčová, L. Slavík <i>Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc</i>	
<b>POKLES KREVNÍCH DESTIČEK PO APLIKACI PAGA S NAVÁZANÝMI IONTY NĚKTERÝCH KOVŮ.....</b>	<b>131</b>
M. Pecka <sup>1</sup> , J. Briestenski <sup>2</sup> , J. Malý <sup>1</sup> , E. Pešková <sup>1</sup> , J. E. Dyr <sup>3</sup> <i><sup>1</sup> II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie FN a katedra interních oborů LF UK Hradec Králové <sup>2</sup>Alltracel Laboratories spol s.r.o., Tišnov <sup>3</sup>Ústav hematologie a krevní Transfúze, Praha</i>	
<b>RYCHLÉ KVALITATIVNÍ STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI KOMPLEXU HEPARIN/DESTIČKOVÝ FAKTOR 4.....</b>	<b>133</b>
E. Pešková, M. Pecka, J. Malý <i>II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie, FN a LF UK Hradec Králové, ČR</i>	

**ÚPRAVA REFERENČNÍCH MEZÍ PRO HEMOKOAGULAČNÍ VYŠETŘENÍ  
BĚHEM GRAVIDITY A JEJICH POUŽITÍ U ŽEN S PREEKLAMPSÍÍ ..... 134**

F. Polák<sup>1</sup>, M. Lipš<sup>1</sup>, P. Kříž<sup>1</sup>, A. Pařízek<sup>2</sup>, J. Kvasnička<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny*

*VFN v Praze 2 a 1. LF UK*

<sup>2</sup> *Gynekologicko-porodnická klinika VFN v Praze 2 a 1. LF UK*

<sup>3</sup> *Trombotické centrum a 1. interní klinika VFN v Praze 2 a 1. LF UK*

**ZKUŠENOSTI SE STATIMOVOU CENTRIFUGOU  
STAT SPIN® EXPRESS 3..... 135**

Popelová M., Veselková J., Hrubá P.

*Oddělení klinické hematologie, FN u sv. Anny v Brně*

**VÝSKYT MUTACÍ GENU CYP450 2C9\*2 A 2C9\*3 U JEDINCŮ  
S NEZVYKLOU TERAPEUTICKOU ODEZVOU NA LÉČBU KUMARINY .... 136**

J. Prošková, P. Solichová, B. Lačňák, B. Bubeník, D. Stejskal

*OLM a interní oddělení Šternberk, hematologická ambulance Frýdek Místek*

**PRŮKAZ ČTYŘLETÉHO SEBEPOŠKOZOVÁNÍ WARFARINEM  
– KASUISTIKA..... 137**

P. Slezák<sup>1</sup>, M. Urbánková<sup>2</sup>, Z. Jehlíková<sup>2</sup>, K. Tesař<sup>2</sup>, B. Ochodnický<sup>2</sup>,

M. Staňková<sup>3</sup>, J. Gumulec<sup>4</sup>, M. Brejcha<sup>4</sup>, J. Minář<sup>4</sup>, P. Smejkal<sup>5</sup>, M. Penka<sup>5</sup>

<sup>1</sup> *Šumperská nemocnice a.s., Hematologická ambulance*

<sup>2</sup> *Šumperská nemocnice a.s.,<sup>3</sup> FN sP Ostrava, toxikol. laboratoř*

<sup>4</sup> *OCJGM N.Jičín, <sup>5</sup> FN Brno*

**PSYCHOSOCIÁLNÍ A ZDRAVOTNÍ ASPEKTY KVALITY ŽIVOTA  
NEMOCNÝCH S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ PO TRANSPLANTACI  
KRVETVORNÝCH BUNĚK: RETROSPEKTIVNÍ ANALÝZA..... 138**

L. Slováček<sup>1,2</sup>, B. Slováčková<sup>3</sup>, L. Jebavý<sup>1,2</sup>, M. Blažek<sup>2</sup>, J. M. Horáček<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví  
Univerzity obrany, Hradec Králové, <sup>2</sup> II. interní klinika – Oddělení klinické  
hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové*

<sup>3</sup> *Psychiatrická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK,  
Hradec Králové*

**GLOBÁLNÍ KVALITA ŽIVOTA NEMOCNÝCH S MNOHOČENÝM  
MYELOMEM A MALIGNÍM LYMFOMEM PO TRANSPLANTACI  
KRVETVORNÝCH BUNĚK: RETROSPEKTIVNÍ ANALÝZA..... 141**

L. Slováček<sup>1,2</sup>, B. Slováčková<sup>3</sup>, L. Jebavý<sup>1,2</sup>, J. M. Horáček<sup>1,2</sup>, M. Blažek<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví  
Univerzity obrany, Hradec Králové-<sup>2</sup> II. interní klinika – Oddělení klinické  
hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové*

<sup>3</sup> *Psychiatrická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta  
UK, Hradec Králové*

**PLASMA LEVELS OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF), BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR (BFGF) AND SOLUBLE ENDOGLIN (SCD105) IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA: IMPACT OF TREATMENT WITH IMATINIB MESYLATE ..... 144**

L. Smolej<sup>1</sup>, J. Voglová<sup>1</sup>, C. Andrýs<sup>2</sup>

*1 – 2<sup>nd</sup> Department of Internal Medicine, Department of Clinical Hematology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové, Czech Republic, 2 - Institute of Clinical Immunology and Allergology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové, Czech Republic*

**KOMPLEXNÍ HODNOCENÍ ANGIOGENEZE U CHRONICKÉ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE: MIKROVASKULÁRNÍ DENZITA, ANGIOGENNÍ CYTOKINY A CÍRKULUJÍCÍ MIKROPARTIKULE..... 145**

L. Smolej<sup>1</sup>, C. Andrýs<sup>2</sup>, P. Kašparová<sup>3</sup>, D. Vokurková<sup>2</sup>, D. Belada<sup>1</sup>, P. Žák<sup>1</sup>, M. Hrudková<sup>1</sup>, J. Krejsek<sup>2</sup>, O. Šíroky<sup>1</sup>, J. Malý<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>II.interní klinika, Oddělení klinické hematologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové, <sup>2</sup>Ústav klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové <sup>3</sup>Fingerlandův ústav patologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové*

**VZNIK OXIDAČNĚ MODIFIKOVANÝCH BÍLKOVIN BĚHEM AKTIVACE KREVŇÍCH DESTIČEK..... 146**

A. Sobotková, J. Suttnar, J. E. Dyr

*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, ČR*

**LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA RELAPSU AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKEMIE V CNS: KAZUISTIKA..... 147**

M. Špaček<sup>1</sup>, L. Bezdičková<sup>1</sup>, H. Machová<sup>2</sup>, S. Peková<sup>3</sup>, P. Lemež<sup>1</sup>, P. Pavlíček<sup>1</sup>, T. Kozák<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady, Praha a 3. lékařská fakulta UK, <sup>2</sup> Klinika neurologie FN Královské Vinohrady, Praha, <sup>3</sup> Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie, Nemocnice Na Homolce, Praha*

**HODNOCENÍ INTERNÍCH KONTROL KVALITY V KOAGULAČNÍ LABORATOŘI..... 148**

P. Straková, J. Zavřelová, M. Méhešová, M. Matýšková, M. Penka

*Oddělení klinické hematologie, FN Brno*

**VLIV PRODUKTŮ OXIDAČNÍHO STRESU NA FUNKČNÍ VLASTNOSTI FIBRINOGENU ..... 149**

J. Štikarová, M. Chytilová, A. Sobotková, J. Suttnar

*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, ČR*

**VYUŽITÍ IN VITRO EXPANDOVANÝCH TUMOR INFILTRUJÍCÍCH LYMFOCYTŮ U PACIENTŮ S METASTAZUJÍCÍM MELANOMEM ..... 150**

P.Vidláková<sup>1</sup>, J.Smejkalová<sup>1</sup>, D.Očadliková<sup>1</sup>, L.Kovářová<sup>1</sup>, L.Hanák<sup>5</sup>,  
R.Hájek<sup>1</sup>, M.Penka<sup>1</sup>, A.Oltová<sup>4</sup>, I.Kocák<sup>5</sup>, V.Fait<sup>5</sup>, J.Žaloudík<sup>5</sup>, J.Michálek<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie,*

*Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno*

<sup>2</sup> *I. dětská interní klinika, Fakultní nemocnice Brno*

<sup>3</sup> *Univerzitní onkologické centrum, Masarykova univerzita Brno*

<sup>4</sup> *Oddělení lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Brno*

<sup>5</sup> *Masarykův onkologický ústav, Brno*

**MONITOROVÁNÍ HLADINY TRANSKRIPTŮ BCR-ABL U PACIENTŮ S CML: POROVNÁNÍ METOD KOMPETITIVNÍ RT-PCR A REAL-TIME RT-PCR..... 152**

K.Vlčanová, V. Zmeková, J. Rulcová, J. Moravcová

*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

**POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ FUNKČNÍHO TESTU REZISTENCE K AKTIVOVANÉMU PROTEINU C A MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ KOAGULAČNÍHO FAKTORU FV LEIDEN..... 153**

F. Vrbacký, V. Dytrychová, J. Pazlarová, M. Pecka, J. Malý

*II. interní klinika – OKH, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové*

**ZAVÁDĚNÍ PERSPEKTIVNÍ METODY „TROMBIN GENERAČNÍ TEST“..... 154**

S. Vytisková<sup>1</sup>, M. Slánská<sup>1</sup>, O. Zapletal<sup>1</sup>, J. Blatný<sup>1</sup>, J. Jarkovský<sup>2</sup>, M. Penka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno, Pracoviště dětské medicíny,*

<sup>2</sup> *Centrum biostatistiky a analýz, Lékařská a Přírodovědecká fakulta MU v Brně*

**VYŠETŘENÍ ROZPUSTNÉHO TRANSFERINOVÉHO RECEPTORU NA KOAGULAČNÍM AUTOMATU ..... 156**

J. Zavřelová, M. Matýšková, A. Buliková, M. Šlechtová, M. Méhešová, M. Penka

*OKH FN Brno*

**DG – CHROMAT: NOVÝ SET PRO STANOVENÍ ANTITROMBINU (ANTI-XA)..... 157**

J. Zavřelová, P. Straková, L. Vrábel, M. Matýšková, M. Penka

*Oddělení klinické hematologie, FN Brno*

**JE SNADNÁ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA SPECIFICKÉHO INHIBITORU?..... 158**

L. Zoubková, J. Zavřelová, M. Méhešová, A. Buliková, M. Matýšková, M. Penka

*Oddělení klinické hematologie, FN Brno*



# PŘEDNÁŠKY

## KE KARYOMETRII KREVNÍCH BUNĚK

K. Smetana, H. Klamová, I. Jirásková, D. Mikulenková, M. Pluskalová, Z. Hrkal  
*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

V klasické hematologické cytologii karyometrie usnadnila stanovení diferenciačních a maturačních stadií zejména v červené a granulocytové řadě. Během diferenciace krevních buněk, jak je obecně známo, dochází ke zmenšování buněčných jader a tím i ke kondenzaci chromatinové struktury. Současně v diferencujících se krevních buňkách dochází i ke zmenšování jadérek s ubýváním nukleolární RNA. V minulém století měření jednotlivých jader a jadérek bylo prováděno jednak přímo po kalibraci pomocí okulárového měřítka, nebo nepřímo měřením na mikrofotografiích a ještě dříve, na zakreslených jádrech pomocí zrcadlového přenosu. Otázka přesnosti byla vždy předmětem velkých diskuzí a ke zkreslování údajů docházelo zejména při nepřímém měření. Proto také ve většině monografií je pojednáváno o velkých, či malých jádrech a jadérkách, obvykle bez numerických údajů.

V současné době bylo měření jader a jaderných komponent usnadněno díky zdokonalenému přenosu a digitalizaci jejich obrazu s následným počítačovým zpracováním. Zdokonalená světelně mikroskopická technika v kombinaci s cílenou cytochemií na roztěrových preparátech se ukázala být výhodnější než měření v řezech a to na světelně, či elektronově mikroskopické úrovni, neboť umožňuje měření celých jader a případně celých jednotlivých jaderných strukturálních a funkčních kompartmentů. Na řezových preparátech, včetně ultratenkých řezů pro elektronovou mikroskopii, je totiž zachycena jen určitá část buněčných jader a jaderných kompartmentů. V našich studiích modifikací snímacího systému na mikroskopu v kombinaci s počítačovou technikou bylo umožněno přímé měření jader a nukleolů vizualizovaných pomocí cílených cytochemických metod při relativně vysokých zvětšeních, tj. kolem 4 000x.

Z nukleolů byla měřena jejich „těla“ bez perinukleolárního chromatinu. V červené řadě byla prokázána skutečná existence „mikroproerytroblastů“, které podle velikosti jader bylo možno zařadit do skupiny K1/2 erytroblastů. Tyto buňky mají nepravidelná velká jadérka a podobnou denzitu jako proerytroblasty, avšak jejich jádra mají velikost odpovídající časným K1/2 bazofilním erytroblastům (early basophilic erythroblasts). Mikroproerytroblasty tak představují tolik diskutovaný mezičlánek mezi proerytroblasty a bazofilními erytroblasty bez ohledu na to zda je fyziologický, či patologický.

V myeloblastech a promyelocytech bylo možné stanovení dosud numericky neuváděných hodnot průměru jader a jadérek v myeloblastech a promyelocytech. Při této příležitosti v kombinaci s počítačovou denzitometrií se také ukázalo, že celkové množství nukleolární RNA v těchto buňkách závisí na velikosti nukleolů a nikoli na její koncentraci v jednotlivých nukleolech. Při rozdílné velikosti nukleolů byla totiž jejich denzita po cytochemickém zobrazení RNA v jednotlivých nukleolech prakticky totožná. Překvapivé bylo také zjištění, že průměrná hodnota velikosti jader u myeloblastů a promyelocytů byla prakticky shodná bez rozdílu ve velikosti jejich cytoplasmy. Konečně z výsledků měření také vyplývalo, že heterogenita jader a jadérek u leukemických blastů a promyelocytů a tak i heterogenita těchto buněk by vlastně mohla být podmíněna tím, že jsou v různé fázi buněčného cyklu. V G1 fázi jsou totiž jadérka i jádra nejmenší, jejich velikost pak v S fázi vzrůstá a je největší v G2 fázi. Velikost nukleolů i jader pak by mohla být vhodným měřítkem fáze buněčného cyklu na úrovni jedné buňky.

Rozdíly ve velikosti jadérek v jedné buňce v progenitorech jak červené, tak granulocy-

tové řady ještě ukázaly, že jeden z přítomných nukleolů v buňce je funkčně dominantní. Ten, díky větší velikosti ve srovnání s ostatními, obsahuje větší počet AgNORů (stříbrem se barvicích nukleolárních organizátorů), na jejichž periferii dochází k přepisu nové nukleolární RNA.

Závěrem lze říci, že karyometrie krevních buněk i v současné době a v současné podobě může být velmi užitečným přístupem ke studiu jejich biologie i patologie a to i na úrovni jednotlivých buněk.

*Studie byla z části podporována Výzkumným záměrem Ministerstva zdravotnictví 0002373601.*

## **HEMOFÍLIA A TROMBOFÍLIA: PORUCHA TOHO ISTÉHO GÉNU S ROZDIELNOU KLINICKOU MANIFESTÁCIOU**

P. Kubisz, M. Dobrotová, J. Ivanková, J. Staško, P. Holly  
*Klinika hematológie a transfuziológie JLF UK a MFN, Martin*

Historicky boli znížené hladiny koagulačného faktora VIII a IX známe ako hemofília A, resp. B. Zvýšená hladina FVIII a FIX je naproti tomu známou príčinou trombofilných stavov (trombofília A<sup>®</sup>?, trombofília B<sup>®</sup>?). S rozvojom metód molekulárnej biológie bolo v posledných rokoch identifikovaných veľké množstvo mutácií koagulačných faktorov a iných hemostazeologicky účinných proteínov, ktoré vedú k rozdielnemu, často protichodnému fenotypu. Znáмым príkladom je FV, kde sú na jednej strane niektoré bodové mutácie (FV Leiden, FV Cambridge, FV Liverpool) príčinou vrodenej rezistencie na aktivovaný proteín C a na druhej strane je identifikovaných okolo 40 mutácií (napr. FV Casablanca, FV Seoul 2) vedúcich k vrodenej defícitu FV, manifestujúcemu sa ako vrodenej krvácajúci stav. Cieľom prednášky je načrtnúť stručný prehľad v súčasnosti známych mutácií u vybraných koagulačných faktorov (FII, FV, FVIII, FIX, FXIII) a ďalších proteínov účastiacich sa hemostázy (trombomodulín, von Willebrandov faktor) s dôrazom na ich rozdielnu klinickú manifestáciu (vrodenej krvácajúci stavy vs. vrodenej trombofilné stavy) a na možný spoločný výskyt u toho istého pacienta.

*Práca bola podporená grantom VEGA č. 1/33810/06.*

## RESISTENCE NA KYSELINU ACETYLOSALICYLOVOU.

J. Malý, M. Pecka, P. Duliček, M. Blažek, M. Bláha

*II. interní klinika LF a FN Hradec Králové*

V současné literatuře se diskutuje řada otázek, na které se hledá odpověď.

*Jsou všichni nemocní citliví k ASA?*

*Existuje resistance na ASA nebo jde jen o důsledek poddávkování ASA lékařem či non compliance nemocného, který lék neužívá dostatečně?.*

*Jakými metodami se dá resistance zjišťovat? Jsme schopni označit nemocného s ASA resistencí?*

*Jaká je prevalence resistance na ASA?*

*Má resistance na ASA klinický význam nebo jde o laboratorní jev?*

*Je to resistance trvalá, přechodná, či závislá na dávce ASA?*

Kyselina acetylosalicylová je bezpochyby je nejstarším a nejužívanějším lékem, který má nepochybný protidestičkový efekt. V roce 1838 Rafaele Piria objevil salicylovou kyselinu a v roce 1859 Herman Kolb ji syntetizoval. V roce 1899 Felix Hoffmann syntetizoval acetylosalicylovou kyselinu. Teprve v roce 1950 bylo prokázáno prodloužení krvácivosti po podání ASA a v roce 1970 byl prokázán její antitrombotický efekt.

Snahou objektivizovat vliv protidestičkové léčby u nemocných s vysokým rizikem arteriálních uzávěrů se zabývá řada prací. Výsledky prací na toto téma jsou shrnuty v analýze 287 studií které referovaly o výsledcích 135,000 pacientů s protidestičkovou léčbou proti kontrolám. Bylo porovnáno 77,000 pacientů v různých režimech protidestičkové léčby. Hlavní sledovaným výsledkem byly : výskyt závažných cévních uzávěrů, dále nefatální srdeční infarkty, nefatální ikty nebo úmrtí na cévní onemocnění. Výsledky jsou shrnuty v publikaci: Antithrombotic Trialists' Collaboration. BMJ 2002; 324: 71–86.

Výsledky svědčí pro tyto závěry:

- ▶ Protidestičková léčba je vhodná u všech rizikových nemocných.
- ▶ Protidestičková léčba snižuje závažné cévní příhody u rizikových nemocných, srdeční infarkt, nefatální ikty, transientní ischemické ataky, nestabilní angínu pectoris, obliterující aterosklerózu tepen dolních končetin. Dále snižují rizika embolie při fibrilaci síní a rizika cévních uzávěrů u jiných nemocných s vysokým rizikem.
- ▶ Protidestičková léčba se má podávat dlouhodobě.
- ▶ Nízkodávkovaná kyselina acetylosalicylová ( ASA ) (75–150 mg/ denně) je stejně účinná jako vysoké dávky ASA .
- ▶ Antagonisté ADP-receptorů jsou jediné, které se ukazují jako efektivnější než ASA (% odds reduction ) .
- ▶ Kombinace ASA s jiným protidestičkovým lékem (clopidogrel , antagonisté GPIIb/IIa) je pro nemocné výhodná.

Inhibice funkce krevních destiček působením acetylsalicylové kyseliny (ASA) je zprostředkována cestou nevratné inhibice cyklooxygenázy. Tato inhibice je účinná již při nízkých dávkách ASA v denní dávce 80 - 160 mg. Monitorování antiagregační léčby po-

mocí acetylsalicylové kyseliny (ASA) nebylo do současné doby dobře proveditelné. Sledování léčby pomocí kolagenové křivky, případně křivky získané za použití adenosindifosfátu (ADP) neposkytuje srovnatelné a interpretovatelné výsledky. Navíc zjištěné hodnoty mohou být ovlivněny přítomností heparinu. V průběhu let se ukázalo, že někteří nemocní neprofitují z podání ASA a byl diskutován pojem ASA resistance. Jde dosud o nepřesně definovaný stav, kdy nutno minimálně hovořit o tzv. klinicky vyjádřené resistenci a resistenci laboratorní. Jako *klinická rezistence* se označují situace, kdy prevence acetylsalicylovou kyselinou (ASA) nezabránila další trombotické příhodě. Výhodnější by bylo nazvat tento jev „selháním léčby acetylsalicylovou kyselinou“. Je třeba se uvědomit, že však nemusí jít vždy o „nedostatečnou odpověď“, protože inhibice agregace vyvolané například trombinem není ovlivnitelná kyselinou acetylsalicylovou a tedy k trombotické příhodě může dojít při rozsáhlém aterosklerotickém postižení i při adekvátní inhibici destičkové funkce. Jde tedy o komplexní problém, kde není „viníkem“ acetylsalicylová kyselina, ale jde o důsledek progresivního průběhu nemoci či jiným způsobem vyvolanou aktivaci krevní destičky.

Acetylsalicylová kyselina (ASA) ireverzibilně inhibuje acetylaci cyklooxygenázu-1 (COX-1). Ireverzibilní blokáda syntézy vyplývá z toho, že krevní destička, jako bezjaderná částice nemá genetickou výbavu k novotvorbě enzymů potřebných k syntéze prostanoidů. Cyklooxygenáza katalyzuje transformaci kyseliny arachidonové uvolněné z fosfolipidové vrstvy buněčné membrány v endoteliích cévní stěny na intermediární produkt – prostaglandin  $H_2$ . Tento meziprodukt se přetváří působením tromboxansyntázy na tromboxan  $A_2$  ( $TXA_2$ ), který je hlavním induktorem shlukování trombocytů a současně významným vazokonstriktořem. Inhibicí cyklooxygenázy-1 je potlačena tvorba prostaglandinů a zejména tromboxanu  $A_2$ . K zastavené aktivitě COX-1 stačí dávka kyseliny acetylsalicylové nižší než 100 mg. Nová tvorba COX-1 restituuje až s novotvorbou trombocytů. Doba života trombocytu je přítom asi 7-14 dní. Běžně užívané chronicky podávané dávky ASA účinné k potlačení tvorby  $TXA_2$  se pohybují mezi 75 a 325 mg, přičemž je prokázáno, že nízké i vysoké dávky při chronické medikaci potlačují téměř stoprocentně tvorbu  $TXA_2$ . Podávání nízkých i vysokých dávek ASA inhibuje též tvorbu prostacyklinu, důležitého vasodilatačního a antitrombotického působku, nicméně endotelie jsou schopny rychlé syntézy COX-1 de novo a obnoví tím tvorbu prostanoidů. Aspirin ve vysokých dávkách působí protizánětlivě díky inhibici další izofomy cyklooxygenázy, a sice typu 2 (COX-2). Tento izoenzym se stává aktivním zejména po zánětlivé aktivaci endotelu, za fyziologické situace je přítomen pouze v malé frakci destiček. Expresce tohoto izoenzymu narůstá také ve chvíli nutné rychlé trombocytární regenerace. V inhibici COX-2 je ASA až 170x méně účinná než v inhibici COX-1. Nutno také zdůraznit, že vysoké dávky ASA mohou mít antitrombotický účinek nezávisle na inhibici COX-1, posílením fibrinolytické aktivity, potlačením tvorby protrombinu, zlepšením endoteliální funkce a obecně protizánětlivým působením. ASA kromě příмого protideštičkového působení působí na LDL a ovlivňuje endoteliální dysfunkci u aterosklerotických nemocných a oslabuje zánětlivou odpověď jako antioxidant. Působí i tedy nezávisle na prostaglandinech.

Nová metoda ke sledování antiagregační léčby pomocí ASA využívá k vyvolání agregační odpovědi kationtové substance propylgallátu (Cationic Propyl Gallate – CPG). Stanovení probíhá v optickém agregometru za použití destičkami bohaté (PRP) a chudé (PPP) plasmu. Měří se výška maximální amplitudy (ma), rychlost náběhu agregační křivky (ms - slope) a doba potřebná k dosažení 50 % ma (T50). Je - li to možné změří se agregační

odpověď před podáním protidestičkové terapie (ASA) a pak se provádí pravidelná měření v průběhu terapie, dokud se nedosáhne optimálního snížení hodnoty slope. Kontroly po dosažení této hodnoty je potom možné provádět v delších časových intervalech. Heparin do hodnoty 4,0 IU/ml nemá vliv na výsledek vyšetření. Počty destiček pod 100. 10<sup>9</sup>/l mohou významně ovlivnit výsledek testu. Nelze stanovit vzorky s chylózní, ikterickou a hemolytickou plazmou. Příčiny aspirinové resistance nejsou zcela jasné a její stanovení je diskutabilní. Tabulka 5 ukazuje možné příčiny aspirinové resistance.

**Tabulka 1. Faktory ovlivňující aspirinovou resistenci**

<b>KLINICKÉ FAKTORY</b>	<b>BUNĚČNÉ FAKTORY</b>	<b>GENETICKÉ POLYMORFIZMY</b>
<b>Nízké dávkování, nebo nepravidelné dávkování ASA</b>	Regenerovaná, neinhibovaná cyklooxygenáza 1 v jaderných buňkách	Polymorfismus COX-1 (alteruje aktivní místo a brání acetylaci aspirinem), COX 2, Tromboxan A <sub>2</sub> , syntetázy
<b>Non compliace nemocného</b>	Zvýšená exprese COX-2 mRNA	Polymorfismus GPIa/Iia, Ib/V/ IX, a IIb/IIIa receptoru
<b>Poruchy vstřebávání ASA</b>	Zvýšení noradrenalinu	Polymorfismus kolagenového receptoru
<b>Interakce s ibuprofenem (interakce s acetylací ASA)</b>	Tvorba 8-iso-PGF <sub>2α</sub>	Polymorfismus receptoru pro v Willebrandův faktor
<b>Akcentace shlukování destiček zevnější faktory (kouření, stres)</b>	zvýšený obrat destiček v kostní dřeni jako odpověď na stres (například po aortokoronárním bypassu)	Polymorfismus faktoru XIII Val34Leu, který vede k inhibici aktivace faktoru XIII při léčbě ASA
<b>Cévní uzávěry, které nevznikají na podkladě aterotrombózy (embolizace, vegetace, nádorové hmoty, umělé látky)</b>	Zvýšená senzitivita destiček na kolagen a ADP	
<b>Arteritidy</b>	Aktivace destiček například aktivitou červených krvinek	

Tak jako se obtížně definuje aspirinová resistance, je obtížné její laboratorní stanovení. Podle použitých metodik ve studiích se liší i její prevalence.

**Tabulka 2. Vybrané studie a laboratorní testy sledující zjišťující resistenci na ASA**

STUDIE	DÁVKA ASA V MG	METODA STANOVENÍ ASA RESISTENCE	KRITERIA ASA RESISTENCE	PREVALENCE ASA RESISTENCE
Nemocní po aortokoronárním bypassu (Buchanan et al)	325	krvácivost	Neproloužení krvácivosti	43%
Nemocní se stabilní ischemickou chorobou srdeční (Gumm et al)	325	PFA 100 + ADP a kolagenová agregace	Normální čas po kolagenu a adrenalinu	9,5%
Nemocní po náhlé cévní příhodě mozkové (Helgason et al)	325	Agregometrie, ADP, EPI, Col, ARA		25%
Nemocní se stabilní angínou pectoris (Macchi et al)	160	PFA 100	Closure time <185 sec	29,2%
Nemocní se stabilní angínou pectoris (Andersen et al)	ASA 160 ASA 75 + Coumadin	PFA 100	Closure time <196 sec	1,36 2,4
Nemocní se stabilní angínou pectoris (Wang et al)	325	Ultegra- RPFA	ARU > 550	23,0%
Nemocní po elektivní PCI (Chen et al.)	80-325	Ultegra- RPFA	ARU > 550	19,2%
Nemocní po náhlé cévní příhodě mozkové (Eikelboom et al)	325	Močová koncentrace 11-dehydrotromboxanu B <sub>2</sub>	Zvýšení oproti kontrolní skupině	Prevalence nestanovena

Legenda: PFA 100 – platelet function analyser, RPFA – rapid platelet function analyser

Na více souborech bylo prokázáno, že nemocní s resistencí na ASA mají větší četnost fatálních i nefatálních koronárních příhod než respondeři. Resistance na ASA je ovažována

za nový rizikový faktor arteriální trombózy (5, 7, 8). Jednou z možností jak obejít ASA rezistenci by mohlo být použití protidestičkových léků, které neblokují syntézu prostaglandinů. Thienopyridiny blokují ADP a inhibují vazbu na fibrinogen pomocí receptoru GPIIb/IIIa, ale na GPIIb/IIIa přímo nepůsobí. Inhibice ADP indukované agregace je 50-60% po 4-6 dnech. Dochází i k blokádě uvolňování ADP z denzních granulí a tím se blokuje sekundární agregace vyvolanou  $Ca^{++}$  a serotoninem a release z velmi denzních granulí (alfa) (trombosodin a fibrinogen).

**Tabulka 3. Laboratorní testy používané k měření protidestičkového působení ASA**

Test	Metoda	Výhody	Nevýhody
Agregace destiček	Optické metody	Dobrá korelace s klinikou	Nespecifické Nejasná senzitivita Laboratorně obtížné závislé na interpretaci
Agregace destiček	Poloautomatické měření aktivity destiček (PFA 100, Ultegra RPFA)	Jednoduché, rychlé	Nespecifické Nejasné senzitivity Nejasné korelace s klinikou
Krvácivost	Vyšetření kapilární krvácivosti z řezu	Jednoduché použitelné snadno	Nespecifické Nesenzitivní Závislé na provedení Omezená reprodukovatelnost Nejasné korelace s klinikou
Tvorba tromboxanu	Vyšetření metabolitů tromboxanu v moči	Korelace s klinikou	Nejasné specifická Nejasná senzitivita Nejasná reprodukovatelnost

Na našem pracovišti jsme se také zabývali ASA rezistencí. Vyšetřili jsme 342 nemocných s ischemickou chorobou srdeční, kteří brali 100 mg ASA denně pomocí agregace po kationickém propylgallátu (CPG) a pomocí vyšetření primární hemostázy na přístroji PFA 100. Při dávce 100 mg ASA byla prevalence resistance po CPG u nemocných s ICHS 12,1% a prevalence pomocí PFA 100 15,3%. Při titraci dávky u nonrespondentů (zvýšení na 200 mg) vede ke snížení počtu resistantních nemocných na 7,6%. Naopak 20% nemocných citlivě reaguje na nižší dávky než 100 mg ASA. Domníváme se, že vyšetření ASA resistance zřejmě odhaluje destičkovou hyperaktivitu.

#### Literatura:

1. Schwartz K.A, Schwartz D.E, Davis J.A: *Detection and monitoring of aspirin inhibition of platelet function using the cationic propyl gallate platelet aggregation assay. In: Abstract Book American Society of Hematology Meeting, 1998 :17-19*



2. Kottke-Marchant, K., Corcoran G.: *The Laboratory Diagnosis of Platelet Disorders An Algorithmic Approach*. Arch. Pathol. Labor. Med. 2001, 126, 2, 133–146.
3. Maree A.O., Fitzgerald D.J.: *Aspirin and coronary artery disease*. Thromb Haemost. 2004, 92:1175-1181
4. Bhatt D.L.: *Aspirin resistance: more than Just a laboratory curiosity*, JACC, 2004. 43,6, 1127-1129
5. Gum P.A., Kottke-Marchant K., Welsh P.A. et al.: *A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease*. J Am Coll Cardiol. 2003 Mar 19;41(6):961-5
6. Antithrombotics Trialist's Collaboration. *Collaborative metaanalysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction and stroke in high risk patients*. BMJ, 1999, 318:759-764
7. Chen W.H., Lee P.Y., Ng W. et al.: *Aspirin resistance in associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment*. J Am Coll Cardiol, 2004, 43: 1122-1126
8. Eikelboom J.W., Hirsh J., Weitz J.I. et al.: *Aspirin resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events*, Circulation 2002, 105, 1650-5
9. Hankey G.J., Eikelboom J.W. :*Aspirin resistance*, BMJ 2004,328, 477-479
10. Kurth T., Glynn R.J., Walker A.M. et al.: *Inhibition of clinocal benefits of aspirin on first myocardial infarction by nonsteroidal intinflammatory drugs* Circulation 2003 108, 1191-5
11. MacDonald , T.M., Wei L. *Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin*. Lancet 2003 361, 572-4
12. Mason P.J., Freedman J.E., Jacobs A.K.: *Aspirin resistance :current concepts.*, Rev. Cardiovasc. Med 2004, 5,3. 156-163
13. Malý J., Pecka M., Duliček P., Malý R., Gregor J., Blažek M., Bláha M.: *Výšetření aktivity destiček se vztahem k resistenci na kyselinu acetylosalicylovou.*, Sborník XI. Slovensko- České konference o hemostáze a trombóze, vyd. Univerzita Komenského Bratislava 2004 s. 26-29.
14. Pecka M., Gregor J., Urbankova J., Pudil J., Maly J.: *Use of propyl gallate in monitoring of antiaggregation therapy with ASA in patients with cardiovascular syndrome in. Reports from the 17 th International Congress on Thrombosis 2002*, ed. S. Cocheri. G. Gensini, G. Palareti. D. Prisce. Monduzzi Ed. s. 15-18.

Práce byla podpořena grantem IGA č. 8036/3/04 a výzkumným záměrem MZd ČR 00179906.

## ANÉMIE PRI ONKOLOGICKÝCH OCHORENIACH

T. Lipšic

*HTO-Klinika laboratórnej medicíny – OÚSA, LFUK, TU, VŠZaSP, Bratislava*

**AOD** - anémia pri onkologických ochoreniach vystupuje stále viac do popredia ako závažný problém pre jej vysokú prevalenciu ale aj pre časté diagnostické omyly, u značnej časti prípadov aj neadekvátnu a neúčinnu terapiu s následným znížením efektívnosti onkologickej terapie a znížením kvality života pacienta.

**PATOFYZIOLÓGIA:** Anémia pri onkologickom ochorení je imunitne podmieneným syndrómom rezultujúcim z komplexných interakcií medzi bunkami tumoru a imunitným systémom. Patologická aktivácia makrofagového systému a následná zvýšená expresia niektorých zápalových cytokínov spôsobuje supresiu erytroidných buniek, nedostatočnú produkciu erythropoetínu, multifokálne poruchy metabolizmu železa a skrátené prežívanie erythrocytov. Bunky tumoru môžu produkovať proinflamačné cytokíny a voľné radikály poškodzujúce erytroidné progenitory a iné tkanivá. Na anémii sa môžu podieľať epizódy krvácania, infiltrácia kostnej drene bunkami tumoru, malabsorbcia, malnutricia, (deficity), splenomegália, orgánové dysfunkcie (renálna, iné), rádio- a chemoterapia.

**DEFINÍCIA:** anémia mierneho až výrazného stupňa z defektu erytropoézy, metabolizmu železa, strát-deštrukcie erythrocytov a z iných pridružených s tumorom asociovaných príčin.

**PREVALENCIA:** výskyt anémie pri onkologických ochoreniach je vysoký a dosahuje 30-55% - je jednou z najčastejších príčin anémie pri chronickom ochorení

### DIAGNOSTIKA

Klinické vyšetrenie a anamnéza sú odrazom symptomatológie základného ochorenia, často v kombinácii so symptómami anémie, niekedy sú v popredí len symptómy anémie.

Laboratórne vyšetrenia - komplexné vyšetrenie zahŕňa numerické a morfológické hematologické vyšetrenia, profily železa, pečene, obličiek, tu- a zápalových markerov.

Laboratórne vyšetrenia - diagnostické spektrum je podobné ako pri anémii z deficitu železa (IDA) alebo anémii pri chronickom ochorení (ACD).

Konfigurácia je často charakterizovaná mikrocytovou hypochrómnu anémiou, hypoferémiou a hypotransferinémiou, hyperferitinémiou a prítomnosťou tu-markerov a reaktantov akútnej fázy. Ostatné parametre sú určované typom a fázou základného ochorenia.

Inštrumentálne – in-vivo vyšetrenia - podľa potreby sú indikované in vivo zobrazovacie (USG, CT, NMR, PET) a iné postupy.

Konfigurácie parametrov sú variabilné štruktúrou, kvalitatívne aj kvantitatívne

### ZÁVER:

Etiológia a patogenéza anémie pri onkologickom ochorení je multifaktoriálna. Komplexný prístup k anémii predchádza zanedbanej diagnostike, vedie k detekcii ochorenia a určení jeho etiopatogenézy - prispieva k správnej, včasnej a efektívnej terapii. Kontinuálne monitorovanie a terapia anémie pri onkologickom ochorení sú základným predpokladom efektívneho riešenia.

## CO STANOVUJÍ TESTY NA D-DIMER?

J. E. Dyr

*Ústav hematologie a krevní transfuze Praha*

Stanovení D-dimeru využívá specifické protilátky pro stanovení struktur, které se vytvářejí při vzniku a/nebo proteolytické degradaci fibrinu. Tyto struktury v krevním řečišti „nově“ vznikají, jsou to nové antigenní determinanty (epitopy) a bývají proto označovány jako neoepitopy. Nové struktury vznikají při odštěpování fibrinopeptidů A i B z fibrinogenu katalyzovaném trombinem, při polymeraci fibrinu i při tvorbě nových kovalentních vazeb katalyzovaných aktivovaným koagulačním faktorem XIIIa, které spojují intramolekulárně gama řetězce fibrinu (tvoří se poměrně velmi rychle) a alfa řetězce fibrinu, které vznikají výrazně pomaleji (v hodinách).

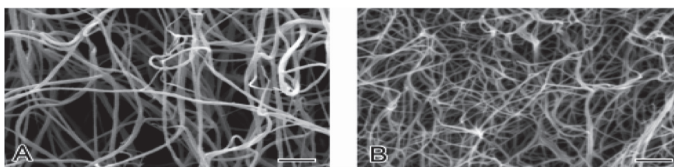
Protilátky v jednotlivých komerčních testech rozeznávají různé struktury. Většina používaných protilátek nereaguje s fibrinogenem a reaguje s izolovaným proteolytickým fragmentem stabilizovaného fibrinu, tzv. D-dimerem. Tento fragment se skládá ze dvou kovalentně spojených (enzymatickým působením aktivovaného faktoru XIIIa) D-domén pocházejících ze dvou různých molekul fibrinogenu. Samotný D-dimer se v cirkulující krvi nevyskytuje, je vždy součástí některého z celé řady různě velkých fibrinových derivátů s molekulární hmotností větší než  $2 \times 10^6$  daltonů. Na těchto derivátech mohou být jednotlivé neoepitopy různě dostupné (reaktivní) a jsou zastoupené v různých počtech. Některé protilátky reagují s konformačními neoepitopy, které vznikají při polymeraci fibrinového monomeru a které se vyskytují i v „nestabilizovaném“ fibrinu.

Charakter, velikost a množství fibrinových derivátů jsou určovány tím, jaký fibrin (tloušťka a uspořádání fibrinových vláken) a jak (čím) byl fragmentován (degradován). Fibrinolýza je závislá na vazbě aktivátorů i inhibitorů a na struktuře fibrinu. Strukturu fibrinu ovlivňuje řada faktorů, nejvýrazněji samotná koncentrace trombinu (obr.1). Se stoupající koncentrací trombinu se zmenšuje tloušťka fibrinových vláken. Plasmin (mechanismem, který je podmiňen jeho specifickou doménovou skladbou) z fibrinu jednotlivé degradační fragmenty „vystřihuje“. Z tenčích fibrinových vláken se tedy tvoří menší degradační produkty.

Používané protilátky se významně liší také ve specifitě, aviditě a afinitě. Liší se také uspořádání imunotestů a proto obecně platí, že jednotlivá stanovení D-dimerů se mohou lišit a mohou spíše vyloučit přítomnost fibrinových derivátů než ji potvrdit.

Možnosti standardizace stanovení D-dimeru jsou průběžně posuzovány komisemi International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH), která provedla opakovaně několik mezinárodních srovnání. Reaktivita komerčních kitů se velmi liší a není pravděpodobné, že bude stanoven mezinárodní akceptovaný standard D-dimeru. Na druhé straně je skutečností, že velká většina komerčních kitů vyhodnotí klinické vzorky s vysokým obsahem D-dimeru jako patologické.

Je zřejmé, že velká část fibrinogenových molekul, které jsou konvertovány do fibrinu není kompletně degradována na D-dimer. Proto je vhodnější vyjadřovat množství stanoveného D-dimeru v ng/mL a ne v různých tzv. fibrinogenových ekvivalentních jednotkách (fibrinogen equivalent units, FEU).



**Obr.1.** Skenovací elektronová mikroskopie fibrinu, délka úsečky 0,5  $\mu\text{m}$  koncentrace výchozího fibrinogenu, 1 mg/mL; trombinu, A, 0,1 NIH u/ml, B, 5 NIH u/ml.

#### Literatura:

1. Dyr J.E., Cajthamlová H., Suttnar J. (1990) *Monoklonální protilátky proti fibrinogenu a fibrinu a proti jejich proteolytickým degradačním produktům. Čas.lék. čes., 129,1349-1351*
2. Dyr J.E., Ryšavá J., Suttnar J., Homola J., Tobiška P. (2001): *Optical sensing of the initial stages in the growth and development of fibrin clot. Sensors and Actuators B 74, 69-73*
3. Weisel J.W. (2005) *Fibrinogen and fibrin. Adv.Protein Chem. 70, 247-299*

*Tato práce byla podpořena Výzkumným záměrem MZ ČR 2373601.*

## HEREDITÁRNÍ HEMOCHROMATÓZA

J. Novotný, Z. Čech, M. Penka  
*Oddělení klinické hematologie FN Brno*

**Úvod.** Železo je biogenní prvek, vyskytující se ve všech živých buňkách od jednobuněčných organismů (bakterie, kvasinky) až po savce. Atom železa je schopen velmi snadno vázat i uvolňovat elektron, čehož živé buňky využívají v celé řadě vitálních biochemických reakcí. Na druhé straně nadbytek železa ohrožuje organismus generací toxických volných radikálů, které mohou oxidací poškozovat proteiny, lipidy i nukleové kyseliny a způsobit tak závažné poškození až smrt buněk. Hereditární hemochromatóza byla popsána v 19. století jako tzv. bronzový diabetes. Šlo o plně vyjádřenou penetraci vrozené dispozice k přetížení železem s postižením parenchymatózních orgánů, srdce, kloubů, kůže a endokrinního systému. Hlavní kandidátní gen pro hemochromatózu byl popsán až v roce 1996 Federem a kol. a byl nazván HFE. Bylo popsáno již přes třicet mutací i polymorfizmů HFE genu, z nich nejčastější jsou bodové mutace C282Y, H63D a S65C. Mutace C282Y tvoří nejfrekventnější genetický základ pro hemochromatózu v bělošské populaci - frekvence heterozygotů zde obnáší 5 – 12%, homozygotní stav C282Y lze

detekovat až u 80% bělošských pacientů s hereditární hemochromatózou. Klasická HFE hemochromatóza představuje autozomálně recesivní onemocnění s inkompletní penetrací (1-50%). Byly však popsány i mutace v dalších genech, kódujících proteiny regulace metabolismu železa, které zapříčiňují vrozenou dispozici k přetížení organismu železem pod obrazem tzv. non-HFE hemochromatóz.

**Soubor nemocných a metodika.** V molekulárně biologické laboratoři OKH FN Brno bylo od roku 2004 vyšetřeno 433 pacientů s podezřením na hereditární hemochromatózu. Mutace HFE C282Y byla detekována pomocí PCR s následným štěpením restriční endonukleázou Rsa I, mutace H63D pomocí PCR s následným štěpením restriční endonukleázou Mbo I.

**Výsledky.** Výše uvedenými metodikami bylo nalezeno 23 (5,3%) homozygotů HFE C282Y a 23 (5,3%) dvojitých heterozygotů HFE C282Y/H63D.

**Diskuze.** Frekvence výskytu hereditární hemochromatózy v bílé evropské populaci je udávána mezi 1:200 až 1:400 obyvatel. Vysoký podíl homozygotů HFE C282Y a dvojitých heterozygotů HFE H63D/C282Y v námi vyšetřeném vzorku pacientů lze vysvětlit selekcí, jelikož nejde o obecnou populaci ale o lékaři cíleně vybrané nemocné, většinou na bázi hypersiderémie a/nebo hyperferitinémie.

**Závěr.** V populaci cíleně na hereditární hemochromatózu vyšetřených nemocných lze očekávat vyšší výskyt mutací HFE genu než v obecné populaci. V námi vyšetřené skupině pacientů byla zjištěna frekvence genotypů zapříčiňujících vrozenou dispozici k přetížení organismu železem cca 10%.

#### **Literatura:**

1. Deicher R, Horl WH: *New insights into the regulation of iron homeostasis. Eur J Clin Invest* 2006, 36:301-309
2. Vantyghem MC, Fajardy I, Dhont F et al. *Phenotype and HFE genotype in a population with abnormal iron markers recruited from an Endocrinology department. Eur J Endocrin* 2006, 154: 835-841
3. Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J, Marx JJ: *Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. Clin Chem* 2006, 52: 950-968

## CLINICAL POTENTIAL OF EMERGING ANTICOAGULANTS

P. Klement<sup>1,2</sup>, H. Klement<sup>2</sup>, J. Rak<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Henderson Research Centre and McMaster University  
711 Concession Street, Hamilton, Ontario, Canada, L8V 1C3  
Ph: 905-527-2299 ext 43780, Email: pklement@thrombosis.hhscr.org

<sup>2</sup> University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences<sup>2</sup>  
Palackeho 1/3, 612 00 Brno, Czech Republic, Ph: 420-723-003-057,  
Email: halkaklement@centrum.cz

<sup>3</sup> McGill University, Montreal Children's Hospital Research Institute, Place Toulon,  
4060 Ste Catherine West, PT-232, Montreal, Quebec, Canada, H3Z 2Z3,  
Ph: 514-412-4400 ext 22342, Email: janusz.rak@mcgill.ca

Currently used anticoagulants such as unfractionated and low molecular heparin (UFH, LMWH), and warfarin derivatives, although generally effective in prevention and treatment of thromboembolic arterial and venous conditions, have several shortcomings including: compliance, delivery, efficacy and safety in various disease settings. For these reasons new anticoagulants are being developed to inhibit blood coagulation at several steps. Agents that target **an initiation phase** of coagulation such as a recombinant tissue factor pathway inhibitor (rTFPI), nematode anticoagulant peptide (NAPc2), active site-blocked factor VIIa (FVIIai), antibodies against TF and RNA aptamer (a high affinity nuclease resistant RNA ligand) mainly inactivate tissue factor/factor VIIa complex. **Propagation phase** of thrombus formation is targeted by various indirect, direct and bimodal inhibitors of factors IXa, Xa, VIIIa or Va, including: RNA aptamer, fondaparinux, indraparinux, tick anticoagulant peptide (TAP), antistatin (ANT), antithrombin-heparin covalent complex (ATH). All these agents are expressing mostly an anti-FXa activity except RNA aptamer with anti-FIXa activity. TAP, ANT, RNA aptamer, and ATH have not progressed beyond pre-clinical animal testing. Stimulators of the protein C (PC) pathway also belong to this group due to the ability of APC to down regulate thrombin generation. These include natural, or recombinant proteins such as PC, activated PC (APC), soluble thrombomodulin (ST) and low dose of thrombin (FIIa) and mutant thrombin (MFII without pro-coagulant activities but with high affinity to PC). These compounds have shown promising results in animal models of thrombosis and sepsis. Interestingly, APC had no impact on outcome of sepsis in pediatric population. Though APC is now approved for the treatment of severe sepsis in adults therapeutic benefits of this agent have been recently questioned. Lastly, **inhibitors of thrombin activity** mostly include either indirect (e.g. heparin mimetics, fucoidans), direct thrombin inhibitors (e.g. hirudin, argatroban, melagatran, dabigatran, and bivalirudin), or bimodal agents (with both direct and indirect mechanism of action, e.g. ATH). Many of these anticoagulants are either in pre-clinical (ATH, fucoidans) or clinical (dabigatran) development, or already approved for clinical use (fondaparinux, bivalirudin).

Although progress has been made many obstacles still remain, including: antidote availability, side effects and cost-effectiveness of many new agents. In addition, an emerging novel area of investigation involves coagulation-independent activities of FIIa, FXa and TF, their activated natural inhibitors (HC II and AT) and respective pharmacological antagonists, particularly in processes such as wound healing, inflammation, angiogenesis, mitogenesis and cell survival, signal transduction and cancer. Future studies will shed more light on the therapeutic consequences of these findings.

## THROMBOSIS AND HEMOSTASIS

Hemostatic plaque formation represents a physiological response to the vessel wall injury, which limits loss of blood. A highly regulated balance between endogenous pro- (e.g. thrombin) and anticoagulant influences (e.g. antithrombin), as well as a fibrinolytic mechanisms (e.g. plasmin, antiplasmin) ensures a measured response to vascular discontinuity by the elements of blood and the extravascular environment, all of which could be significantly affected by pathological processes (atherosclerosis, inflammation and cancer) as well as medical intervention (surgery, extracorporeal circulation or indwelling catheters and medication) (*Friedman, 1987; Colwell, 2006; Adess, 2006*). Indeed, various elements of the Virchow's triad could be involved in aberrant blood clotting including: (i) blood hypercoagulability, (ii) blood stasis and (iii) vessel wall injury, with differential mechanisms being engaged in each case under either low shear (venous) or high shear (arterial) conditions (*DeWood, 1980; Lensing, 1999; Schoni, 2006; Bosler, 2006; Adess, 2006*).

This considerable complexity necessitates a corresponding sophistication in anticoagulant treatment approaches aimed at restricting/eliminating aberrant clotting events, while retaining efficient systemic hemostasis. For instance, major orthopedic surgery, namely hip and knee replacement, is often associated with deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE) where thrombi are composed of rich fibrin networks containing blood cells (*Colwell, 2006; Liu, 2006*). On the other hand arterial thrombi, such as those formed around atherosclerotic plaques are mainly composed of platelet aggregates embedded in the fibrin mesh (*DeWood, 1980*). Although related to the hemostatic dysfunction each of these pathologic processes has its own specific nature and dynamics the latter often leading to distinct medical emergencies, such as DVT, pulmonary embolization (PE), acute myocardial infarction (AMI) or thromboembolic stroke (TES).

## CLASSICAL ANTICOAGULANTS

Optimal resolution of diverse thromboembolic conditions (arterial and venous) are only partially met by classical anticoagulants (*Hirsh, 2003; Levi, 2005; Bates, 2006*). Of those, low molecular weight heparins (LMWHs) and unfractionated heparin (UFH) are presently used for prevention and treatment of most patients with thromboembolism (*Hirsh, 2003; Kearon, 2006*). Both agents are not always fully effective and their use is often associated with complications, such as spontaneous bleeding, re-currency of thrombosis after treatment termination and heparin induced thrombocytopenia (HIT) (*Hirsh, 2003; Bates, 2006*). Long-term antithrombotic strategy is presently met, to some degree by coumarin (warfarin) derivatives even though they require time-consuming and expensive coagulation monitoring tests, due to their narrow therapeutic window and interaction with diet or concomitant medication (*Hirsh, 2003*). For these reasons new anticoagulants are being developed. These agents are designed to target critical steps in the coagulation process, namely: (i) **initiation**, (ii) **propagation** and (iii) the final burst of **thrombin activity** in hope to alleviate shortcomings of classical anticoagulants, as well as improve antithrombotic efficacy, while preserving hemostasis.

## EMERGING ANTICOAGULANTS

### ***Inhibitors of the initiation phase of coagulation***

Since tissue factor (TF) plays a significant role in initiation of coagulation associated with many diseases such as cancer, atherosclerosis and inflammation its inhibition has been a focus of intensive research (Wojtukiewicz, 2001; Igbal, 2002; Yu, 2004; Lwaleed, 2006; Rak, 2006; Viles-Gonzalez, 2006). Agents that inhibit TF initiated phase of coagulation include recombinant tissue factor pathway inhibitor (rTFPI), nematode anticoagulant peptide (NAPc2), active site-blocked factor VIIa (Factor VIIai), RNA aptamer (an small RNA-oligonucleotide), and TF targeting antibodies. Of those rTFPI (tifacogin) was promising in pre-clinical animal testing, but offered no benefit in reducing all-cause mortality at 28 days in patients suffering from severe sepsis (phase III clinical trials) (Creasey, 1993; Bajaj, 1997; Abraham, 2001, 2003; Matyal, 2005). Presently tifacogin is being evaluated in patients with severe community acquired pneumonia. The frontrunner in this regard is an activated protein C (APC) achieving promising results in clinical testing (Manns, 2002). NAPc2, an 85 amino acid anticoagulant protein extracted from canine round worm *Ancylostoma caninum* binds to non-catalytic sites of factor X and Xa and blocks the activity of the TF/VIIa/Xa complex (Stassens, 1996). NAPc2 was effective in prevention of venous thromboembolism after elective knee replacement, though when compared to historical controls it was not different in efficacy/safety than LMWH (Lee, 2001, 2003). This agent is also being tested in several phase II clinical trials involving patients suffering from unstable angina, non-ST-myocardial infarction and coronary angioplasty (PTCA) where it is co-administered with aspirin, clopidogrel, heparins (UFH, LMWH) or GPIIb/IIIa inhibitors. However, the long half-life of rNAPc2 (50 hours) may present a safety concern in some clinical settings. An active site inhibited Factor VIIa (FVIIai) acts as a competitive inhibitor of TF-dependent activation of factors X and IX. While effective in pre-clinical testing, its clinical assessment as an antithrombotic agent has thus far been disappointing when compared to heparin in MI, PTCA, and other medical conditions (Jang, 1995; Harker, 1997; Giesen, 1999; Lincoff, 2000). Lastly, a new inhibitor of FVII/FVIIa was isolated from a combinatorial RNA library, as an active aptamer. This new high affinity, nuclease-resistant RNA ligand binds specifically (like monoclonal antibodies) to factor VII/VIIa thus preventing assembly of a functional FVII/TF complex. The major advantage of this agent is that its anticoagulant activities could be fully reversed by a specific antidote (Rusconi, 2000; Nimjee, 2005). This agent is currently in pre-clinical testing.

### ***Inhibitors of propagation of blood coagulation***

This group of agents includes novel inhibitors of factors IXa, Xa, VIIIa or Va. Of those, factor IXa with blocked active site (FIXai) competes with the natural factor IXa for access to the tenase complex on the surface of activated platelets. Indeed, in a canine model of coronary injury, factor IXai was shown to attenuate thrombosis (Benedict, 1991). Monoclonal antibodies against factor IX/IXa also exhibited antithrombotic activity, notably in a rat arterial thrombosis model (Bajaj, 1985; Feuerstein, 1999). Although promising in pre-clinical animal models of arterial thrombosis and in some phase I studies, both agents have yet to undergo further assessment and development. A new orally



available factor IXa inhibitor TT889, after successful completion of phase I is currently in phase II clinical evaluation (Eriksson, 2006a). A novel RNA aptamer against FIXa has been developed, as well. Anticoagulant activity of this agent could be fully reversed by a specific complementary small nucleotide. So far, pre-clinical testing on animal models of thrombosis and cardiopulmonary bypass show excellent antithrombotic efficacy (Rusconi, 2002, 2004; Nimjee, 2006).

Propagation of thrombosis can also be controlled by *stimulators of the protein C pathway*. These agents activate or supplement endogenous protein C (APC) and its cofactor protein S that in turn inactivate factor Va and VIIIa, both key components of intrinsic tenase and prothrombinase (Norstrom, 2006; Varfaj, 2006). In this regard, natural protein C (PC), activated protein C (APC) and soluble thrombomodulin are in the most advanced stages of testing. Protein C and APC are available in both plasma-derived and recombinant forms. In patients with meningococcaemia, or severe sepsis treated with PC concentrate, reduction in mortality was reported when compared to placebo (Ettinghausen, 1999; White, 2000). Subsequent clinical trials expanded and confirmed previous observations reporting a significant reduction (~19%) in death in adult patients with severe sepsis treated with iv recombinant APC (Bernard, 2001; Manns, 2002). Despite the fact that the rate of major bleedings increased when compared to placebo the APC [drotrecogin and recombinant human activated protein (rhAPC)] has been licensed in North America for adult patients with severe sepsis with failure of at least two organs. Other studies have also confirmed bleeding tendencies associated with APC therapy (Vincent, 2005). Surprisingly APC had no effect on a mortality rate but increases rate of major bleedings in patients with severe sepsis with low risk of death (Abraham, 2005). Furthermore when APC treatment was compared to placebo in children with severe sepsis, the trial had to be stopped prematurely due to the lack of benefit at interim evaluation (Bates, 2006). Based on these and recent studies the role of APC therapy in patients (adults and children) with sepsis has been questioned (Gardlund, 2006). Soluble form of thrombomodulin (ST) has been developed to binds FIIa and while in complex with Protein S it will activate PC. In animal models recombinant ST has shown antithrombotic effect, but the drug half life of 2-3 days after subcutaneous injection represents a significant consideration (Gomi, 1990; Aoki, 1994). When used for thromboprophylaxis in patients undergoing elective hip arthroplasty ST in higher dose produced increase in major bleedings (when compared to a lower dose), however no venographically detected DVT, or symptomatic PE was observed (Kearon, 2005). Further clinical trials are needed to compare an efficacy safety profile of ST to that of LMWH or fondaparinux in thromboprophylaxis. Interestingly, low doses of thrombin, as well as mutant thrombin (without coagulant activity) when infused into animal models of thrombosis result in formation of TM/APC complexes providing safe and effective anticoagulation (Wu, 1991; Cantwell, 2000; Marzec, 2005).

*Factor Xa inhibitors* express their anticoagulant activity either *indirectly* via antithrombin (AT) or *directly* by inactivating the catalytic site of factor Xa, or by both modes of action combined – *bimodal mechanism* (Bates, 2006; Klement, 2006). In the first instance *indirect FXa inhibitors* form a complex with AT first and then bind/inactivate soluble factor Xa. However, several *in vitro* and *in vivo* studies have suggested the inability of these agents to block ‘bound’ (platelet-associated) FXa activity (Brufatto, 2001; Rezaie, 2001). Typical examples of this group of agents are synthetic pentasaccharides such as fondaparinux and idraparinux (a hypermethylated derivative of fondaparinux). Due to their short carbohydrate

chains these agents could only bridge AT to Xa, but not to thrombin (FIIa). Due to this mode of action only generation (but not activity) of thrombin is inhibited. Because these agents do not interact with other plasma proteins, platelet factor 4 (PF4), or platelet surfaces they induce a predictable anti-Xa response (100% bioavailability vs. 80-90% of that of LMWH after subcutaneous administration) (Bates, 2006). Although recent study has suggested that fondaparinux may provoke formation of anti PF-4 antibodies, there is no clinical experience suggesting that its administration would facilitate heparin-induced thrombocytopenia (HIT) (Warkentin, 2005; Savi, 2005; Kovacs, 2005). Current clinical evidence suggests that fondaparinux might be used as an alternative anticoagulant in patients with history of HIT (Hassel, 2005). Half-life of fondaparinux and idraparinux is 17 and 80 hours, respectively vs. 4 hours of LMWH (Herbert, 1998; Boneu, 1995). Both agents are not neutralized by protamine sulfate, an antidote for UFH (with partial neutralizing activity against LMWH) (Walenga, 2002). Unfortunately due to the absence of an antidote and long half-life, the use of idraparinux in the clinic may be somewhat limited. When fondaparinux was compared to enoxaparin for thromboprophylaxis after hip fracture surgery, or elective knee, or hip arthroplasty (meta-analysis of four phase III trials), the risk of venous thromboembolism was significantly reduced by approximately 55% (Bauer, 2001; Eriksson, 2001; Lassen, 2002; Turpie, 2002a,b). It has been suggested that such benefit may be in part due to an early drug administration after surgery (6 hours vs. 12 to 24 hours delay in the case of enoxaparin). This circumstance may also explain an increase in major bleeds when compared to enoxaparin (Turpie, 2003). Interestingly, prolonged administration of fondaparinux (from one to four weeks) following surgery for hip fracture significantly reduced a composite incidence of DVT (by routine venography) and symptomatic venous thromboembolism from 35% to 1.4% (Eriksson, 2003). When fondaparinux was compared to LMWH (dalteparin) in the context of thromboprophylaxis in both medical and surgical patients, former agent was as (or more) effective as was administration of dalteparin, and without exacerbation of major bleeding complications (Agnelli, 2003, 2005a; Turpie, 2005a; Cohen, 2006;). In patients suffering from DVT or PE fondaparinux produced therapeutic outcomes comparable to those of UFH, or LMWH (MATISSE Investigators, 2003; Buller, 2004). When fondaparinux was used for the treatment of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction it was as potent as enoxaparin at preventing death, new infarction and ischemia, but the rate of clinically important bleeding was lower (Yusuf, 2006a; McClanahan, 2006). When combined with alteplase (ALT) for treatment of patients suffering from acute myocardial infarction (AMI) with elevated ST-segment, administration of fondaparinux was associated with patency rate similar to that induced by UFH with ATL therapy (Yusuf, 2006b). Interestingly, both treatment strategies in this trial were associated with similar bleeding rates. In a phase II dose-finding trial idraparinux (once a week sc.) was compared to warfarin therapy in patients with proximal DVT following initial treatment with enoxaparin for one week (PERSIST Investigators, 2004). There were no significant differences between these treatments in the rates of normalization of ultrasonography and lung perfusion scanning, while unacceptably high rates of major bleeding were associated with high doses (10 mg) of idraparinux. Indeed, an excess of bleeding was the reason for premature termination of the phase III study comparing once weekly idraparinux with warfarin in patients with atrial fibrillation (Bates, 2006).

*Direct FXa inhibitors:* This group of anticoagulants includes many new agents such as tick anticoagulant peptide (TAP), and antistasin (ANT), proteins originally isolated

from the soft tick and Mexican leech, respectively (Dunwiddie, 1989; Vlasuk, 1993). Both agents are available in recombinant forms, however their development beyond animal testing was stopped due to their antigenic nature. On the other hand, synthetic low molecular weight inhibitor, DX-9065a has shown promise in animal models of thrombosis and in patients with stable coronary artery disease (a phase I study), non-ST elevation of acute coronary syndrome (phase II study), or elective native PTCA (a pilot study) without evoking antibody production (Herbert, 1996; Alexander, 2004, 2005; Becker, 2006). Such encouraging results require confirmation in phase III clinical trials. Among orally active inhibitors, razaxaban (an aminobenzisoxazol) has been compared to enoxaparin in several clinical trials. Razaxaban has been tested in a phase II trial given twice daily in various doses for 10 days for thromboprophylaxis in patients undergoing knee arthroplasty (Lassen, 2003). Although this agent reduced DVT by 45 % it also provoked increase in major bleeding as compared to enoxaparin, particularly at higher doses. For this reason a modified variant of razaxaban, apixaban is being evaluated in patients with symptomatic DVT (phase II study). BAY 59-7939 another oral, small molecule FXa inhibitor possesses already documented antithrombotic properties in pre-clinical and some clinical settings (Kubitza, 2005; Perzborn, 2005; Turpie, 2005b; Eriksson, 2006a,b). However, in patients undergoing total elective knee replacement, therapy with BAY 59-7939 at doses ranging from 2.5 to 30 mg twice daily and initiated 6-8 after surgery was as efficacious as enoxaparin (initiated 12 –24 hours post surgery), including: presence of DVT detected by venography, or clinically at 5-9 days and all cause mortality at day 30 (Turpie, 2005b). However, significantly greater bleeding was evident in the BAY 59-7939 cohort relative to patients treated with enoxaparin. Similar results were also reported in patients undergoing total hip replacement treated either with lower doses of BAY 59-7939 (2.5 to 10 mg) or with enoxaparin (Erikson, 2005a, 2006b). Although elevation of liver enzymes has been reported in 3- 8% in BAY 59-7939-treated patients, the phase II and III studies for treatment of DVT are underway. Other oral FXa inhibitors such as LY-517717, YM150, DU-176b are in clinical testing for VTE prevention, or treatment and the results are few but promising (Agnelli, 2005b; Eriksson, 2005b).

Recently we have developed an antithrombin heparin covalent complex (ATH) a new kind of a *bimodal FXa and FIIa inhibitor*. ATH inactivates both FXa and FIIa in their bound, or unbound forms (Chan, 1997; 1998). Since AT is already a part of the ATH molecule it acts as direct inhibitor, while free pentasaccharide (of the heparin component of ATH) can attract circulating AT, and thereby initiate an additional, indirect inhibitory action. ATH has shown a superior efficacy/safety profile when compared to heparin in animal models of venous and arterial thrombosis, as well as when coated on venous catheters chronically implanted in rabbits (Chan 1998, 2002; Berry, 2003, Du, 2005; Klement, 2006). This agent may have a potential in treatment of patients with the hereditary, or acquired AT deficiency (hemodilution during cardiopulmonary bypass) requiring antithrombotic therapy. It may also be useful in therapy of premature infants with respiratory distress syndrome to prevent the associated extravascular coagulation within the lungs airspace (Berry, 2003; Chan, 2003).

### ***Inhibitors of thrombin activity***

Inhibitors of Thrombin (FIIa) are classified as *indirect, direct or bimodal*, according to their mode of interaction with thrombin.

*Indirect thrombin inhibitors* include a group of synthetic heparin mimetics (Petitou, 1999; Sinay 1999; De Kort, 2005). Typical examples of this group are SR123781A and Org42675 compounds (Herbert, 2001; De Kort, 2005). SR123781A is a synthetic hexadecasaccharide comprising an antithrombin (AT) binding domain, and a neutral methylated hexasaccharide sequence. It inactivates FIIa and FXa in their clot bound and fluid forms and in a manner exclusively dependent on AT (but not on HCII). This compound does not compete with heparin for binding to PF4 and does not activate platelets in the presence of plasma from patients with HIT (Herbert, 2001). In various animal models of thrombosis and in *in vitro* models, SR123781A exhibited a promising antithrombotic-bleeding profile (Herault, 2003; Bal dit Sollier, 2004; Alban, 2005). In contrast to heparinoids (or their mimetics) mainly acting *via* AT-dependent mechanisms, fucoidans exhibit anticoagulant (antithrombotic) activities that are mediated by heparin cofactor II (minimally *via* AT), protease nexin-1 (extravascular PN-1) and by stimulation and release of TFPI from endothelial cells into the circulation (Colliec, 1991; Nishimo, 1994; Mauray, 1998; Chevolut, 1999; Millet, 1999; Richard, 2006). These high molecular weight sulphated polysaccharides (800 – 8,000 kDa) abundant in brown seaweed, when fed to rats in high doses (900 and 2,500 mg/kg po), induce anticoagulation without toxic side effects and excessive bleeding (Duarte, 2001; Li, 2005). Natural fucoidans possess antithrombotic, antiviral, antiproliferative, antifertilizing and antitumoral, antibacterial and anti-inflammatory (complement inhibitory) properties, and potentiate wound repair (Shibata, 1999; Feldman, 1999; Zvyagintseva, 2000; Shibata, 2001; Ponce, 2003; Koyanagi, 2003; Matsumoto, 2004; O'Leary, 2004). Large molecule natural fucoidans have been derivatized into low molecular weight (LMW) species (<10,000 kDa) more suitable for therapy (Colliec, 1991; Chevolut, 1999; Millet, 1999). These LMW fractions are composed of fucose (21-41%) and sulfate (18-44%) with small proportion of galactose (0-7%), xylose (0-8%) and uronic acids (0-14%) (Chevolut, 1999) the unique composition of which influences the anticoagulant and antithrombotic activities of these molecules (Mauray, 1995; Chevolut, 1999). Thus far, encouraging results were obtained in pre-clinical testing of LMW fucoidans in *in vivo* and *in vitro* models of thrombosis (Mauray, 1995, 1998; Chevolut, 1999; Millet, 1999; Colliec-Jouault, 2003), cancer and angiogenesis (Soeda, 1994; Matou, 2002; Liu, 2005; Matsubara, 2005). Interestingly, *in vivo* LMW fucoidans possess equivalent, or slightly better antithrombotic efficacy with minimal impact on hemostasis that those of LMWH (Millet, 1999; Colliec-Jouault, 2003). This group of agents may have a great potential to treat medical conditions such as advanced atherosclerosis (arterial disease) where an increased activity of heparin cofactor II not only has been shown to be an independent antiatherosclerotic factor, but also protects coronary and peripheral stents from re-stenosis (Schillinger, 2004; Huang, 2006). No results of clinical testing of fucoidans have been published to date. Another natural anticoagulant recently identified is known as fucosylated chondroitin sulfate (FCS), a glycoaminoglycan isolated from sea cucumber. This agent is composed of alternating beta-D-glucuronic acid and N-acetyl-beta-D-galactosamine units similar to human chondroitin sulfate (Zancan, 2004). Due to branches of sulfated fucose on the beta-D-glucuronic acid residues it possesses high anticoagulant and antithrombotic properties, mediated mainly through HCII. In animal models of thrombosis FCS had to be used in high doses to achieve significant antithrombotic effects with corresponding increase in bleeding. There is no information available to date on clinical testing of this compound. More studied in this regard is dermatan 4, 6-O-disulfate (intimatan) derived from invertebrate or porcine skin.

This agent exhibits antithrombotic activities also mediated via HCII. In a mouse model of photochemically induced thrombosis in the carotid artery and in canine model of deep vessel wall injury (in the right carotid artery) intimated alone, or in combination with the recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) produced a significant antithrombotic effect and prevented vessel re-occlusion (Hennan, 2002; Vicente, 2004; Hong, 2006). However, no clinical verification of these findings is presently available. The latter is true also for beta-D xylosides which after multiple oral administration have exert an HCII-dependent antithrombotic effect in animal model of thromboembolism (arterial and venous) (Aguejof, 1996).

*Direct thrombin inhibitors* bind to FIIa thereby blocking the influence of this enzyme on formation of fibrin, platelet aggregation, activation of PAR receptors. In addition to antithrombotic consequences this effect can block thrombin mediated cellular mitogenesis, angiogenesis and other biological functions (Coughlin, 2000; Markwardt, 2002; Hirsh, 2003). Interestingly, direct thrombin inhibitors are equally effective in inactivation of fibrin-bound and fluid-phase thrombin, a property which may reflect their potent antithrombotic efficacy when compared to UFH (mostly acting on fluid phase FIIa) (Weitz, 1990; Klement, 1992; Hirsh, 2003; Bates, 2006). Agents such as hirudin possess high binding affinity to the catalytic center of thrombin and are also interacting with exosites I and II of this protease (Markwardt, 2002). Due to these properties the anticoagulant activity of these agents is often associated with an increased rate of spontaneous bleeding complications (Kaiser, 1986; Klement, 1998, 2003; Markwardt, 2002). As these agents do not bind to plasma proteins and PF4 their anticoagulant effects are more stable and predictable than those of UFH (Fox, 1993; Markwardt, 2002; Hirsh, 2003) and they do not induce thrombocytopenia (HIT). However, antigenic properties of some of these agents may limit their clinical usefulness, especially when repeated administration is necessary (e.g. hirudin and some of its analog). Among direct thrombin inhibitors hirudin, argatroban, melagatran, ximelagatran and bivalirudin, are among the most studied. Of those, hirudin and argatroban have already been approved for the treatment of patients with HIT, while bivalirudin is approved for PTCA (Lewis, 2001, 2003; Lincoff, 2003; Bates, 2006). Ironically, this group of agents also provided some illuminating examples as to benefits and unexpected risks that may occur in the clinic. Thus, ximelagatran, the first orally available potent direct thrombin inhibitor has recently been approved in Europe for the treatment and thromboprophylaxis in a variety of medical and surgical conditions, to be promptly withdrawn from the market shortly thereafter (Bates, 2006). Amidst reports indicating its linkage to a serious liver damage. Nevertheless, many more agents in this category are currently in the pipeline. For instance, dabigatran etexilate (BIBR 1048) is a new oral direct thrombin inhibitor under intensive clinical development (Hauel, 2002; Gustafsson, 2003). This compound comes from a new structural class of nonpeptidic inhibitors employing a 1,2,5-trisubstituted benzimidazole as the central scaffold. BIBR 1048 is biotransformed to BIBR 953 with high inhibitory activity against thrombin ( $K_i$  of 4.5 nM) with the peak of anticoagulant activity approximately 6 hours after administration and half-life of 12 hours. BIBR 953 is then eliminated *via* renal route. In animal models of venous thrombosis and in thus far limited clinical trials the results with this new agent are promising although increase in major bleeding have been noticed with higher doses (Stassen, 2001; Wiene, 2001a,b; Eriksson, 2004, 2005c). On the basis of this data a series of phase III trials have been initiated to establish the efficacy safety profile of this agent in

the context of thromboprophylaxis in patients undergoing major orthopaedic surgery, VTE treatment and stroke prevention in patients with atrial fibrillation. LB-30057 (CI-1028), another oral direct thrombin inhibitor with a  $K_{ia}$  of 0.38 nM against human thrombin has also shown excellent antithrombotic properties when tested in a canine and rabbit models of venous and arterial thrombosis (*McClanahan, 2000; Chi, 2001*). In a rabbit veno-venous shunt model this agent outperformed inogatran in reduction of thrombus size with shorter bleeding time. Similarly, BCH-2763 a selective and potent ( $K_i$  of 0.11 nM) bivalent (binding catalytic center and anion binding exosite) direct small molecule thrombin inhibitor has shown superior antithrombotic properties when compared to argatroban in canine model of venous and arterial thrombosis and also when compared to hirudin, hirulog or heparin as an adjunct to tPA in a rat carotid arterial model of fibrinolysis (*Fincle, 1998; Deschenes, 1998; McClanahan, 1999*). One major shortcoming of all of these agents is that there is no specific antidote available at present time. To address this problem an anticoagulant RNA oligonucleotide (aptamer) was developed which targets exosite II of thrombin in a manner that could be reversed by a specific antidote (*Jeter, 2004; Potti, 2004*). Pre-clinical testing of this compound is underway.

## CONCLUSIONS

While some of the emerging anticoagulants (e.g. idraparinux, dabigatran, fucoidans, heparin mimetics and ATH) appear to possess superior properties to conventional agents, their cost-effectiveness and availability of specific antidotes has hampered their potential inclusion into the standards of care. The RNA aptamer technology may alleviate this problem by generating new anti-coagulants and their specific antidotes (*Potti, 2004; Nimjee, 2005, 2006*). It remains to be seen how effectively this exciting class of agents will pass the mundane test of pre-clinical scrutiny and clinical practicalities. It should also be considered that coagulation factors such as TF, FXa and FIIa, their physiological inhibitors (HC II and AT) and pharmacological agents possess biological functions beyond the realm of blood coagulation (*Coughlin, 2000; Spek, 2004; Rak, 2006*). In this regard, perturbations in cellular processes governed by signals emanating from TF and PARs may constitute a hitherto less studied limitation of increasingly potent anticoagulants, and/or (perhaps in a context dependent manner) open unforeseen therapeutic opportunities to treat conditions such as vascular diseases, inflammatory conditions and cancer.

*Seznam literatury je možné si vyžádat na e-mailové adrese: zyklova@fnhk.cz*

## PROGRESS AND CHALLENGES IN ANTIANGIOGENIC THERAPY OF CANCER

J. Rak

McGill University, Montreal Children's Hospital Research Institute, Place Toulon,  
4060 Ste Catherine West, PT-232, Montreal, Quebec, Canada, H3Z 2Z3  
Ph: 514-412-4400 ext 22342, Email: [janusz.rak@mcgill.ca](mailto:janusz.rak@mcgill.ca)

Developments of the last 3-4 years have significantly changed the tone of the ongoing discussion as to the role of the vascular system in the pathogenesis of human malignancies, and therapeutic opportunities that may lie therein 1. First, a series of large phase III clinical trials documented therapeutic utility, and precipitated fast track FDA approval of at least three novel agents (bevacuzimab, sunitent, sorafenib), the anticancer activity of which rests with their ability to inhibit tumor blood vessel formation (angiogenesis) 2;3. Second, four major clinical trials concluded that another class of 'vascular' agents, low molecular weight heparin (LMWH) and related anticoagulants may exert anticancer effects, possibly beyond their role in thromboprophylaxis 4-8. Once again, the action of these agents may rely, at least in part, on their antiangiogenic activity and secondary damage to the tumor parenchyma 9;10.

Targeting tumor vasculature can be accomplished either by acute obliteration of already formed vessels (by *antivascular/vascular disrupting agents*), or by blocking processes of blood vessel recruitment (by *antiangiogenic agents*). The latter type of agents can be classified according to their mechanism of action into either *direct*, or *indirect* antiangiogenics, depending whether they interfere mainly with the effector apparatus of endothelial cells (and/or pericytes), or else block the incoming proangiogenic stimuli, respectively 1:11. Although very promising overall, antiangiogenic therapy is not, as originally expected, universally active and free from the problem of drug resistance 12. Indeed, the redundancy of angiogenic factors, heterogeneity of the tumor vasculature and genetically encoded (or adaptive) resistance of cancer cells to ischemia 13, may all contribute to variable responses to specific antiangiogenic agents in various tumor settings. Hence, there is an increasing need to develop new agents and their combinations (*antiangiogenic cocktails*), with which treatment of specific human cancers could be more effective. Interestingly, clinical and preclinical experience suggests that antiangiogenic therapies are in many instances more effective when combined with traditional chemo-, or radiotherapy 14;15.

Some of the most successful antiangiogenic agents/strategies, presently in advanced preclinical and clinical development (or approved), include the following categories: (i) Antagonists of vascular endothelial growth factor (VEGF), such as bevacuzimab/Avastin, a humanized monoclonal VEGF-neutralizing antibody and VEGF-trap, soluble chimeric VEGF-receptor. (ii) Multikinase inhibitors directed against growth factor receptors involved in angiogenesis (e.g. VEGF-, PDGF-, EGF-, and/or FGF receptors). This includes sunitinib/sunitent (recently approved for clinical use) and a large number of other, mostly small molecule agents (PTK787/vatalanib, AZD2171, ZD6474/zactima, XL184, AMG-706). (iii) Kinase inhibitors with complex mechanisms of antiangiogenic activity (BAY 43-9006/sorafenib tosylate, enzastaurin, genistein). (iv) Metronomic low-dose chemotherapy and "chemo-switch" therapies 16. These protocols composed of traditional anticancer agents (cyclophosphamide, vinblastin, temozolomide) are administered in a dose dense, or alternating fashion to selectively obliterate endothelial cell growth without significant

direct damage to cancer cells, or crippling toxicity to rapidly proliferating normal tissues. Sometimes agents with indirect antiangiogenic activity (bevacizumab, celebrex, steroids, retinoids) are incorporated into these regimens. (v) Antiangiogenic proteins and peptides (endostatin, tumstatin, thrombospondin peptides). (vi) Agents directed against angiogenic integrins (EMD 121974). (vii) Agents acting through complex mechanisms that may include, but are not restricted to, antiangiogenesis. This group is composed of thalidomide and its analogues (lenalidomide), certain signal transduction inhibitors and anti-inflammatory drugs (celecoxib), as well as oncogene-directed agents that suppress the angiogenic phenotype of cancer cells (herceptin, gefitinib, erlotinib, imatinib) {Rak, 2004 6173 /id}. (ix) Certain carbohydrates with anticoagulant activity<sup>9,10</sup> (dalteparin, PI-88), and (x) agents stabilizing extracellular matrix (suramin). In addition, some of the ‘vascular disrupting’ agents (VDAs) have entered the phase of more advanced development, and those are exemplified by combretastatin A4 phosphate (CA-4-P), ZD6126, ABT-751 and a handful of other compounds<sup>15</sup>.

While significant progress has been made and most of the agents developed to date are relatively well tolerated, achieving the full potential of antiangiogenic therapy will likely depend on selection of drugs that are active in specific tumor settings, e.g. in adult vs pediatric malignancies, and in one particular disease site (e.g. renal cancer), but not necessarily in the other<sup>17,18</sup>. In this regard much depends on further development of more accurate predictive biomarkers and surrogate measures of antiangiogenic efficacy, which presently include only a handful of not fully validated parameters (e.g. circulating thrombospondin, VEGF, or endothelial progenitor cells). Ultimately, a better understanding of the underlying pathological process (angiogenesis in a given tumor) will help define the most appropriate therapeutic targets, more precise (cause-related) biomarkers, the course and the limits of blood vessel directed therapy in various cancer settings<sup>3,11,19</sup>.

## References:

1. Folkman J, Kalluri R. *Tumor Angiogenesis*. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR et al., eds. *Cancer Medicine*. Hamilton, London: BC Decker Inc.; 2003:161-194.
2. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Cartwright T et al. Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) prolongs survival in first-line colorectal cancer (CRC): Results of a phase III trial of bevacizumab in combination with bolus IFL (irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin) as first-line therapy in subjects with metastatic CRC [abstract]. *Abstracts ASCO 2003* 2003;
3. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat.Rev.Drug Discov*. 2004;3:391-400.
4. Falanga A. Thrombophilia in cancer. *Semin.Thromb.Hemost*. 2005;31:104-110.
5. Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z et al. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin.Oncol*. 2004;22:1944-1948.
6. Lee AY, Rickles FR, Julian JA et al. Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism. *J Clin.Oncol*. 2005;23:2123-2129.
7. Klerk CP, Smorenburg SM, Otten HM et al. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J Clin.Oncol*. 2005;23:2130-2135.



8. Altinbas M, Coskun HS, Er O et al. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. *J.Thromb.Haemost.* 2004;2:1266-1271.
9. Petralia GA, Lemoine NR, Kakkar AK. Mechanisms of disease: the impact of antithrombotic therapy in cancer patients. *Nat.Clin.Pract.Oncol.* 2005;2:356-363.
10. Rak J, Milsom C, May L, Klement P, Yu J. Tissue Factor in Cancer and Angiogenesis: The Molecular Link between Genetic Tumor Progression, Tumor Neovascularization, and Cancer Coagulopathy. *Semin.Thromb.Hemost.* 2006;32:54-70.
11. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature.* 2005; 438:967-974.
12. Kerbel RS. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* 1997;390:335-336.
13. Rak J, Yu JL. Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular „supply” and vascular „demand”. *Semin.Cancer Biol.* 2004;14:93-104.
14. Hurwitz H. Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Clin.Colorectal Cancer* 2004;4 Suppl 2:S62-8.:S62-S68.
15. Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat.Rev. Cancer.* 2005;5:423-435.
16. Pietras K, Hanahan D. A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose „chemo-switch” regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. *J Clin.Oncol.* 2005;23:939-952.
17. Sterba J, Valik D, Mudry P et al. Combined biodifferentiating and antiangiogenic oral metronomic therapy is feasible and effective in relapsed solid tumors in children: single-center pilot study. *Onkologie.* 2006;29:308-313.
18. Kieran MW, Turner CD, Rubin JB et al. A feasibility trial of antiangiogenic (metronomic) chemotherapy in pediatric patients with recurrent or progressive cancer. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 2005;27:573-581.
19. Jubb AM, Oates AJ, Holden S, Koeppen H. Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat.Rev.Cancer.* 2006;6:626-635.

## LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA A DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA KONGENITÁLNÍCH DYSERYTROPOETICKÝCH ANÉMIIÍ.

L. Chrobák

*Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta a fakultní nemocnice v Hradci Králové, II.  
interní klinika, Oddělení klinické hematologie*

Kongenitální dyserytroetická anémie (CDAs) představují skupinu vzácných poruch erytropoézy charakterizovanou neefektivní erytropoézou jako převažujícím mechanismem anémie a charakteristickými morfoloickými změnami erytroblastů v kostní dřeni.

Diagnóza CDA vyžaduje obecně splnění těchto čtyř kritérií:

1. Přítomnost kongenitální anémie/žloutenky
2. Znamky neefektivní erytropoézy
3. Charakteristické morfoloické změny erytroblastů v kostní dřeni
4. Vyloučení kongenitálních anémii při:
  - talasemických syndromech
  - patologických hemoglobinech
  - dědičných sideroplastických anémiiích

Dyserytroepózu můžeme zastihnout i v normální kostní dřeni v malém počtu erytroblastů: ve formě bazofilního tečkování, vakuolizace cytoplazmy, nepravidelnosti v kontuře jader, přítomnosti Howell-Jollyho tělísek, ojedinělých dvoujaderných erytroblastů. Vícejaderné erytroblasty se v normální dřeni nenacházejí.

Výraznější dyserytroepóza bývá přítomna při poruchách hematopoézy:

Při poruše syntézy desoxyribonukleinové kyseliny

- nedostatek vit. B<sub>12</sub>
- nedostatek kyseliny listové

Při poruše syntézy hemu a globinu

- sideroachrastické anémie
- talasemické syndromy
- hemoglobinopatie

Při myelodysplastickém syndromu

Při myelofibróze

Po transplantacích v období obnovy erytropoézy

Název kongenitální dyserytroetická anémie použili poprvé Crookston et al. v roce 1966 pro čtyři případy později označené jako CDA-II. V roce 1968 navrhl Heimpel a Wendt klasifikaci CDA podle charakteristických morfoloických změn erythroblastů v kostní dřeni na CDA I-III, klasifikace která se dosud používá. Benjamin et al. v roce 1975 popsal CDA-IV. V dalších letech byly popsány další případy CDA lišící se v jednotlivostech od dosud známých čtyř typů a označeny varianty CDA.

Obecná charakteristika CDA je uvedena v tab. 1.

Nálezy CDA-I až CDA-III jsou uvedeny v tab. 2 a 3.

Základní charakteristika variant CDA je uvedena v tab. 4.

### Obecná charakteristika CDA

Tab. 1

<b>PATOGENEZE:</b>	<b>NEEFEKTIVNÍ ERYTROPOÉZA</b>
<b>Krevní obraz: (obvykle)</b>	Hb: 80 – 100 g/l Rtc: lehce zvýšené
<b>Kostní dřev:</b>	erytropoéza zvýšená s charakteristickými morfologickými změnami erytroblastů granucytopoéza - normální trombocytopoéza - normální
<b>Známky zvýšeného odbourávání hemoglobinu:</b>	zvýšení nepřímého bilirubinu zvýšení s-LD snížená hodnota haptoglobinu
<b>Ferokinetika:</b>	zvýšení s-Fe, vysoká saturace transferinu zvýšený odsun Fe z plazmy snížená inkorporace Fe do hemoglobinu

### Charakteristika CDA I-III

Tab. 2

	<b>CDA-I</b>	<b>CDA-II</b>	<b>CDA-III</b>
<b>Dědičnost</b>	autosomálně recesivní	autosomálně recesivní	autosomálně: dominantní recesivní
<b>Červené krvinky</b>	makrocyty Cabotovy prostence	normocyty	makrocyty
<b>Erytroblasty v kostní dřevě</b>	<u>charakteristický</u> <u>nález</u>	<u>charakteristický</u> <u>nález</u>	<u>charakteristický</u> <u>nález</u>
<b>Hamův test</b>	negativní	<u>pozitivní</u> HEMPAS*	negativní
<b>Splenomegalie</b>	v 75%	velmi častá	velmi vzácná
<b>Přetížení železem</b>	časté	velmi časté	velmi vzácné
<b>Lokalizace genu</b>	15(q15.1-15.3): CDAN1 izraelští beduíni	neznáma	15(q21-25):CDAN3

\* Hereditary Erythroblastic Multinuclearity with Positive Acidified Serum test

Klasifikace CDA I-III  
(nález v kostní dřeni)

Tab. 3

	CDA-I	CDA-II	CDA-III
	<b>ERYTROBLASTY:</b>		
<b>Světelný mikroskop</b>	- megaloblastoidní vzhled - 5% dvoujaderné eryblasty (nestejná velikost) - mezijaderné chromatinové můstky	- dvou až mnoho jaderné oxy – a polychromatofilní eryblastů (stejná velikost jader)	- 10-40% dvou a vícejaderných eryblastů -gigantoblasty až 12 jader
<b>Elektronový mikroskop</b>	- nerovnoměrné zahuštění jaderného chromatinu (houbovitý vzhled) - nerovné okraje jader - hluboké vchlípeniny plazmy s cytoplazmatickými organely	- fenomen dvojité membrány	- neúplná jaderná membrána s invaginací cytoplazmy do jádra

Nález dvojité membrány v erytroblastu jsme jako ojedinělé pozorování v literatuře pozorovali u nemocné se sekundární akutní leukemií vzniklé na bázi myelodysplastického syndromu u nemocné po masivním ozáření pro Ca prsu.

Varianty CDA

Tab. 4

1. CDA-typ IV: typické změny jako u CDA-II, ale negativní test s okyseleným sérem
2. CDA s výraznou erytroblastózou, po splenektomii (až $50 \times 10^9/l$ ) s negativním testem s okyseleným sérem.
3. CDA s intraerytroblastickými inkluzemi (Wickramasinghle 1998)
4. Kongenitální neefektivní erythropoéza a erytroidní hyperplazie, ale nepřítomnost dyserythropoézy (šuntová hyperbilirubinémie)
5. CDA s trombocytopenií.*

\*mohlo by patřit i mezi chronické kongenitální myeloproliferativní stavy

## Klasifikace CDA

1966 Crookston et al.:	název CDA: Congenital Dyserythropoietic Anemia
1968 Heimpel a Wendt:	CDA I-III
1975 Benjamin et al.:	CDA IV
v dalších letech:	varianty CDA

*Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.*

### K DIAGNOSTICE VON WILLEBRANDOVY CHOROBY

M. Penka, P. Smejkal, M. Matýšková, A. Buliková, M. Šlechtová, J. Kisořová, J. Blatný,  
O. Zapletal

*OKH FN Brno, Univerzité centrum pro trombózu a hemostázu MU*

von Willebrandova choroba (von Willebrand disease – vWD) je nejčastější dědičná krvácivá choroba s prevalencí v populaci přibližně 1%. Klinicky významné krvácivé projevy jsou u pacientů s vWD udávány s prevalencí 23 - 200 / milion populace, život ohrožující krvácení u 0,5 – 3,0 osob/1 000000. Dle odhadu ISTH je však krvácením ohroženo přibližně 3 000 – 4 000 osob/milion populace.

Rozlišujeme von Willebrandovu chorobu způsobenou hereditárním defektem von Willebrandova faktoru (vWF) – kvantitativního či kvalitativního charakteru – způsobeného změnou v genu pro vWF a získaný von Willebrandův syndrom se získanou formou defektu vWF. Odlišit je třeba také pseudo-von Willebrandovu chorobu, jejíž podstata tkví v destičkách samotných.

vWF je tvořen v megakaryocytech a v endoteliálních buňkách a má v hemostáze dvě základní funkce:

- ve vázané podobě na FVIII, (kde jsou stejně účinné všechny multimery vWF – viz níže), chrání FVIII před proteolytickou degradací enzymy, lokalizuje jej v místě poruchy cévní stěny, uvolňuje jej do oběhu a působí jako kofaktor při proteolytické aktivaci FVIII trombinem

- v primární hemostáze (účinnější jsou zde větší multimery vWF) zajišťuje adhezi trombocytů k subendoteliálním strukturám prostřednictvím GPIb a také adhezi trombocytů a jejich agregaci vazbou na aktivovaný GPIIb/III.

**von Willebrandovu chorobu** klasifikujeme dle ISTH z roku 1994 následovně:

Typ 1: parciální kvantitativní defekt vWF s dědičností autozomálně dominantní

Typ 2: kvalitativní defekt vWF, dědičnost převážně autozomálně dominantní

2A: pokles na trombocytech závislých funkcí vWF spojený s *chyběním* velkých multimerů vWF

2B: zvýšená afinita vWF k destičkovému GPIb

2M: pokles na trombocytech závislých funkcí vWF *bez chybění* velkých multimerů vWF

2N: pokles afinity vWF k FVIII s dědičností autozomálně recesivní  
Typ 3: úplný nedostatek vWF s autozomálně recesivní dědičností

Z posledních studií vyplývá, že nejčastěji je zastoupen typ 2 vWD (50% případů), dále pak typ 1 (asi 40-50%) a typ 3 kolem 5%. Zároveň se však ukazuje celá řada možných genetických odchylek, které klasifikaci vWD ještě podrobněji rozčleňují.

### **Získaný von Willebrandův syndrom**

se na prevalenci defektu vWF podílí přibližně 1%. Sekundárně dochází k deficitu vWF různými mechanismy (protilátky proti vWF, imunoadsorpce komplexu FVIII/vWF na maligní buňky či trombocyty, zvýšená proteolýza komplexu FVIII/vWF v cirkulaci, snížená produkce vWF, zvýšená spotřeba vWF v cirkulaci, ireverzibilní interakce mezi velkými multimery vWF a trombocyty a odstranění těchto komplexů z cirkulace spolu se ztrátou velkých multimerů vWF a další (např. ve spojitosti s účinky léků).

### **Pseudo-von Willebrandova choroba**

Jedná se zde o defekt destičkového receptoru, GPIb (příčinou je mutace v jeho genu), který má zvýšenou afinitu k vWF. Následkem toho chybí velké multimery vWF v plazmě. Dědičnost je autosomálně dominantní. U zmíněné choroby se tedy nejedná o defekt vWF!

### **Diagnózu vWD stanovujeme na základě:**

- krvácivých projevů
- zjištění dědičnosti nemoci – tedy přímo vWD nebo krvácivých projevů v rodinné anamnéze
- průkazu kvantitativního či kvalitativního defektu vWF

Za patologii se považuje plazmatická hladina antigenu vWF (vWF:Ag) a jeho funkční aktivity (ristocetin kofaktoru – vWF:RCo) pod dvě směrodatné odchylky od průměru populace – pro vWF:Ag, vWF:RCo i pro FVIII:C dolní mez normálu je 50%. Pro vWF (Ag i RCo) u krevní skupiny 0 je hranice nižší, kolem 40-45%, naopak u krevních skupin non-0 vyšší, kolem 50-55%.

Rozlišení na jednotlivé typy vWD dle konkrétního laboratorního nálezu:

- U typu 1 vWD je proporcionální snížení vWF:Ag, vWF:RCo, FVIII:C většinou jen na 25 -50%, výjimečně nižší – až k 10%,
- U typu 2 vWD je snížen především vWF:RCo většinou na 5-30% při jen lehce patologických či normálních hodnotách vWF:Ag a FVIII:C.
- Při nedostupnosti přímého vyšetření deficitu velkých multimerů vWF a jejich struktury lze k odlišení typu 1 a 2 vWDCH použít poměru vWF:RCo / vWF:Ag - je-li pod 0,7 - s 80% pravděpodobností, že jde o typy 2A, B, M.
- Při možnosti vyšetřit vWF:CBA, lze pomocí poměru vWF:Ag / vWF:CBA odlišit typy 2A, B (poměr < 0,5); nekonstantně je vWF:CBA snížen i u typu 2M
- RIPA je vhodným orientačním vyšetřením, pokud je nutné urychleně vyloučit těžkou formu vWD (např. před oper. zákroky), protože normální RIPA při základní koncentraci ristocetinu vyloučí těžší defekt vWF
- Typ 2B lze odlišit pomocí RIPA při výsledné koncentraci ristocetinu  $\leq 0,5$ mg/ml,

kdy u zmíněného typu ještě dochází k agregační odpovědi, zatímco u ostatních typů a normálu k agregaci již nedojde.

- Typ 2N se klinicky projevuje jako lehká či středně těžká autosomálně recesivně dědičná hemofilie A. Sníženou vazebnou kapacitu pro FVIII lze vyšetřit ELISA metodou.

V diferenciální diagnostice je třeba vyloučit jinou koagulopatii (defekt faktorů plazmatického systému), sekundární von Willebrandův syndrom, pseudo-von Willebrandovu nemoc, jinou trombocytopatii či vaskulopatii.

#### **Literatura:**

1. *Berntorp, E.: von Willebrand factor containing factor VIII concentrates. Haemophilia 1999, 5, suppl. 2: 60-63.*
2. *Budde, U., Drewke, E., Mainusch, K., Schneppenheim, R.: Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. Semin. Thromb. Hemost. 2002, 28(2): 173-190.*
3. *Favaloro, E. J.: Appropriate laboratory assessment as a critical facet in the proper diagnosis and classification of von Willebrand disorder. Best Practice & Research Clinical Haematology 2001, 14: 299-331.*
4. *Federici, A. B., Castaman, G., Mannucci, P. M. et al: Guidelines for the diagnosis and management of von Willebrand disease in Italy. Haemophilia 2002, 8: 607-621.*
5. *Federici, A. B.: Clinical diagnosis of von Willebrand disease. Haemophilia 2004, 10 (suppl. 4): 169-176*
6. *Mannucci, P. M.: Treatment of von Willebrand disease. Thrombosis Haemostasis 2001, 86: 149-153.*
7. *Penka M., Buliková A., Matýšková M., Zavřelová J.: Hematologie I, Neonkologická hematologie. Grada Publishing, Praha, 2001, 167 – 173*
8. *Sadler, J. E.: A revised classification of von Willebrand disease. Thrombosis and Haemostasis 1994, 71: 520-525.*
9. *Scientific Subcommittee Session: von Willebrand Factor; ISTH, XIX Congress, 12-18 July 2003, Birmingham*
10. *Smejkal P., Matýšková M.: von Willebrandova choroba. Programy kvality a standardy léčebných postupů. Doshöfer Verlag, www.dashofer.cz*

## TROMBÍNOM AKTIVOVATEĽNÝ INHIBÍTOR FIBRINOLÝZY A DIABETES MELLITUS 2.TYPU S MIKROALBUMINÚRIOU.

J. Staško<sup>1</sup>, P. Hollý<sup>1</sup>, J. Ivanková<sup>1</sup>, B. Holman<sup>2</sup>, P. Galajda<sup>2</sup>, M. Dobrotová<sup>1</sup>, P. Kubisz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfuziológie JLF UK a MFN, Martin

<sup>2</sup>I. interná klinika JLF UK a MFN, Martin

Úvod: Je známe, že pacienti s diabetes mellitus (DM) majú popri hyperkoagulačnom stave aj zníženú fibrinolýzu. Porucha fibrinolýzy v dôsledku zvýšenej produkcie inhibítora tkanivového faktora typu-1 (PAI-1) je najcharakteristickejší prejav protrombotického stavu, ktorý sa spája s DM 2.typu. Predpokladá sa, že aj trombínom aktivovateľný inhibítor fibrinolýzy (TAFI) ako hlavný regulátor včasnej fibrinolýzy, ktorá je rozhodujúca pre stabilitu čerstvo vytvoreného fibrínového koagula, môže mať úlohu v inhibícii fibrinolýzy u pacientov s DM 2.typu.

Cieľ štúdie: Vyhodnotiť vzťah medzi hladinou TAFI a parametrami fibrinolýzy a endotelovej dysfunkcie u pacientov s DM 2.typu s mikroalbuminúriou.

Pacienti a metódy: V porovnávacjej štúdií bolo zaradených 52 pacientov s DM 2.typu s normálnou hladinou kreatinínu, ktorí boli rozdelení do 2 podskupín podľa prítomnosti mikroalbuminúrie (MAU $\geq$ 50 mg/24 hod.). V podskupine s MAU bolo 29 pacientov, v podskupine s normoalbuminúriou (NAU<50 mg/24 hod.) bolo 23 pacientov.

Kontrolný súbor tvorilo 26 zdravých jedincov. Okrem TAFI antigénu (Ag) boli vyšetrené vWF, sTM, PAI-1, t-PA, F1+F2 fragment protrombínu a metabolické parametre (vrátane glykovaného HbA1c, C-peptidu a IRI).

Výsledky: Zistili sme významne zvýšenú hladinu TAFI Ag v podskupine pacientov s DM s MAU (131,5 $\pm$ 58,8%) oproti diabetikom s NAU (107,2 $\pm$ 48,7%, p<0,05) a zdravým kontrolám (78,4 $\pm$ 22,5%, p<0,0001). TAFI u pacientov s MAU pozitívne koreloval s F1+2 fragmentom protrombínu a hranične koreloval so sTM.

Záver: Výsledky našej štúdie potvrdzujú významne zvýšené hladiny TAFI u pacientov s DM 2.typu a MAU, čo svedčí pre úlohu TAFI v patogenéze hypofibrinolýzy u týchto pacientov. Zvýšenie TAFI je pravdepodobne sekundárne pri aktivácii koagulácie (hyperkoagulačnom stave), keďže u pacientov s DM 2.typu a MAU dobre korelovala hladina TAFI s hladinami F1+2.

*Práca bola podporená grantom VEGA č.1/2309/05.*



## TROMBOFÍLIA A HOMOCYSTEIN

Hulíková M., Hudáková D.  
RCHaT FNsP Košice

Homocystein je sulfhydryl jednoduchej aminokyseliny, ktorý vzniká matabolickou konverziou methioninu. Metabolizmus methioninu je závislý od vitamínov (B6, B12, folát) ako kofaktorov alebo kosubstrátov a od aktivity enzýmov (methionin syntetáza,  $\gamma$ -cystationáza, cystation  $\beta$ -syntetáza, MTHFR). Pri poruche metabolizmu methioninu dochádza k hromadeniu homocysteínu a hyperhomocysteinémia súvisí s rizikom a./v. trombózy, recidivujúcich potratov s malformáciou plodu a inou patológiou. Príčina hyperhomocysteinémie je multifaktoriálna ( vek, pohlavie, výživa, lieky, systémové ochorenie, genetické faktory). Hyperhomocysteinémia je nezávislý rizikový faktor hyperkoagulácie. Spôsobuje zmeny v koagulačnom profile, reguluje generáciu trombínu, ovplyvňuje aktivitu koagulačných faktorov, prirodzených inhibítorov zrážania (PC, AT), expresiu trombomodulínu a pod. V ostatnom čase pribúdajú informácie o génomom polymorfizme v súvislosti so zvýšeným rizikom vývoja trombózy. Najčastejším vrodenným rizikovým faktorom je mutácia v géne FV, protrombínu 20210GA. Deficit antitrombínu, PC, PS sú menej časté vrodené rizikové faktory, ale majú vysokú klinickú manifestáciu. V súčasnosti sa veľa diskutuje o hyperhomocysteinémii, ktorá je spôsobená polymorfizmom v géne MTHFR ( C677T, A1298C). Jedinci s homozygotnou mutáciou produkujú termolabilný proteín s redukovanou aktivitou enzýmu, ktorá vedie ku zníženej recyklácii folátu a zvýšeniu hladiny homocysteínu. Kombinovaný heterozygotný polymorfizmus C677T a A1298C tiež súvisí so zvýšenou hladinou homocysteínu a venóznou trombózou.

*Cieľ práce:* u pacientov ( 185) s prekonanou venóznou trombózou, CMP, recidivujúcimi potratmi analyzujeme trombofiliu, incidenciu genetických mutácií, získaných trombofilných faktorov, hyperhomocysteinémie, a ich vzájomné predpokladané interakcie.

*Laboratórne vyšetrenia trombofilie* zahŕňali základné koagulačné testy (PT, APTT, fibrinogén, D dimer, trombocyty), špeciálne koagulačné testy ( koagulačné faktory, inhibítory (AT, PC,PS, PAI),ProCglobal s FV, LA), DNA analýzu: trombofilné mutácie (FVLeiden, FII G20210A, MTHFR), biochemické vyšetrenie: homocystein, vyšetrenia imunologické : antifosfolipidové protilátky.

*Záver:* Z analýzy výsledkov vyplýva, že v základných koagulačných testoch sme iba v 30% zachytili hyperkoagulačný stav. U pacientov s deficitom inhibítorov – AT (2,61%), PC (3,48%) je vysoké riziko trombózy. FV Leiden má vysokú prevalenciu (21,7%), ale nízku klinickú manifestáciu. Mutácia protrombínu 20210 bola v súvislosti s trombózou v 5,22%. V sledovanej skupine pacientov s mutáciou MTHFR A (45,22%), MTHFR C (43,48%) sme hyperhomocysteinémiu zistili v 28%. Hyperhomocysteinémia zohráva úlohu vo vývoji trombotickej manifestácie APA. Z analýzy ďalej vyplýva, že v sledovanej skupine pacientov sa na trombóze podieľa kombinácia viacerých faktorov ( v 76,52% pacientov sme zistili prítomnosť 2, 3 4 a  $\geq$ 5 trombofilných faktorov) a iba v 23,48% bol príčinou trombózy iba jeden trombofilný faktor.

Laboratórne zistenie trombofilie, koincidencia trombofilných faktorov, ich kumulatívny účinok, alebo ich súčasné pôsobenie ako nezávislých rizikových faktorov môže byť prínosom v klinickej praxi. Chápanie týchto súvislostí umožní zaradiť pacienta do rizikovej skupiny a vypracovať správnu stratégiu profylaxie a liečby trombózy.

## BLOKÁTORY FUNKCE KREVNÍ DESTIČKY A MOŽNOSTI JEJICH MONITOROVÁNÍ

M. Pecka, J. Malý, P. Dulíček, M. Blažek, E. Pešková, R. Malý  
I. a II. interní klinika – OKH FN a katedra interních oborů LF UK, Hradec Králové

**Antiagregační léčba je zaměřena na omezení shlukovací schopnosti krevních destiček.** Aktivace krevních destiček nabízí vzhledem k počtu zúčastněným faktorů několik úrovní, ve kterých je možno farmakologicky zasáhnout a léčbu je možné kombinovat. V současnosti dostupné protideštičkové léky interferují s různými kroky aktivačních procesů, včetně adheze, uvolňovací reakce nebo agregace a snižují riziko arteriální trombózy, ale mohou **zvýšit riziko krvácení při jejich předávkování**. Indikace protideštičkové léčby vyplývá především z přítomnosti rizikových faktorů tepenné okluze. Trombocyty je možné inhibovat ve fázi adheze, aktivace nebo agregace, popřípadě můžeme potencovat jejich stabilitu:

### ■ **Blokáda adheze krevních destiček na subendoteliální matrix**

Ve fázi adheze lze inhibovat vazbu na obnažená kolagenní vlákna buď na úrovni destičkových receptorů (nejčastěji GP Ib/IIa) nebo blokádou vWF, který tuto vazbu zprostředkuje:

1. blokátoři GP Ib/IIa
2. antagonisté vWF – používají se nefunkční fragmenty vWF, které obsazují vazebná místa ke kolagenu a tím se znemožní vazba na obnažený subendotel.

### ■ **Blokáda aktivačních cest a cyklů**

1. inhibitory COX (cyklus kyseliny arachidonové) jiných enzymů cyklu kyseliny arachidonové

**Blokace cyklooxygenázy (COX – 1):** Antiagregační účinek ASA je dán interferencí s biosyntézou cyklických prostanoidů v cyklu kyseliny arachidonové (Awtry a Loscalzo, 2000). ASA vyvolá **nevratnou inhibici cyklooxygenázy** a následné potlačení syntézy TXA<sub>2</sub> a dalších prostaglandinů (Hilmerová a Filipovský, 2004). ASA je poměrně rychle deacetylována játry – plazmatický poločas je asi 20 minut.

**Blokace tromboxansyntetázy:** Využívá se imidazolových přípravků (např. VAPIPROST nebo RIDOGREL). Jedná se o kombinované blokátoři receptorů TXA<sub>2</sub> a tromboxansyntázy.

### 2. blokáda receptorů krevních destiček

#### *a. Selektivní inhibitory*

**Receptory ADP:** ADP je vylučovaný z denzních granul destiček a z aktivovaného cévního subendotelu. Thienopyrimidinové deriváty (**TICLOPIDIN a CLOPIDOGREL**) ireversibilně blokují ADP receptory krevních destiček typu P2Y<sub>1</sub>. Jiné cesty aktivace zůstávají neovlivněny.

**Receptory pro trombin:** používají se

- **Blokátory trombinových destičkových receptorů PAR-1:** jejich účinek je založen na principu protilátek proti vlastnímu receptoru.
- **Trombostatín:** jedná se o degradační oligopeptidový produkt bradykininu o 5 aminokyselinach, který se váže přímo na aktivní místo receptoru.

b. *Komplexní inhibitory* – inhibují více receptorů najednou (léčiva s komplexním působením jako je např. ANAGRELID).

■ **Stabilizace krevních destiček**

1. zvýšení destičkové cAMP a cGMP

■ **Blokáda agregace krevních destiček**

1. Blokátory receptorů GP IIb/IIIa

Inhibitory glykoproteinových receptorů typu GP IIb/IIIa zasahují v místě konečného a společného bodu všech cest vedoucích k aktivaci krevních destiček a v důsledku toho blokují agregaci destiček, která je vyvolána všemi agonisty. Inhibitory blokují připojení fibrinogenu k receptoru IIb/IIIa na krevních destičkách tím, že obsadí receptorové místo na konformačně změněné molekule GP IIb/IIIa.

*Fragmenty monoklonálních protilátek* – blokují nespecifickou sterickou zábranou destičkový receptor GP IIb/IIIa

*Inhibitory s malou molekulou* – tyto látky napodobují RGD sekvenci aminokyselin fibrinogenu a váží se ve stejném místě jako fibrinogen specificky na GP IIb/IIIa. Rozlišujeme:

- Syntetické peptidové inhibitory
- Nepeptidové inhibitory (fibany)

inhibitory gp receptorů jsou v současné době neúčinnějšími protideštičkovými léky

2. Blokátory geneze trombinu

*Nízkomolekulární hepariny - LMWH*: potencují účinek antitrombinu k vyvazování F Xa a tím snižují produkci trombinu. Aktivace destiček ostatními mechanismy zůstává zachována (*Vojáček, 2003*).

Monitorování antiagregační léčby

- agregační křivky po stimulaci induktory
- PFA – 100
- Impact

**Literatura:**

1. Awtry, H.A. a Loscalzo, J.: *Aspirin. Circulation, 101, 2000, s. 1206 – 1218.*
2. Hilmerová, J. a Filipovský, J.: *Klinický význam aspirinové rezistence. Vnitř. Lék., 50, 2004, č. 6, s. 462 – 469.*
3. Vojáček, J.: *Inhibitory destičkových glykoproteinových receptorů typu IIb/IIIa. Remedia 13, 2003, č.2, s. 84 – 92.*

*Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906*

## POUŽITÍ TROMBIN GENERAČNÍHO TESTU U PACIENTŮ S HETEROZYGOTNÍ FORMOU FV LEIDEN

L. Slavík, A. Hluší, V. Krčová, P. Novák, J. Mališková  
*Hemato-onkologická klinika FN Olomouc*

Trombin generační test založený na tvorbě trombinu v průběhu měření nám poskytuje aktuální komplexní obraz hemostázy a maximálně se snaží přiblížit in vivo podmínkám. My jsme tohoto stanovení využili pro sledování generace trombinu u pacientů s dobře definovaným trombofilním stavem jako je heterozygotní forma mutace FV Leiden.

Předmětem naší práce je porovnat úroveň generace trombinu s rizikem klinické manifestace trombofilního stavu, jelikož sledujeme řadu pacientů (s heterozygotní formou FV Leiden) bez klinické manifestace nicméně máme také velkou skupinu s prokázanou manifestací trombofilního stavu ve formě hluboké žilní trombózy.

Generaci trombinu jsme stanovovali pomocí Microplate Fluorescence Reader GENios (TECAN) s excitační vlnovou délkou 360 nm a emisi jsme stanovovali při 465 nm. Plasma chudá na destičky byla aktivována reagensii s nízkou koncentrací tkáňového faktoru, která je určena právě pro monitorování generace trombinu u trombofilních stavů. Měřený nárůst intenzity fluorescence pak přímo úměrně odpovídal generovanému množství trombinu. Měření bylo prováděno kontinuálně při 37°C po dobu 90 min.

Z naměřených výsledků jsme následně hodnotili čtyři parametry: lag time generace trombinu, čas nutný pro dosažení maximální koncentrace trombinu, maximální koncentraci trombinu a celková množství generovaného trombinu pomocí integrace plochy pod křivkou.

Analyzovali jsme skupinu 40 pacientů s heterozygotní formou mutace FV Leiden. V daném souboru jsme stanovili generaci trombinu a porovnali ji s klinickou manifestací trombofilního stavu.

Na základě statistického zhodnocení výsledků můžeme potvrdit korelaci klinických projevů trombózy se zvýšenou hladinou generace trombinu.

### **Literatura:**

1. *Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test predicts for venous thrombosis in men and women Tans G. et al., British Journal of Haematology, 2003, 122, 465 -470*

## EXTERNÍ KONTROLA KVALITY V MORFOLOGII

M. Matýšková  
OKH FN Brno

Externí kontrola kvality (EKK) v morfologii v ČR a SR (prováděna firmou SEKK) je zajištěna pro parametry krevního obrazu (KO), počty retikulocytů mikroskopicky (RET) a na analyzátoru (RC), hodnocení nátěru periferní krve (DIF a NF).

Jak ukazují výsledky externí kontroly, většina laboratoří již používá pro stanovení KO automatické analyzátory. S jejich rozšířením stoupla úspěšnost v tomto cyklu EKK. Se zpřesňující se metodikou je proto možné „zpevnit“ toleranční meze přímo měřených parametrů s výjimkou trombocytů. Od r. 2007 by měly platit hodnoty uvedené v tabulce.

ZKOUŠKA	CÍLOVÁ NEJISTOTA MĚŘENÍ PRO EHK (TMU)
<b>Leukocyty (počet)</b>	13 %
Erytrocyty (počet)	8 %
Hemoglobin	6 %
Hematokrit	10 %
MCV	10 %
Trombocyty (počet)	počty > 200.10 <sup>9</sup> /l: 20 % počty ≤ 200.10 <sup>9</sup> /l: 27 %

Podstatně komplikovanější je kontrolní cyklus „hodnocení nátěru periferní krve“. Jednak je obtížné zajištění standardní kvality vzorků (nejen technika nátěru, ale např. barvení je stále připomínkováno), na straně druhé jsou potíže ze strany pracovišť. Řada laboratoří stále ještě pod pojmem „hodnocení nátěru“ rozumí pouze početní zhodnocení a nevíšimá si morfologie především červených krvinek a trombocytů. Pro hodnocení výkonu účastníků se od r. 2005 používá bodový systém. Jako úspěšná je hodnocena laboratoř, která dosáhla 60 a více % z možných bodů u každého nátěru. Toto hodnocení je využito i pro výběr pracovišť, která v tomto cyklu pracují jako „expertní“, tj. definují cílové hodnoty - počty buněk i znaky.

Ve snaze o co možná nejjasnější pravidla jsme se pokusili navrhnout kritéria, která by definovala, za jakých podmínek zaškrtnávat daný znak v průvodním listu. Některé laboratoře totiž zaškrtnávají změny v nátěru již při nálezu jedné či dvou buněk a dochází tím často až k paradoxním situacím, kdy ze zdravých osob uděláme nemocné.

Zpracované doporučení je trvale k dispozici v dokumentu „Hodnocení nátěru periferní krve – Pokyny pro vyplňování průvodního listu“ na [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz) v oddíle Infoservis. Samozřejmě vítáme veškeré připomínky z terénu.

## INTERNÍ KONTROLA KVALITY V KOAGULAČNÍ LABORATOŘI

J. Zavřelová, M. Matýšková, M. Penka  
*Oddělení klinické hematologie, FN Brno*

Interní kontrola kvality (IKK) je sledování spolehlivosti analytických měření pomocí kontrolních materiálů zařazených do jednotlivých sérií měření. Poskytuje denní průběžné informace o každé metodě, o její přesnosti (opakovatelnosti a reprodukovatelnosti), správnosti a porovnatelnosti výsledků. Frekvence a rozsah kontrol je individuální, řídí se typem laboratoře, množstvím analyzovaných vzorků, typem vyšetření a jejich počtem, přístrojovým vybavením, zkušeností pracovníků a dostupností kontrolního materiálu, ale současně musí plnit požadavky legislativy. Konkrétní podmínky provádění, hodnocení, záznamování IKK pro jednotlivé metody v dané laboratoři musí být popsány ve standartních operačních postupech.

Problémem IKK v koagulaci je zejména dostupnost vhodného kontrolního materiálu (globální testy a testy k vyšetření funkcí trombocytů). Pro řadu koagulačních vyšetření nejsou definovány referenční metody, návaznost kontrolních materiálů na referenční standardy je pro většinu parametrů zajištěna.

V koagulační laboratoři se provádí kontroly: správnosti, přesnosti v čase (reprodukovatelnosti), přesnosti v sérii (opakovatelnosti) a porovnatelnost přístrojů. K IKK se používají: 1) kontrolní vzorky komerční v referenčních mezích („normální“ N) a mimo referenční meze („patologické“ P). Mohou být atestované (s přesně udanou hladinou měřeného parametru s udáním povolených odchylek) nebo neatestované. 2) vzorky připravené laboratoří čerstvé i zamražené po alikvotech (N i P).

Ke kontrole správnosti se používají minimálně dva nezávislé komerční atestované kontrolní materiály (N a P). Vyhodnocení kontrol správnosti se provádí porovnáním s deklarovaným rozmezím. Kontroly správnosti je nutné provádět vždy při změně šarží reagensů a po kalibraci. Kromě toho je u rutinních vyšetření vhodné provedení kontrol správnosti minimálně 1x měsíčně a u speciálních koagulačních vyšetření provedení s každou sérií vyšetření.

Ke kontrole přesnosti stačí používat komerční neatestované kontroly event. vzorky připravené laboratoří (pokud možno N i P). Tyto materiály se v rámci kontroly přesnosti v čase opakovaně analyzují v provozních podmínkách současně se vzorky pacientů. Minimální frekvence provádění je u rutinní koagulace 1 – 2 denně pro každý test a každý přístroj, který je v provozu. Vyhodnocení musí být provedeno bezprostředně a vyžaduje speciální statistické programy. Stanovení přesnosti v čase u speciální koagulace lze provádět pouze u metod s větší frekvencí provádění. Kontroly přesnosti v sérii nepatří mezi běžné kontroly v koagulaci, provádí se při validacích přístrojů, pro ověření správné funkce přístroje a při zavádění nových metod.

Porovnatelnost přístrojů se provádí u rutinní koagulace při používání více přístrojů pro danou metodu. Tyto kontroly je nutné provádět bezprostředně po kalibraci metody, při změně šarže reagensie, kromě toho je vhodné provádět 1x denně při současném provozu na více přístrojích.

Výběr kontrolních materiálů je individuální a řídí se doporučením výrobců setů, přístrojů a požadavky laboratoře. Frekvence kontrol určuje ekonomická náročnost, která je závislá na počtu vyšetření.

## Literatura:

1. Lewis S.M.: *Quality assurance in hematology. WHO Document LAB/98.4, 1998.*
2. Plzák Z., Koruna I., Friedecký B., Kratochvíla J.: *Metrologická terminologie v analytické laboratoři. SEKK Pardubice 2003.*
3. *Scientific and Standardization Committee Communication: A Reference System Approach to Future Standardization of Laboratory Tests for Hemostasis, ISTH Website 2001.*

## EXTERNÍ KONTROLA KVALITY VYŠETŘENÍ INR NA POCT PŘÍSTROJI – VÝSLEDKY PILOTNÍ STUDIE.

P. Kessler

*Odd. hematologie a transfuziologie Nemocnice Pelhřimov, p.o.*

**Úvod:** Point of care testing (POCT) je laboratorní testování „blízko pacienta“, mimo standardní laboratorní podmínky. Správnost výsledků by měla - stejně, jako v případě klasických laboratorních testů - být ověřována systémem externího hodnocení kvality (EHK). Protože lékař provádějící POCT je i klinickým interpretem získaných výsledků, je možno do systému EHK zahrnout i hodnocení postanalytické fáze a tím přispívat ke zvyšování kvality péče jako celku.

CoaguCheck S je přenosný přístroj určený k POCT stanovení protrombinového testu. Vyšetření analogu INR je prováděno z plně kapilární krve. Kontrolní materiál, používaný za účelem EHK obsahuje citrátovou plazmu a kalcium, které se před vyšetřením smíchají, čímž napodobují situaci vyšetření z plné krve.

**Metodika:** V pilotní studii organizované SEKK, byl použit kontrolní materiál od britského organizátora EHK, společnosti UK NEQAS. Byla hodnocena správnost vyšetření analogu INR ve dvou vzorcích plazmy pacientů léčených warfarinem. V průvodním materiálu byla uvedena stručná anamnéza obou pacientů a kromě správnosti vlastních výsledků testu byly hodnoceny i odpovědi na 3 otázky mapující schopnost účastníků správně interpretovat dosažený výsledek. 1. otázka se týkala přiměřenosti naměřené hodnoty vzhledem k cílovému rozmezí INR, 2. otázka se týkala dalšího dávkování warfarinu a 3. otázka se zabývala intervalem mezi současnou a následnou kontrolou. Výsledky testů a odpovědi na výše uvedené otázky byly hodnoceny jako správné – vedoucí k optimálnímu léčebnému postupu, akceptovatelné, vedoucí k suboptimálnímu postupu, který však pacienta neohrožuje, a nesprávné – tedy ve svých důsledcích potenciálně ohrožující pacienta. Za úspěšný byl považován výsledek správný nebo akceptovatelný.

**Výsledky:** EHK se zúčastnilo 35 pracovišť, z toho 2 pracoviště neodpověděla na interpretační otázky. Úspěšnost vlastního vyšetření (průměrný výsledek  $\pm 23\%$ ) byla 97,1%. Odpověď na 1. otázku byla u obou testů správná u 31 (93,9%) účastníků, u 2 (6,1%) byla pro 1 vzorek nesprávná, pro 2. vzorek správná. Odpověď na 2. otázku byla v 1 případě (3%) nesprávná u 1 vzorku, v 5 (15,2%) případech akceptovatelná u 1 vzorku a

správná u 2. vzorku, ve většině případů - 27 (81,8%) správná u obou vzorků. Odpověď na 3. otázku byla jen u 11 (33,3%) účastníků správná pro oba vzorky, u 6 (18,2%) účastníků správná pro 1 vzorek a akceptovatelná pro 2. vzorek, u 2 (6,1%) účastníků akceptovatelná pro oba vzorky, u 3 (9,1%) účastníků správná pro 1 vzorek a nesprávná pro 2. vzorek, u 2 (6,1%) účastníků akceptovatelná pro 1 vzorek a nesprávná pro 2. vzorek a u 9 (27,2%) účastníků nesprávná pro oba vzorky. Celkově úspěšných bylo 18 (51,4%) účastníků, z toho 10 (28,6%) účastníků mělo všechny odpovědi správné.

**Závěr:** Úspěšnost vlastního laboratorního vyšetření byla velmi dobrá, stejně tak většina odpovědí na otázky přiměřenosti dávkování a změny dávkování byla úspěšná. Alarmující je vysoké procento účastníků, doporučující příliš dlouhé intervaly mezi kontrolami u pacientů s vysokým rizikem trombotických komplikací a nestabilními hodnotami INR. Zahnutí interpretační fáze do systému EHK se ukázalo jako užitečné.

#### Literatura:

1. Kristoffersen AH, Thue G, Sandberg S: Postanalytical external quality assessment of warfarin monitoring in primary healthcare. *Clin Chem* 2006 Oct;52(10):1871-8.
2. Poller L, Keown M, Chauhan N, et al.: European concerted action on anticoagulation. Quality assessment of the CoaguChek Mini and TAS PT-NC point-of-care whole-blood prothrombin time monitors. *Clin Chem* 2004 Mar;50(3):537-44.

## ERYTROCYTY Z AFERÉZY – MARKERY VITALITY BUNĚK PŘI HODNOCENÍ PARAMETRŮ JAKOSTI

R. Procházková<sup>1</sup>, L. Hubáčková<sup>1</sup>, C. Andrýs<sup>2</sup>, J. Krejsek<sup>2</sup>, M. Bláha<sup>3</sup>, L. Řehořová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Liberec,

<sup>2</sup>Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové,

<sup>3</sup>Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové

**Úvod:** Erytrocyty pro léčebné podání lze získat nejen klasickými odběry plné krve, ale i aferetickými technikami, které umožňují současný odběr dvou transfuzních jednotek (TU) erytrocytů (RBC) či kombinaci odběrů trombocytů s erytrocyty a/nebo plasmou při jedné návštěvě dárce. Cílem přípravy je získat RBC koncentrát standardní jakosti dle Doporučení Rady Evropy, s minimálním poškozením funkce erytrocytů. Pro hodnocení vitality buněk lze použít stanovení např. hladiny kalia, glukosy, laktátu či LDH. Moderním parametrem jakosti je annexin V, marker buněčné apoptózy. **Cílem** práce bylo zhodnotit markery poškození buněk u erytrocytů z aferézy s odlišnou technologií přípravy.

**Metodika:** U dárců krve, kteří splňovali kritéria Doporučení Rady Evropy, jsme provedli na separátoru Haemonetics MCS+ 20 aferéz, při kterých jsme získali 40 TU RBC deleukotizovaných (EAD MCS+), 20 aferéz s odběrem 40 TU RBC resuspendovaných (EAR), na separátoru Trima Accel 19 kombinovaných odběrů deleukotizovaných RBC (EAD Trima) a trombocytů. V den skladování 0 a 40 jsme stanovili: obsah Hb, Ht a leukocyty v TU, hodnotu pH, hladiny volného Hb, LDH, kalia, glukosy, laktátu a annexinu V. Výsledky byly



porovnány se souborem 20 in-line deleukotizovaných erytrocytů z plné krve (ERD). K hodnocení jsme použili dvouvýběrový t-test, párový test, Pearsonův a Spearmanův korelační koeficient. Statistická významnost byla posouzena na hladině  $p < 0,05$ .

**Výsledky:** U všech typů RBC bylo docíleno predikovaných standardních parametrů jakosti. Během skladování u žádného z typu RBC nedošlo k poklesu Ht a obsahu Hb v TU. Vzestup obsahu **volného Hb** byl vyšší u EAD MCS a EAR než u ERD, mezi EAD Trima a ERD nebyl statisticky významný rozdíl ( $p=0,18$ ). U EAD MCS+ a ERD byl srovnatelný vzestup hladiny **kalia** ( $p=0,98$ ), nejnižší byl u EAD TRIMA, nejvyšší vzestup u EAR. Korelaci hodnoty kalia se stupněm hemolýzy jsme nepotvrdili. Vzestup hodnot **LDH** byl vyšší u EAD MCS+ než u ERD a EAD Trima, nejmarkantnější byl u EAR a koreloval se stupněm hemolýzy u všech typů RBC. Vzestup **laktátu** byl nejvyšší u ERD, bez korelací s ostatními parametry. Pokles hladiny **glukózy** byl srovnatelný u obou přípravků ze separátoru MCS+ ( $p=0,86$ ), nejméně obsah glukózy poklesl u EAD Trima. Nejmenší pokles **pH** byl u EAD Trima, u žádného typu RBC pH nekleslo pod hodnotu 6,5. Vzestup hodnot **annexinu V** byl srovnatelný u ERD a EAD Trima ( $p=0,11$ ), vyšší u EAD MCS+ ( $p=0,009$ ), nejvyšší u EAR. Hladiny annexinu V korelovaly se vzestupem volného Hb a LDH u všech typů RBC. Korelaci annexinu V s laktátem jsme nepotvrdili.

**Závěr:** Vývoj markerů poškození erytrocytů byl srovnatelný u EAD Trima a ERD, nejvýraznější u EAR. Z výsledků usuzujeme, že z uvedených technologií přípravy erytrocytů je patrně nejšetrnější standardní zpracování plné krve a aferéza na separátoru TRIMA Accel. Typ technologie přípravy RBC jako takový však patrně nemá takový vliv na poškození erytrocytu, jako kontaminace přípravku leukocyty. Mimo annexinu V se jako vhodný marker poškození erytrocytu ukazuje i stanovení LDH, jejíž hodnoty jsou v korelaci s vývojem hemolýzy a hladinou annexinu V v přípravku.

#### **Literatura:**

1. *Matthes G.A.: Red cell apheresis: new concepts of blood component processing. Ther Apher 1997, 1(1): 22-28.*
2. *Seghatchian J., Krailadsiri P.: Red cell storage lesion assessed by the levels of potassium, hemoglobin and annexin V in supernatant. Transfus and Apher Sci 2002,26 (2): 121-127.*
3. *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 9 th ed. Strasburg: Council of Europe Publishing, 2003.*

*Studie je podpořena granty IGA MZČR č. NR/8015 – 3, MZO 00179906.*

## MANAGEMENT SYSTÉMU ZABEZPEČENÍ KVALITY V HEMATOLOGICKÉ LABORATOŘI „OKRESNÍHO“ TYPU.

M. Drgoňová

*Odd. hematologie a transfuziologie, Nemocnice Pelhřimov*

Zatímco v transfúzní službě je v důsledku tlaku ze strany státních orgánů již na všech pracovištích zavedený dobře fungující systém zabezpečení kvality, v hematologických laboratořích je situace horší, částečně z důvodu nedostatečné personální kapacity, částečně z důvodu snahy vedení nemocnic o maximální úspory.

Management systému zabezpečení kvality zahrnuje standardizaci postupů v preanalytické, analytické i postanalytické fázi jednotlivých vyšetření, kontrolu dodržování standardních operačních postupů, validaci laboratorních postupů, vnitřní kontrolu kvality a účast v cyklech externího hodnocení kvality. Systém vnitřní kontroly kvality zahrnuje zejména kontrolu přesnosti, správnosti a reprodukovatelnosti výsledků vyšetření, prováděnou v pravidelných, předem stanovených intervalech. Z případných chyb jsou neprodleně vyvozovány závěry a přijímána opatření k jejich odstranění. Výsledkem fungování systému by měly být přesné a spolehlivé výsledky laboratorních vyšetření.

Externí hodnocení kvality slouží k objektivnímu ověření funkčnosti systému zabezpečení kvality prostřednictvím kontroly správnosti a přesnosti laboratorních výsledků.

Systém zabezpečení kvality vede na jedné straně ke zvýšení nákladů na kontrolní laboratorní materiál a nároků na personál. Na druhé straně je nutným předpokladem kontinuálního zvyšování kvality laboratorní práce s bezprostředním dopadem na kvalitu péče o pacienta. Ve svých důsledcích pak vede k nemalým úsporám snížením výskytu komplikací, způsobených léčbou indikovanou na základě nesprávného laboratorního výsledku.

### Literatura:

1. Bourková L., Matýšková M., Kratochvíla J.,: *Doporučení ČHS ČLS JEP Kontrola kvality měření krevních obrazů na hematologických analyzátoch, 2004*
2. Friedecký B., Kratochvíla J., Matýšková M., Bourková L.,: *Doporučený postup získávání dat laboratorní reprodukovatelnosti, 2004*
3. *Quality assurance in hematology. WHO Document LAB/98.4 (1998)*

## KLASIFIKÁCIA A KATALOGIZÁCIA VÝKONOV - TÉZY

T. Lipšic <sup>1</sup>, P. Findo, R. Zajac

<sup>1</sup> *Klinika laboratórnej medicíny – OÚSA, LFUK, TU, VŠZaSP Bratislava*

“Verba volant, scripta manent” – slová vyprchajú, písmo ostáva. Pre vyjadrovanie a písanie – komunikáciu, popis, zvažovanie, definovanie, hodnotenie - sú nevyhnutnou potrebou abeceda-písmo, gramatika a syntax - tými sú pre výkony v zdravotníctve systémy klasifikácie, katalogizácie a kategorizácie.

Definovanie pojmov, komplexné analýzy, unifikácia, harmonizácia, jednoznačná štruktúra a štandardné postupy sú nevyhnutné pri každej zmysluplnej činnosti, teda aj zdravotníctvo.

- Terminológia pojmov:

Zoznam zdravotných výkonov (ZZV) – klasifikácia: systematické a štandardizované/ unifikované usporiadanie zdravotných výkonov

Katalóg zdravotných výkonov (KZV), je súhrn zdravotných výkonov, ich frekvencií a indikačných obmedzení patriacich k jednotlivým chorobám

- Aplikácia unifikovanej a správnej terminológie:

jednotný jazyk, ktorý presne popisuje lekárske, chirurgické a diagnostické služby. Služi na komunikáciu medzi lekármi, pacientmi a tretími stranami

- Aplikácia striktnej hierarchizácie:

ZZV a KZV sú formované na základe hierarchie pojmov a výkonov – v diagnostike aj v terapii. Základným princípom hierarchizácie je anatomické a funkčné členenie orgánov a systémov

- Výkon pre klasifikáciu a katalogizáciu musí spĺňať tieto kritériá:

zodpovedá súčasnej správnej medicínskej praxi, vykonávajú ho mnohí lekári a vkonáva sa na viacerých miestach.

Výkony v ZZV: sú odborovo neutrálne, umiestnenie výkonov v určitej časti katalógu neobmedzuje ich použitie v inej medicínskej oblasti, komplex výkonov označovaný ako “SVLZ“ je umiestnený podľa systematiky (nie organizácie odborov), výkony “funkčnej diagnostiky“ sú zaradené k príslušným orgánovým systémom. Výkon v katalógu je jedinečný, nemá sa opakovať.

Na základe skúseností z literatúry a práce na klasifikácii sú vytvorené tieto skupiny výkonov:

1. Všeobecné výkony

2. Diagnostické výkony - laboratórne výkony

3. Klinické výkony

Klasifikácia a vytvorenie ZZV sú základným predpokladom pre katalogizáciu a kategorizáciu výkonov (= abeceda, gramatika, syntax).

Na základe klasifikácie/katalogizácie môžu vzniknúť harmonizované a kompatibilné algoritmy postupov - štandardné diagnostické a terapeutické postupy.

Konečným realizačným výstupom je štandardizácia zdravotníckych výkonov a postupov (kvalita, efektívnosť a ekonomizácia) a vo finálnej fáze hodnotenie zdravotnej starostlivosti (ZS) podľa štandardného balíka výkonov na diagnózu (“DRG”). Cena je predpokladanou úhradou za štandardnú ZS poskytnutú pri konkrétnej chorobe podľa MKCH 10.

## HARMONIZÁCIA VÝSLEDKOV VYŠETRENÍ: KLINICKÝ PRÍNOS

P. Bartek, T. Lipšic

*Hematologické a transfuziologické oddelenie KLM TU, Onkologický ústav sv. Alžbety,  
s.r.o. Bratislava*

Presnosť, spoľahlivosť a interpretovateľnosť výsledkov laboratórných vyšetrení vzorky pacienta sú v mnohých prípadoch ovplyvnené faktom, kde a s akým technickým a personálnym vybavením boli vyšetrenia počas zdravotnej starostlivosti o pacienta vykonané. Model Virtuálneho Centrálného Laboratória (VCL), prezentovaný v praxi už v roku 1995 ako model pre manažment laboratórných údajov z klinických štúdií vo farmaceutickom výskume, ponúka námet na to, ako dosiahnuť zvýšenú jednotnosť dát aj v rámci veľkého územia. Harmonizácia výsledkov procesom štandardizácie umožní zavedenie jednotne definovaných limitov referenčných hodnôt a následné použitie jednotných rozhodovacích kritérií, čím sa zvýši interpretovateľnosť výsledkov daného pacienta v kontexte jeho predchádzajúcej zdravotnej starostlivosti a prinesie spoľahlivejšie rozhodovanie predovšetkým u pacientov s hraničnými hodnotami jednotlivých sledovaných parametrov.

## PROČ JDOU KOAGULAČNÍ TESTY ŠPATNĚ?

I. Hrachovinová, M. Zemanová, P. Kudláčková, H. Novotná, J. Prelllová, I. Železná  
*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

Problémy s vyšetrením koagulačných parametrov môžu vzniknúť na mnoha úrovniach koagulačného vyšetrenia. Je nutné si uvědomiť, že vyšetrenie nezačína spuštěním koagulačného testu, ale mnohým dříve - v době, kdy je zvolen určitý test a končí interpretací výsledku testu.

Zhruba si celý postup můžeme rozdělit na:

- a) preanalytickou
- b) analytickou
- c) postanalytickou fázi.

V preanalytické fázi jsou zdrojem chyb nevhodně zvolené testy vzhledem ke stavu pacienta, nevhodně naplánovaný odběr krve, nevhodně provedený odběr nebo odběr z nevhodného místa. Špatně zvolený antikoagulační roztok může být také zdrojem problémů. Skladování a příprava vzorku pro vyšetření jsou častým zdrojem chyb, které se mohou projevit hned (aktivace destiček a některých koagulačních faktorů, konzumpce heparinu) a nebo později, při použití skladovaných zamražených vzorků (při testech na lupus antikoagulants, resistenci na aktivovaný protein C a jiných).

V analytické fázi mohou být problémy vázané na používání přístrojů, poloautomatických nebo plně automatických koagulometrů. Zdrojem chyb mohou být nánosy nečistot, neodpovídající objemy reagentů nebo kontaminace reagentů mezi sebou. Samotné provedení testů může být zatíženo chybami vzniklými nevhodnými inkubačními časy, špatně

prováděnou kalibrací, hodnotou ISI neodpovídající použité reagentii, ředěním nebo nevhodnými kalibrátory. U reagentii je nutné dbát na dobu expirace a na to, že některé reagentie nejsou vhodné pro všechny druhy koagulometrů. Důvodem je optická prostupnost, nutnost míchání nebo objem reagentii. Většinou chyb analytické fáze lze předejít pravidelnou vnitřní kontrolou kvality, jejíž výsledky včas upozorní na problémy. Dohledat jejich příčiny nebývá nikdy jednoduché. Je nutné krok za krokem zkontrolovat postupy správné laboratorní praxe. Některé chybné výsledky ale nejsou zachytitelné ani vnitřní kontrolou kvality. Mohou být následkem jednobodového měření nebo nevhodou extrapolací diluční křivky. Výsledky z externí kontroly kvality pomáhají upozornit na další problémy.

V postanalytická fázi může dojít ke špatné interpretaci výsledků následkem neodpovídajícího analytického rozmezí nebo kvůli nedostatečným nebo zkresleným informacím o vzorku. K pochopení a interpretaci nepřehledného výsledkového listu bez odpovídajícího normálního rozmezí nepomůže ani bezchybné provádění preanalytické i analytické fáze.

Většina laboratorů ví, kde jsou její slabá místa a vedení laboratoře se je snaží kontrolovat. Bohužel koagulace a testování koagulace je trvalým zdrojem problémů, i když dodržujeme všechna pravidla správné laboratorní praxe. Všechno, co může jít špatně většinou jde špatně v tu nejnevhodnější dobu, a proto je nutná neustálá ostražitost.

#### Literatura:

1. *Clinical Diagnostic Technology. The Total Testing Process.* K.M. Ward-Cook, C.A. Lehmann, L.E. Schoeff, and R.H. Williams, editors. Washington, DC: AACC Press, Vol.1, 2003, Vol.2, 2005.

## PLASTICITA HEMATOPOETICKÉHO SYSTÉMU.

S. Filip<sup>1</sup>, J. Mokry<sup>2</sup>, M. Bláha<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Klinika onkologie a radioterapie LFUK a FN, Hradec Králové*

<sup>2</sup> *Ústav histologie a embryologie LFUK, Hradec Králové*

<sup>3</sup> *Oddělení klinické hematologie LFUK a FN, Hradec Králové*

#### Úvod.

Problematika kmenových buněk zaznamenala velký rozvoj. Systematické studium kmenových buněk zahájila pionýrská práce Tilla a McCullocha v Torontu začátkem roku 1961. Hlavním zaměřením této laboratoře bylo pochopit rozdíl mezi radiosenzitivitou normálních a rakovinových buněk.

Ve své přednášce se autoři zaměřují na kmenové buňky z různých pohledů – především ale se zaměřením na vztah mezi embryonálními (ES) a hematopoetickými kmenovými buňkami (HSC). Z tohoto komplikovaného vztahu vychází současný pohled na kmenové buňky a také vznášejí některé otázky a nabízí také odpovědi k této problematice. Připomeňme si ty nejdůležitější: Je možné přimět buňky jednoho typu tkáně, aby vypadaly a chovaly se

jako buňky jiné tkáně? Dochází k těmto změnám přirozeně? A mohly by se takové transdiferenciace použít v léčbě některých nemocí? Jak se řeší problémy bioetiky?

Významný pokrok v pochopení biologie kmenových buněk představuje objevení způsobu *in vitro* kultivace lidských embryonálních kmenových (hES) buněk. Tyto buňky lze získat při potratech nebo z „přebytečných“ embryí při *in vitro* fertilizaci, přičemž lze jejich potomstvo cíleně nasměrovat k vývoji a diferenciaci buněk pro potřeby regenerace poškozených tkání. Řada překvapujících pozorování z poslední doby doložila, že i tkánově specifické kmenové (multipotentní) buňky mají schopnost za vhodných podmínek produkovat celé spektrum buněčných typů bez ohledu na to, zda jsou odvozeny z téhož zárodečného listu či nikoli. Tato schopnost je nejčastěji nazývána plasticitou kmenových buněk. V současné době je nejvíce propracovaný systém hematopoézy, dále např. nervový systém a další.

Studie na zvířatech ukazují, že transplantací buď derivátů pluripotentních kmenových buněk nebo fetálních buněk lze úspěšně léčit řadu chronických onemocnění jako je diabetes mellitus, Parkinsonova nemoc, traumatické poranění míchy, Purkyňova buněčná degenerace, selhání jater, selhání srdce, Duchennova muskulární dystrofie a osteogenesis imperfecta. V současné době se také ukazuje, že bude možno léčit některá onemocnění krvetvorby např. akutní leukemii, dřevňové útlumy a další.

Ačkoliv bylo v posledních letech dosaženo značného pokroku, stále existuje několik hlavních překážek, které omezují širokou aplikaci buněčné transplantace v rutinní léčbě těchto stavů. Hlavními překážkami, s nimiž se musí počítat, je potřeba masivních dávek imunosupresivních léků pro prevenci rejekce transplantované tkáně a nedostatek orgánů od mrtvých dárců. I přes tyto překážky, strategie na bázi hES buněk by mohla umožnit tvorbu neomezeného množství buněk a tkání a jejich dostatečný přísun z abundančního, obnovitelného a rychle dostupného zdroje. Kromě toho by ES buňky, podle své přizpůsobivosti pro stabilní genetickou modifikaci, mohly být upraveny tak, aby se vyhnuly nebo inhibovaly imunitní odpověď hostitele.

Prvním krokem k úspěšnému vývoji terapie na bázi kmenových buněk u lidí je dokázat, že hES buňky mají schopnost diferencovat se v určitý, pro nás „zajímavý“ buněčný typ a ze smíšené populace tuto linii purifikovat. V druhém kroku bude nutné kriticky posoudit a demonstrovat, že diferencované buněčné deriváty fungují fyziologickým způsobem, např. že sekrece inzulínu v buňkách pankreatických ostrůvků je normální a odpovídá hladině glukózy. Třetím a hlavním milníkem na cestě ke klinickým testům bude důkaz efektivity na zvířecích modelech některých onemocnění. Za čtvrté, je zde možnost, že transplantace derivátů diferencovaných hES buněk lidským příjemcům může mít za následek tvorbu tumorů odvozených z hES buněk. Vzhledem k tomu, že pokrok v tomto směru pokračuje mílovými kroky, přibudou jistě další důležité otázky, které mohou limitovat využití kmenových buněk v terapii.

V konečném důsledku ale nemůžeme opomenout také možná zdravotní rizika, která se mohou vyskytovat při používání embryonálních kmenových buněk. Ještě nedávno jsme si mysleli, že budeme řešit otázku embryonálních kmenových buněk odděleně od dospělých kmenových buněk. Dnes se ale ukazuje, že tyto dva směry se musí nutně střetnout. Očekávané bioetické řešení a také snížení zdravotního rizika se ukazuje jenom jako oddálení již existujícího problému, který sebou nese buněčná terapie.

## Literatura:

1. Filip, S., English, D., Mokry, J.: *Issues in stem cell plasticity. J. Cell. Mol. Med.*, 2004, 4, s. 572-577
2. Srouf, E.F., Yoder, M.C.: *Flow cytometric analysis of hematopoietic development. Methods Mol. Med.*, 2005, 105, s. 65-80
3. Qusenberry, P.J.: *The continuum model of marrow cell regulation. Curr. Opin. Hematol.*, 2006, 13, s. 216-221
4. Filip, S., Mokry, J., Hruška, I.: *Kmenové buňky – biologie, medicína, filozofie. Galén Praha*, 2006, 228 s.

*Práce vznikla s podporou výzkumného záměru MSM 0021620820.*

## ANALÝZA KULTIVOVANÝCH DB U ZDRAVÝCH DÁRCŮ A PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM PO STIMULACI CD40L, CI A TNF alfa

L. Kovářová<sup>1</sup>, J. Michálek<sup>1</sup>, D. Očadlíková<sup>1</sup>, L. Pour<sup>1,2</sup>, S. Dudová<sup>1</sup>, J. Vigášová<sup>1</sup>,  
L. Zahradová<sup>1,2</sup>, M. Penka<sup>1</sup>, R. Hájek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>LEHABI-OKH, FN Brno-PMDV, Jihlavská 20, 625 00 Brno

<sup>2</sup>Interní hematologická klinika, FN Brno-PMDV, Jihlavská 20, 625 00 Brno

Úvod: Dendritické buňky (DB) jsou účinné antigen-prezentující buňky (APB) vyznačující se schopností stimulovat naivní T lymfocyty, iniciovat tak primární imunitní odpověď a udržovat toleranci proti patogenům, tumorům a vlastním antigenům. Schopnost DB regulovat odezvu imunitního systému závisí na jejich stavu, kdy maturaci dochází k přechodu od nezralých DB směrem ke zralým s množstvím změn jejich fenotypu a následně i funkce. Nekonzistentnost informací, že u DB získaných od pacientů s mnohočetným myelomem existuje porucha na úrovni kostimulace, nás vedla k tomu, abychom se zaměřili na studium fenotypu kultivovaných DB získaných z různých zdrojů a zároveň sledovali schopnost vyžrávání DB v závislosti na přidaném stimulans.

Cíl: Analýza fenotypu DB a srovnání schopnosti jejich vyžrávání u zdravých kontrol, pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) a neléčených pacientů s mnohočetným myelomem (MM) po stimulaci pomocí CD40Ligandu (CD40L), calcium ionophore (CI) a TNF alfa.

Metodika: Adherentní prekurzory mononukleárních buněk periferní krve jsou 5 dnů kultivovány s IL-4 a GM-CSF pro získání nezralých DB. Po přidavku stimulans CD40L, CI, TNF $\alpha$  a další 24h kultivaci jsou získané DB analyzovány na průtokovém cytometru. Sledovány jsou tyto markery: CD1a, CD11c, CD14, CD80, CD83, CD86, CCR6, CCR7, lineage mixture, HLA-DR a dále marker vyžrávání IL-12 pomocí ELISA.

Výsledky: V bezsérových podmínkách kultivace prozatím nebyl nalezen výrazný rozdíl mezi fenotypem DB zdravých dárců, pacientů s MGUS a s MM. Expresí znaku CD83, markeru zralosti DB, je v nízké míře nalézána již na nezralých DB, avšak po přidavku stimulans se dále zvyšuje až na 50%. Znak HLA-DR je exprimován ve velmi vysoké míře na nestimulovaných i stimulovaných buňkách. Expresí kostimulačních molekul CD80

a CD86 je výrazně ovlivněna stimulací, kdy hodnoty CD86 dosahují až 90%. Bylo zjištěno, že kultivací získané DB již neexprimují monocytární marker CD14, výrazně snižují expresi liniových markerů a exprimují znak CD11c, který odpovídá myeloidnímu typu DB. Expresie chemokininových markerů byla obtížně prokazatelná. Lze říci, že CD40L i TNF alfa se jeví jako vhodné stimulanty, zatímco CI zřejmě na buňky působí cytotoxicky. Podporováno grantem MZČR NR/8081-3.

#### **Literatura:**

1. Brown RD, Pope B, Murray A, Esdale W, Sze DM, Gibson J, Ho PJ, Hart D, Joshua D. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin 10. *Blood*. 2001 Nov 15; 98(10): 2992-8.
2. Büchler T, Michálek J, Kovářová, Musilová R, Hájek R. Dendritic cells in the treatment of hematological malignancies. *Hematology* 2003; 8: 97-104.

### **PŘÍPRAVA PROTINÁDOROVÉ VAKCÍNY S VYUŽITÍM DENDRITICKÝCH BUNĚK AKTIVOVANÝCH MONOKLONÁLNÍM IMUNOGLOBULINEM: PRVNÍ VÝSLEDKY KLINICKÉ STUDIE FÁZE II**

D. Očadlíková<sup>1</sup>, L. Zahradová<sup>1,2</sup>, L. Kovářová<sup>1</sup>, J. Smejkalová<sup>1</sup>, L. Pour<sup>1,2</sup>,  
P. Vidláková<sup>1</sup>, D. Kyjovská<sup>1</sup>, H. Novotná<sup>3</sup>, I. Jelínková<sup>4</sup>, M. Penka<sup>1</sup>, J. Michálek<sup>1</sup>,  
R. Hájek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické hematologie,

FN Brno, pracoviště Bohunice

<sup>2</sup>Interní hematologická klinika, FN Brno, pracoviště Bohunice

<sup>3</sup>Oddělení klinické biochemie, FN Brno, pracoviště Bohunice

<sup>4</sup>Firma Genex CZ s.r.o., Brno

V roce 2004 proběhla v našem centru první klinická studie fáze II, kde byl pacientům s mnohočetným myelomem (MM) podáván monoklonální imunoglobulin (Id-protein) po konjugaci s imunogenním nosičem keyhole limpet hemocyanin (KLH). Vakcína byla použita ve skupině 12 nemocných se stabilním nebo mírně aktivním onemocněním. Výsledky naznačily, že imunitní systém nemocných je schopen reakce na podaný antigen, který však není natolik imunogenní, aby vyvolal klinickou odpověď. Proto byla v našich laboratořích připravena vakcína nové generace s využitím dendritických buněk (DB), které jsou považovány za nejučinnější antigen-prezentující buňky. DB byly získány z periferní krve pacientů s MM a kultivovány po dobu 9 dnů za přítomnosti cytokinů IL-4 a GM-CSF. Pátý den kultivace byl přidán autologní Id-protein vyizolovaný z plazmy pacientů metodou afinitní chromatografie. Úplné dozrání DB bylo dokončeno přidáním TNF-alfa.



Devátý den kultivace jsou pacientům splňujícím kritéria pro zařazení do studie (po vysokodávkované chemoterapii s autologní transplantací kmenových buněk se stabilním nebo mírně aktivním onemocněním, u kterých nebyla indikovaná standardní terapie) podávány plně zralé DB aktivované Id-proteinem v množství vyšším než  $1 \times 10^6$ . V této klinické studii jsou vakcinováni 4 pacienti po dobu 6 měsíců a vakcína je aplikována 1x měsíčně.

Kontrola připravené vakcíny je prováděna z hlediska kvality (bezpečnostní testy na přítomnost endotoxinu, mykoplazmat a mikrobiologické vyšetření, flowcytometrický panel) a kvantitativní (dostatečný počet vitálních, zralých a funkčních buněk).

Od podání první vakcíny je monitorována imunologická a klinická odpověď na vakcínu. V září letošního roku se nacházíme v polovině vakcinačního cyklu. Vzhledem k ukončení této studie až v lednu 2007 bychom rádi předložili první výsledky a zkušenosti s vakcinací 4 pacientů. Jedná se zejména o výsledky metody ELISPOT, flow cytometrie a ELISA.

Metodou ELISPOT je hodnocena specifická aktivace imunitního systému antigenem (Id-protein) na základě produkce aktivačního markeru interferonu gama (IFN- $\gamma$ ). Nespecifická imunitní odpověď je hodnocena pomocí diferenciálního krevního obrazu a výsledků flow cytometrického panelu. Sledovány jsou tyto parametry: antigeny T buněk (CD3, CD5, kombinace CD4/8), NK buněk (kombinace CD16/CD56), B buněk (kombinace CD19/CD20), monocytů (CD14), dendritických buněk (kombinace CD83/DR/11c a CD83/DR/123) a aktivačních markerů (CD25, CD69, HLA-DR, CD45RO, CD45RA). Základním parametrem pro sledování klinické odpovědi na vakcínu je hladina monoklonálního imunoglobulinu v séru pacientů.

Jedná se o podání první protinádorové vakcíny v České republice obsahující antigenem aktivované DB. Podání vakcíny s sebou nese žádné významné riziko toxicity pro pacienty. Touto prací bychom chtěli informovat o způsobu přípravy vakcíny a prvních výsledcích reakce na její podání.

#### **Literatura:**

1. Titzer S, Christensen O, Mancke O et al. Vaccination of multiple myeloma patients with idiotypic-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *Br J Haematol* 2000; 108:805-16.
2. Büchler T, Hájek R. Dendritic cell vaccines in the treatment of multiple myeloma: advances and limitations. *Med Oncol* 2002; 19:213-8.
3. Büchler T, Hanak L, Smejkalova J et al. Využití monoklonálního imunoglobulinu k přípravě protinádorové vakcíny u nemocných s mnohočetným myelomem – první zkušenosti z klinické studie. *Klinická onkologie* 2004; 17: 64-7.

*Tato práce byla podpořena grantem IGA NR 8945-4.*

## HODNOCENÍ ANGIOGENETICKÉHO PROFILU VE DŘENÍ A PERIFERNÍ KRVÍ U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM.

L. Pour <sup>1</sup>, L. Smolej <sup>2</sup>, R. Hájek, V. Maisnar, Z. Adam, M. Krejčí, M. Penka

<sup>1</sup> LEHABI FN Brno

<sup>2</sup> OKH FN Hradec Králové

<sup>3</sup> IHOK FN Brno

<sup>4</sup> LF MU Brno

Angiogeneze je fyziologický děj; ve zvýšené míře se však vyskytuje, a je podmínkou, při růstu a metastazování nádorů. Existuje velké množství faktorů, které angiogenezu potencují a naproti tomu jiné faktory angiogenezu inhibují. Již na počátku 90-tých let minulého století bylo ověřeno, že stupeň angiogeneze je zvýšen nejen u solidních nádorů, ale i u hematologických malignit, obzvláště u mnohočetného myelomu. Nejdříve bylo prokázáno zvýšení mikrovaskulární density v kostní dřeni u pacientů s mnohočetným myelomem a posléze i zvýšení hladin jednotlivých faktorů angiogeneze v kostní dřeni a séru u pacientů s mnohočetným myelomem. Výsledky u jednotlivých faktorů nebyly však zcela jednoznačné, v naší studii se podařilo prokázat, že jedním z důvodů může být to, že při větším množství odebírané kostní dřene je poté koncentrace jednotlivých angiogenních faktorů nižší než při hodnocení z první porce odebrané dřene. V literatuře je poměrně velké množství informací o významu aktivátorů angiogeneze u mnohočetného myelomu, avšak informace o inhibitech jsou poměrně řídké.

V našem projektu komplexního hodnocení angiogeneze u pacientů s mnohočetným myelomem jsme hodnotili stupeň angiogeneze 1. hodnocením mikrovaskulární density kostní dřene MVD,

2. hodnocením hladiny aktivátorů a) vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) b) hepatocytární růstový faktor (HGF) a c) basický fibroblastový růstový faktor (bFGF) 3. hodnocením hladiny inhibitorů a) angiostatinu, b) thrombospondinu a c) endostatinu. Hodnocení bylo prováděno u pacientů podstupujících autologní transplantaci při stanovení diagnózy, v době maximální léčebné odpovědi po transplantaci a pak pravidelně 1x ročně z periferní plasmy i plasmy kostní dřene. Hodnocení mikrovaskulární density bylo prováděno pouze při stanovení diagnózy a podezření na relaps onemocnění.

Celkem bylo zhodnoceno 86 trepanobiopsií od 64 pacientů k určení MVD, t.j. bylo zhodnoceno 362 vzorků od 111 pacientů k určení hladiny výše uvedených šesti faktorů. Potvrdili jsme korelaci MVD a stádia onemocnění dle Durie-Salmona, potvrdili jsme zvýšenou hladinu aktivátorů angiogeneze v plasmě kostní dřene oproti plasmě periferní krve. Je pozorován trend k lepší léčebné odpovědi u pacientů s nižšími hladinami aktivátorů a vyššími hladinami inhibitorů angiogeneze oproti ostatním pacientům. Nyní je dokončováno měřování všech nasbíraných vzorků a statistické zhodnocení výsledků, které bude kompletně presentováno.

*Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR NR 8076-3, MZO 00179906.*

## MORFOLOGIE ERYTROCYTŮ

L. Bourková, M. Matýšková, J. Hoblová, J. Novotný, M. Penka  
*Oddělení klinické hematologie FN Brno Bohunice, Česká republika*

Hodnocení morfolgie erytrocytů z nátěrů periferní krve na sklo, patří k důležitým diagnostickým ukazatelům. Přes veškerou váhu, která tomuto vyšetření náleží, bývá ale jeho význam podceňován, jak ze strany kliniků (tj. vyžádání mikroskopického vyšetření erytrocytů), tak ze strany laboratoří (tj. správné vyhodnocování). Tato skutečnost vyplývá z řady analýz a vyhodnocování kontrolních cyklů SEKK, a proto považujeme za nutné, na tuto důležitou součást hematologického vyšetření upozornit.

Erytrocyty v nátěru jsou velmi citlivé na způsob zpracování vzorku (tj. kvalita a správná technika nátěru, správná fixace, barvení a uchovávání vzorku). K minimalizaci možnosti výskytu artefaktů a tím i falešně pozitivních nálezů, je nezbytné přesné dodržování SOP. Erytrocyty potom hodnotíme v místě, kde jsou erytrocyty rovnoměrně rozloženy a nepřekrývají se.

K hodnocení morfolgie erytrocytů z nátěru je vhodné respektovat výsledky KO, které nám mikroskopické hodnocení doplňují a upřesňují. Zohledňování výsledků KO využíváme především u hodnocení velikosti buněk, kde sledujeme hodnoty MCV, RDW a tvar distribuční křivky, a dále u hemoglobinizace (barvitelnosti) buněk, kde nám pomáhají hodnoty MCH a MCHC. U některých analyzátorů lze z distribuční křivky erytrocytů vyčíst i podezření na možnou zvýšenou přítomnost fragmentů erytrocytů, tj. schistocytů.

Morfologie erytrocytů většinou hodnotíme v nátěrech periferní krve, které jsou barveny standardní metodou MGG. Z hlediska velikosti hodnotíme: normocyty, mikrocyty, makrocyty, anizocyty; z hlediska barvitelnosti buňky se popisuje: normochromie, hypochromie, hyperchromie, anizochromie a polychromázie. Dále se zaměřujeme na tvarové odchylky (obecně můžeme mluvit o poikilocytech), které zahrnují: akantocyty, echinocyty, terčovitě (target cells) erytrocyty, slzičkovité erytrocyty (dakryocyty), srpkovité erytrocyty, eliptocyty, keratocyty, knizocyty, schistocyty, sférocyty, stomatocyty. U tvarových odchylek se většinou nehodnotí náhodný nález jedné buňky, ale prokazatelné zvýšení jejich přítomnosti v nátěru. V patologických erytrocytech se nachází také inkluze: bazofilní tečkování, Cabotovy prstence, Howell-Jollyho tělíčka, Papaniemiérova tělíčka. Ve vhodném místě nátěru, tj. tam, kde hodnotíme morfolgii, také sledujeme případné shluky (aglutinace) nebo penízkovatění (rouleaux) erytrocytů. Prezentace je v celém znění na webových stránkách [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz).

### Literatura:

1. S.C. Anderson, K.B. Poulsen: *Atlas of hamatology*, Lippincott Williams & Wilkins, 2003
2. E. Beutler, B.S. Collier, M.A. Lichtman: *Williams Hematology*, 6th ed., McGraw-Hill, 2001
3. D. Zucker-Franklin, M.F. Greaves, C.E. Grossi, A.M. Marmont: *Atlas of Blood Cells Function and Pathology*, volume 1, Edi. Ermes – Milano, 1988

## CO LZE A CO NELZE VYČÍST U MYELOYDYSPLASTICKÉHO SYNDROMU Z CYTOLOGIE DŘENĚ ZÍSKANÉ ASPIRACÍ.

R. Neuwirtová <sup>1</sup>, E. Vodičková <sup>2</sup>, H. Hochová <sup>2</sup>, J.Housková <sup>2</sup>

<sup>1</sup> I. interní klinika VFN, Praha

<sup>2</sup> Odd. klinické hematologie FN Motol, Praha

Diagnosa myelodysplastického syndromu (MDS) se neobejde bez vyšetření morfologie nátěrů punkce dřeně. U MDS je vyšetření cytologie kostní dřeně nadřazeno nad histologii.

Úvodem promítneme typické dysplastické změny ve třech hemopoetických řadách, pro názornost s jednoduchými skicami dysplastických změn. Nezbytné je barvit nátěry na železo. Vedle klasického diferencování dřeně provádíme v určitých případech kvantifikaci dysplastických změn.

### Co lze vyčíst z cytologie dřeně?

1. Z cytologie stanovíme diagnosu podtypu MDS jak dle FAB klasifikace, tak i upřesnění podtypů podle WHO klasifikace, tj. rozlišit RA (refrakterní anemie) od RCMD (refrakterní cytopenie s multilineární dysplasií) a rozdělit RAEB (refrakterní anemie s excesem blastů) na 1 a 2.
2. Spočítání věnečkových sideroblastů je podmínkou stanovení podtypu RARS (sideroblastická anemie) a RCMD-RS (RCMD s věnečkovými sideroblasty) dle přítomnosti dysplasie v ostatních řadách mimo červenou.
3. Vyhledáním některých specifických dysplastických změn je možno stanovit diagnosu 5q minus syndromu nebo pomýšlet na vzácněji se vyskytující podskupinu MDS s aberací 17. chromosomu nebo na syndrom „shlukování chromatinu“.
4. Rozmnožení hrudek Fe v retikulu svědčí pro siderosu dřeně (a pravděpodobně i jiných orgánů).

### Co lze vyčíst z cytologie dřeně jen částečně?

1. Ze zvýšeného počtu blastů lze odhadnout prognosu bez znalosti cytogenetiky. Nepříznivou prognosu lze předpokládat při těžké dysplasií. Naopak neplatí, že čím více věnečkových sideroblastů, tím vážnější prognosa.
2. Zmnožení monocytů spolu s monocytosou bez leukocytosy v periférii uzavíráme jako neproliferativní CMML (chronická myelomonocytární leukemie). Právem?
3. Přítomnost velkých tyčí nebo rozmnožení plasmocytů je suspektní z toho, že jde o „falešný MDS“ nebo-li symptomatickou dysplasií.

### Co nelze z cytologie dřeně vyčíst?

1. Přítomnost myelofibrozy.
2. Rozlišit hypoplastický MDS od aplastické anemie nebo od autoimunních hypoplastických cytopenií.
3. Určení prognosy tam, kde nejsou rozmnoženy blasty.
4. Odlišit LGL (large granular lymphocytes) leukemii od MDS.
5. Přítomnost a míru apoptosy.

I v moderní době s přibývajícimi sofistikovanými metodami a přístroji zůstává pro hematologa nutnost naučit se spolehlivě odečítat dřevňové nátěry. Zejména diagnosu MDS si hematolog na prvním místě ověřuje detailním hodnocením cytologie dřevňů.

## MOŽNOSTI STANOVENÍ NOVÝCH PARAMETRŮ NA ANALYZÁTORECH KREVŇNÍCH BUNĚK A MOŽNÉ INTERFERENCE

I. Fátorová, F. Vrbacký, J. Hošková, M. Pecka

*II. interní klinika – OKH, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařské fakulty  
Univerzity Karlovy v Hradci Králové*

Hematologické analyzátory krevních buněk zaznamenaly v posledním desetiletí výrazný rozvoj v užitých technologiích. Existují již analyzátory, kterými je možné kombinací různých detekčních principů velmi přesně stanovit pětipopulační diferenciální počet leukocytů, absolutní a relativní počty retikulocytů a normoblastů z plně krve, ale např. i počty periferních kmenových buněk ve vzorcích ze separátorů krvinek. Zvětšuje se linearita a stabilita rozsahu měření především u leukocytů a trombocytů. Některé analyzátory díky zdokonalení vyhodnocovacích algoritmů jsou schopné vydat i velmi přesné početní hodnoty některých morfologických buněčných abnormalit, např. fragmentů erytrocytů. Na trhu jsou již i kombinované hematoimunologické analyzátory, které jsou schopny stanovit počty jednotlivých typů krvinek na principu průtokové cytometrie. Všechny tyto parametry se dnes běžně využívají při diagnostice nebo léčbě celé řady onemocnění.

Na druhou stranu je dnes již možné stanovit i mnoho dalších speciálních parametrů krevních buněk, které se ještě běžně v medicíně nevyužívají a jsou spíše výzkumného charakteru.

### **Erytrocyty a hemoglobin**

Na některých typech analyzátorů lze stanovit počet erytrocytů nejen metodou nízkofrekvenční impedance (RBC), ale i opticky pomocí průtokové fluorescenční cytometrie (RBC-O). Vypočteným parametrem je pak poměr RBC-O/RBC. Dalšími parametry převážně výzkumného charakteru je např. stanovení střední koncentrace korpuskulárního hemoglobinu, obsahu korpuskulárního hemoglobinu, širší distribuce podle koncentrace hemoglobinu, širší distribuce podle obsahu buněčného hemoglobinu, Red Cell Size Factor a Micocytic Anemia Factor nebo stanovení počtu fragmentů erytrocytů (schistocytů). V některých případech mohou vyšší počty schistocytů ovlivnit stanovení trombocytů impedanční metodou.

### **Trombocyty**

Také počty trombocytů lze na některých analyzátozech stanovit impedančně (PLT) i opticky (PLT-O). Vypočteným parametrem je opět poměr PLT-O/PLT. Přítomnost obřích trombocytů nebo mikroshluků PLT může vést v některých případech při impedančním

stanovení k falešně nižším počtům PLT. U onemocnění, kde se můžeme setkat s výskytem fragmentů leukocytů v obvodové krvi, je možné získat falešně vyšší počty PLT optickou metodou. Dalšími destičkovými parametry převážně výzkumného charakteru je např. stanovení nezralé destičkové frakce, střední denzity trombocytů, střední suché masy trombocytů, distribuční šíře dle denzity trombocytů, distribuční šíře dle suché masy trombocytů.

#### **Pětipopulační diferenciální počet leukocytů**

Jedná se o elektronické hodnocení buněk bílé řady, které jsou opracované lyzačními a stabilizačními roztoky. K rozlišení jednotlivých typů bílých krvinek se využívají různé metody stanovení, popřípadě jejich kombinace. Nejčastěji se využívají detekční metody založené na principu rozptylu laserového paprsku, polarizovaného laserového paprsku nebo metody založené na principu nízkofrekvenční impedance a vysokofrekvenčního střídavého elektrického proudu. Různí výrobci kombinují různé detekční metody stanovení. Zpřesněním vyhodnocovacích algoritmů bylo dosaženo toho, že některé analyzátory jsou schopny číselně vyhodnotit střední objem a distribuční šíři jednotlivých subpopulací leukocytů. Tyto parametry nás informují o výskytu mladších, nezralých nebo reaktivních forem leukocytů. Analyzátory kromě běžných počtů jednotlivých typů leukocytů vyhodnocují i speciální populace buněk, např. Avia-120 firmy Bayer tzv. Large Unstained Cells (LUC) a parametr MPXI (MyeloPeroXidase Index).

#### **Retikulocyty**

Krvinky se obarví barvivem afinitním k DNA/RNA strukturám. Barvivo prostupuje přes membránu dovnitř buněk. Absolutní i relativní počet (RET #, RET %) se stanovuje většinou na principu průtokové fluorescenční cytometrie, kdy na osu x je vynesena míra fluorescence a na osu y velikost buňky. Vysoké počty retikulocytů nebo fragmentů retikulocytů mohou ovlivnit počet trombocytů stanovených optickou metodou (vyšší hodnoty). Dalšími stanovovanými nebo vypočtenými parametry RET jsou např. retikulohematokrit, koncentrace hemoglobinu v retikulocytech, rozdíl mezi koncentracemi hemoglobinu v RBC a RET (vypočtený parametr), střední objem retikulocytů, střední obsah hemoglobinu v retikulocytech, šíře distribuce retikulocytů, mladší a starší vývojové formy retikulocytů, střední koncentrace korpuskulárního hemoglobinu v retikulocytech, obsah buněčného hemoglobinu v RET, šíře distribuce podle koncentrace hemoglobinu v RET, šíře distribuce podle obsahu buněčného hemoglobinu v RET.

#### **Normoblasty**

Erytrocyty a erytroblasty se vystaví působení lyzačního roztoku, leukocyty se nelyzují. Dále jsou buňky obarveny fluorescenčním barvivem afinitním k jaderné DNA. Absolutní i relativní počet (NRBC #, NRBC %) se stanovuje většinou na principu průtokové fluorescenční cytometrie, kdy na ose x je vynesena míra fluorescence a na ose y velikost buňky. Vysoké počty NRBC mohou ovlivnit absolutní počet leukocytů (vyšší počty).

#### **Strukturální parametry**

Ve výstupech z analyzátorů se objevují i tzv. parametry strukturální, které se běžně nevydávají, např. DIF-X(Y), DIF-WX(WY), NEUT-X(Y), BASO-X(Y), BASO-WX(WY), LYMPH-X, LYMPH-Y, RBC-X(Y), RBC-WX(WY), RET-X,(Y), NRBC-X(Y), NRBC-WX(WY). Tyto parametry vyjadřují průměrné rozložení nebo šíři distribuce buněk v axiální rovině X nebo Y a slouží k doplnění informací o populaci jednotlivých typů buněk.

### **Průtoková cytometrie**

Princípem metody je detekce buněk značených monoklonální protilátkou specifickou pro určitý povrchový antigen (CD znak) buňky. Např. kombinovaný hematoimunologický analyzátor Sapphire firmy Abbott umožňuje stanovení počtu T-lymfocytů pomocí CD 3/4 a CD 3/8 a počtu trombocytů pomocí CD 61.

### **Stanovení počtu kmenových buněk**

Některé analyzátoři, např. Sysmex XE-2100, stanovují i absolutní a relativní počty hematopoetických progenitorových buněk v periferní krvi (HPC #, HPC %) a nezralých granulocytů (IG #, IG %) v tzv. IMI kanálu, kde jsou buňky na ose x separovány podle velikosti (detekce pomocí stejnosměrného nízkofrekvenčního proudu) a na ose y podle hustoty a vnitřního vybavení buňky (detekce pomocí vysokofrekvenčního střídavého proudu).

### **Literatura:**

[http://www.labnews.de/en/products/pr\\_120.php#descr](http://www.labnews.de/en/products/pr_120.php#descr)

<http://www.medcompare.com/showcase.asp?showcaseid=220>

[http://www.findarticles.com/p/articles/mi\\_qa3725/is\\_200103/ai\\_n8932256](http://www.findarticles.com/p/articles/mi_qa3725/is_200103/ai_n8932256)

<http://www.medcompare.com/details/13949/COULTER-LH-750-Hematology-Analyzer.html>

*Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.*

## **NÁŠ POHLED NA ANALYZÁTOR KREVNÍCH ČÁSTIC COULTER LH 755**

P. Šigutová, A. Štambachová, Z. Hajšmanová, R. Perlík

*Ústav klinické biochemie a hematologie, hematologický úsek, FN a LF UK Plzeň*

V listopadu 2005 jsme začali ve fakultní hematologické laboratoři pracovat s novým analyzátořem krevních částic Coulter LH 755, který nahradil hlavní přístroj z r. 1998. V dnešní době máme ve dvou od sebe vzdálených laboratořích (každá je v jiné městské čtvrti) dva analyzátoři Coulter LH 750, z nichž jeden je vybaven automatickou nátěrovou a barvicí linkou.

V našem sdělení popisujeme výhody i nevýhody vysoce výkonných analyzátořů. Využíváme novou nabídku v analýze krevního obrazu jako např. posouzení stupně zralosti retikulocytů, přímé měření NRBC a automatickou korekci počtu leukocytů u každého vzorku krve.

Diferenciální rozpočet leukocytů pokročilou technologií analýzy krevních částic ve 3D prostoru pomocí tří nezávislých fyzikálních veličin v naší laboratoři významně omezil počty vyšetření rozpočtu leukocytů v mikroskopu, k čemuž přispěla i nově zavedená mikroskopická validace automatických rozpočtů. Po určitých počátečních potížích umožňují nátěrový a barvicí automat uspořít manuální práci laborantek a vylepšit kvalitu nátěrů.

Oboustranné propojení s LIS slouží v naší laboratoři poprvé ke kompletnímu přímému

řízení analyzátoru krevních částic včetně kontrolního modulu dle požadavků systémů kontroly kvality měření.

Za nevýhodu tohoto vysoce výkonného zařízení považujeme nutnost odebrat poměrně velké množství krve (pro manuální mód prakticky 220 µl), což u pediatrických vzorků bývá problém. Doplnění této automatické linky dalšími analyzátory dále zkvalitní a zrychlí laboratorní práci a umožní plně vyhovět různorodým požadavkům na laboratoř.

#### **Literatura:**

1. *Igout J., Fretigny M., Vasse M. et al: Evaluation of the Coulter LH 750 haematology analyser compared with flow cytometry as the reference method for WBC, platelet and nucleated RBC count. Clin Lab. Haem., 2004, 26, 1 - 7*

### **ZKUŠENOSTI S POUŽITÍM ANALYZÁTORU ADVIA-120 V DIAGNOSTICE AKUTNÍ LEUKÉMIE**

D. Mikulenková, R. Šimečková, T. Prchal, M. Moravcová, H. Černíková, A. Papáčková,  
L. Bergerová, V. Horáčková, I. Jirásková  
*Ústav hematologie a krevní transfúze Praha*

**Princip měření:** Od r.2001 používáme k měření krevního obrazu analyzátor Advia 120 od fi Bayer. Ten měří a hodnotí leukocyty ve dvou systémech. V basofil/lobularity kanálu využívá k měření laserovou metodu, kdy kyselina ftalová a surfaktant (ADVIA 120 baso činidlo) lyzuje erythrocyty, trombocyty a cytoplazmu všech leukocytů kromě bazofilů. Rozptyl laserového paprsku ve dvou úhlech určuje v leukocytech velikost (osa y) a segmentaci jader (osa x). Je zde určen i jejich celkový počet. Peroxidasový kanál používá známou cytochemickou metodu, při které se nejprve surfaktantem (dodecyl sulfát sodný a Brij-35) za tepelného stresu lyzují erythrocyty, poté jsou leukocyty fixovány formaldehydem. Posledním krokem je barvení leukocytů 4chloro-1-naftolem za přítomnosti peroxidu vodíku, kdy se v buňkách tvoří tmavý precipitát. Buňky jsou rozděleny na základě rozptylu paprsku halogenové žárovky (velikost) a absorpce světla (intenzita zbarvení). Výsledkem je 6-populační diferenciál. Kromě základních 5 populací (neutrofilů, eosinofilů, basofilů, lymfocytů, monocytů) měří analyzátor navíc tzv.LUC = large unstained cells, které odpovídají buňkám větším než lymfocyty a mají nulovou peroxidázovou aktivitu.

**Závěr:** Analyzátorový 6-populační rozpočet leukocytů v krevním obraze na našem pracovišti používáme k rychlému a orientačnímu zhodnocení vstupního krevního obrazu při podezření na akutní leukemii. Ke stanovení diagnózy je dále nutné morfologické a cytochemické zhodnocení nátěru krve a kostní dřeně, dále vyšetření buněk průtokovou cytometrií, cytogenetickými a molekulárně-genetickými metodami, u leukopenických vzorků s hypocelulárními nátěry dřeně též histologické vyšetření.



## Literatura:

1. David M. Dorfman, MD, PhD et al.: *ADVIA 120 Hematology System: Clinical utility in the analysis hematopoietic malignancies, 1.international Bayer diagnostic lab symposium, 1997. Italy*
2. Merino A. et al: *Acute myeloid leukaemia patients and pseudo eosinophilia, Core lab CDB, Hospital clinic, University of Barcelona, Spain, ISLH 2006 Amsterdam- XIXth international symposium of technological innovations in laboratory hematology*
3. Barbara J.Bain: *Blood cells. Practical guide, 3.edition, 2002*

## PŘÍPRAVA BAKALÁŘŮ PRO ZDRAVOTNICKÉ LABORATOŘE

P. Štern<sup>1,2,3</sup>, K. Kotaška<sup>2</sup>, J. Kukačka<sup>2</sup>, R. Průša<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> LF UK, Praha

<sup>2</sup> LF UK, Praha

<sup>3</sup> IPVZ Praha

Bakalářské studium připravující posluchače pro zdravotnické laboratoře je obvykle tříleté, výjimečně čtyřleté. Některé fakulty nemají dosud otevřené všechny ročníky (2. LF UK Praha, LF MU Brno, Zdravotně sociální fakulta České Budějovice; podobně je tomu na Slovensku v Košicích, Martině, Trenčíně a Trnavě). Některé fakulty otvírají vedle prezenčního (dříve denního) studia také kombinovanou formu (dříve dálkové studium). Všechny ročníky bakalářského studia již otevřely 1. LF UK Praha, Farmaceutická fakulta UK Hradec Králové, Fakulta biomedicínského inženýrství ČVUT Praha, Zdravotně sociální fakulta Ostravské univerzity a Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice; na Slovensku pak LF KU (externí forma je čtyřleté studium) a Slovenská technická univerzita v Bratislavě. Všechny uvedené VŠ s výjimkou Ostravské univerzity nabízejí navazující dvouleté magisterské studium.

Porovnáme-li studijní programy pěti českých fakult s plně rozvinutým bakalářským programem, pak klinická biochemie se vyučuje buď pod tímto názvem nebo v rámci biochemie v rozsahu 1 – 7 h. Dvě fakulty vyučují také biochemické metody 3 – 6 h. Obecná chemie se učí na všech fakultách (někdy pod jiným názvem) v rozsahu 1 – 11 h, biochemie na všech fakultách 1 – 7 h, analytická chemie na dvou fakultách 6 – 12 h (sečteny 2 semestry), instrumentální analýza na dvou fakultách 3 – 5 h. Klinická biochemie je státnicovým předmětem na třech fakultách, analytická chemie na dvou fakultách a biochemie na jedné fakultě.

Hematologie se vyučuje v plně rozvinutém bakalářském programu na dvou fakultách 1 až 2 semestry vždy 2 h týdně a praktika jsou buď 1 semestr 3 h nebo 2 semestry 2 h týdně.

Bakalářské studium (obvykle Biomedical laboratory science) na LF v zemích EU není obvyklé, častější je jinde (PF, technologické fakulty, životní prostředí aj.). Výjimkou je Belgie, kde tříleté bakalářské studium je jako první část studia lékařství na LF (lze jako bakalář pracovat ve zdravotnictví – studium je ukončeno státní zkouškou), pak může následovat čtyřleté magisterské studium k dosažení lékařského diplomu.

## SOUČASNÝ STAV VE VZDĚLÁVÁNÍ PRACOVNÍKŮ V KLINICKÝCH LABORATOŘÍCH

S. Lexová  
NCO NZO, Brno

Rámcový vzdělávací program pro získání specializované způsobilosti v oboru hematologie a transfúzní služba - Věstník MZ ČR částka 4 - staví podmínky pro zařazení do specializačního vzdělávání:

- získání odborné způsobilosti k výkonu povolání zdravotního laboranta dle zákona č. 96/2004 Sb., § 9

- výkon povolání v oboru specializace v délce trvání nejméně 12 měsíců.

Součástí přihlášky do specializačního vzdělávání jsou i úředně ověřené kopie dokladů o získané odborné způsobilosti. Příjem přihlášek bylo MZ ČR pověřeno NCO NZO. Zákon stanoví, že žadatel musí být zařazen do specializačního vzdělávání do 30 dnů po přijetí přihlášky. Po zařazení do specializačního oboru je nutné splnit podmínku 12 měsíců výkonu povolání v oboru specializace a pak následuje studium akreditovaného vzdělávacího programu na akreditovaném pracovišti. Délka vzdělávacího programu je 24 měsíců a skládá se z teoretické a praktické části. **Specializační vzdělávání je uskutečňováno modulovým způsobem. NCO NZO žádá o akreditaci na teoretickou část vzdělávacího programu. Na praktickou část vzdělávacího programu se může akreditovat pouze poskytovatel zdravotní péče, nikoliv NCO NZO.**

### 1. ročník

#### Základní modul - povinný

Organizačně-provozní problematika klinických laboratoří

délka trvání modulu: 1 týden

#### Odborný modul – povinný

Hematologie a transfúzní služba

délka trvání modulu: 2 týdny teorie, 1 týden konzultací a 4 týdny praxe na provedení předepsaných laboratorních výkonů

### 2.ročník

#### Speciální modul

**Laboratorní metody v hematologii se zaměřením na cytomorfologii – povinně volitelný**

**Laboratorní metody v hemokoagulaci – povinně volitelný**

**Laboratorní metody v imunoematologii – povinně volitelný**

délka trvání modulu 1 týden teorie, 2 týdny praxe, k provedení odborné písemné práce 1 týden konzultací a 4 týdny praxe

Po splnění předepsaných podmínek, absolvování základního modulu, odborného modulu, speciálního modulu, předepsaných praxí a úkolů spojených se specializačním vzděláváním je studium ohodnoceno 120 kredity (Evropský kreditní transfer), se účastník přihlásí k atestační zkoušce. Průběh atestační zkoušky a složení atestační komise upravuje vyhláška MZ ČR č. 394 a č. 395. **Evropský kreditní transfer není totožný s kreditním systémem vyhlášky č. 423/2004. Dle této vyhlášky získá studující 100 kreditů do kreditního systému celoživotního vzdělávání.**

## Literatura:

1. *Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky, ročník 2006, částka 4, vydáno květen 2006*
2. *Sbírka zákonů Česká republika, částka 139, 423.*
3. *Zákon 96/2004 Sb. o podmínkách získávání způsobilosti k výkonu nelékařských zdravotnických povolání a k výkonu činností souvisejících s poskytováním zdravotní péče a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o nelékařských zdravotnických povoláních).*

## BAKALÁŘSKÉ A MAGISTERSKÉ STUDIUM ZDRAVOTNICKÁ BIOANALYTIKA NA HRADECKÉ FARMACEUTICKÉ FAKULTĚ

J. Dršata<sup>1</sup>, R. Karlíček<sup>1</sup>, M. Pecka<sup>2</sup>, M. Tichý<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Farmaceutická fakulta UK

<sup>2</sup>FN a LFUK v Hradci Králové

Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy (FaFUK) v Hradci Králové od roku 1969 vychovává zdravotnické pracovníky. Řada farmaceutů se úspěšně uplatnila i v laboratorních zdravotnických zařízeních různého typu. Proto byl na fakultě v 90. letech připraven a od akademického roku 1999/2000 otevřen studijní program - Zdravotnická bioanalýtika. Výuka ve studijním programu Zdravotnická bioanalýtika navázala na zkušenosti se vzděláváním farmaceutů a využívá pedagogických pracovníků z řad kvalifikovaných farmaceutů a lékařů – stálých pracovníků fakulty. Vedle toho Farmaceutická fakulta ve výuce bioanalytiků úzce spolupracuje zejména s Lékařskou fakultou UK a s fakultní nemocnicí v Hradci Králové, jejichž pracovníci zajišťují v tomto studijním programu výuku některých preklinických a klinických disciplín.

Studijní program Zdravotnická bioanalýtika byl původně koncipován jako souvislý magisterský pětiletý program a v akademickém roce 2003/2004 ukončili úspěšně studium a odcházejí do laboratorní praxe první absolventi tohoto programu.

V souvislosti se zaváděním strukturovaných studijních programů s tendencí rozdělit vysokoškolské studium řady oborů na programy bakalářské a navazující magisterské bylo na FaF UK v Hradci Králové připraveno na základě zkušenosti s dosavadním pětiletým magisterským programem dvoustupňové studium Zdravotnické bioanalýtky.

První ročník bakalářského studia Zdravotnické bioanalýtky byl otevřen v akademickém roce 2003/2004. Na něj navazuje samostatné dvouleté magisterské studium oboru, zatímco pětiletý souvislý program skončí v roce 2007.

V akademickém roce 2004/2005 otevřela FaF UK, reagující na poptávku v oblasti zdravotnictví, samostatné bakalářské studium v kombinované formě. Tato forma studia je zamýšlena jako nabídka zvýšení vzdělání pro již pracující laboranty biochemických, hematologických, imunologických, mikrobiologických a případně dalších specializovaných zdravotnických laboratoří. Absolventi tohoto studia budou mít vyšší formu vzdělání než laboranti a diplomovaní laboranti a mohou být zařazeni zejména do specializovaných nebo vedoucích funkcí v nemocnicích. Přednáška seznámí posluchače s náplní studia, aktuálními problémy a cíli studijního programu.

## BAKALÁŘSKÉ STUDIUM ZDRAVOTNICKÁ BIOANALYTIKA NA FARMACEUTICKÉ FAKULTĚ V HRADCI KRÁLOVÉ

J. Blažková, L. Haklová, I. Jokešová, V. Palička  
*Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové*

Při Farmaceutické fakultě UK v HK je od roku 2004 otevřen studijní program Zdravotnická bioanalytika, koncipovaný jako bakalářský tříletý kombinovaný pro laboranty z praxe. Náplň studia je tvořena předměty chemického a biologického charakteru, které jsou rozloženy do všech ročníků vyváženě a vzájemně se doplňují. Výuka probíhá ve formě vybraných seminářů a cvičení v pátek a v sobotu celkem 7 krát za semestr a je výrazně posunuta k samostudiu. Studium trvá tři roky a je ukončeno státní bakalářskou zkouškou a obhajobou písemné bakalářské práce. Cílem studia je umožnit současným pracovníkům se středoškolským vzděláním ve všech typech laboratoří klinických oborů, v laboratořích transfúzního lékařství a hygienické služby všestranné a kontinuální zvýšení kvalifikace jak v příslušné odbornosti, tak ve znalosti jazyků i moderních informačních technologiích.

### VÝSLEDKY STANOVENÍ BCL-2/IGH PŘESTAVBY U NEMOCNÝCH S NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÝM FOLIKULÁRNÍM B-NEHODGKINSKÝM LYMFOMEM ZA OBDOBÍ 2002-2004

D. Belada<sup>1</sup>, M. Beránek<sup>2</sup>, V. Palička<sup>2</sup>, D. Dvořáková<sup>3</sup>, J. Malý<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *II. interní klinika, oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská Fakulta UK Hradec Králové*

<sup>2</sup> *Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové*

<sup>3</sup> *Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, FN Brno - Bohunice*

Folikulární lymfom (FL) je druhý nejčastější ne - Hodgkinův lymfom (NHL) v západní populaci. Je charakteristický svými molekulárně genetickými znaky – přítomností translokace t(14,18) (q32,q21). Z molekulárně genetického hlediska zahrnuje lokus 18q21 pro gen bcl-2, který je translokován do oblasti lokusu 14q32, který kóduje těžký řetězec imunoglobulinu (IgH), což vede k jeho nadměrně expresi, a tím k nadměrné syntéze proteinu bcl-2, mohutného inhibitoru apoptózy. Dostupné PCR metodiky jsou postaveny na detekci 2 základních zlomových míst na chromozómu 18: MBR (major breakpoint region) a mcr - minor cluster region, existují ale i další zlomová místa (5' mcr, 3' MBR). Význam stanovení této translokace spočívá v potvrzení diagnózy FL, posouzení minimální reziduální nemoci, zhodnocení prognostického rizika a k vyhodnocování efektu nových léčebných postupů. Cílem naší práce bylo zjistit výskyt translokace t(14;18) u nemocných s nově diagnostikovaným FL pomocí vyšetření technikou nested PCR ze vzorků kostní dřeně a periferní krve před a po léčbě. Zajímala nás korelace pozitivivity t(14;18) mezi molekulárně genetickým vyšetřením pomocí PCR a imunohistochemickým (IHCH) stanovením proteinu bcl-2

v trepanobiopických vzorcích kostní dřeně. Posledním úkolem bylo stanovit, jaká část nemocných dosáhla molekulárně genetické remise onemocnění po terapii a zda se lišily mezi sebou skupiny nemocných, které byly léčeny samotnou chemoterapií a chemoterapií v kombinaci s monoklonální protilátkou anti CD20, rituximabem. V našem souboru bylo 41 nemocných s věkovým mediánem 57 let (31-76), z toho 24 mužů a 17 žen. Pozitivita bcl-2/IgH (pro oblast MBR + mcr) v kostní dřeni nebo v periferní krvi byla nalezena u 18 ze 41 pacientů s FL (44%), přičemž v 16 případech se jednalo o oblast MBR a 1x mcr a 1x 5' mcr. Při porovnání výsledků IHCH z kostní dřeně a PCR bylo zjištěno, že z 21 nemocných IHCH pozitivních byla nalezena přestavba bcl-2/IgH u 16 nemocných (76%), naopak jen 2 z 41 nemocných byli IHCH biopicky negativní při PCR pozitivitě (5%). U PCR negativních byla zaznamenána shoda s IHCH v 18 z 20 případů (90%). Z hlediska konverze z PCR pozitivity do negativity po léčbě byl tento jev sledován u 11 z 18 vstupně PCR pozitivních nemocných (61%), z toho u 10 z nich byl podáván rituximab (91%), jen u 1 nemocného došlo ke konverzi po samotné chemoterapii. Shoda mezi výsledky PCR stanovení v kostní dřeni a periferní krvi byla nalezena u 23 z 26 nemocných (88%), u kterých byly vyšetřeny oba kompartmenty před léčbou. Výsledky našeho pozorování jsou ve shodě s literárně uváděnými daty, dosažení PCR negativity je možné jak samotnou chemoterapií, tak zejména přidáním rituximabu, což vedlo v našem souboru ke konverzi do PCR negativity ve vysokém procentu případů. Výsledky jsou ve shodě s literárně publikovanými daty.

#### **Literatura:**

1. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME et al. Distinctive chromosomal abnormalities in histologie subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1982; 307:1231-1236
2. Montoto S, López-Guillermo A, Colomer D., et al. Incidence and clinical significance of bcl-2/IgH rearrangements in follicular lymphoma. *Leukemia and lymphoma* 2003;44:71-76
3. Montoto S, López-Guillermo A, Colomer D., et al. Incidence and clinical significance of bcl-2/IgH rearrangements in follicular lymphoma. *Leukemia and lymphoma* 2003;44:71-76

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

„FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING“  
– NAŠE ZKUŠENOSTI A MOŽNOSTI VYUŽITÍ  
V HEMATOONKOLOGII

M. Borský, D. Dvořáková, M. Klabusay, J. Mayer

*Laboratoř flow cytometrie a celulární terapie, Interní hematatoonkologická klinika,  
Centrum molekulární biologie a genové terpaie, Interní hematatoonkologická klinika  
Fakultní nemocnice Brno*

Složitá síť kooperací a interakcí velkého počtu specializovaných buněčných typů v krevním prostředí nás nutí využívat stále sofistikovanější separační techniky, abychom mohli adekvátně použít vysoce citlivé diagnostické metodiky především z oblasti molekulární biologie. Naše klinika využívá pro účely specializované molekulární diagnostiky separační techniku „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS).

Separace krevních buněk provádíme na zařízení FACS Vantage SE (Becton-Dickinson, U.S.A.) což je průtokový cytometr špičkových parametrů pracující na bázi „stream in air“. S jeho pomocí dokážeme definovat buněčné populace na základě až osmi parametrů měřených současně na jedné buňce. Vybrané populace lze následně fyzicky separovat do dvou sběrných nádob paralelně rychlostí až 40 000 případů za sekundu v čistotě dosahující až 99,8%. Buňky lze od sebe separovat nejen na základě povrchových antigenů, ale také jejich cytoplazmatických antigenů a měřených biofyzikálních veličin.

Tato separační technika nachází své využití všude tam, kde je zapotřebí získat přesně definovanou populaci buněk z biologického materiálu. Je tedy logickým předstupněm citlivých molekulárně-biologických diagnostických technik jako jsou PCR, sekvenování, DNA čipy, ale rovněž tkáňových kultur, expanzí a diferenciací specifických cílových populací buněk.

Klinické studie běžící v současné době na našem pracovišti se soustřeďují především na sledování minimální reziduální nemoci (MRN) u leukemických pacientů po transplantaci. V dlouhodobém pohledu monitorujeme MRD v populacích buněk CD34+ a CD34- kostní dřeně pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML). Stanovujeme chimerismus v základních typech buněk periferní krve leukemických pacientů po transplantaci. U pacientů s B - chronickou lymfatickou leukémií (B-CLL) separujeme nádorovou populaci buněk definovanou jako CD 5+19+45+ s cílem stanovit mutační status genu pro IgV<sub>H</sub>, který je důležitým prognostickým faktorem tohoto onemocnění.

Všechny tyto projekty využívající FACS sledují cíl, kterým je vysoce specializovaná hematatoonkologická diagnostika, která by umožnila lékařům rychleji a účinněji reagovat na stav hematatoonkologického onemocnění.

#### **Literatura:**

1. Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005 Nov; 56(2):283-309.
2. Khan F, Agarwal A, Agrawal S.: Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant.* 2004 Jul;34(1):1-12.
3. Bouley J, Deriano L, Delic J, Merle-Beral H.: New molecular markers in resistant B-CLL. *Leuk Lymphoma.* 2006 May;47(5):791-801. Review.

## MOLEKULOVO-BIOLOGICKÉ METÓDY POUŽÍVANÉ V MONITOROVANÍ LIEČBY CHRONICKEJ MYELOIDNEJ LEUKÉMIE.

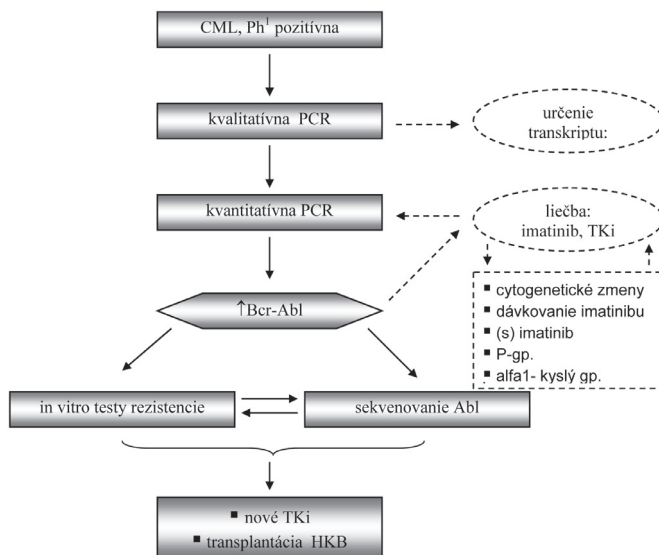
P. Rohoň<sup>1</sup>, E. Faber<sup>1</sup>, J. Nauková<sup>2</sup>, Š. Rožmanová<sup>1</sup>, R. Solná<sup>2</sup>, M. Jarošová<sup>1</sup>,  
V. Divoký<sup>2</sup>, K. Indrák<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Hemato-onkologická klinika FN Olomouc a LF UP v Olomouci*

<sup>2</sup>*Ústav biológie LF UP v Olomouci*

Chronická myeloidná leukémia (CML) je myeloproliferatívnym ochorením charakterizovaným prítomnosťou Ph<sup>1</sup> chromozómu, ktorý vzniká recipročnou translokáciou t(9;22) (q34;q11). Dôsledkom tejto cytogenetickej zmeny je vznik fúzneho génu Bcr/Abl. Ten kóduje chimérický proteín s konštitutívne zvýšenou tyrozinínázovou aktivitou. Jeho podiel na patogenéze CML a výslednom leukemickom fenotype buniek je v súčasnosti považovaný za kľúčový. Zásadný prielom v liečbe CML znamenalo zavedenie imatinibu. Liek účinkuje pomocou interakcie s proteínom Bcr/Abl (p210) v mieste väzby ATP, pričom stabilizuje celý proteín, pozastavuje autofosforyláciu tyrozinových zvyškov, čo napokon vedie k zablokovaniu fosforylácie proteínov signálnych dráh podieľajúcich sa na leukemickom fenotype bunky. Pre sledovanie odpovede na liečbu má kľúčový význam metóda kvantitatívnej RT-PCR, ktorá ako jedna z najcitlivejších dostupných metód umožňuje posudzovať množstvo prítomného transkriptu Bcr/Abl. Dynamika zmien v hladinách fúzneho génu Bcr/Abl odzrkadľuje stav choroby a veľmi presne určuje obdobie vzniku rezistencie k liečbe. V prípade podozrenia z vzniku rezistencie je iniciované vyšetrovanie, ktoré smeruje k odhaľovaniu jej príčin. Je to predovšetkým skrining na mutácie v ABL kinázovej doméne, detekcia fosforylačného stavu proteínu CRKL a ďalšie testy, napríklad expresný profil génu WT1 (Wilmsov tumor). V neposlednom rade sem patrí aj stanovenie prídavných cytogenetických zmien (napr. duplikácie Ph<sup>1</sup> chromozómu), ktoré sa môžu objaviť počas liečby. Cieľom prednášky je navrhnúť postup, ktorý by mal byť používaný u pacientov so vznikom molekulovej rezistencie k liečbe.

**Kľúčové slová:** Bcr/Abl fúzny gén, CRKL proteín, WT1 gén, kvantitatívna RT-PCR, inhibitory tyrozinových kináz, rezistencia k imatinibu



P-gp. – glykoproteín P, TKi – inhibítory tyrozínových kináz, HKB – hemopoetické kmeňové bunky

*Práca bola podporená grantami: NR 7870-03 a MSM 6198959205*



## POROVNÁNÍ STANDARDNÍCH PROGNOTICKÝCH FAKTORŮ U PACIENTŮ STUDIE CMG 2002 S DELECÍ 13Q14 STANOVENOU MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÝMI METODAMI

J. Smejkalová<sup>1</sup>, P. Kuglík<sup>2</sup>, H. Filková<sup>3</sup>, A. Oltová<sup>3</sup>, Z. Adam<sup>4</sup>, L. Pour<sup>4</sup>, M. Krejčí<sup>4</sup>,  
M. Penka<sup>1</sup>, R. Hájek<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické  
hematologie, FN Brno

<sup>2</sup>Katedra genetiky a molekulární biologie, PŘF MU

<sup>3</sup>Oddělení lékařské genetiky, FN Brno

<sup>4</sup>Interní hematologická klinika, FN Brno

**Úvod.** Cytogenetické změny u mnohočetného myelomu (MM) představují dominantní, na ostatních prognostických faktorech nezávislý ukazatel prognózy (Tricot 1997, Fonseca 2004, (Avet-Loiseau 2004).

**Cíle.** Stanovit korelace mezi změnami chromosomu 13 (detekce molekulárně cytogenetickými metodami) a prognostickými faktory u vybraných pacientů studie CMG 2002 při různých cut off level (9%, 20% a 80%) metody I-FISH.

**Metody.** K detekci maligních plazmatických buněk kostní dřene byla použita metoda interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH) a metoda cytoplazmatického imunoglobulinového značení v kombinaci s detekcí delece oblasti 13q14 pomocí interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace [cIg-FISH] (Ahmann 1998). Bylo vyšetřeno 65 nově diagnostikovaných pacientů s MM, medián sledování byl 22 měsíců (rozpětí 1,4–44,6 měsíců).

**Výsledky.** Aberace chromosomu 13 byla nalezena při cut off level 9% a 20% u 40% (26/65) pacientů a při cut off level 80% u 21,5% (14/65). V souboru pacientů jsme hledali korelace s prognostickými faktory (MIG, LDH,  $\beta_2$ M, Hb, PLT, albumin), celkovou dobou přežití (OS) a dobou od transplantace do relapsu (EFS) s delecí 13q14 stanovenou metodou I-FISH na plně kostní dřeni a metodou cIg-FISH. Při hodnotě cut off level 9% a 20% jsme zjistili vyšší hodnoty MIG v séru a nižší hodnoty albuminu a PLT než pacienti bez změny chromosomu 13. Podobně tomu bylo při použití cut off level 80%. Ani u prognosticky nepříznivé skupiny nemocných s mediánem doby do relapsu kratším než 1 rok se zatím nepodařilo prokázat zásadní prognostických význam aberace chromosomu 13.

**Závěr.** U prognosticky nepříznivé skupiny 65 nemocných s mediánem doby do relapsu kratším než 1 rok se zatím nepodařilo prokázat zásadní prognostických význam aberace chromosomu 13. Lze říct, že tato aberace je spíše odrazem délky trvání onemocnění než odrazem agresivity MM. Tato analýza bude provedena pro všechna centra CMG 2002.

### Literatura:

1. Ahmann GJ, Jalal SM, Juneau AL, Christensen ER, Hanson CA, Dewald GW, Greipp PR.: A novel three-color, clone-specific fluorescence *in situ* hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998 Feb;101(1):7-11.
2. Avet-Loiseau H. Genetics of multiple myeloma. *Hematology.* 2004;1:206-210.

3. *Fonseca R. Multiple Myeloma: Cytogenetics, FISH, and beyond (Abstract). Lymphoma & Myeloma. 2004; 11.*
4. *Tricot G, Sawyer JR, Jagannath S, et al: Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplant. J Clin Oncol. 1997;15:2659-2666.*

*Podporováno grantem IGA NR 8945-4 a Českou Myelomovou skupinou.*

### **STANOVENÍ FREKVENCE POLYMORFISMU -1639 G>A V GENU VKORC1 V POPULACI ČR METODOU REAL-TIME PCR**

R. Richterová<sup>1</sup>, P. Riedlová<sup>1</sup>, A. Bóday<sup>1</sup>, P. Kessler<sup>2</sup>, H. Poul<sup>2</sup>, J. Gumulec<sup>1</sup>, M. Radina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Onkologické centrum J.G.Mendela, Nový Jičín*

<sup>2</sup> *Odd. hematologie a transfuziologie, Nemocnice Pelhřimov*

Genu VKORC1 se podle současných poznatků ve farmakogenetice připisuje velká pozornost v souvislosti s odbouráváním antikoagulačního léčiva warfarinu. Gen VKORC1 je lokalizován na chromozomu 16p12-q21, má tři exony a kóduje podjednotku 1 transmembránového proteinu - vitamin K epoxid reduktázového komplexu, o velikosti 163 aminokyselin. Komplex VKOR recykluje vitamin K 2,3-epoxid na vitamin K hydrochinon, který je esenciálním kofaktorem posttranslační  $\gamma$ -karboxylace mnoha koagulačních faktorů (FII, FVII, FIX, FX ad.). Do dnešní doby byly zjištěny dva časté polymorfismy v genu VKORC1, 1173 C>T lokalizovaný v prvním intronu a -1639 G>A v promotorové oblasti. U těchto dvou polymorfismů však byla prokázána těsná vazba, a proto je zcela dostačující detekce jedné mutace, v tomto případě mutace -1639 G>A. Výsledky studií publikované v odborné literatuře poukazují na to, že pacientům s 1639 GA genotypem hrozí 2,3 krát a pacientům s 1639 AA genotypem 10,5 krát vyšší riziko předávkování warfarinem.

Cílem této pilotní studie bylo stanovit genotypovou a alelovou frekvenci polymorfismu -1639 G>A v naší populaci. Vzorky DNA byly izolovány z leukocytů periferní krve. Molekulárně genetická analýza byla zpočátku postavena na PCR-RFLP. Tato metoda je časově náročná a z toho důvodu byla zavedena metoda real-time PCR na přístroji Realplex.

Celkem bylo vyšetřeno 474 pacientů (948 alel). V souboru bylo zastoupeno 184 GG homozygotů (frekvence 0,388), 225 GA heterozygotů (frekvence 0,475) a 65 AA homozygotů (frekvence 0,137). Z uvedených údajů plyne, že frekvence alely G v populaci je 0,625 a alely A je 0,375. Vypočítaná frekvence genotypu GG je 0,3906, GA je 0,4688 a AA je 0,1406.

Výsledky zjištěné na našem pracovišti se shodují s literárními údaji, které se týkají indoevropské populace. Vzhledem k polygenní dědičnosti se na katabolismu warfarinu podílí také řada dalších enzymů (např. Cyp2C9), jejichž genotypy mohou různým způsobem ovlivnit finální úspěšnost tohoto procesu.

## AUTOMATIZACE V IMUNOHEMATOLOGICKÉ LABORATOŘI

M. Bohoněk, D. Horčíčková

*Ústřední vojenská nemocnice Praha, Oddělení hematologie, biochemie a krevní transfúze*

Hodnocení výsledků imunohematologických reakcí založených na posuzování míry aglutinace erytrocytů se vždy vyznačovala vyšší mírou přidané hodnoty zkušeností laboratorního pracovníka a pokud byla imunohematologická vyšetření založená na zkumavkových a sklíčkových metodikách, byly možnosti jejich automatizace omezené. Určitý pokrok přinesly aglutinace prováděné v jamkách mikrotitračních destiček, dramatický zlom ale představovalo uvedení kompaktních metodik systému pevné fáze a metodik gelových v 90. letech minulého století. Přesto trvalo více než desetiletí, aby se různé poloautomatické systémy, které představovaly samostatné a nepropojené poloautomaty pipetování, centrifugy a vyhodnocovače, vyvinuly v systémy plně automatické, typu „walk away“, jak je již dávno zvykem v klinické biochemii a hematologii. V současné době jsou ze stále omezené nabídky na trhu k dispozici automaty založené na zpracování diagnostických metodik systému pevné fáze f.ImmucorGamma (Galileo) a automaty zpracovávající karty gelové aglutinace f.Grifols (WaDiana), DiaMed (ID-GelStation, TechnoTwinStation), Ortho (AutoVue). Autoři hodnotí výhody a nevýhody jednotlivých systémů a prezentují vlastní 2 leté zkušenosti s plně automatizovaným provozem laboratoře krevního skladu i laboratoře dárců krve založených na provozu 2 automatů Galileo. Plně automatizovaný systém imunohematologické laboratoře krevního skladu na OHBKT ÚVN Praha mj. umožnil bezpečně zavedení elektronického testu kompatibility, který v současné době je na jako jediném pracovišti v ČR prováděn v cca 85% všech požadavků na provedení testu. Kombinace plně automatizace a elektronického křížení kromě zvýšení bezpečnosti vydávaných výsledků umožnila i 20% úsporu pracovních sil.

## VISKOZITA KRVE, KREVŇÍ PLAZMY A SÉRA – NOVÉ POZNATKY, MOŽNOSTI VYUŽITÍ A STANOVENÍ V KLINICKÉ PRAXI.

F. Vrbáčký, I. Fátorová, M. Pecka, M. Bláha, J. Malý

*II. interní klinika – Oddělení kliniké hematologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta UK v Hradci Králové*

Nejčastější příčinou úmrtí v průmyslově vyspělých zemích se v posledních desetiletích staly kardiovaskulární choroby. Hlavní přístup k jejich studiu se soustředil na biochemické změny v krvi a cévní stěně, jejich histologii, koagulační faktory a krevní destičky. Příčina řady cévních chorob, hlavně aterosklerózy, však zůstávala dlouhou dobu nejasná. Přesnější měření reologických parametrů ne-newtonovských kapalin způsobené technickým vývojem umožnilo také vývoj měření viskozity krve a dalších tělních tekutin. Díky tomuto vývoji se také začal intenzivněji studovat vliv viskozity krve a krevní plazmy na oběhovou soustavu a další tkáně (1, 2). Práce posledních let podporují teorii, že zvýšená viskozita

krve zvyšuje riziko řady onemocnění a její studium by mohlo významně přispět k jejich prevenci a léčbě (2).

V hematologické laboratoři II. interní kliniky - OKH Fakultní nemocnice Hradec Králové používáme k měření viskozity krve, krevní plazmy a séra rotační viskozimetr Brookfield DV-II+Pro. Toto zařízení pracuje na principu měření odporu, který klade vzorek vložený mezi otáčející se disk a pevnou plochu. Tento princip měření umožňuje, na rozdíl od starších typů viskozimetrů, měření neprůhledných kapalin (jako je krev) a přesnější charakteristiku ne-newtonovských kapalin pomocí křivek závislosti viskozity na hodnotě smykového poměru, jehož hodnota se v krevním řečišti pacienta také mění. Výsledek získaný aplikací Cassonova matematického modelu (3) na získaná data tak zahrnuje viskozitu při parametrech odpovídajících nejen prostředí velkých cév, ale i kapilár a míst nejčastějšího výskytu aterosklerotických plátů, kde se vysoká viskozita krevní plazmy a krve projevuje na zdravotním stavu pacienta nejvýrazněji. Kromě stanovení viskozity krve, krevní plazmy a séra u pacientů s poruchami metabolismu lipoproteinů lze použít toto vyšetření i u řady jiných onemocnění, mezi která patří např. hyperviskozitní syndromy, jako je mnohočetný myelom či Waldenströмова makroglobulinémie (4).

#### **Literatura:**

1. Kensey, K.R.: The mechanistic relationships between hemorheological characteristics and cardiovascular disease. *Cur Med Res Opin* 2003, **19**(7), 587-96
2. Klingel, R., Fassbender, et al.: Reopheresis: rheologic, functional, and structural aspects. *Ther Apher* 2000, **4**(5), 348-57
3. Das, B. and Batra, R.L.: Non-Newtonian flow of Blood in an Arteriosclerotic Blood Vessel with Rigid Permeable Walls. *J Theor Biol* 1995, **175**(1), 1-11
4. Reinhart, W.H., Lutolf, O., et al.: Plasmapheresis for hyperviscosity syndrome in macroglobulinemia Waldenstrom and multiple myeloma: influence on blood rheology and the microcirculation. *J Lab Clin Med* 1992, **119**(1), 69-76

*Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.*

## **TEST KRYOHEMOLÝZY – DIAGNOSTICKÝ NÁSTROJ U HEREDITÁRNÍ SFÉROCYTÓZY**

Š. Rožmanová<sup>1</sup>, M. Divoká<sup>1</sup>, D. Pospíšilová<sup>2</sup>, Z. Novák<sup>2</sup>, M. Jarošová<sup>1</sup>, V. Divoký<sup>3</sup>,  
K. Indrák<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc

<sup>2</sup> Dětská klinika FN a LF UP Olomouc

<sup>3</sup> Ústav lékařské biologie LF UP Olomouc

Hereditární sférocytóza (HS) je nejčastější příčinou vrozené hemolytické anémie. V laboratorní diagnostice patří k nejdůležitějším skriningovým nálezům pro potvrzení diagnózy HS nález sférocytů v nátěru periferní krve, zvýšený počet retikulocytů, možná přítomnost anémie a zvýšené hodnoty nepřímého bilirubinu. Pro diferenciální diagnostiku jsou ovšem nutné specifické laboratorní testy. Nejrozšířenější testy k potvrzení sférocytózy

jsou vyšetření osmotické rezistence, Pink test a test autohemolýzy. Tyto testy jsou ovšem časově náročné a často neposkytují jednoznačné výsledky.

Na HOK FN Olomouc používáme od roku 2003 k diagnostice HS test kryohemolýzy. Hypertonická kryohemolýza je definována jako lýza erytrocytů v hypertonickém prostředí, ke které dochází při teplotní změně z 37°C na 0-4°C. Bylo popsáno, že erytrocyty HS jsou v těchto podmínkách signifikantně fragilnější než normální buňky (Streichman, Am J Hematol 1998).

Cílem práce je popis metodiky a prezentace výsledků, které byly získány při diferenční diagnostice anémií pacientů Dětské kliniky a Hemato-onkologické kliniky FNO, kteří přicházeli s obrazem hemolytické nebo nehemolytické anémie. Soubor obsahuje 51 pacientů, u kterých bylo provedeno celkově 67 vyšetření. Výsledky testu kryohemolýzy a následná diagnostika rozdělily soubor na 2 skupiny. V první skupině 23 nemocných, u kterých výsledky svědčily pro dg. HS, byla ve 34 odběrech zjištěna významně vyšší hodnota kryohemolýzy (medián 25%, rozmezí 10-50%). Tito pacienti jsou dále i v souladu s ostatními laboratorními a klinickými nálezy dispenzarizováni s diagnózou hereditární sférocytózy. Naproti tomu, u 28 pacientů v druhém souboru byl ve 33 vyšetřeních zjištěn medián kryohemolýzy pouze 3% (rozmezí 1-18%). Tyto výsledky dg. HS neprokázaly a nemocní jsou dále sledováni pro jiné hemolytické a nehemolytické anémie.

Naše výsledky potvrzují senzitivitu a specifitu testu kryohemolýzy pro diagnózu hereditární sférocytózy. Tento test je časově nenáročný a potřeba malého množství vzorku jej činí dostupný i pro pediatrické pacienty, včetně novorozenců.

#### Literatura:

1. *Streichman S, Gescheidt Y: Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: Correlation studies with osmotic fragility and autoheolysis. Am J Hematol 58:206-212, 1998.*
2. *Iglauer A, Reinhardt D., Schroter W., Pekrun A.: Cryohemolysis test as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. Ann Hematol 78:555-557, 1999.*

### N6-BENZYLADENINE POTENTIATES CYTOTOXIC EFFECT OF OTHER BASES BY INDUCTION OF INCREASED ACTIVITY OF APRT ENZYME

I. Frydrych, P. Mlejnek

*Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Palacky University,  
Hnevotinska 3, Olomouc 77515, Czech Republic, E-mail: fridex@centrum.cz*

**Abstract** The synthesis of nucleotides from the purine bases is known as the salvage pathway. Adenine phosphoribosyltransferase (APRT, EC 2.4.2.7) catalyzes the synthesis of adenosine 5'-monophosphate (AMP) from adenine and 5'-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. APRT is ubiquitously distributed in all human cells and provides the only mechanism by which free adenine can be converted to the nucleotide (Simmonds et al., 1995). Recent studies indicated possible involvement of APRT in cytotoxic effects of N6-sub-

stituted derivatives of adenine (cytokinins) in plants (Mlejnek et al., 2004). Not surprisingly, a similar role of APRT in the activation of N6-substituted derivatives of adenine was suggested also in mammalian cells (Mlejnek and Dolezel, 2005). Indeed, metabolism of purines is largely shared between plants and animals (e.g., Prinsen et al., 1997). However, formation of corresponding monophosphates from N6-substituted derivatives of adenine, as well as, their ability to induce apoptosis is much lower in mammalian cells than in plants (Mlejnek and Dolezel, 2005).

We observed that nontoxic concentrations of N6-benzyladenine potentiated cytotoxic effect of other bases with pyrazole pyrimidine ring, which mimics purine ring, such as 4-aminopyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (4-APP). This effect could be explained by the finding that low concentrations of N6-benzyladenine induced increased enzymatic activity of APRT. RT-PCR analysis revealed that elevated activity of APRT enzyme was probably due to increased expression of *APRT* mRNA. The properties of N6-benzyladenine could be of potential therapeutic value for treatment of APRT deficiency.

#### References:

1. Simmonds, H.A., Sahota, A., and Van Acker, K.J., 1995. *APRT deficiency: 2,8-dihydroxyadenine lithiasis*. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (tth ed.), edited by Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., and Fredrickson, D.G., New York: McGraw-Hill.
2. Mlejnek, P., Dolezel, P., and Prochazka, S., 2004. *Intracellular conversion of cytokinin bases into corresponding mononucleotides is related to cell death induction in tobacco BY-2 cells*. *Plant Science* **168** (2), 389-395.
3. Mlejnek, P., and Dolezel, P., 2005. *Apoptosis induced by N6-substituted derivatives of adenosine is related to intracellular accumulation of corresponding mononucleotides in HL-60 cells*. *Toxicology in Vitro* **19**(7), 985-990.
4. Prinsen, E., Kamínek, M., and Van Onckelen, H.A., 1997. *Cytokinin biosynthesis: a black box? Growth Regul.* **23**, 3-15.

**Acknowledgement** This work was supported by grant #MSM 6198959216 and in part by the Czech Grant agency, grant GA301/04/1239

## MYELOYDYSPLASTICKÉ SYNDRÓMY A NADBYTOK ŽELEZA.

M. Nosál

*Hematologická ambulancia FNŠP- Nemocnica Staré Mesto, Bratislava, SK*

Transfúzie erytrocytov je základnou liečbou u pacientov s MDS. Klinické účinky nadbytku železa spôsobené transfúziami u pacientov s MDS sú limitované. Následky a liečba nadbytku železa sú dobre známe u pacientov s talazémiou s hereditárnou hemochromatózou (HH). Klinické skúsenosti u týchto pacientov sa môžu vzťahovať na MDS. Zatiaľčo pacienti s MDS sú starší, nemusia byť vystavení nadbytku železa tak dlho ako pacienti s talazémiou a HH. Vek a komorbidity u pacientov s MDS ich môžu robiť viac vnímavými na nežiaduce účinky nadbytku železa. Na elimináciu železa z organizmu sa dlhšiu dobu používa infúzna chelačná liečba DFO (Desferal), ktorá má však svoje obmedzenia. Novšie je použitie orálneho chelátora deferasirox (Exjade, ICL 670), od tejto liečby sa očakáva zlepšenie tak kvality života, ako aj prežívanie pacientov s MDS.

### Literatúra:

1. Abdulhaq H., Rossetti J.M., Shaddock R.K.: *The myelodysplastic syndromes. Oncol. Special.ED, 2006;9:97-101.*
2. VanOrden H.E., Hegemann T.M.: *Deferasirox-an oral agent for chronic overload. Ann Pharmacother.2006;40.*
3. Greenberg P.L., Baer M.R., Bennet J.M. et al. *Myelodysplastic syndromes clinical practice guidelines in oncology. J Natl Compr Canc Netw.2006;4:58-77.*

## GENERACE TROMBINU - KDE JE UŽITEČNÉ JEJ MĚŘIT A JAK

I. Hrachovinová, M. Hladíková, J. Prellová, P. Salaj

*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

Laboratorní analýza koagulace představuje jednotlivé testy sledující určité části koagulační kaskády. Z klinického hlediska by bylo užitečné mít jednoduché testy, které stanoví fenotyp pacienta a které by korelovaly s hyperkoagulačním nebo krvácivým stavem pacienta. Testy, které by dokázaly by monitorovat účinek substituční léčby bez ohledu na druh. Ať je to podávání koncentráту FVIII nebo bypassová aktivita FEIBA a rFVIIa, případně podávání heparinů nebo přímých inhibitorů trombinu.

Trombin generační test (TGT), jak jej poprvé popsal Hemker (2000), je první test, který se přibližuje *in vivo* podmínkám. Je možné podle něj hodnotit důsledky poruch nebo ovlivnění hemostázy. Není plně univerzální, protože testovaným vzorkem je patientská plazma. Do reakce se přidávají různé koncentrace tkáňového faktoru (TF) a fosfolipidů podle toho, zda se monitoruje hyper či hypokoagulační stav, případně podle toho jaká situace *in vivo* se napodobuje. Při generaci trombinu odpovídajícímu normálnímu stavu bez zranění a aktivovaných destiček se do reakce přidává pouze nízká koncentrace fosfolipidů,

přidání nízké koncentrace TF a fosfolipidů odpovídá drobnému poškození cév, vysoká koncentrace TF a fosfolipidů odpovídá situaci poškození buněk a aktivaci destiček. Při monitorování antikoagulační terapie se používá vysoká koncentrace fosfolipidů i TF, při sledování hyperkoagulačních stavů a terapie rFVIIa se používá nízká koncentrace fosfolipidů a vysoká TF a pro monitorování léčby FEIBA nízká koncentrace fosfolipidů i TF. K standardizaci měření TGT přispěla dostupnost komerčních kitů. Na trhu jsou tři výrobky, které se liší způsobem vyhodnocení měřených veličin. Jsou to: kalibrovaná automatizovaná trombinografie (CAT), Technothrombin (Technoclone), ETP(Dade Behring).

K tomu, aby TGT mohl být rutinně používán, je nutné, aby byly porovnány a vyhodnoceny výsledky generace trombinu u různých klinických stavů (hodnoty pacientů a normální populace). Výsledkem prospektivní studie by mělo být například stanovení rizika trombózy na základě výsledků TGT. Zatím byla provedena studie vlivu OA na zvýšení generace trombinu a vliv trvalého zvýšení generace trombinu na rekurenci TEN. TGT je již hojně používán při bypasové léčbě hemofiliků. Test citlivě monitoruje pozitivní změny generace trombinu. Bude ale nutno širší korelace pro stanovení krvácivého rizika pacienta, zvláště u získaných stavů koagulopatie.

#### Literatura:

1. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Beguin S. *The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. Thromb Haemost.* 2000; 83(4):589-91.
2. Baglin T. *The measurement and application of thrombin generation. Br J Haematol.* 2005; 130(5):653-61.
3. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. *Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. JAMA.* 2006; 296(4): 397-402.

## SOUČASNÉ VYŠETŘENÍ POLYMORFISMŮ CYP4502C9 A VKORC1 U PACIENTŮ LÉČENÝCH WARFARINEM.

P. Kessler<sup>1</sup>, R. Richterová<sup>2</sup>, P. Riedlová<sup>2</sup>, H. Poul<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Odd. hematologie a transfuziologie Nemocnice Pelhřimov

<sup>2</sup> P+R LAB, Laboratoř molekulární biologie, Nový Jičín

**Úvod:** Interindividuální variabilita velikosti dávky warfarinu, nutné k dosažení terapeutického rozmezí INR je podmíněna řadou faktorů. Mezi nejvýznamnější z nich se v posledních letech zařadily polymorfismy některých genů, především cytochromu P450 2C9, ovlivňující rychlost biotransformace warfarinu a VKORC1, ovlivňující cílový enzym – epoxidreduktázu.

**Cíl studie:** Zjistit vliv polymorfismů CyP4502C9 a VKORC1 na dávku warfarinu potřebnou k udržení cílového INR a vzájemnou interakci jejich působení.



**Soubor a metodika:** Bylo vyšetřeno 307 pacientů (178 mužů, 129 žen) ve věku 18-93 let, léčených warfarinem s cílovým rozmezím INR 2,0-3,5. Průměrná doba antikoagulační léčby byla 3,98 roku, celkově bylo vyhodnoceno 1223 pac/let. Byly vyšetřeny polymorfismy genů CyP4502C9 \*2 a \*3 a genu VKORC1 1639G>A. Rozdíly v dávkování warfarinu mezi jednotlivými skupinami byly hodnoceny T-testem.

**Výsledky:** U 203(66,1%) pacientů byl prokázán „wild typ“ (\*1) cytochromu P4502C9, u 45 (14,7%) pacientů byl zjištěn typ \*2 v heterozygotní formě, u 44(14,3%) typ \*3 v heterozygotní formě, u 15(4,9%) byla zjištěna smíšená heterozygotní forma \*2\*3 nebo homozygotní forma \*2\*2 nebo \*3\*3. U 130(42,4%) pacientů byl zjištěn genotyp VKORC1 GG, u 137(44,6%) genotyp GA a u 40 (13%) genotyp AA.

Průměrná denní dávka warfarinu byla u nosičů polymorfismu CyP4502C9 genotypů \*1\*1,\*1\*2,\*1\*3, \*x\*x(tedy společně \*2\*2,\*3\*3,\*2\*3) 4,56 mg, 3,72 mg, 3,08 mg, 1,91 mg. Rozdíly mezi všemi skupinami navzájem byly statisticky významné (\*1\*1/\*1\*2: P=0,001, \*1\*1/\*1\*3: P<0,0001, \*1\*1/\*x\*x: P<0,0001, \*1\*2/\*1\*3: P=0,025)

Průměrná denní dávka warfarinu u nosičů polymorfismu VKORC1 genotypů GG,GA,AA byla 4,85 mg, 3,78 mg a 2,71 mg. Rozdíly mezi skupinami navzájem byly statisticky významné (GG/GA: P<0,0001, GG/AA: P<0,0001, GA/AA: P<0,0001).

U nosičů aspoň 1 alely A genu VKORC 1 byla hodnocena dávka warfarinu v závislosti na celkovém počtu mutací obou genů (VKORC1 a CyP4502C9). U nosičů 1 mutace byla průměrná dávka warfarinu 4,14 mg, medián 4,09 mg, u nosičů 2 mutací průměrná dávka 3,36 mg, medián 2,92, u nosičů 3 mutací průměrná dávka 2,08 mg, medián 1,75 mg, u nosičů 4 mutací průměrná dávka 1,53 mg, medián 1,54 mg. Rozdíly byly statisticky významné - mezi nosiči 1 a 2 mutací P=0,001, mezi nosiči 1 a 3 mutací P<0,0001, mezi nosiči 2 a 3 mutací P=0,0002. U nosičů 2 a více mutací (N=62) bylo 40 pacientů s dávkou nižší než 3 mg a 15 pacientů s dávkou nižší než 2 mg.

**Závěr:** Efekt polymorfismů CyP4502C9 a VKORC1 na velikost denní dávky warfarinu potřebné k udržení terapeutického rozmezí se navzájem potencuje. 20% populace patří k vysoce rizikové skupině nosičů polymorfismu VKORC1 AA nebo současně genotypu VKORC1 GA a současně aspoň 1 mutace CyP450 2C9 – v této skupině 64,5% pacientů potřebuje udržovací dávku warfarinu nižší než 3 mg/den a 24% dokonce dávku nižší než 2 mg/den. Tito pacienti jsou ve vysokém riziku předávkování, zejména v úvodu léčby.

#### Literatura:

1. Aquilante CL, Langae TY, Lopez LM, et al.: Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clin Pharmacol Ther* 2006 Apr;79(4):291-302.
2. D'Andrea G, D'ambrosio RL, Di Perna P, et al.: A polymorphism in VKORC1 gene is associated with an inter-individual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):645-9.
3. Linder MW, Looney S, Adams JE 3rd, et al.: Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis*. 2002 Dec;14(3):227-32.

## FLOWCYTOMETRICKÁ ANALÝZA ENDOTELIÁLNÍCH A TROMBOCYTÁRNÍCH MIKROPARTIKULÍ – PRVNÍ ZKUŠENOSTI SE ZAVÁDĚNÍM METODIKY

L. Kovářová, A. Buliková, M. Matýšková, M. Penka

*Oddělení klinické hematologie, FN Brno-PMDV, Jihlavská 20, 625 00 Brno*

**Úvod:** Endoteliální mikropartikule (EMP) jsou malé membránové vezikuly uvolňované z povrchu endoteliálních buněk jako odpověď na aktivaci, poranění či apoptózu. Vznik EMP může být vyvolán řadou cytokinů jako IL-1, TNF či zvýšeným smykovým napětím. Analýza cirkulujících EMP odráží poškození endoteliálních buněk a zvýšené zastoupení EMP nalzáme obecně u stavů spojených s endoteliálním poškozením, např. u trombotické trombocytopenické purpury, u akutních koronárních syndromů a také u pacientů s roztroušenou sklerózou a lupus antikoagulans. Literárně uváděný imunofenotyp EMP: CD31<sup>+</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>CD141<sup>+</sup>CD142<sup>+</sup>CD144<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>.

Destičkové mikropartikule (PMP) vznikají podobně jako EMP tvorbou a uvolňováním membránových vezikulů. Množství cirkulujících PMP je známkou aktivace destiček. PMP ovlivňují prokoagulační aktivitu a dále působí stimulačně na endoteliální bb, leukocyty, neutrofile, monocyty a další destičky. Jejich počty jsou zvýšeny u několika trombotických stavů – např. akutní infarkt myokardu a mozková ischemie. Zvýšené zastoupení PMP je také nalzáno u stavů charakterizovaných zvýšenou aktivací/poškozením destiček jako idiopatická trombocytopenická purpura, heparinem indukovaná trombocytopenie a systémový lupus erythematosus. Chronické zvýšení počtu PMP nalzáme u cévních demencí. Uváděný imunofenotyp PMP: CD31<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD42b<sup>+</sup>PAC-1<sup>+</sup>CD42a<sup>+</sup>.

**Cíl:** Ověření možnosti flowcytometrické analýzy mikropartikulí EMP a PMP v našich podmínkách. Stanovení normálních hodnot u zdravých dárců a dále nalezení vztahu mezi jejich relativním počtem a sledovanou diagnózou u pacientů.

**Metodika:** Ze vzorků krve (zdravé kontroly a pacienti po informovaném souhlasu) odebraných do citrátu byla trojí centrifugací připravena bezdestičková plazma (platelet-free plasma – PFP), která byla dále flowcytometricky analyzována na přístroji fy Beckman Coulter - Cytomics FC500 v nastavení fluorescencí dle izotypové kontroly. MoAb (CD31, CD41, CD42b, CD61, CD51) byly s PFP inkubovány 15 minut v temnu, poté doplněny PBS a kalibračními částicemi a analyzovány.

**Výsledky:** Vybrané markery v kombinacích CD31/CD42b/CD41 a CD51/CD61/CD41 umožňují rozlišit oba typy partikulí na základě (ne)expresy trombocytárního markeru CD41. Velikost mikropartikulí je  $\leq 1,5\mu\text{m}$  a jejich zastoupení není vysoké, což znesnadňuje získání výsledků zejména z důvodu možné „analýzy“ nečistot v samotném přístroji či použitých roztocích. Tímto příspěvkem bychom rádi informovali o možných problémech a našich prvních výsledcích, přestože soubor prozatím není dostatečný pro statistické zhodnocení.

### Literatura:

1. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, Brunet P, Dignat-George F. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost.* 2006 Mar;4(3):566-73.
2. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension.* 2003 Feb;41(2):211-7

## MOŽNOSTI LÉČBY HEPARINEM INDUKOVANÉ TROMBOCYTOPENIE TYPU II SYNTETICKÝMI PENTASACHARIDY

J. Novotný<sup>1</sup>, P. Smejkal<sup>1</sup>, S. Králová<sup>2</sup>, J. Gumulec<sup>2</sup>, J. Zavřelová<sup>1</sup>, M. Penka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centrum pro trombózu a hemostázu - Oddělení klinické hematologie FN Brno

<sup>2</sup> Centrum pro trombózu a hemostázu – Onkologické centrum JG Mendela, Nový Jičín

Výskyt heparinem indukovaná trombocytopenie II. typu (dále HIT II) je udáván asi u 3% pacientů, léčených nefrakcionovanými hepariny a asi u 0,1% nemocných, léčených nízkomolekulárními hepariny. Jedná se o jednu z nejzávažnějších komplikací heparinové léčby s rizikem rozvoje venózních i arteriálních hyperkoagulací. HIT II je způsobena imunologickou reakcí proti komplexu protein/heparin (nejčastěji destičkový faktor 4/heparin) s následnou aktivací destiček i endotelu a zvýšenou generací trombinu. Diagnostika HIT II je obtížná a spočívá ve vyšetření séra a/nebo plazmy pacienta baterií funkčních (agregace, serotonin release, případně cytoflowmetrie a lumiagregometrie) a sérologických (ELISA, Diamed, PIFA test) testů. Testy mají více konfirmační charakter, jelikož i negativita všech testů HIT II s absolutní jistotou nevylučuje. U pacientů se suspektním HIT II je prvním krokem vysazení heparinů a je nutno zvážit alternativní antitrombotickou léčbu, jelikož generace trombinu pokračuje i řadu hodin po vysazení glykosaminoglykanu. V minulosti byl v léčbě HIT II u řady nemocných úspěšně vyzkoušen nízkomolekulární glykosaminoglykan danaparoid (Orgaran), je zde však zdokumentováno až 10% zkřížených reakcí s hepariny. Orgaran není v současnosti u nás registrován. Velmi úspěšnými léky u HIT II jsou jak nízkomolekulární přímé inhibitory trombinu (argatroban), tak i rekombinantní analoga hirudin (lepidurin - Refludan). Mezi nevýhody Refludanu, který je v ČR v současnosti nejvíce v léčbě HIT II používán, patří nutnost laboratorního monitorování, neexistence specifického antidota, indukce tvorby protilátek proti lepidurinu, možná interference s protrombinovým časem při nastavování pacientů na Warfarin, nízká dostupnost a vysoká cena. Pentasacharidy (PS) jsou synteticky připravené nepřímé inhibitory koagulačního faktoru FXa, které po vazbě na anti-trombin (AT) mnohonásobně urychlují inhibici FXa. Po vytvoření komplexu AT/FXa je PS uvolněn a může aktivovat další molekulu AT. PS se nevážou na destičkový faktor 4 a nebyla pozorována zkřížená reaktivita mezi HIT-protilátkami a PS v séru či plazmě. Naopak bylo prokázáno, že PS mohou blokovat reaktivitu takzvaných hyperimunních HIT-protilátek v testech in vitro. Z hlediska snadného dávkování, pravděpodobně nižšího rizika krvácení, možnosti blokace aktivace destiček in vivo, neinterference s protrombinovým časem, jednoduchého s.c. podání 1x denně bez nutnosti monitorování mohou PS představovat velmi dobrou alternativu v léčbě HIT II. V současnosti byly iniciovány klinické studie užití syntetických PS v léčbě HIT II. Autoři diskutují laboratorní diagnostiku HIT II a uvádějí vlastní zkušenosti s podáním fondaparinuxu (Arixtra) u pacientů s HIT II.

### Literatura:

1. Savi P, Chong BH, Greinacher A et al. Effect of fondaparinux on platelet activation in the presence of heparin-dependent antibodies: a blinded comparative multicenter study with unfractionated heparin. *Blood* 2005, 105: 139-144.
2. Kuo KH, Kovacs MJ: Fondaparinux: a potential new therapy for HIT. *Hematology* 2005, 10: 271-275.
3. Spinler SA. New concepts in HIT: diagnosis and management. *J Thrombos Thrombolys* 2006, 21: 17-21

## VYUŽITÍ ULTRACENTRIFUGACE PRO KOAGULAČNÍ VYŠETŘENÍ

L. Slavík, J. Mališková, M. Sýkorová, J. Ježáková, P. Chalupníková  
*Hemato-onkologická klinika FN OLOMOUC, ČR*

V našem sdělení prezentujeme výsledky srovnání stanovení základních koagulačních parametrů za použití moderních ultracentrifug pro separaci plasmy s klasickým postupem získání plasmy chudé na destičky pomocí centrifugace při 3000 ot./ 10 resp. 15 min.

Pro porovnání jsme vybrali náhodně vzorky 20 pacientů odeslaných k základnímu koagulačnímu vyšetření. Vzorky pacientů jsme separovali klasickým postupem, provedli vyšetření a následně jsme je separovali pomocí ultracentrifugace, kdy byly vzorky centrifugovány po dobu 2 min. při 7200 ot./min. (4440 g) na centrifuze StatSpin 3 resp. 8000 ot./min. (4440 g) na centrifuze StatSpin 2 při poloměru rotorů 7,65 cm resp. 5,15 cm.

Pro kontrolu separace jsme použili měření trombocytů v plasmě pomocí hematologického analyzátoru Sysmex XE 2100, které jsme provedli vždy ihned po každé centrifugaci. Následně jsme stanovovali protrombinový čas a parametry jsme vždy porovnali.

Z výsledků je patrné, že ultracentrifugace se plně vyrovná klasickému postupu separace plasmy a neovlivňuje výsledky jak v normálním tak v patologickém rozmezí. Výhodou použití tohoto postupu je výrazná úspora času při zpracování materiálu.

### Literatura:

1. *Comparison Study Between the StatSpin Express 3 Centrifuge and the Heraus Labofuge 400 Centrifuge* Linda M., company study sponsored Henry Ford Hospital, Detroit, Michigan

## DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA KOAGULOPATIÍ SE ZAMĚŘENÍM NA VYŠETŘENÍ PŘED INVAZIVNÍM VÝKONEM — POHLED DĚTSKÉHO HEMATOLOGA

K. Toušová  
*Klinika dětské onkologie, FN Brno*

Odhad rizika krvácení u jednotlivých pacientů před plánovaným chirurgickým výkonem je přetrvávajícím problémem v klinické praxi. Dochází k nedocení klinických okolností na straně jedné a k přeceňování významu, „skrininkových“ koagulačních testů na straně druhé.

V rámci ČR zatím neexistuje jednotný postup ve vyšetřování hemokoagulace přev in- vazivním výkonem.

De literárních zkušeností jsou za 90% před operací neodhalených koagulopatií zodpovědné trombocytopatie. Ty nejsou odhaleny běžně požadovanou kombinací vyšetření :trombocyty, APTT, PT. Na druhou stranu, z publikovaných souborů pacientů vyplývá, že patologické hodnoty APTT a PT opakovaně selhaly v predikci rizika krvácení u jinak

zdravých pacientů, vyšetřovaných nejčastěji před adenotomií či tonsilektomií. Nejčastější příčinou patologického APTT je přítomný cirkulující antifosfolipid (1,2).

Rozhodující úlohu v předoperačním skríninku hraje anamnéza pacienta. Při použití standardizovaného dotazníku, zaměřeného na odhad rizika koagulopatie, se ukázala negativní i pozitivní prediktivní hodnota anamnézy až 99%. Z takto odhalených koagulopatií bylo 90% získaných či vrozených trombocytopatií a téměř všichni pacienti byli odhaleni pomocí vyšetření PFA-100(3). Na podkladě standardizované anamnézy lze jistě částí pacientů koagulační skrínink „odpustit“ a naopak, u pacientů s pozitivní anamnézou rozšířit obvyklý panel o PFA-100.

Ke zvýšení efektivity vyšetření a minimalizace iatrogenizace pacienta je na místě standardizovat vyšetřovací postup před invazivním výkonem u jinak zdravých osob.

#### **Literatura:**

1. Burk CD., Miller L., Handler SD.: *Preoperative History and Coagulation Screening in Children Undergoing Tonsillectomy. Pediatrics.* 1992, 89(4):691-695
2. Chee YL., Greaves M.: *Role of coagulation testing in predicting bleeding risk. The Hematology Journal.* 2003, 4, 373-378
3. Koscielny J., Ziemer S., Radtke H. et al: *A Practical Concept for Preoperative Identification of Patients with Impaired Primary Hemostasis. Clin Appl Thrombosis/Hemostasis,* 2004, 10(3):195-204

## **RACIONALIZACE LÉČBY LDL-AFERÉZOU POMOCÍ SLEDOVÁNÍ FUNKČNÍCH ZMĚN PRIMÁRNÍ HEMOSTÁZY – MOŽNOSTI VYUŽITÍ ANALYZÁTORU PFA-100 A MODIFIKOVANÝCH VYŠETŘENÍ AGREGACE TROMBOCYTŮ.**

M. Blažek, M. Bláha, V. Mašín, J. Malý, V. Bláha, M. Pecka  
*Univerzita Karlova v Praze – Lékařská fakulta v Hradci Králové,  
Fakultní nemocnice Hradec Králové – II. interní klinika, Oddělení klinické hematologie,  
ČR*

**Úvod :** LDL-aféze je metoda extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu, používaná u pacientů se závažnou hyperlipidemií, která je rezistentní na farmakoterapii a dietní opatření. Familiární hypercholesterolemie (FH) je dominantně dědičná choroba, jejíž podstatou je postižení genu pro LDL-receptor. Zvýšená hladina LDL-částic v krvi nemocného je příčinou akcelerované aterosklerózy a vede k předčasným úmrtím na ischemickou chorobu srdeční. Heterozygotní jedinci mají cca 50 % normálního počtu funkčních LDL-receptorů, hladina LDL-cholesterolu se pohybuje kolem 9-14 mmol/l. Výskyt v naší populaci je 1:500. Nemocní mívají předčasně aterosklerotické změny cév a mohou mít šlachové xantomy, xantelazmata na víčkách a arcus cornea senilis. Terapie zahrnuje dietní a režimová opatření a medikamentózní léčbu. Pouze u 3-5 % nemocných konzervativní terapie selhává. Výskyt homozygotních forem je 1:1000000. Nízké aktivitě jejich reziduálních LDL-receptorů odpovídá i zvýšení hladiny LDL-cholesterolu v plazmě, které

dosahuje mezi 16 až 30 mmol/l. Ischemická choroba srdeční se u těchto jedinců vyskytuje již v dětství a mnozí na ni umírají již kolem 20. roku života. Tito pacienti špatně reagují na konvenční léčbu. Pravidelná extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu je pro tyto nemocné život zachraňující postup. Metabolická efektivita LDL-aférezý koreluje se zpomalením progresu či dokonce s regresí koronární aterosklerózy (1).

LDL-aféреза je metoda náročná medicínsky i ekonomicky a je proto žádoucí hledat ukazatele určující optimální intenzitu i četnost jednotlivých léčebných procedur. Z dlouhodobého hlediska jsou ukazatele jasné (zobrazovací metody), chybí však vhodné markery aktuálního stavu. Naše pracoviště provádí LDL-aférezu jako v současné době jediné v ČR a má během 10 let zkušenosti s cca 1200 procedurami. Během minulých let jsme vyzkoušeli řadu markerů pro optimální řízení terapie, které podle literárních nebo vlastních zkušeností připadaly v úvahu. Oproti literárním údajům (2,3) se ukázaly některé z nich nevhodnými (např. velikost krevních destiček nebo jejich hematokrit), jiné sice vhodnější, ale hůře kvantitativně hodnotitelné nebo obtížněji vyšetřitelné jak po stránce technické, tak ekonomické – např. některé selektiny, MCP-1, endotelin-1 (4) a další. Určení vhodných ukazatelů účinnosti této léčby na dostatečné snížení aktivity aterosklerózy stále zůstává nedořešeným problémem.

V procesu komplikací aterosklerózy hraje významnou roli aktivita primární hemostázy a podle některých prací dochází k normalizaci poměrů aktivovaných trombocytů. Vyšetření funkčních změn krevních destiček před a po léčebné LDL-aférezě je potenciale rychle a přínosně pro zprostředkované sledování aktivity aterogeneze a tedy přínosné k medicínsky i ekonomicky optimálnímu vedení léčby LDL-aférezou. Jako součást analýzy primární hemostázy se může uplatnit vyšetření agregace trombocytů (5). V posledních letech se naděje vkládaly do nových metodik, např. vyšetření komerčním analyzátozem Dade Behring PFA-100, Německo (PFA, platelet function analyse).

**METODIKA:** *Sledovaný soubor* tvoří 9 pacientů s familiární hypercholesterolemií (4 ženy a 5 mužů) ve věku 17-59 let (průměr 46,4 let a medián 55 let). Genetická porucha metabolismu lipidů je v daném souboru zastoupena u dvou nemocných v homozygotní formě, v heterozygotní podobě u sedmi pacientů, z toho jedenkrát se jedná o kombinovanou familiární hyperlipidemii (FCHL). Interval mezi jednotlivými léčebnými LDL-aférezami byl  $17.5 \pm 1.6$  dnů (mean  $\pm$  SD).

Bylo použito *vyšetření analyzátozem Dade Behring PFA-100* (Německo), který umožňuje měřit destičkami zprostředkovanou hemostázu (6,7) z materiálu nesrážlivé, resp. citrátové krve. Metoda napodobuje aktivaci destiček mechanickou zátěží a kolagenem in vivo. Použitá membrána v diagnostickém modulu je potažena kolagenem (COL), tedy proteinem, který se obecně považuje za iniciátor počáteční fyziologické aktivity trombocytů. Dále jsme použili modul s membránou potaženou epinephrinem (EPI) nebo ADP, tedy dalšími fyziologicky významnými agonisty agregace trombocytů. Přítomnost těchto destičkových biochemických induktorů a vysoký stupeň střížných sil indukovaný standardizovaným průtokem krve kapilárou vede k destičkové adhezi, aktivaci a agregaci, tím se postupně vytváří stabilní destičkový trombus v mikroskopickém otvoru diagnostické kapiláry (6,7). Výstupním parametrem je čas potřebný od aktivace primární hemostázy k uzavření diagnostické kapiláry destičkovým trombem, tzv. CT (closure-time), který je ovlivněn stavem destičkových funkcí. To vedlo k hypotéze, že by uvedené vyšetření mohlo být vhodným markerem též ke sledování účinnosti LDL-aférezý. Vyhodnoceno tak bylo

70 vyšetření, z toho bylo 18 párů vyšetření pomocí COL/EPI membrány (kolagen/epinephrin) a 17 párů vyšetření pomocí COL/ADP membrány (kolagen/ADP).

**Vyšetření agregací trombocytů** byla prováděna standardním způsobem na agregometru APACT-4 (Biogenics). V klasické agregometrii vyvolává postupná tvorba agregátu změnu průchodu světla, kterou lze měřit a prezentovat v procentech oproti kalibrační křivce a dále potom interpretovat. Ke sledovaným parametrům patří strmost agregační křivky (tzv. slope, [%/min]) a časové údaje popisující průběh agregací křivky, z nich např. maximální amplituda agregační křivky apod. Předně jsme ve výzkumné sondě provedli standardní spektrum agregací vyšetření, při kterém se destičky stimulují 10  $\mu\text{M}$  ADP, 300  $\mu\text{M}$  epinefrinu, 10  $\mu\text{g/ml}$  kolagenu, 500  $\mu\text{g/ml}$  kyseliny arachidonové a 1500  $\mu\text{g/ml}$  ristocetinu. Jediné změny při standardních testech byly naznačeny po stimulaci ADP. Proto jsme dále vyšetřili modifikované agregace s použitím 3 různých ředění ADP - konkrétně 2,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$  a 0,625  $\mu\text{M}$ . Bylo takto vyhodnoceno 88 agregací vyšetření provedených u 7 léčených nemocných s těžkou FH a to před a po léčebné proceduře LDL-aféřezy.

Shromážděná data byla statisticky vyhodnocena na odborném pracovišti Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové. Použit byl software : Statistica 6.0, StatSoft. Inc., Tulsa (USA).

**VÝSLEDKY:** Při analýze **PFA-100** se ve všech případech po separaci hodnoty CT (closure time) prodloužily, avšak míra prodloužení CT po procedurách nedosáhla statistické významnosti ( $p < 0,14$ ). Nebyly rozdíly mezi homozygoty a heterozygoty. Naše hypotéza byla potvrzena jen v tom, že vyšetření vykazují po LDL-aféřeze známky zlepšení sledovaných parametrů, avšak v našem souboru ne zcela přesvědčivě : rozdíly výsledků před a po LDL-aféřeze jsou statisticky nevýznamné.

V **modifikovaných testech agregace trombocytů** dochází po aféřeze ke zmenšení strmosti agregací křivky a ke snížení maximální amplitudy ( $p < 0,05$ ). Při těchto agregací vyšetřeních jsme zjistili zřetelný pokles agregability trombocytů u homozygotů, kde je hladina LDL cholesterolu nejvyšší a kde je také pokles cholesterolu po léčebném výkonu největší. U pacientů stabilizovaných a také u heterozygotů, již situace tak jasná není. U obou skupin pacientů však zřejmě záleží na velikosti poklesu hladiny cholesterolu po léčebné LDL-aféřeze oproti výchozí hodnotě před procedurou.

**ZÁVĚR:** Procedura LDL-aféřezy u nemocných s FH zlepšuje poměry primární hemostázy. Modifikovaná vyšetření agregace trombocytů by mohla být dalším ukazatelem, vhodným ke sledování aktivity procesu u těchto těžce nemocných. Jde však o relativně technicky a ekonomicky náročná vyšetření.

Vyšetření analyzátozem PFA-100 je v klinické praxi svým provedením potencionálně lépe dostupné, přístroj relativně dokonale napodobuje proces, který se odehrává v mikrořečišti a v jiných indikacích se osvědčil. Podle prvních zkušeností se však zdá vyšetření PFA-100 samostatně nevhodné pro aktuální posouzení optimální intenzity jednotlivých procedur LDL-aféřezy.

Pro správnost interpretace vyhodnocených výsledků je nutno zohlednit i nevelký počet pacientů ve sledovaném souboru. Vzhledem k technické i ekonomické náročnosti dlouhodobé terapie se nepodařilo vytvořit větší soubor nemocných. Jde o největší soubor dlouhodobě sledovaných pacientů v České republice, avšak ani vyspělá zahraniční pracoviště mnohdy nemají obdobné soubory dlouhodobě sledovaných pacientů přesahující počet 10-20.

### **Literatura:**

1. Nishimura S., et al.: *Effects of intensive lipid lowering by low-density lipoprotein apheresis on regression of coronary atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia: Japan LDL-apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study (LCAPS)*. *Atherosclerosis*. 1999, vol. 144, p. 409-417.
2. Brøijersen A., et al.: *Effects of selective LDL-apheresis and pravastatin therapy on platelet function in familial hypercholesterolaemia*. *Eur. J. Clin. Invest.* 1994, vol. 24, p. 488-498.
3. Thompson G.R., et al.: *Plasma exchange in the management of familial hypercholesterolemia*. *Lancet*. 1975, vol. 305, no. 7918, p. 1208-1211.
4. Bláha M., et al.: *Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity*. *Physiol. Res.*, 53, 2004, s. 273 – 278.
5. Bláha M., et al.: *Activity of Thrombocytes as a Marker of Sufficient Intensity of LDL-apheresis in Familial Hypercholesterolaemia*. *Transfus. Apheresis Sci.*, 2004, vol. 30, No. 2: p. 83-87.
6. Vojáček J., et al.: *Arteriální a žilní trombóza*. Praha : Grada, 2004. 276 s.
7. Kvasnička J., et al.: *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. Praha: Grada, 2003. 299 s.

*Práce byla podpořena granty: MZ CR NR / 8505-3; MZ CR NR / 8062-3; NR/9103-4; MZO 00179906; MSM 0021620820.*



**P O S T E R Y**

## DETEKCE MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOCI U CHRONICKÉ B-LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE.

L. Bezdičková<sup>1</sup>, S. Peková<sup>2</sup>, H. Šubrtová<sup>1</sup>, M. Hončíková<sup>1</sup>, T. Kozák<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha*

<sup>2</sup>*Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie, Nemocnice Na Homolce, Praha*

**Úvod:** Reziduální leukemické buňky, které nejsou standardně používanými metodami (cytologie, histologie, konvenční flow cytometrie) zjistitelné, jsou podkladem relapsů chronické B-lymfocytární leukemie (B-CLL). Současné poznatky naznačují, že nepřítomnost minimální reziduální nemoci (MRN) po léčbě je spojena s lepší prognózou.

**Cíl:** Zavést dostatečně citlivé a specifické metody sledování MRN.

**Metody:** Od 10/2004 jsme vyšetřili celkem 39 nemocných s B-CLL pomocí čtyřbarevné průtokové cytometrie a Real-Time kvantitativní PCR. Byla vyšetřována kostní dřeň (KD) a periferní krev (PK) před zahájením léčby, v její polovině a dále optimálně v 3-měsíčních intervalech dle plánovaných klinických kontrol. Pro průtokovou cytometrii bylo inkubováno  $10^6$  leukocytů/zkumavka s 5  $\mu$ l každé monoklonální protilátky (4-barevné značení, FITC/PE/ECD/PE-Cy5.5: 1. CD45/14/19/3, 2. CD20/79b/19/5, 3. CD22/38/19/5, 4. Ig  $\kappa/\lambda$ /CD19/5). Vzorky s Ig  $\kappa/\lambda$  byly nejprve 2x promyty v roztoku PBS. Následně byly vzorky lyzovány v roztoku chloridu amonného, 1x promyty v PBS a měřeny na průtokovém cytometru Epics XL (Beckman Coulter). Bylo analyzováno minimálně 5000 B-lymfocytů, nebo 300 000 událostí celkem (měření ukončeno při splnění jednoho z kritérií). V gate na B-lymfocyty byla pro každou zkumavku identifikována populace odpovídající B-CLL (CD45+, 19+, 5+, 20+/-, 22+/-, 38+/-,  $\kappa$ +/-,  $\lambda$ +/-) a spočítáno % B-CLL buněk z leukocytů. Za populaci buněk bylo považováno minimálně 30 událostí. Pro kvantifikaci klonální přestavby IgV<sub>H</sub> pomocí Real-Time PCR technologie byly pro každého pacienta připraveny klon-specifické primery a kvantifikační klonovaný standard. Cílová IgV<sub>H</sub> přestavba byla PCR- amplifikována na úrovni cDNA přístrojem Rotor-Gene 3000. Ke kvantifikaci jednotlivých klonálních transkriptů IgV<sub>H</sub> byly použity fluorescenčně značené LNA (locked nucleic acids) - modifikované hybridizační sondy. Expresse klonálně - specifického IgV<sub>H</sub> transkriptu byla vztažena k expresi kontrolního genu (ABL).

**Výsledky:** Diluci PK pacienta s B-CLL při diagnóze a PK od zdravé osoby byla ověřena senzitivita průtokové cytometrie  $10^{-4}$ . S použitím LNA-technologie bylo dosaženo senzitivity Real-Time kvantitativní PCR  $10^{-8}$ . Nezaznamenali jsme žádný případ přítomnosti MRN na úrovni průtokové cytometrie při její nepřítomnosti na úrovni PCR. V 1 případě nebylo možné vzhledem k atypickému imunofenotypu sledovat MRN průtokovou cytometrií. U 5 vzorků vyšetřených oběma metodami byla MRN detekována pouze na úrovni Real-Time PCR.

**Závěr:** Byly zavedeny dostatečně senzitivní i specifické metody detekce MRN u B-CLL, které umožňují sledování pacientů v průběhu léčby a po léčbě. Výhodou průtokové cytometrie je její dobrá dostupnost, časová nenáročnost a v porovnání s PCR nižší cena vyšetření. Prezentovaná Real-Time PCR technologie umožňuje s extrémní senzitivitou monitorovat MRN a slouží tak jako referenční metoda. Navíc je využitelná i u pacientů s atypickým imunofenotypem B-CLL buněk.

**Literatura:**

1. Rawstron AC, Kennedy B, Evans PAS et al. *Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. Blood 2001;98(1):29-35.*
2. Pekova S, Saudkova L, Smolej L, Kozak T. *Quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia using LNA-modified fluorescently labeled probes and Real-Time PCR technology. 11th EHA Congress, abstract 0271. Hematologica 2006; 91(s1): 101-102.*

*Podporováno grantem GAUK 64/2005/C.*

## ENDOGLIN - A PROMISING LABORATORY MARKER FOR EVALUATION OF DECREASE IN ATHEROSCLEROSIS ACTIVITY

M. Bláha <sup>1</sup>, M. Cermanová <sup>1</sup>, V. Bláha <sup>1</sup>, P. Karolín <sup>2</sup>, C. Andrys <sup>1</sup>, M. Blažek <sup>1</sup>, J. Malý <sup>1</sup>, L. Smolej <sup>1</sup>, R. Procházková <sup>3</sup>, J. Zajíc, R. Zimová <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Charles University, Faculty of Medicine and the Faculty Hospital, Hradec Kralove, CZ

<sup>2</sup> Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

<sup>3</sup> Transfusion Dpt., Regional Hospital, Liberec, CZ

<sup>4</sup> State Institute for Drug Control, Prague, CZ

**Objectives:** Familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia are genetic disorders that lead to severe cardiovascular complications in young adults. Extracorporeal elimination (EE) is a method of LDL-lowering therapy that is effective in patients with severe familial hyperlipoproteinemia after other forms of therapy have failed. However it has to be repeated relatively frequently and performed regularly for extended periods of time. Moreover, EE is rather time-consuming and may not be tolerated well by some patients.

These reasons led to a search for diagnostic methods that would allow to determine the necessary frequency and intensity of therapy. Such methods should be non-invasive and the results should be readily available after completion of each therapeutic procedure. We speculated that endoglin levels could represent an effective tool for evaluation of treatment efficacy.

**Patients and methods:** We studied 10 patients who received long-term treatment with extracorporeal elimination of LDL-cholesterol. We measured sCD105 levels in the 10 patients immediately before and after two consecutive elimination procedures.

**Results:** Serum sCD105 levels before LDL eliminations were significantly higher in the patients than in the control group. The decrease in sCD105 after both LDL-elimination series was also statistically significant and was not caused by non-specific capture of endoglin in adsorption or filtration columns.

**Conclusion:** We conclude that (i) soluble endoglin levels are increased in patients with severe familial hyperlipidemia and decreases after EE and (ii) endoglin is a useful marker for evaluation of the treatment efficacy (and decrease of atherosclerosis activity) in patients with familial hyperlipoproteinemia treated by extracorporeal LDL-cholesterol elimination.

*Supported by the grants IGA MH CR NR/8505-3, NR/8062-3, NR/9103-4. MZO 00179906, MSM 0021620820.*

## LABORATORY AND CLINICAL RESULTS OF HAEMORHEOPHERETIC PROCEDURES IN OPHTHALMOLOGY

M. Bláha, E. Rencová, V. Bláha, M. Blažek, D. Solichová, J. Malý, V. Řeháček  
*Faculty Hospital and Medical Faculty, Charles University, Hradec Králové, CZ*

### **Objective:**

#### *Definition of haemorheopheresis:*

Hemorheopheresis was specifically designed to treat microcirculatory disorders like the microcirculatory impairment of the macula associated with dry age-related macular degeneration using a rheofilter in combination with an appropriate controlled pump technology. The single procedure simultaneously eliminates an exactly defined spectrum of high-molecular weight rheologically relevant plasma proteins (i.e.  $\alpha$ 2-macroglobulin, fibrinogen, LDL-cholesterol, Lp(a), von Willebrand factor [vWF], IgM, fibronectin, and putatively multimeric vitronectin). This results in the immediate pulsed reduction of plasma viscosity as well whole blood viscosity, which with a series of treatments can lead to sustained microcirculatory recovery, and change significantly the natural course of a chronic disease.

*Age-related macular degeneration (AMD)* is the main cause of blindness in people older than 50 years in developed countries. Presently, there is no other therapy verified by a randomized study than rheopheresis. That is why we developed our modification of haemorheopheresis and applied it to the therapy.

### **Methods and patients:**

The cascade method was used - plasma completely free of cellular elements after high-speed centrifugation on the Cobe-Spectra separator is run through the „second grade“. Evaflex filters 4A (Kuraray) were used. The plasma flow is continuous (1,5 body volume). The filter pore size is such that it sieves quite an amount of LDL cholesterol, lipoprotein(a), fibrinogen,  $\alpha$ -2-macroglobulin and other immunoglobulins, mostly IgM. Other technical details were the same as in other therapeutic apheretic procedures. 6 patients with dry form of age-related macular degeneration were treated (8 procedures in 10 weeks), 5 patients finished the treatment, 1 follows the therapy.

### **Results:**

51 procedures were finished, 1 procedure was interrupted (technical problems with the venous access). Other side effects were not observed. Cholesterol decreases significantly (62%), apo-B, lipoprotein(a) and IgM, too. Rheologic factors: decrease of fibrinogen (61, 7%) and plasma viscosity (15, 3%). Visus on internationally acknowledged EDTRS improved in 2 patients, in all 6 patients AMD did not progress.

### **Conclusions:**

Our preliminary results indicate that rheopheresis corrects ischemia of external retinal layers, allows renewal of retinal pigmental epithelium activity and may even stimulate AMD sensitive stage with soft drusen to prevent reversal to the wet form of AMD and, eventually, initiate soft drusen absorption and reduce the risk of blindness. Our modification of hemorheopheresis is a safe procedure. Even the tolerance of the procedure is acceptable if its duration does not exceed 4 hours.

*Supported by the grant IGA MH CR NR/9118-3, MZO 00179906.*

## TO THE DANGER OF INFECTION TRANSMISSION DURING GRAFT IN STEM CELL TRANSPLANTATION – OUR RESULTS

M. Bláha, P. Měříčka, J. Malý, L. Jebavý, P. Žák, M. Cermanová, S. Filip, M. Blažek,  
R. Malý, V. Řeháček

*Faculty Hospital and Medical Faculty, Charles University, Hradec Králové, CZ*

### **Objectives:**

The problem of safety assurance for cell and tissue transplantation is very urgent. In our work attention is focused on danger of infection transmission by infusion of cryopreserved peripheral blood progenitor cells to the patient and/or cross contamination of stored grafts.

### **Patients and methods:**

The study was performed on a group of 71 patients and 22 donors. No laboratory signs of active infection were found in 15 donors (13 related, 2 unrelated), i.e., in 68.2 % and in 55 patients (77.5 %).

### **Results:**

The active infection from herpes viruses was the most common (in 13 patients and 7 donors) Hepatitis B was found in only one case. The CMV IgG test was the most common marker of previous infection, it was found in 14 donors and 55 patients.

### **Conclusion:**

We can conclude that the rate of clinically unsuspected infections in donors and patients including cases requiring immediate treatment among the patients group is relatively high and fully justifies the practice of prophylactic serological testing in the whole palette of tests according to EBMT and ISHGE in both autologous and allogeneous transplantations of haematopoietic stem cells.

*Supported by the research tasks MZO 00179906, MSM 0021620820.*

## vyšetření počtu PLT z plazmy na hematologických analyzátořech

M. Boudná, J. Hoblová, L. Bourková, S. Vytisková, J. Zavřelová, S. Mičanková,  
H. Fišárková, Z. Veselá, M. Penka  
*Oddělení klinické hematologie FN Brno*

Na hematologických analyzátořech bývá někdy problematické počítání trombocytů v plazmě. Nepřesnosti v počítání jsou dány především nestandardním materiálem plazmou. Přístroje jsou validovány na plnou krev, a zde je také zabezpečena linearita do vysokých počtů PLT ( $2000 \times 10^9/L$ ).

Cílem naší práce bylo porovnat počty PLT v plazmě pro vyšetřování agregací na různých typech analyzátořů s počty PLT z mikroskopického hodnocení v Bürkerově komůřce.

Počítání PLT v plazmě na analyzátořu je vhodné nejprve ověřit mikroskopicky. I přesto, že mikroskopický počet trombocytů není tak přesný (studie uvádí  $CV=7,1\%$ ) jako z analyzátořu ( $CV=2,9\%$ ), tak je v literatuře pro ověřování počtu PLT z plazmy doporučován.

Měřili jsme 19 vzorků PRP ( $111-558 \times 10^9$  PLT /L) na přístrojích: Abbott CD1700, CD3700, CD4000 a Sysmex XE-2100 a pro kontrolu byla použita Bürkerova komůřka. Výsledky z analyzátořů a mikroskopu jsme porovnávali variačním koeficientem (CV). Medián CV pro impedanční analýzu z CD1700 je 8,2% a z CD3700 je 11,4%; pro optickou analýzu z CD4000 je 5,05% a z XE-2100 je 6,8%.

Počítání PLT v plazmě může být ovlivněno principem měření daného hematologického analyzátořu. Nezbytná je také manipulace s takto nestandardním materiálem. Jednoznačně lze předcházet falešně nízkému počtu trombocytů řádným mícháním vzorku. Lze jej také eliminovat ředěním vzorku a to až na hladinu původního počtu PLT v plném vzorku.

Závěrem lze říci, že impedanční analýza má lehce vyšší CV než optická, ale s ohledem na možnou nepřesnost mikroskopického počítání PLT a potřebné rozmezí PLT v PRP ( $250 \pm 50 \times 10^9/L$ ) pro vyšetřování agregací, jsou výsledky porovnatelné a pro vyšetřování agregací vyhovující. Výsledky jsou uspokojivé i ve vztahu k doporučené hodnotě  $CV=15\%$  (WHO 1998) pro přesnost měření PLT na analyzátořech.

### Literatura:

1. J.E.Woodell-May, D.N.Ridderman, M.J. Swift, J. Higgins: *Producing Accurate Platelet Counts for Platelet Rich Plasma: Validation of a Hematology Analyzer and Preparation Techniques for Counting*, *J Craniofac Surg.* 2005 Sep; 16(5): 749-756
2. Smith GA, Nightingale MJ et al, *Platelet Counting using Plasma Platelet concentrate samples*. *Transfusion Medicine* 1992; 201-205

## VÝKLAD K JEDNOTLIVÝM PARAMETRŮM KREVNÍHO OBRAZU Z HEMATOLOGICKÝCH ANALYZÁTORŮ

L. Bourková, M. Matýšková, M. Penka

*Oddělení klinické hematologie FN Brno Bohunice, Česká republika*

Vyšetření krevního obrazu je řazeno mezi základní laboratorní vyšetření, které je nezbytné pro diagnostiku a sledování léčby řady nemocných. Na moderních analyzátořech získáváme výsledky mnoha nových parametrů, které jsme dříve neměli k dispozici. Proto je třeba znát nejen důvody proč toto vyšetření požadovat, ale i okolnosti, které souvisí s vlastním vyšetřováním na hematologických analyzátořech. Dobré povědomí o významu jednotlivých parametrů a jejich řádná interpretace vede ke zlepšení nejen výtěžnosti vyšetření, ale i k jejich řádné indikaci.

K získání co nejvíce informací z daného vyšetření je třeba ze strany kliniky mít ujasněné indikace k vyšetření. Na požadavkový list je nutné uvádět i léčbu, která by mohla mít zásadní vliv na výsledky vyšetření včetně podávání koncentrátů. Ze strany laboratoře je nutné: zohledňovat výsledky předešlých vyšetření, přihlížet k souvisejícím informacím (diagnóza, věk, pohlaví, léčba pacienta) a respektovat preventivní zásady vlastního vyšetření na analyzátořech. K prevenci vedle obecných zásad (znalost principů měření KO na daném analyzátoři, znát linearitu měřených parametrů, nelze hodnotit pouze čísla, respektovat jednotky, respektovat grafické znázorňování výsledků, sledovat hodnoty pozadí pro měřené parametry) patří i určité specifické požadavky (hodnotit výsledky v souvislosti s jednotlivými parametry krevního obrazu, interpretovat interference, interpretovat hlášení přístroje). Příslušné parametry krevního obrazu jsou v prezentaci rozebrány z pohledů: souvislosti s jinými parametry, ovlivňování měření, indikace vyšetření, interpretace výsledků a diferenciální diagnózy. Vlastní vyšetření na hematologických analyzátořech nám dává komplexní náhled na krevní obraz. Jednotlivé výsledky, přímo měřené i vypočítané, spolu úzce souvisí, a proto nelze žádný výsledek vyhodnocovat bez kontextu k ostatním parametrům.

Pochopení souvislostí mezi výsledky krevního obrazu a všech preventivních zásad vede ke správné interpretaci výsledků. Tato problematika je také zpracována v celém znění na CD: Encyklopedie 5 laboratorní medicíny pro klinickou praxi.

### **Literatura:**

1. R. Bratt-Wytton: *Artikl 473, Interpretation of routine blood tests, Nursing Standard, 13,12, 42-48, 1998*



## MUTÁCIA METYLTETRAHYDROFOLÁT REDUKÁZY (MTHFR) C677T, HODNOTA HOMOCYSTEÍNU A RIZIKO VČASNÝCH ABORTOV

M. Dobrotová, J. Ivanková, I. Plameňová  
*KHaT MFN a JLF UK, Martin*

O vzťahu mutácie MTHFR C677T ku vzniku včasných spontánnych abortov sú obmedzené literárne údaje. Etiopatogenéza straty plodu pri tejto poruche stále nie je jednoznačne objasnená.

Autori sledovali častosť výskytu mutácie MTHFR C677T, hodnotu homocysteínu u tehotných žien s anamnézou opakovaných včasných potratov (do 8. týždňa gravidity) = skupina 1, v porovnaní s frekvenciou výskytu mutácie MTHFR C677T v kvantitatívne porovnateľnej skupine tehotných žien s anamnézou opakovaných spontánnych abortov v neskoršom období gravidity (po 8. týždni gravidity) = skupina 2.

V skupine tehotných žien s včasnými potratmi sa zistil štatisticky významne častejší výskyt mutácie MTHFR C677T (u 12% pacientiek homozygotná forma mutácie) ako v 2. skupine žien (častejší výskyt iných vrodených alebo získaných hyperkoagulačných porúch).

Nezistila sa štatisticky významná redukcia hodnoty homocysteínu po aplikácii kyseliny listovej a vitamínu B12

## TRANSLOKACE t(12;20)(p13;q11.2) U PACIENTA S AML, NOVÝ TRANSLOKAČNÍ PARTNER ETV6 GENU, KAZUISTIKA

B. Dřevojánková, S. Králová, L. Sokol, V. Holubová, M. Martinková, M. Wróbel,  
J. Gumulec, J. Sobotka, M. Radina

*Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín*

Cytogenetické a molekulárně-cytogenetické vyšetření u pacientů s onkohematologickým onemocněním má diagnostický, prognostický a léčebný význam.

Přestavby ETV6 (TEL) genu, který leží na krátkém raménku chromozomu 12 v oblasti 12p13, jsou identifikovány u pacientů s myeloproliferativním onemocněním, myelodysplastickým syndromem či akutní leukémií. Doposud bylo identifikováno více jak 30 partnerských zlomových míst s genem ETV6 na různých chromozomech. Po těchto reciprokých translokacích se v místech zlomu vytváří různé fuzní geny. Geny účastníci se translokace mohou kódovat transkripční faktory a tato změna regulace transkripce je jedním z faktorů onkogeneze.

Uvádíme kazuistiku pacienta s akutní myeloidní leukémií, u kterého byla klasickým cytogenetickým a molekulárně-cytogenetickým vyšetřením identifikována translokace t(12;20)(p13;q11.2) s přestavbou v ETV6 genu. Pomocí mnohobarevného pruhování (M-band) bylo místo zlomu na chromozomu 20 identifikováno do oblasti q11.2. Partnerský gen v této oblasti nebyl identifikován. Jedná se pravděpodobně o nového translokačního partnera ETV6 genu. Popisujeme zajímavý klinický průběh onemocnění u pacienta ve vztahu k retrospektivní cytogenetické analýze.

## MONITOROVÁNÍ AGREGACE TROMBOCYTŮ PO INDUKCI KATIONICKÝM PROPYLALÁTEM V RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH U NEMOCNÝCH LÉČENÝCH NÍZKÝMI DÁVKAMI ASA

I. Fátorová, V. Dytrychová, G. Tučková, S. Kieslichová, M. Pecka

*II. interní klinika – OKH, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařské fakulty  
Univerzity Karlovy v Hradci Králové*

Vyšetření funkce krevních deštiček je i v dnešní době velmi problematické. Neexistují žádné standardní materiály pro kontrolu správnosti, v některých případech mohou být výsledky vyšetření ovlivněné užíváním léků nebo potravinových doplňků s antiagregačním účinkem v neposlední řadě i časovou prodlevou mezi odběrem krve a vlastním stanovením.

Agregace krevních destiček po indukci kationickým propylgalátem sodným (CPG) slouží k monitorování léčby nemocných nízkými dávkami kyseliny acetylosalicylové (ASA). Dle výrobce reagentie je neoptimálnější použití CPG v pracovní koncentraci 30  $\mu\text{mol/l}$ . Naše pracoviště zajímalo, zda je tato koncentrace opravdu dostatečná a pokud ne, tak jaké budou rozdíly při použití vyšších koncentrací této reagentie.

U souboru 29 pacientů s kardiovaskulárním onemocněním, kteří dlouhodobě užívají nízké dávky ASA, jsme stanovovali agregaci trombocytů po indukci CPG, a to v koncentracích 30  $\mu\text{mol/l}$ , 45  $\mu\text{mol/l}$  a 50  $\mu\text{mol/l}$ . Vyšetření jsme prováděli na agregometru APACT 4 (firma Helena Laboratories), který má výrobcem deklarovanou citlivost měření  $\pm 10\%$ . Sledovali jsme změny v parametrech slope (%/min), maximální agregační amplitudě (%) a  $T_{50}$  (s).

Statisticky významné rozdíly při použití různých koncentrací CPG byly zaznamenány pouze v případě hodnoty  $T_{50}$ . Časy  $T_{50}$  se se vzrůstající koncentrací zkracovaly, ale tato hodnota výsledek agregačního vyšetření jako celku neovlivnila. Rozdíly u hodnot slope a maximálních agregačních amplitud byly statisticky nevýznamné. Prokázali jsme tak dostatečnou citlivost reagentie CPG v pracovní koncentraci 30  $\mu\text{mol/l}$ .

### **Literatura:**

*[www.analyticalcontrols.com/SPATaspr.htm](http://www.analyticalcontrols.com/SPATaspr.htm)*

## VYŠETŘENÍ RISTOCETIN KOFAKTOROVÉ AKTIVITY vWF NA KOAGULAČNÍM AUTOMATU STA R

P. Hájková, J. Zavřelová, M. Méhešová, M. Matýšková, P. Smejkal, M. Penka  
*Oddělení klinické hematologie, FN Brno*

Von Willebrandův faktor (vWF) plní v hemostáze dvě důležité funkce: 1) v primární hemostáze při adhezi a agregaci trombocytů, 2) v procesu koagulace jako nosič faktoru VIII, který chrání před jeho degradací a lokalizuje v místě sraženiny. Stanovení ristocetin kofaktorové aktivity vWF (vWF:RCo) slouží k posouzení na trombocytech vázaných funkcí vWF v primární hemostáze. Příčinou snížení je vrozená nebo získaná Willebrandova choroba. Příčinou zvýšení jsou infekce, operace a úrazy, těhotenství a hormonální antikoncepce, fyzická námaha, nádorová, jaterní a kardiovaskulární onemocnění.

Při vyšetření vWF:RCo se využívá schopnosti vWF aglutinovat (agregovat) trombocyty v přítomnosti antibiotika ristocetinu. Ke stanovení vWF:RCo se používá agregační popřípadě aglutinační metoda za využití komerčních setů. V naší laboratoři používáme set BC von Willebrand Reagent firmy Dade Behring obsahující lyofilizované normální promyté trombocyty a antibiotikum ristocetin, pro kalibraci Standart Human Plasma a kontrolu správnosti Control Plasma N a P též firmy. U agregační metody se sleduje změna transmise světla v agregační kyvetě, obsahující suspenzi trombocytů a ristocetinu, po přidavku bezdestičkové vyšetřované plazmy (zdroj vWF), registrované v podobě agregační křivky. Z agregační křivky se vyhodnotí maximální změna transmise/min a vWF:RCo se odečítá z kalibrační křivky (lin/log závislost).

Firma Diagnostica Stago vytvořila adaptaci setu BC von Willebrand Reagent pro koagulační automat STA R. Princip metody je podobný jako u agregační metody, tj. optický systém přístroje registruje změnu turbidity vyvolanou shlukováním trombocytů. Vyhodnocuje se ale na rozdíl od agregační metody změna absorbance/min. Výsledky vWF:RCo jsou automaticky odečteny z kalibrační křivky (polynom 3. stupně). Kalibrační křivka je 6. bodová v rozsahu vWF:RCo cca 10 – 60 %. Pro nižší a vyšší hladiny jsou naprogramovány závislé metody s nižším nebo vyšším ředěním vyšetřované plazmy včetně přepočtu.

Cílem práce bylo odzkoušet adaptaci metody pro koagulační automat STA R, ověřit reprodukovatelnost a správnost stanovení, porovnat výsledky s běžně používanou agregační metodou stanovení u souboru vzorků pacientů.

Výsledky testování adaptace setu Von Willebrand Reagent prokázaly správnost stanovení, reprodukovatelnost výsledků je podobná jako u agregační metody, výsledky vWF:RCo při paralelním vyšetření vzorků oběma metodami jsou porovnatelné.

Výhodou vyšetření vWF:RCo na koagulačním automatu je plná automatizace procesu a s tím spojená i minimalizace subjektivních vlivů.

### Literatura:

1. Veyradier A. et al: *Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. Int. J. Clin. Lab Res. (1998), 28, 201-210.*
2. *Diagnostica Stago: Addaptation suggested protocol BC von Willebrand Reagent (Dade Behring): Determination of ristocetin cofactor activity on STA-R.*

## ÚSPĚŠNÁ ERADIKACE INHIBITORU U PACIENTKY SE ZÍSKANOU HEMOFILII A

H. Pavlíková, D. Petrmichlová, Z. Hajšmanová  
*Hematologický úsek ÚKBH FN a LF ÚK Plzeň*

Naše sdělení se týká diagnostiky a léčby inhibitoru u 56leté nemocné. První klinické příznaky ve formě rozsáhlých podkožních hematomů se objevily na sklonku r. 2005. Podezření na přítomnost inhibitoru na základě významně prodlouženého APTT se potvrdilo vyšetřením koagulační aktivity FVIII:C, která nedosahovala ani 1%, a kvantifikací inhibitoru, jehož maximální titr dosáhl 68BU.

Po zaléčení akutních krvácivých komplikací koncentrátem s bypassovou aktivitou byla paralelně zahájena i léčba imunosupresivou za účelem eradikace inhibitoru.

Během následujících šesti měsíců došlo k vymizení projevů spontánní hemoragické diatézy a normalizaci koagulačních parametrů.

Příznivý klinický stav i parametry trvají doposud.

## IMUNOFENOTYPIZAČNÍ STANOVENÍ EXPRESE ZAP-70 A KORELACE S MUTAČNÍM STAVEM IGVH U PACIENTŮ S DIAGNÓZOU B-CLL

M. Heidekerová, M. Doubek, M. Klabusay, Y. Brychtová

*Laboratoř flow cytometrie a celulární terapie, Interní hematologická klinika,  
Fakultní nemocnice Brno; e-mail: mklabus@fnbrno.cz, monika.heidekerova@email.cz*

Chronická lymfatická leukémie (B-CLL) je lymfoproliferativním onemocněním vzniklým klonální proliferací lymfocytů s postupnou akumulací nádorových lymfocytů v lymfatické tkáni i v periferní krvi. Tyto patologické lymfocyty postupně utlačují zdravou krvetvorbu.

Navzdory skutečnosti, že B-CLL je nejčastější typ leukémie dospělých, není její molekulární patogenéze příliš jasná.

B-CLL je onemocnění, které probíhá značně variabilně. Přesná prognostická stratifikace pacientů je nezbytná ke stanovení správné taktiky a intenzity léčby.

Přesnější stratifikaci umožňují moderní ukazatelé, zejména cytogenetické aberace a stanovení mutačního stavu genu pro variabilní části těžkých řetězců imunoglobulinů (IgVH).

Imunofenotypizační stanovení exprese kinázy ZAP-70 představuje další prognostický ukazatel, který lze pokládat za znak významným způsobem doplňující a časem i nahrazující náročnou analýzu IgVH.

Největším problémem stanovení ZAP-70 je však nedostatečná standardizace a validace. Dosud nebyl ujasněn způsob pozitivní a negativní kontroly, strategie gatingu, ani určena hranice pozitivity a negativity ZAP-70 u B-CLL, která by byla obecně standardizována.

V naší laboratoři jsme u 166 pacientů hodnotili expresi ZAP-70 a pokusili se najít korelace mezi nálezy tohoto vyšetření s dalšími prognostickými znaky a klinikou nemocných. Zejména jsme se zaměřili na analýzu různých metod imunofenotypizačního stanovení ZAP-70 a na skupinu pacientů s rozdílnými nálezy při analýze ZAP-70 a mutačního stavu IgVH.

Z celkového počtu 166 pacientů nemělo 48 v době analýzy zhodnocený IgVH status.

V 75 případech ZAP-70 koreloval s mutačním stavem IgVH, z čehož u 46 pacientů pozitivita ZAP-70 korelovala s nemutovaným stavem IgVH (homologie je vyšší než 98%) a u 29 pacientů negativní ZAP-70 koreloval s mutovaným IgVH (homologie je nižší než 98%). U 45 pacientů hodnota ZAP-70 nekorelovala s mutačním stavem.

Detailní výsledky budou prezentovány.

### Literatura:

1. Cheson BD, Bennett JM, Grever M et al.: *National Cancer Institute-Sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. Blood* 87, 1996, 4990-4997
2. Cheson BD (Ed.): *Chronic lymphoid leukemias. Second edition. Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel* 2001, 626 s.
3. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M: *Chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med.* 2005 Feb 24;352(8):804-15.

## ODCHYLKY V MORFOLOGII ERYTROCYTŮ Z POHLEDU PATOFYZIOLOGIE

J. Hoblová, L. Bourková, M. Matýšková, J. Novotný, M. Penka  
*Oddělení klinické hematologie FN Brno Bohunice, Česká republika*

Hodnocení morfolgie erytrocytů z nátěrů periferní krve na sklo, patří k důležitým diagnostickým ukazatelům. Poster je zamýšlen jako doplnění k prezentované přednášce „Bourková L., Matýšková M., Hoblová J., Novotný J., Penka M.: Morfolgie erytrocytů“. Fotografie morfolgických odchylek z literatury i klinické praxe jsou doplněny vysvětlujícími texty. Komentáře k patofyziologii jednotlivých odchylek v morfologii erytrocytů se budou týkat změny velikosti erytrocytů (mikrocyty, makrocyty, anizocytóza), změny zbarvení erytrocytů (normochromie, hypochromie, hyperchromie), změny ve tvarech erytrocytů (akantocyty, echinocyty, terčovitě erytrocyty, slzičkovité erytrocyty, srpkovité erytrocyty, eliptocyty, keratocyty, knizocyty, schistocyty, sférocyty, stomatocyty) a erytrocytárních inkluzi.

### **Literatura:**

1. S.C. Anderson, K.B. Poulsen: *Atlas of hamatology*, Lippincott Williams & Wilkins, 2003
2. E. Beutler, B.S. Coller, M.A. Lichtman: *Williams Hemotology*, 6th ed., McGraw-Hill, 2001
3. D. Zucker-Franklin, M.F. Greaves, C.E. Grossi, A.M. Marmont: *Atlas of Blood Cells Function and Pathology*, volume 1, Edi. Ermes – Milano, 1988

## KOMBINOVANÁ VRODENÁ TROMBOFÍLIA U PACIENTA S OPAKOVANÝMI ISCHEMICKÝMI CIEVNÝMI MOZGOVÝMI PRÍHODAMI – PREZENTÁCIA KAZUISTIKY

P. Hollý, J. Ivanková, M. Dobrotová, J. Staško, P. Kubisz  
*Klinika hematológie a transfúziológie JLF UK a MFN, Martin*

Cievne mozgové príhody (CMP) patria k častým ochoreniam, vo vyspelých krajinách sa považujú za 3. najčastejšiu príčinu morbidity a mortality. Približne v 80% sú podmienené ischemiou, vznikajúcou najčastejšie na podklade arteriosklerózy ciev, menej často z iných príčin vrátane vrodenej alebo získanej trombofilie, ktorá sa podieľa na približne 6% ischemických CMP, pričom jej podiel je vyšší v mladších vekových skupinách.

V kazuistike opisujeme prípad 19-ročného muža s kombinovanou vrodenu trombofiliou (syndróm lepivých doštičiek typu II, heterozygotný stav pre P1A1/A2 polymorfizmus glykoproteínu IIIa a vrodená hyperhomocysteinémia podmienená homozygotným stavom pre mutáciu C677T metylén-tetrahydrofolátreduktázy), ktorej klinická manifestácia zahŕňala recidivujúce hlboké venózne trombózy v povodí v. ileofemoralis l.dx. a ischemické CMP v povodí a. cerebri media l.dx. vedúce k centrálnej paréze n.VII, supranukleárnej dyzartrii, bulbárnemu syndrómu a ľavostrannej centrálnej hemiparéze až centrálnej kvadruparéze stredne ťažkého až ťažkého stupňa. Napriek adekvátnej profylaktickej antikoagulačnej liečbe (warfarinizácia resp. nízkomolekulárne heparíny v profylaktickej dávke), doplnenej po potvrdení vrodenej trombocytopenie o antiagregačnú liečbu (inhibitory COX-1 resp. inhibitory ADP receptora) sa u pacienta opakovane vyskytli ischemické CMP s progresiou klinického nálezu. Prípad demonštruje terapeutické úskalia kombinovaných porúch hemostázy.

*Práca bola podporená grantom VEGA č. 1/33810/06.*



## CD ZNAKY KREVNÍCH DESTIČEK

J. Hřebečková, K. Koubek, A. Radovská  
*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

Na povrchu krevních destiček jsou membránové molekuly, které se uplatňují při různých normálních i patologických procesech. V rámci inventarizace lidského leukocytárního systému do CD nomenklatury je snaha i jednotlivým destičkovým molekulám přiřadit jejich CD označení. U těchto antigenů se detailněji objasňuje molekulární hmotnost, genetická determinace, jejich exprese a funkce. Dále se zpřesňuje jejich význam pro patogenezi a patofyziologii krevních destiček u různých nemocí.

Většinu z membránových molekul zastoupených na krevních destičkách nalézáme i na jiných typech hematopoetických buněk. Do CD nomenklatury je v současné době zahrnuto 53 membránových molekul vyskytujících se na neaktivovaných krevních destičkách a po aktivaci se jejich počet zvyšuje na 60. Na neaktivovaných destičkách jsou to znaky CD9, CDw12, CDw17, CD23, CD29, CD31, CD32, CD36, CD41, CD42,a,b,c,d, CD43, CD46, CD47, CD47R, CD49b, CD49e, CD49f, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD60a,b,c, CD61, CD69, CD82, CD84, CD92, CD102, CD110, CD111, CD112, CD114, CD132, CD140a, CD140b, CD141, CD147, CD148, CD151, CD165, CD173, CD226, CD245, CD295, CD298, CD321 a CD324 a po aktivaci se objevují znaky CD62P, CD63, CD68, CD107a, CD107b, CD109 a CD154.

S velkým rozvojem monoklonálních protilátek dochází ke značnému nárůstu možnosti průtokové cytometrie, a tím i k potřebě znalostí antigenů vyskytujících se na jednotlivých krevních elementech. Molekulami významnými pro patogenezi a patofyziologii jsou např. molekuly CD41/CD61, které jsou základním diagnostickým znakem pro Glanzmannovu trombastonii a molekuly CD42a,b,c,d mají význam u Bernard-Soulierova syndromu.

V tomto sdělení se zaměříme na charakter jednotlivých molekul na krevních destičkách, i když bude nastiněn jejich vývoj v rámci destičkové řady. Tato řada je ovlivňována pomocí hematopoetických růstových faktorů (TPO, EPO, GM-CSF, SCF, IL3, IL6, IL7, IL11), které v interakci se svými receptory navozují vznik krevních destiček. Krevní destičky také produkují některé cytokiny a chemokiny (EGF, TGF- $\beta$ , PDGF, IL-1, PD-ECGF, HGP, CXCL-1), které se uplatňují ve zpětnovazebních mechanismech.

### Literatura:

1. Koubek, K. *Lidské leukocytární antigeny. Immunotech/Beckman-Coulter. Praha 2003*  
Zola H, Swart B, Nicholson I, et al. *CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. Blood 2005; 106:3123-3126*

## CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE A VLIV TERAPIE NA VYBRANÉ IMUNOLOGICKÉ PARAMETRY

Z. Humlová<sup>1,4</sup>, H. Klamová<sup>2</sup>, I. Janatová<sup>4</sup>, P. Šandová<sup>4</sup>, I. Šterzl<sup>1</sup>, V. Vonka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav imunologie a mikrobiologie I. LF UK a VFN, Karlovo nám. 32, 121 11 Praha 2

<sup>2</sup>Ústav hematologie a krevní transfúze, Klinické oddělení, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2

<sup>3</sup>Ústav hematologie a krevní transfúze, Oddělení experimentální virologie,  
U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2

<sup>4</sup>Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky I. LF UK a VFN, Laboratoř klinické  
imunologie a alergologie, Karlovo nám. 32, 121 11, Praha 2

**Úvod:** Terapie chronické myeloidní leukémie (CML) je doprovázena řadou změn v imunologických parametrech. U pacientů léčených interferonem- $\alpha$  (INF $\alpha$ ) je pozorován rozvoj autoimunitních onemocnění jako je například systémový lupus erythematoses, ANCA-asociované vaskulitidy, autoimunitní thyroditida a další imunopatologické stavy. Rozvoj těchto nepříznivých reakcí pravděpodobně souvisí s imunomodulační aktivitou interferonu, případně s jeho toxickým působením na některé orgány. U inhibitoru tyrozinokinázy - imatinib mesylátu (IM) bylo prokázáno, že inhibuje proliferaci lymfocytů T a funkce dendritických buněk.

**Metody:** Dvacet čtyř pacientů s diagnózou CML (9 mužů a 15 žen) v rozmezí od 24 do 72 let (medián 44 let), bylo zahrnuto do studie v době diagnózy onemocnění tj. před zahájením jakékoli protinádorové terapie. U všech jsme vyšetřovali široké spektrum imunologických parametrů, které zahrnovalo hladiny imunoglobulinů, složek komplementu, C-reaktivního proteinu (CRP), přítomnost autoprotilátek, vybrané markery buněčné imunity, jako jsou: subpopulace lymfocytů, intracelulární cytokiny a fagocytóza, a alergologický profil. Vzorky byly odebírány po 6 měsících a vždy před změnou terapie. Výsledky dlouhodobějšího vyšetření jsou v současné době dostupné u 16 pacientů.

**Výsledky:** Největší změny jsme pozorovali v hladinách podříd imunoglobulinu IgG, především IgG3. U čtyř pacientů byly jeho hladiny sníženy. Jeden z pacientů měl snížené hladiny již před terapií, u ostatních se pokles dostavil až po terapii (dva byli léčeni hydroxyureou (HU) a následně INF $\alpha$ , jeden IM). U jednoho pacienta léčeného HU a následně IM došlo též k poklesu imunoglobulinů IgA a IgM. Přítomnost autoprotilátek proti cytoplasmě neutrofilů (ANCAb) byla prokázána u 3 pacientů, kteří byli léčeni HU nebo INF $\alpha$  a následně IM. Pozitivita antidesmosomálních protilátek byla také zjištěna u 3 pacientů, kteří byli léčeni HU a následně INF $\alpha$ . K poklesu hladiny CRP došlo u 9 z 15 pacientů, u kterých byly hladiny zvýšené v době zařazení do studie. Při analýze subpopulací lymfocytů jsme po zahájení léčby našli snížené počty CD8+ lymfocytů u 9 pacientů. Při stanovení produkce intracelulárních cytokinů v CD3+ buňkách jsme zjistili zvýšenou produkci IL-2 u 9 pacientů (6 z nich bylo léčeno INF $\alpha$ ) ve srovnání s hodnotami před terapií. Fagocytární stimulační index polymorfonukleárů, měřený ingescí *E.coli* (SI), který byl před léčbou snížený u většiny pacientů, se zcela normalizoval.

**Závěr:** Sledování imunitní odpovědi u pacientů s CML v závislosti na terapii může být přínosem pro prevenci některých komplikací, vyplývajících z léčby, k vybrání dalších parametrů, které by měly být sledovány i v souvislosti s prognózou onemocnění či pro výběr a monitorování stavu pacientů vhodných pro terapii budoucími protinádorovými vakcínami.

## SLEDOVANIE ÚČINNOSTI LIEČBY ASA : VOĽBA VHODNÉHO INDUKTORA AGREGÁCIE TROMBOCYTOV

J. Ivanková, M. Dobrotová, P. Kubisz

*Národné centrum hemostázy a trombózy*

*Klinika hematológie a transfuziológie, Martinská fakultná nemocnica, Martin*

### **Úvod**

Acetylosalicylová kyselina (ASA) patrí medzi látky, ktoré sa vo veľkej miere používajú na prevenciu trombotických komplikácií. Optimálne dávky ASA a metódy stanovenia dostatočnej odpovede na ASA, vrátane voľby vhodného induktora agregácie trombocytov sú predmetom diskusie. Podľa literárnych údajov existuje vysoké percento jedincov u ktorých je efekt ASA nedostatočný („aspirínová rezistencia“). Cieľom našej práce bolo zhodnotiť citlivosť 4 induktorov agregácie trombocytov a množstvo zdravých jedincov, ktorí nedostatočne odpovedajú na liečbu ASA.

### **Metóda**

Vyšetrili sme funkciu trombocytov metódou agregácie podľa Borna u 65 zdravých kontrol pred a po užití 100 mg ASA počas troch dní. Sledovali sme maximálnu amplitúdu vyjadrenú percentom rozdielu PRP-PPP a slope (strmosť) agregáčnej krivky po indukcii trombocytov: ADP ( 10  $\mu$ M ), Epinefrín ( EPI , 300  $\mu$ M ), Kationický propyl galát ( CPG, 30  $\mu$ M ) , Arachidónová kyselina ( AA , 500  $\mu$ g/ml ).

### **Výsledky**

U každého z 65 zdravých kontrol sme zaznamenali kompletnú inhibíciu agregácie trombocytov u sledovaných parametrov iba po indukcii arachidónovou kyselinou:

agregácia (%): 85,2  $\pm$  7,3 pred a 11,6  $\pm$  4,2 po užití ASA ( p=0,00001 )

slope : 115,1  $\pm$  22,1 pred a 13,3  $\pm$  5,0 po užití ASA ( p=0,00001 )

4 zdravé kontroly dosiahli kompletnú inhibíciu agregácie trombocytov po zvýšení dávky ASA: 200 mg ( 3 zdravé kontroly ), 400 mg ( 1 zdravá kontrola ).

### **Záver**

Na monitorovanie účinnosti ASA za vhodnú metódu považujeme konvenčnú agregometriu, ktorá priamo dokazuje blokovanie cyklooxygenázy, s použitím arachidónovej kyseliny ako induktora agregácie trombocytov, ktorou sme zistili kompletnú inhibíciu agregácie trombocytov v oboch sledovaných parametroch. Arachidónová kyselina spúšťa formáciu tromboxánu A<sub>2</sub> v trombocytoch vrátane cyklooxygenázy a zablokovanie tohto enzýmu v trombocytoch spôsobí inhibíciu arachidónovou kyselinou navodenej agregácie ex vivo. Ani u jednej zdravej kontroly sme nezistili „aspirínovú rezistenciu“. Nie je udávané vysoké percento jedincov, ktorí sú „rezistentní“ na ASA nadhodnotené ? Nie je tento jav aj otázkou voľby vhodnej metódy, induktora agregácie trombocytov a otázkou voľby dostatočnej dávky ASA ?

## PŘEHLED IZOLAČNÍCH METOD NUKLEOVÝCH KYSELIN S DŮRAZEM NA VYUŽITÍ V KLINICKÉ PRAXI

H. Janýšková, M. Jursová, P. Kopecká, E. Zlámalíková, P. Riedlová, S. Tavandzis,  
E. Průšová, M. Teichmanová, A. Bodat, M. Radina

*Onkologické centrum J.G. Mendela, Laboratoř molekulární biologie, Nový Jičín*

Nukleové kyseliny (NK) představují nejdelší makromolekulární struktury uvnitř buněk. Jejich zásadní význam v rámci druhu spočívá v uchování, přenosu a realizaci genetické informace. Vlivem vnějšího i vnitřního prostředí organismu vznikají v DNA mutace, jejichž následkem může být změna fenotypu. Úspěšná detekce mutací spontánních i germinálních je předpokladem stanovení etiologické příčiny onemocnění, která dále umožňuje použití nejúčinnějších preventivních opatření a léčebných postupů u pacienta i v jeho rodině.

Dynamický rozvoj molekulární biologie na poli humánní medicíny, převážně klinické diagnostiky onemocnění a poruch vyžadujících analýzu lidské DNA a RNA, si v současné době nárokuje stále efektivnější metodiky izolaci NK s maximálním důrazem na jejich rychlost, eventuálně automatizaci při zachování vysoké čistoty a odpovídající kvantity. Jako makromolekulární látky s vysoce organizovanou strukturou vykazují NK fyzikálně-chemické vlastnosti, kterými se liší od strukturně a konformačně podobných proteinů. Navíc odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti jednovláknové a dvouvláknové NK umožňují jejich úspěšnou separaci a následnou mutační i/nebo expresní analýzu genů, které jsou předmětem zájmu vyšetření.

V tomto sdělení je snaha porovnávat a zhodnotit nejužívanější izolační postupy, jejich prostorovou, přístrojovou a chemickou náročnost a vliv na výslednou kvalitu a kvantitu vzorku pro další laboratorní využití. Volba izolačních metod je závislá především na vybavenosti laboratoře, počtu a typu vzorků, na organizaci práce v laboratoři a na typech následujících molekulárně genetických vyšetření. Dále se věnuje maximální pozornost preanalytické fázi, skladování a zpracování biologického materiálu v závislosti na jeho typu a také krátko- a dlouhodobému uchovávání izolované DNA a RNA v NK bance. Na základě nových vědeckých poznatků se v laboratoři neustále zavádějí nové metody a tak lze kdykoliv dle potřeby doplnit nová vyšetření z již v bance uložené NK a tím neustále upřesňovat etiologickou příčinu diagnózy pacienta.

## PRŮKAZ MYELOPEROXIDÁZY DIAMINOBEZIDINEM

I. Jirásková, D. Mikulenková, K. Smetana  
*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

Jak je obecně známo, klasické techniky pro průkaz aktivity peroxidázy v primárních azurofilních granulech granulocytů a monocytů většinou užívaly jako substrát benzidin. Tyto techniky byly spolehlivé a v různých modifikacích velmi citlivé. Užívání benzidinu bylo však vzhledem k jeho kancerogenitě v běžné klinické laboratoři zakázáno bezpečnostními předpisy. Z tohoto důvodu byly vypracovány metody, které užívají jiné substráty, např. diaminobenzidin (DAB) a 4-chloro-1-naftol, který je i komerčně dostupný v diagnostickém kitu Leucognost® POX (Merck, NSR) a který využívá i náš analyzátor ADVIA 120 od fi Bayer k hodnocení leukocytů. Tyto metody však ve srovnání s klasickými metodami užívajícími benzidin mají celou řadu nevýhod, jako je vyšší cena, omezená stabilita, mnohdy nižší citlivost a jsou složitější s většími nároky na konečnou fázi při přípravě preparátu pro mikroskopování (montování do speciálního media).

Jelikož DAB se osvědčil i v elektronové mikroskopii, byla zkoumáno i jeho využití na roztěrových preparátech ve světelné mikroskopii, které by bylo proveditelné v klinických hematologických laboratořích. Z různých fixačních metod (metanol, formol, formolové páry, metanol-formol, aceton, po různou dobu) se nám osvědčila velmi krátká fixace v univerzálním fixačním činidle pro cytochemii enzymů Leocognost® (Merck, NSR) (1 min. v závislosti na tloušťce nátěru). Z velké řady zkoušených koncentrací a doby inkubace nátěrů byla optimální patnáctiminutová inkubace substance DABu (5mg) rozpuštěné v 10ml nárazníku TRIS-HCl (pH 7) s přidáním 50μl 1% peroxidu vodíku. Po oplachu a případném dobarvení v jaderném barvivu (z různých hematoxylinů, jádrové červeně, neutrální červeně, bazického fuchsínu, metylové zeleně – se osvědčil pro dostatečný kontrast Gillův hematoxylin II) je možné prohlížení suchého preparátu bez montování běžným imerzním objektivem. Výsledkem je zlato-hnědé zbarvení primárních azurofilních granul v buňkách granulocytové a monocytové řady. Citlivost metody je shodná s klasickými metodami užívajícími benzidin či 4-chloro-1-naftol. Další výhodou je stabilita roztoku, možnost prohlížení imerzním objektivem bez nutnosti montování do speciálních medií. Nevýhodou metody, avšak snadno překonatelnou, je nutná standardizace metody po přípravě nových roztoků.

### Literatura:

1. H.Löffler, J.Rastetter: *Atlas of clinical hematology*
2. F.G. J. Hayhoe, D,Quaglino: *Hematological cytochemistry*

*Částečně s podporou Výzkumného záměru Min zdrav. 0002373601.*

**VÝZNAM MUTÁCIE V617F V GÉNE *JAK2* PRI DIAGNOSTIKE  
CHRONICKÝCH MYELOPROLIFERATÍVNYCH OCHORENÍ SO  
ZAMERANÍM NA DIFERENCIÁLNU DIAGNOSTIKU PRAVEJ POLYCYTÉMIE  
A OSTATNÝCH TYPOV POLYCYTÉMII**

B. Katrincskáková <sup>1</sup>, M. Horváthová <sup>2</sup>, J. Veselovská <sup>2</sup>, M. Pecúchová <sup>1</sup>, V. Divoký <sup>2</sup>,  
M. Jarošová <sup>1</sup>, K. Indrák <sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc*

<sup>2</sup>*Ústav lekárskej biológie LF UP Olomouc*

Pravá polycytémia (Polycythemia vera, PV) je klonálne ochorenie hematopoetickej kmeňovej bunky, ktoré je charakterizované nadmernou produkciou fenotypovo normálnych erytrocytov, leukocytov a trombocytov. Medzi charakteristické črty PV patrí tvorba endogénnych erytroidných kolónií in vitro bez dodania exogénneho erythropoetínu a taktiež hypersenzitívita hematopoetických buniek na radu ďalších hematopoetických rastových faktorov. Okrem hyperexpresie génu *PRI-1* (Polycythemia rubra vera 1) je taktiež známa asociácia medzi PV a bodovou mutáciou V617F v géne tyrozínkinázy *JAK2* (Janusova kináza 2). Funkčné analýzy potvrdzujú, že uvedená mutácia zodpovedá v in vitro podmienkach za vznik konštitutívne aktívnej tyrozínkinázy (signálna dráha JAK/STAT) a in vivo navodzuje erytrocytózu u myši. Práve na základe týchto údajov sa predpokladá, že mutácia *JAK2* (V617F) participuje na patogenéze PV, hoci je zrejme, že nie je kauzálnou príčinou ochorenia.

Skríning zameraný na výskyt mutácie V617F v géne *JAK2* uplatňujeme v rámci diferenciálnej diagnostiky myeloproliferatívnych ochorení aj na našom pracovisku. Pri detekcii mutácie využívame jednak metódu alelovo špecifickej PCR (AS-PCR), ako aj metódu restriktívnej analýzy PCR produktu restriktázou BsaXI. Cieľom práce je prezentovať výsledky, ktoré sme získali monitorovaním výskytu mutácie *JAK2*(V617F) u pacientov s *BCR/ABL* negatívnymi myeloproliferatívnymi ochoreniami sledovanými na HOK FN Olomouc. Výskyt mutácie dosahuje v našom súbore 30 pacientov s fenotypovými charakteristikami PV úroveň 93% (28/30). I naše výsledky potvrdzujú, že existujú pacienti s klasickou PV, ktorí mutáciu v géne *JAK2* nemajú. Navyiac, mutácia nie je špecifická pre PV a jej prítomnosť je možné na signifikantnej úrovni potvrdiť i u pacientov s ďalšími myeloproliferatívnymi ochoreniami (idiopatická myelofibróza, esenciálna trombocytémia, vrátane atypických myeloproliferatívnych ochorení). Je teda zrejme, že na základe výskytu mutácie *JAK2*(V617F) nie je možné diferencovať heterogénnu skupinu myeloproliferatívnych ochorení do konkrétnych typov. V súlade s literárnymi údajmi sme však mutáciu *JAK2*(V617F) neidentifikovali ani u jedného pacienta so sekundárnou erytrocytózou (0/10). Potvrdenie výskytu tejto mutácie môže mať preto hodnotu diferenciálneho diagnostického znaku práve pri odlíšení PV od sekundárnych polycytémii a spolu s ďalšími klinickými a laboratórnymi kritériami môže prispieť k diferenciálnej diagnostike PV a chronických myeloproliferatívnych ochorení všeobecne.

### **Literatúra:**

1. *Baxter E, Scott LM, Campbell PJ, East CL, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet. 2005 Mar 19-25;365(9464):1054-1061.*
2. *Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR, United Kingdom Myeloproliferative Disorders Study Group, Medical research Council Adult Leukaemia Working Party, Australian Leukaemia and Lymphoma Group Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. Lancet. 2005 Dec 3;366(9501):1945-53.*

*Práca je podporovaná grantom: GAR 301/04/1239 a MSM 6198959205*

## STANOVENÍ MUTACÍ V GENU PRO ATP7B U PACIENTŮ S PODEZŘENÍM NA WILSONOVU CHOROBU METODOU SEKVENAČNÍ ANALÝZY

H. Kolaříková, A. Bóday, P. Riedlová, J. Fišer, M. Radina  
*Onkologické centrum J.G.Mendela, Nový Jičín*

Wilsonova choroba je hepatolentikulární degenerace způsobena poruchou metabolismu mědi. Frekvence onemocnění je různá: v evropské populaci 1 : 30 000, v Japonsku 1 : 10 000, na Sardinii až 1 : 7 000. Etiologickou příčinou tohoto dědičného, autozomálně recesivního onemocnění je nepřítomnost nebo dysfunkce měď transportující ATPázy (ATP7B) s následnou toxickou akumulací mědi zejména v tkáních jater, mozku a ledvin. ATP7B je regulátorem homeostázy mědi, tedy zabudování mědi do ceruloplasminu a jeho transportu přes buněčnou membránu a také exkrece mědi do žluči. Podle současných znalostí jsou příčinou zmíněného onemocnění právě mutace v genu pro ATP7B. Do dnešní doby bylo identifikováno přes 200 mutací v příslušném genu. Pro indoevropskou populaci je prevalentní mutace H1069Q (s alelickou frekvencí 56,6%). Další mutace W779X, R778G a 3402delC se vyskytují s frekvencí mezi 1,5 - 4 %.

Stanovení klinické diagnózy je obtížné, protože spektrum symptomů je rozsáhlé, různorodé a především nespecifické. První známky onemocnění se mohou projevit mezi 10.- 40. rokem života pacienta. Asi 40% postižených trpí poruchou funkce jater a až 50% má neurologické či psychiatrické obtíže.

V současné době přispívá významnou měrou k potvrzení onemocnění molekulárně genetická analýza příslušného genu. Na našem pracovišti jsme se zaměřili na analýzu exonů, které ovlivňují vazbu mědi a ATP na příslušný protein. Pro přímou DNA diagnostiku jsme zvolili strategii přímého sekvenování exonů 8, 14 a 15, která kromě uvedených nejčastějších mutací odhalí i méně časté změny, především bodové mutace, malé delece či inserce.



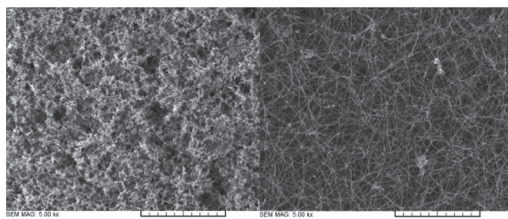
## ZÍSKANÁ DYSFIBRINOGENEMIE V SOUVISLOSTI S MNOHOČETNÝM MYELOMEM

R. Kotlín, M. Chytilová, P. Salaj, J. Suttnar, T. Riedel, J. E. Dyr  
*Ústav hematologie a krevní transfuze, U nemocnice 1, 128 20 Praha 2*

**Úvod:** Fibrinogen, klíčová molekula krevního srážení, je glykoprotein vyskytující se v krevní plazmě v koncentracích 2 - 4 g/l. Je tvořen třemi různými páry polypeptidových řetězců -  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  a  $\gamma$ , které jsou navzájem propojeny 29 disulfidovými vazbami. Fibrinogen je přeměňován na fibrin působením thrombinu. Dysfibrinogenemie je choroba koagulace, kdy je porušena přeměna fibrinogenu na fibrin. Získané dysfibrinogenémie tvoří skupinu dysfibrinogenémií, které se objevují sekundárně s jinými onemocněními nebo jsou vyvolány užíváním nějakého léku. Mnohočetný myelom (Kahlerova choroba) je zhoubné nádorové onemocnění vycházející z patologického klonu plasmocytů charakterizované nadprodukcí monoklonálního imunoglobulinu nebo jiné bílkoviny (paraprotein). Paraproteiny negativně ovlivňují polymeraci fibrinových monomerů tím, že buď interferují s fibrinovými monomery, nebo s nimi interagují jako s antigenem(1).

**Metody a pacienti:** pacient – 75 letý muž, byl poprvé vyšetřen v koagulační laboratoři v souvislosti s mnohočetným myelomem v září roku 2005. Při tomto vyšetření byl zjištěn prodloužený protrombinový čas (23,3 s), prodloužený trombinový čas (64,1 s) a prodloužený reptilasový čas (57,6 s). Hladina fibrinogenu byla mírně zvýšená (4,35 g/l). Hladina paraproteinu (M-komponenta) byla 85,75 g/l. Po půl roce léčby došlo k normalizaci koagulačních testů při hladině paraproteinu (M-komponenta) 19,48 g/l. Koagulační vyšetření bylo provedeno pomocí koagulačního analyzátoru STA-R (Diagnostica Stago, Francie). Polymerace fibrinu byla měřena spektrofotometricky při 340 nm. SDS PAGE elektroforéza byla provedena podle Laemmliho (2) a skenovací elektronová mikroskopie byla provedena pomocí mikroskopu VEGA Plus TS 5135 (Tescan s.r.o., Brno). DNA analýza byla provedena dideoxysekvencovací metodou pomocí CEQ 8000 genetického analyzátoru (Beckman Coulter, USA)

**Výsledky:** vzorky plasmy pacienta jeví známky dysfibrinogenemie byly vyšetřeny pomocí sledování polymerace fibrinových monomerů. Vzorek nepolymeroval při 340 nm ani trombinem ani reptilasou. SDS PAGE neodhalilo žádné abnormality v jednotlivých řetězcích fibrinogenu a DNA analýza exonů kódujících jednotlivé řetězce fibrinogenu neodhalila žádné mutace DNA pacienta. Elektronová mikroskopie fibrinových vláken ukázala neobvyklou patologickou strukturu fibrinové sítě (Obr. 1). Vzorky plasmy po snížení hladiny M-komponenty normálně polymerovaly jak trombinem, tak reptilasou. Skenovací elektronová mikroskopie fibrinové sítě ukázala normální morfologii fibrinového klotu (Obr. 2)



**Obr.1:** houbovitá síť

**Obr.2:** síť po snížení hladiny paraproteinu

**Závěr:** u pacienta s mnohočetným myelome m byla diagnostikována získaná dysfibrinogenemie s prodlouženým trombinovým a reptilasovým časem a s poruchou polymerace fibrinových monomerů. Byla sledována patologická fibrinová síť s houbovitou morfologií. Symptomy dysfibrinogenemie se eliminovaly po poklesu hladiny paraproteinu.

**Literatura:**

1. O`Kane MJ, Wisdom GB, Desai ZR, Archbold GPR. Inhibition of fibrin monomer polymerisation by myeloma immunoglobulin. *J. Clin. Pathol.* 1994; 47: 266 – 268.
2. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680 - 685.

*Tato práce vznikla díky finanční podpoře MZ 2373601.*

## EXPRESSE CHEMOKINOVÝCH RECEPTORŮ NA LIDSKÝCH NORMÁLNÍCH A PATOLOGICKÝCH KREVNÍCH BUŇKÁCH

K. Koubek, A. Radovská, J. Hřebačková

Ústav hematologie a krevní transfúze, 128 20 Praha 2, Česká republika

E-mail: koubek@uhkt.cz

**Úvod.** Vzájemná interakce hematopoetických růstových faktorů (cytokinů a chemokinů) s jejich receptory ovlivňuje celou řadu funkcí hematopoetického a imunitního systému. V naší práci jsme analyzovali reaktivitu monoklonálních protilátek proti chemokinovým receptorům na normálních a patologických buňkách protože exprese těchto receptorů poskytuje důležitý pohled, který se promítá do diagnostických a terapeutických úvah.

**Materiál a metody.** Normální buňky periferní krve (lymfocyty, monocyty, granulocyty, CD34+ buňky) byly analyzovány monoklonálním protilátkami (MoAbs) na expresi chemokinových receptorů /MoAb anti CXCR-1 (MCA1469), anti CXCR-2 (MCA1470), anti CXCR-3 (C6473), anti CXCR-4 (MCA1619), anti CXCR-5 (MAB190), anti CCR-1 (MAB145), anti CCR-2 (MAB150), anti CCR-3 (MAB155), MoAbs anti CCR-5 (C5973) a anti CCR-6 (MAB195/.. Patologické (leukemické) buňky byly testovány MoAbs s buňkami periferní krve a kostní dřeně od nemocných s krevními chorobami (AML, ALL, CLL, CML, NHL lymfomy). Analýza imunofluorescenčních nálezů byla prováděna průtokovou cytometrií.

**Výsledky a diskuse** Analýzu chemokinových receptorů (CXCR-1, CXCR-2, CXCR-3, CXCR-4, CXCR-5, CCR-1, CCR-2, CCR-3, CCR-4, CCR-5 a CCR-6) na normálních a patologických byla prováděna imunofluorescenčními testy a vyhodnocována průtokovou cytometrií. V některých případech jsme prováděli tž. dvojí značení kdy koexpres chemokinových receptorů byla sledována s dalšími molekulami (CD3, CD4, CD8, CD19, CD34), které napomáhají vymezovat T a B lymfocytární populace a populace kmenových/progenitorových buněk. Z výsledků dále vyplývá, že chemokinové receptory jsou vyjádřené na normálních a leukemických buňkách v nízkém zastoupení (zhruba 512-1970 kopií na buňku). Expres chemokinových receptorů na patologických buňkách nemocných s leukemií je velmi heterogenní. Nicméně dva chemokinové receptory - CXCR3, CCR6 - byly vyjádřeny na většině patologických buněk nemocných s lymfoidní leukemií B typu. Kvantitativní imunocytometrie dovoluje více objektivně charakterizovat pozitivní nález a to v případech, když jsou receptory zastoupeny na buňkách v nízkých počtech.

**Poděkování.** Autoři děkují Mgr. J. Niederlové za spolupráci při vyhodnocování vzorků průtokovou cytometrií.

*Abstrakt je podpořen vědeckým záměrem, poskytnutým MZ pro UHKT na rok 2006.*

## VLIV INHIBITORŮ P-GLYKOPROTEINU NA ÚČINNOST PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV U BUNĚČNÉ LINIE K562

P. Krumpochová<sup>1</sup>, I. Frydrych<sup>2</sup> a P. Mlejnek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, Olomouc

<sup>2</sup>Ústav biologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, Olomouc 77515

**Abstrakt** P-glykoprotein (P-gp) je transmembránová pumpa zajišťující transport látek z cytoplazmy do extracelulárního prostoru. Transport probíhá i proti koncentračnímu spádu za současné hydrolyzy ATP. Substrátová specifita P-gp je relativně malá. Mezi substráty P-gp patří hydrofóbní organické molekuly, většinou bazické povahy s malou molekulovou hmotností. P-gp je první popsáný protein podílející se na vzniku takzvané mnohočetné lékové rezistence (MDR) u nádorových buněk. MDR je komplexní obranný mechanismus, kdy opakované podávání jednoho typu protinádorového léčiva, vede ke vzniku rezistence i na jiné typy léčiv, které nemají s původním léčivem společnou ani strukturu ani mechanismus účinku. Předpokládá se, že opakované podávání některých protinádorových léčiv vede ke zvýšené expresi P-gp, který svou aktivitou trvale snižuje intracelulární koncentraci léčiva, a tak navozuje stav rezistence (Simon a Schindler 1994).

Cyklosporin A (CsA) a verapamil (VPA) jsou známé inhibitory P-gp, jež blokují transport léčiva ven z buněk, a tím obnovují jejich citlivost vůči tomuto léčivu. Naše výsledky však překvapivě ukazují, že CsA i VPA potencují cytotoxické účinky protinádorových léčiv bez ohledu na expresi P-gp. Zjistili jsme také, že CsA i VPA neovlivňují podstatným způsobem intracelulární koncentraci testovaných léčiv. Z našich výsledků vyplývá, že podíl P-gp na vzniku MDR nemusí být tak významný, jak se původně předpokládalo.

### Literatura

1. Simon, S. M., Schindler, M., 1994, *Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3497-3504.
2. Slater LM, Sweet P, Stupecky M, Gupta S, 1986, *Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro*, J Clin Invest., 77(4), 1405-1408.
3. Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., and Sakurai, Y., 1981, *Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil*, Cancer Research 41 (5), 1967-1972.

Projekt je podporován granty #MSM 6198959216 a GAČR GA301/04/1239.

## MECHANISMUS AKTIVACE KREVNÍCH DESTIČEK OXIDOVANOU CELULOSOU

P. Křížová, L. Chrastinová, E. Schönfeldová, J. E. Dyr  
*Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha*

Mezi hemostyptické materiály používané v chirurgii k zástavě krvácení patří např. fibrin, trombin, kolagen a celuloza. Mechanismus hemostyptického působení celulosy však není dosud zcela znám. Celuloza obsahuje hydroxylové skupiny, které je možno dále modifikovat a tím upravovat její vlastnosti (vyšší či nižší rozpustnost ve vodě, biostabilitu či biodegradabilitu). Znalosti mechanismu působení celulosy na hemostázu by bylo možno zpětně využít k cílené úpravě jejích hemostyptických vlastností. K bližšímu objasnění tohoto mechanismu by měla vést i naše studie. Používali jsme mikrodisperzní vápenato-sodnou sůl oxidované celulosy s obchodním názvem Altracell. Jde o biokompatibilní dobře resorbovatelné hemostyptikum, které se ve formě prášku používá k zástavě kapilárního a parenchymatózního krvácení. Krevní destičky byly izolovány z krve zdravých dárců a resuspendovány v plazmě zdravých dárců nebo v plazmě pacientů s deficiencí jednotlivých koagulačních faktorů (VIII, IX, XII a XIII). Aktivace krevních destiček oxidovanou celulosou byla sledována turbidimetricky a stanovením serotoninu uvolněného z destiček během jejich aktivace. Serotonin byl stanoven metodou HPLC-RP s fluorescenční detekcí. Promyté destičky a promyté destičky s 0,2% fibrinogenem nebyly celulosou aktivovány. Destičky resuspendované v normální plazmě byly aktivovány 2% oxidovanou celulosou. Závislost aktivace destiček na čase obsahovala lag fázi a následně rychlý nárůst koncentrace serotoninu. Délka lag fáze se u normální plazmy pohybovala od 5 do 10 minut. Aktivace destiček resuspendovaných v plazmě pacientů s deficiencí faktorů VIII, IX a XII měla lag fázi prodlouženou o 10-15 minut. Oproti tomu deficience faktoru XIII neměla vliv na aktivaci destiček oxidovanou celulosou. Z uvedených výsledků vyplývá, že celuloza neaktivuje krevní destičky přímo, ale prostřednictvím některých složek plazmy. K aktivaci destiček celulosou neslouží ani interakce celulosy s fibrinogenem, který je v určité konformaci schopen interagovat s membránovými glykoproteiny klidových destiček. Na aktivaci krevních destiček celulosou se podle naměřených výsledků podílejí faktory iniciační fáze koagulační kaskády vedoucí k tvorbě trombinu.

*Tato práce byla podpořena grantem VZ MZ CR 00002373601.*

## THE COMPUTER CONTROLLED MODEL FOR OPTIMIZATION OF THE LDL-APHERESIS VERIFIED IN CLINICAL PRACTICE

V. Mašín<sup>1</sup>, M. Bláha<sup>2</sup>, R. Malý<sup>2</sup>, V. Bláha<sup>3</sup>, J. Zajíc<sup>2</sup>, R. Zimová<sup>3</sup>, J. Malý<sup>2</sup>, Z. Zadák<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Medical Biophysics, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>2</sup>2nd Dept. of Internal Medicine, <sup>3</sup>Dept. of Gerontology and Metabolism, Faculty Hospital in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>3</sup>State Institute for Drug Control, Prague, Czech Republic

**Introduction:** Familial hyperlipidemia represents a population of patients at high risk for atherosclerotic cardiovascular diseases. Patients are started on a low fat/cholesterol diet, an exercise program, and treatment with statins, or other cholesterol-lowering medications. If more aggressive measures are required, one such option is LDL-apheresis. To maximize the efficacy of LDL-apheresis procedure we created a computerized model. The aim of this study is to verify it in clinical practice.

**Patients and methods:** A therapeutic technique of immunoabsorption was used, applying a pair of Lipopak® columns (Pocard, Russia). Plasma was separated by a continuous-flow plasma separator (Cobe Spectra, USA); adsorption was controlled by adsorption-desorption equipment Adasorb (Medicap, Germany). We have been using LDL-apheresis for aggressive cholesterol lowering in a cohort of patients since 1994. Repeated 1200 LDL-apheresis procedures had been used in patients with primary hypercholesterolemia and 494 last of them had been evaluated in the earlier study. 47 other procedures were used in this verification study. The program for procedure planning was programmed in Microsoft® Excel for Windows. Complex metabolism of the LDL-cholesterol was neglected (regarding to a short-time period of the procedure – up to 4 hours) and the procedure was calculated as continuous filtration. The input fed to the program includes merely basic patient data (mass, height, sex and initial plasma LDL level in mmol/L).

**Results:** The results show a very good match between calculated levels and the real laboratory results in most procedures, but in some (especially longer) procedures we observed minor differences (0,05 mmol/L), which we account to the transport of the LDL-cholesterol from tissues into circulation. However some technical and medical details must be carefully observed (initial cholesterol level, correct calculation of plasma volume, the precise capacity of adsorbents that must not be overshoot); they influence correct match between calculated and real results significantly.

**Conclusions:** Although our software uses a fairly simplified model of the LDL-cholesterol kinetics during the LDL-apheresis, it is providing a great aid in the procedure planning. It is also suitable for practical use because it only requires a few commonly used and readily available input values.

### References:

1. Blaha M.: Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2003;46:3–7.
  2. Blaha M, Masin V, Stranek P, Blaha V, Cermanova M, Malý J, Belada D. Optimization of the therapeutic procedure during LDL-apheresis – a computerized model. *Transfusion and Apheresis Science* 2005;32:149–156.
  3. Stefanec GM. Prädiktionsparameter extrakorporaler Eliminationstherapien am Modell der LDL-apherese. Eds.: Copy Team KMS, Köln am Rhein, Germany 1999, p. 117
- Supported by the grants IGA MH CZ NR/8062-3, 8505-3, 9103-4, VZO 00179906.

## STANOVENÍ VOLNÝCH LEHKÝCH ŘETĚZCŮ U PACIENTŮ S MONOKLONÁLNÍMI GAMAPATIEMI – NAŠE ZKUŠENOSTI. KAZUISTIKA.

L. Nováčková<sup>1</sup>, E. Šumná<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav klinické biochemie, Fakultní nemocnice Ostrava a Zdravotně sociální fakulta  
Ostravské university

<sup>2</sup> Onkologické centrum J.G. Mendela, Hematologická ambulance, Vítkovice

**Úvod:** Syntéza monoklonálních volných lehkých řetězců provází převážnou většinu monoklonálních gamapatií. Jejich koncentrace v séru závisí na počtu plazmatických buněk, rychlosti syntézy a funkci ledvin. Velmi krátký biologický poločas předurčuje volné lehké řetězce k využití pro monitorování změn např. v počtu plazmatických buněk (na rozdíl od hodnoty monoklonálního gradientu). Pro možný vliv polyklonálních volných lehkých řetězců je vhodné použít vzájemný poměr kappa a lambda volných řetězců a tím vyhodnocení více zpřesnit. (AR Bradwell, GP Mead, HD Carr-Smith.: Serum Free Light Chain Analysis, Third Edition)

**Analytické znaky sledování:** Používáme soupravy FREELITE KAPPA a FREELITE LAMBDA firmy Binding Site. Souprava obsahuje specifické protilátky proti skrytým epitopům lehkých řetězců imunoglobulinů. Tyto epitopy jsou přístupné pouze v případě, jde-li o volné lehké řetězce. K detekci vzniklého imunokomplexu používáme nefelometr Immage (Becman Coulter). Princip měření – rate nefelometrie. Kalibrátor není vztažen na mezinárodní standard. Stanovení je z pohledu laboratorního pracovníka jednoduché a rychlé. Správnost a reprodukovatelnost odpovídá požadavkům imunoanalytických metod.

**Soubor sledovaných pacientů:** Pacienti s monoklonálními gamapatiemi, v péči hematologické ambulance Interní kliniky FNŠP Ostrava a Hematologická ambulance Onkologického centra J.G. Mendela, Ostrava – Vítkovice. Laboratoř ústavu klinické biochemie FNŠP Ostrava sleduje hladinu volných lehkých řetězců u těchto pacientů dva roky. V souboru jsou pacienti v různém stádiu onemocnění, léčení, či sledování. Na vybraných příkladech uvádíme situace, kdy vyšetření volných lehkých řetězců přináší důležitou informaci. Vyšetření volných lehkých řetězců je z našeho pohledu cenné:

- U pacientů s diagnózou Bence-Jones mnohočetný myelom
- V případech, kdy monoklonální gradient migruje přesně ve frakci, kde migrují jiné proteiny a jeho denzitometrická hodnota je přítomností těchto proteinů ovlivněna
- U pacienta s expanzí do extramedulárního prostoru
- Tam, kde paraprotein vykazuje kryoprecipitační vlastnosti.
- Při diferenciální diagnostice amyloidózy

Autoři předkládají několik vybraných kazuistik, týkajících se monitorování volných lehkých řetězců v séru nemocných s monoklonální gamapatií.

**Kontakt:** ludmila.novackova@fnspo.cz, elen.sumna@centrum.cz

### Literatura:

- AR Bradwell, GP Mead, HD Carr-Smith: Serum Free Light Chain Analysis, Third Edition, The Binding Site, 2005, ISBN 0704424894)
- Mead G P, Carr-Smith H D, Drayson M T, Morgan G J, Child J A, Bradwell A R.: Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. Br J Haematol. 2004 Aug., 126(3): 348-54
- Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Clark RJ, Bradwell AR, Melton LJ 3rd, Larson DR, Plevak MF, Katzmann JA.: Presence of monoclonal free light chains in the serum predicts risk of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. Br J Haematol. 2004 Nov, 127 (3): 308 - 104.

## MOŽNOSTI STANOVENÍ ASPIRINOVÉ RESISTENCE PŘI POUŽITÍ ROZDÍLNÝCH INDUKTORŮ AGREGACE TROMBOCYTŮ

P. Novák, V. Krčová, L. Slavík  
*Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc*

### Úvod:

Literární údaje uvádí velice rozlišné údaje procentuálního vyjádření pacientů s aspirinovou (ASA) resistencí, někteří autoři udávají v závislosti na použité metodě stanovení až 30% výskyt tzv. non-responderů, přičemž se rozlišuje buď laboratorní nebo klinická ASA resistance.

Cílem naší práce bylo zjistit výskyt ASA resistance při měření na novém čtyřkanálovém optickém agregometru APACT 4004 a zjistit rozdíly při měření při použití čtyř rozdílných induktorů, které jsou literárně popsány jako vhodné ke stanovení. Jedná se o agonisty ADP Reagent, Arachidonic Acid(AA), Epinephrin(EPI) a v poslední době často diskutovaný Cationic PropylGallate(CPG). ASA působí ireverzibilní blokádu cyklooxygenázy při procesu syntézy tromboxanu A2 a trvá po celou dobu životnosti trombocytů 7-10 dnů.

### Metoda:

Vyšetření bylo prováděno z PRP(300x10x9/l), žádný z pacientů neměl hladinu destiček nižší než 100x10x9/l, kdy může dojít k ovlivnění výsledku. Nelze stanovit vzorky ikterické, chylózní nebo s jinak pozměněným pozadím. Rozhodujícím měřeným parametrem byla výška maximální amplitudy agregační křivky vyjádřená v procentech.

### Výsledky a závěr:

Za časový úsek 5 měsíců bylo na našem pracovišti vyšetřeno 92 nemocných převážně s kardio a cerebrovaskulárním onemocněním, kterým byla profylakticky podávána ASA, převážně v dávce 100mg. Zároveň zde byla také skupina 13 pacientů užívajících clopidogrel. Sledovali jsme tuto skupinu nemocných pouze z laboratorního hlediska vždy při použití stejné koncentrace všech čtyř zmíněných induktorů v závislosti výsledků agregační odpovědi.

Sledování léčby pomocí agregační křivky po použití induktorů ADP a CPG poskytuje porovnatelné výsledky, s tím že v procentuálním vyjádření bylo v naší skupině naměřena resistance po ADP u 8% pacientů a po přidání CPG u 15% pacientů.

EPI a ADP neposkytuje srovnatelné a interpretovatelné výsledky a proto je nelze pro sledování ASA resistance doporučit. Induktor ADP umožňuje sledovat pouze resistenci na clopidogrel.

### Literatura:

1. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. *A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. J Am Coll Cardiol. 2003 Mar 19;41(6):961-5.*
2. Michelson AD. *Aspirin resistance. Pathophysiol Haemost Thromb. 2006;35(1-2):5-9.*
3. Sanderson S, Emery J, Baglin T, Kinmonth AL. *Narrative review: aspirin resistance and its clinical implications. Ann Intern Med. 2005 Mar 1;142(5):370-80. Review.*



## POKLES KREVŇNÍCH DESTIČEK PO APLIKACI PAGA S NAVÁZANÝMI IONTY NĚKTERÝCH KOVŮ

M. Pecka<sup>1</sup>, J. Břiestenski<sup>2</sup>, J. Malý<sup>1</sup>, E. Pešková<sup>1</sup>, J. E. Dyr<sup>3</sup>

<sup>1</sup> II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie FN a katedra interních oborů

LF UK Hradec Králové

<sup>2</sup> Alltracel Laboratories spol s.r.o., Tišnov

<sup>3</sup> Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

V chirurgické praxi činí velké problémy zastavení silného kapilárního krvácení z parenchymatických orgánů, kde nelze použít mechanického způsobu zástavy krvácení. Běžná hemostatika nemohou být ponechána in situ v organismu a musí být během procesu vyjmuta. Dnes se používají různě modifikované preparáty tzv. oxidovaných celulózy a zejména přípravky na bázi uronových kyselin. Mezi tyto preparáty se řadí výrobky některých zahraničních společností (Surgicel – fy Johnson and Johnson, Alginate – fy Prothane) a také výrobek firmy Alltracel, patříci do skupiny glukuronanů. K účinným hemostyptikům patří i přípravky bílkovinné povahy (derivát kolagenu Avitene - fy Ethicon a jiné). Alltracell je mikrod disperzní vápenato - sodná sůl oxidované celulózy (MDOC). Jedná se o přírodní biokompatibilní, neutrální a resorbovatelné hemostyptikum, jež se ve formě prášku používá k léčbě kapilárního a parenchymatózního krvácení společně s chirurgickou léčbou.

Ve své práci jsme vyšli ze studie amerických autorů (Wagner a spol., 1996), ve které je popsán vliv hemostyptik na pokles počtu trombocytů v plazmě bohaté na destičky. My jsme tuto metodu aplikovali na nesrážlivou krev. Vzorky oxidované celulózy (Alltracel) byly připraveny oxidativní hydrolýzou základního glukuronoglukanu. Jednotlivé studie byly prováděny s nesrážlivou lidskou krví (krev:ACD = 1:8), která byla odebírána v pravidelných intervalech většinou od jednoho dárce. V rámci grafického vyhodnocení byla zjišťována odlišnost směrnic proložených přímkami charakterizujícími pokles krevních destiček v závislosti na čase inkubace s polymerní složkou. Jednotlivá hemostyptika byla porovnána s hodnotami blanku a poměrná zastoupení počtu destiček vzorků ku blanku (podíl jednotek) zanesena do grafů.

Ve studii jsme sledovali pokles krevních destiček v nesrážlivé krvi. Porovnávali jsme účinek přípravků modifikovaných forem PAGA, u kterých byly postupně nahrazeny ionty  $\text{Ca}^{2+}$  ionty:  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ . Srovnávali jsme účinek navázaných kationtů s účinkem PAGA se zavedenou sulfátovou skupinou ( $\text{OSO}_3\text{H}$ ). Potvrdili jsme si, že zavedením sulfátové skupiny do molekuly PAGA klesne podstatně její hemostatická účinnost. Obdobný účinek lze sledovat u heparinu a jeho postupně desulfatovaných modifikací, kdy stoupá jejich antilipidemický a klesá antikoagulační účinek. Různé vlivy jednotlivých kationtů na pokles krevních destiček lze vysvětlit změnou konformace molekuly PAGA, která bude jedním z faktorů, jež ovlivňují počet obsazených aktivních míst na povrchové membráně krevní destičky.

Z prací Catonih (*Cantoni C et al.1998*) a Miertuse (*Miertus S. et al.1995*) vyplývá, že každý kationt specificky ovlivňuje základní konformační uspořádání řetězce PAGA. Ve studii se projevuje výrazný účinek vápenatých iontů, mírnější účinek železitých iontů a pravděpodobně pozdější nástup hlinitých iontů. Všechny tyto látky jsou známy z literatury, jako látky anorganického původu, které ovlivňují systém hemostázy. Ostatní použité ionty vázané ve struktuře PAGA průběh testu neovlivňují.

### **Literatura:**

1. *Cantoni, C., Zennaro, F., Bertocchi, C., Mariotti, P., Rizo, R.: C6-oxidized cellulose. Ion interactions with mono- and divalent cations. Biopolym. 1998; 45:157-163*
2. *Miertus, S., Bertocchi, C., Krempaska, R., Paoletti, S.: Conformational analysis of segments of oxidized cellulose. Part I: Molecular modelling of glucuronic acid dimers considering the effect of counter-ions and a polar environment. Int. J. Biol. Macromol., 1995; 17(3-4):183-8*
3. *Wagner, W.R., Pachence, J.M., Ristich, J., Johnson, J.M.: Comparative in vitro analysis of topical hemostatic agents. J. Surg. Res. 1996; 66:100 - 108.*

*Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.*

## RYCHLÉ KVALITATIVNÍ STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI KOMPLEXU HEPARIN/DESTIČKOVÝ FAKTOR 4

E. Pešková, M. Pecka, J. Malý

*II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie, FN a LF UK Hradec Králové, ČR*

Během antikoagulační léčby heparinem se může u některých pacientů objevit nežádoucí reakce – tzv. heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT). Při HIT dochází k agregaci trombocytů, tvorbě destičkových trombů, a tím k nežádoucí trombotizaci.

HIT se vyskytuje ve dvou formách. Typ 1 vzniká následkem neimunních reakcí, k poklesu trombocytů dochází přímým působením heparinu. Tato trombocytopenie se objeví během prvních dní léčby a po vysazení heparinu se počet trombocytů rychle upravuje. Typ 2 představuje závažnou komplikaci léčby, přímo ohrožuje život nemocného. Trombocytopenie je zde vyvolána tvorbou protilátek proti krevním destičkám. Tyto protilátky se vytvořily buď po předchozím podávání heparinu nebo v průběhu dlouhodobé léčby heparinem. Heparin zde působí jako haptén navázaný na krevní destičku prostřednictvím vazby s destičkovým faktorem 4 (PF4). Protilátky proti krevním destičkám se také mohou vytvořit u osob, u kterých došlo k senzibilizaci proti bílkovinám zvířat, z jejichž orgánů byl použitý heparin vyroben. Protilátky indukují agregaci trombocytů a jejich protrombotický účinek ještě prohlubuje trombofilii a dochází tak ke vzniku žilní či tepenné trombózy nebo embolie (HITT – HIT s trombózou).

Laboratorní diagnostika HIT je problematická, protože laboratorní vyšetření buď nejsou běžně dostupná nebo jsou jejich výsledky k dispozici s časovou prodlevou. V naší laboratoři jsme testovali rychlé a jednoduché kvalitativní stanovení protilátek proti komplexu heparin/PF4 pomocí setu PIFA® Heparin/Platelet Factor 4 Rapid Assay. Tento screeningový, manuálně prováděný test může napomoci rychleji diagnostikovat HIT a snížit tak riziko vzniku trombózy.

Vyšetřovaným materiálem je sérum pacienta. Test PIFA® Heparin/Platelet Factor 4 Rapid Assay je založen na principu imunofiltrace. Pomocí mikročastic s navázaným PF4 dochází k vizualizaci výsledku testu. Dojde-li k navázání protilátky na mikročástici s PF4, nedokáže tato mikročástice, na rozdíl od mikročástice s nenavázanou protilátkou, projít membránovým filtračním systémem. Podle zabarvení „výsledkového okna“ se usuzuje na pozitivní či negativní výsledek testu.

Zatím jsme v naší laboratoři vyšetřili pouze 6 vzorků séra pacientů s podezřením na HIT. Jednalo se o pacienty hospitalizované ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Tři pacienti (1 muž a 2 ženy) měli diagnózu akutní respirační selhání a 1 pacient diagnózu plicní embolie, 1 pacientka diagnózu aplastická anémie vyvolaná léky a 1 pacientka diagnózu sekundární zhoubný novotvar jater. Ve třech případech byl laboratorní nález negativní, ve třech pozitivní.

Pro test PIFA® Heparin/Platelet Factor 4 Rapid Assay je udávána senzitivita 91,3 %, specifická 98,1 %.

Závěrem lze říci, že test PIFA® Heparin/Platelet Factor 4 Rapid Assay slouží jako rychlé, jednoduché, i když bohužel ne levné, screeningové vyšetření HIT, které může napomoci rychlejší diagnóze heparinem indukované trombocytopenie. Samotná přítomnost protilátek proti komplexu heparin/PF4 však nepotvrzuje diagnózu HIT či HITT.

*Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.*

**ÚPRAVA REFERENČNÍCH MEZÍ PRO HEMOKOAGULAČNÍ VYŠETŘENÍ  
BĚHEM GRAVIDITY  
A JEJICH POUŽITÍ U ŽEN S PREEKLAMPSIÍ.**

F. Polák <sup>1</sup>, M. Lipš <sup>1</sup>, P. Kříž <sup>1</sup>, A. Pařízek <sup>2</sup>, J. Kvasnička <sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny VFN v Praze 2 a 1. LF UK*

<sup>2</sup> *Gynekologicko-porodnická klinika VFN v Praze 2 a 1. LF UK*

<sup>3</sup> *Trombotické centrum a 1. interní klinika VFN v Praze 2 a 1. LF UK*

Během fyziologicky probíhajícího těhotenství dochází u žen k posunu koagulační rovnováhy ve smyslu hyperkoagulace. Ačkoliv je tato skutečnost dostatečně známa, není v praxi vždy dostatečně brána na zřetel. Důvodem je jistě i fakt, že jen málokteré pracoviště používá pro hodnocení výsledků koagulace zvláštní (“těhotenská”) referenční rozmezí. Posuzování koagulačních parametrů těhotných žen dle norem pro běžnou populaci může být přitom zavádějící.

V první fázi studie jsme vyšetřili koagulační stav 60 zdravých těhotných žen - u všech byla provedena trombelastografie a podrobné laboratorní koagulační vyšetření. Na základě těchto výsledků jsme vypracovali nová referenční rozmezí pro těhotné ženy.

Ve druhé fázi jsme vyšetřili 40 žen s preeklampsií. Jako normy jsme použili v první fázi vypracovaná referenční rozmezí. Potvrdili jsme, že při použití “těhotenských” norem lze lépe identifikovat koagulačně rizikové pacientky - ať už pro hyperkoagulační nebo hypokoagulační stav.

Kontakt:

MUDr. Ferdinand Polák

KARIM, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze 2 a 1. LF UK U Nemocnice 2

Praha 2, 128 08

ferdinand.polak@vfu.cz

*Grant IGA MZ č. NR/8157-3, VZ 6416502*

## ZKUŠENOSTI SE STATIMOVOU CENTRIFUGOU STAT SPIN® EXPRESS 3

Popelová M., Veselková J., Hrubá P.  
*Oddělení klinické hematologie, FN u sv. Anny v Brně*

Cílem práce je shrnutí našich zkušeností se statimovou centrifugou Stat Spin® Express 3 a srovnání účinnosti centrifugace s běžně používanou centrifugou Hettich Universal 32 R.

Centrifuga Stat Spin® Express 3 firmy Iris Sample Processing – Westwood USA je novou centrifugou, která umožňuje získání bezdestičkové krevní plasmy pro hemokoagulační vyšetření již po 3. minutách centrifugace.

Byla provedena srovnávací studie 50. vzorků, které byly centrifugovány jak v centrifuze Stat Spin® Express 3 po dobu 3. minut rychlostí 7700 ot/min., tak v chlazené centrifuze Hettich Universal 32 R po dobu 15. minut rychlostí 4000 ot/min. U obou skupin byly spočítány hodnoty počtu trombocytů v získané plasmě na hematologickém analyzátoru Sysmex XE 2100 a následně bylo provedeno stanovení hemokoagulačních parametrů - PT, aPTT, fibrinogenu a trombinového času na koagulačním analyzátoru BCS.

Jak v počtu trombocytů, tak v hodnotách hemokoagulačních parametrů nebyly sledány významější odchylky.

Centrifuga Stat Spin® Express 3 je malá stolní centrifuga s osmi pozicemi pro vzorky, uzpůsobenými pro jakýkoliv typ zkumavek. Na základě srovnávací studie a našich zkušeností můžeme centrifugu doporučit do pohotovostního provozu hemokoagulačních laboratoří, kde zkrácení doby vydání výsledku o téměř 15. minut hraje velkou roli u život ohrožujících stavů.

## VÝSKYT MUTACÍ GENU CYP450 2C9\*2 A 2C9\*3 U JEDINCŮ S NEZVYKLOU TERAPEUTICKOU ODEZVOU NA LÉČBU KUMARINY.

J. Prošková, P. Solichová, B. Lačňák, B. Bubeník, D. Stejskal  
*OLM a interní oddělení Šternberk, hematologická ambulance Frýdek Místek*

Úvod: proteiny cytochromu P450 jsou s membránou asociované hemové bílkoviny, které metabolizují fyziologicky důležité látky. Lidské proteiny CYP450 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4 jsou hlavní isoformy, které metabolizují léky. Polymorfismy těchto proteinů mohou vést k poruše účinnosti řady léků.

Mutace CYP450 2C9\*2 a především CYP450\*3 je spojena s vysokým rizikem snadného předávkování kumariny (jedinci s těmito mutacemi jsou pomalí metabolizátoři kumarinů a vyžadují nižší dávky těchto léků k dosažení optimální účinnosti léčby). Tyto dvě mutace se vyskytují až u 30 % populace.

Metodika: v letech 2005 – 2006 bylo vyšetřeno 145 osob s podezřením na uvedené mutace, pacienti byli k vyšetření indikováni z důvodu obtížně nastavitelné terapie kumariny.

Závěr: je dokumentována frekvence výskytu mutace CYP450 2C9\*2 a 2C9\*3 v populaci pacientů léčených kumariny, jejichž reakce na podávanou terapii nebyla obvyklá.

Jsou zmíněny indikace vyšetření, interpretace a možné obtíže s tím spojené.

### Literatura:

1. *Yasar U, Eliasson E, Dahl M-L, Johansson I et al: Validation of methods for CYP2C9 genotyping: Frequencies of mutant alleles in a swedish population, BBRC 254: 628-631(1999)*
2. *Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK: Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. Lancet 353:717-804 (1999)*
3. *Taube J, Halsall D, Baglin T.: Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. Blood 96: 1816-1819 (2000)*

## PRŮKAZ ČTYŘLETÉHO SEBEPOŠKOZOVÁNÍ WARFARINEM – KASUISTIKA.

P. Slezák<sup>1</sup>, M. Urbánková<sup>2</sup>, Z. Jehlíková<sup>2</sup>, K. Tesář<sup>2</sup>, B. Ochodnický<sup>2</sup>, M. Staňková<sup>3</sup>, J. Gumulec<sup>4</sup>, M. Brejcha<sup>4</sup>, J. Minář<sup>4</sup>, P. Smejkal<sup>5</sup>, M. Penka<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Šumperská nemocnice a.s., Hematologická ambulance

<sup>2</sup> Šumperská nemocnice a.s.

<sup>3</sup> FNsP Ostrava, toxikol. laboratoř

<sup>4</sup> OCJGM N.Jičín

<sup>5</sup> FN Brno

39letý pacient byl počátkem roku 2002 opakovaně vyšetřen na interní ambulanci pro susp. flebotrombózu l. bérce. V dubnu 2002 susp. embolisace do plic, odmítl hospitalisaci. Diagnóza nebyla potvrzena, byl nasazen Warfarin. Pro nesrážlivé hodnoty byl Warfarin 17.4.02 vysazen, vysoké hodnoty INR přetrvávaly celý měsíc. Již v té době bylo vysloveno podezření na sebepoškozování. Od té doby trvaly intermitentní vzestupy INR cca v rozmezí 5-14 údajně bez medikace Warfarinu, s krvácením do lokte, s dalšími krvácivými projevy spíše „anamnestickými“. Od června 2002 opakovaně vyšetřen na OKH FN Brno se závěrem – pomalý metabolizátor kumarinů, pro průkaz v.s. chronické neúplné trombot. okluze stř. části VTP pak v období 6/2002 až 9/2003 warfarinisován s opak. nevysvětlitelným kolísáním PT, s pacientem je špatná spolupráce, na kontroly chodí nepravidelně a výsledky zjišťuje pouze telefonicky. V letech 2004 a 2005 již údajně bez medikace kumariny opak. vyšetřován pro nejasné vzestupy PT až na neměřitelné hodnoty. Podávána mražená plazma a Kanavit i.v. – na obojí postupně udává alergii, takže od prosince 2005 podáván Prothromplex a Kanavit p.o. V roce 2006 situace kulminuje, intervaly mezi „atakami“ se zkracují, pacient je v dlouhodobé prac. neschopnosti pro řadu diagnóz – deprese, metabolický syndrom, art. hypertenze, asthma bronchiale. Vzhledem k narůstajícím nákladům na substituci znovu revidovány možnosti průkazu sebepoškozování. V červenci 06 pak byl ve 2 různých vzorcích moči prokázán Warfarin metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. (Chromatograf GC-MS QP 2010 Shimadzu, hmotnostní detektor Quadrapol). Po sdělení výsledku pacient „náhle“ bez krvácivých potíží, byla ukončena prac. neschopnost a přehodnocuje se částečný inv. důchod, který byl přiznán v r.2004. Psychiatr neshledává dřívější známky deprese, hodnotí pacienta jako úzkostnou osobnost s narcistními rysy a pravděpodobně s Münghausenovým syndromem (opakované vyhledávání lékařské péče zpravidla na základě traumatu z dětství...). Předkládaná kasuistika demonstruje užitečnost mezioborové spolupráce hematologů a toxikologů.

**PSYCHOSOCIÁLNÍ A ZDRAVOTNÍ ASPEKTY KVALITY ŽIVOTA  
NEMOCNÝCH S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ  
PO TRANSPLANTACI KRVETVORNÝCH BUNĚK: RETROSPEKTIVNÍ  
ANALÝZA**

L. Slováček <sup>1,2</sup>, B. Slováčková <sup>3</sup>, L. Jebavý <sup>1,2</sup>, M. Blažek <sup>2</sup>, J. M. Horáček <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové*

<sup>2</sup> *II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové*

<sup>3</sup> *Psychiatrická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové*

Transplantace krvinek je léčebná metoda užívaná nejen v terapii hematologických onemocnění, ale i v terapii solidních tumorů a v neposlední řadě i v terapii nenádorových onemocnění. Podobně jako jiné léčebné metody, transplantace krvinek ovlivňuje další průběh onemocnění, a tím i kvalitu života nemocného.

Kvalita života je obecně definována jako „subjektivní posouzení vlastní životní situace“. Pojem kvalita života zahrnuje údaje o fyzickém, psychickém, sociálním a spirituálním stavu jedince. Hodnocení kvality života je prováděno dotazníky, generickými a specifickými. Generické dotazníky všeobecně hodnotí celkový stav nemocného bez ohledu na dané onemocnění. Specifické dotazníky jsou koncipovány pro hodnocení celkového stavu nemocného u konkrétního typu onemocnění nebo pro hodnocení specifického aspektu kvality života (např. bolest, únava, apod.).

***Hlavní cíle studie:***

1. analyzovat vliv vybraných psychosociálních a zdravotních aspektů na kvalitu života nemocných s akutní myeloidní leukémií po transplantaci krvinek na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN v Hradci Králové.
2. zhodnotit globální kvalitu života nemocných s akutní myeloidní leukémií po transplantaci krvinek na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN v Hradci Králové.

***Typ studie, sběr dat:***

-lokální, transverzální, retrospektivní, deskriptivní. Data získaná v průběhu roku 2004 (září – prosinec) od 12 nemocných s akutní myeloidní leukémií po transplantaci krvinek. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

***Pacienti a metodika:***

Celkový počet nemocných s akutní myeloidní leukémií po transplantaci krvinek na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové v letech 2001-2003 byl **31**. Počet zemřelých nemocných byl **7**, počet retransplantovaných nemocných byl **5**. Počet nemocných k otestování byl **19** (9 nemocných po autologní transplantaci, 3 nemocní po alogenní transplantaci). Počet respondentů byl **12** (63% návratnost dotazníků). Věkový medián byl 47,5 roku, poměr muži / ženy byl 1,17 / 1. Hodnotitelných dotazníků bylo 100%. Všichni alogenně transplantovaní nemocní měli projevy chronické GVHD 1. stupně.



### *Metoda:*

Byla použili česká verze mezinárodního generického dotazníku European Quality of Life Questionnaire - Version EQ-5D. Dotazník hodnotí 2 ukazatele, objektivní a subjektivní. Objektivní ukazatel zahrnuje 5 dimenzí kvality života: pohyblivost, sebeobsluha, obvyklá činnost, bolest / obtíže, úzkost / deprese. Ke každé otázce jsou nabídnuty tři stupně odpovědi vyjadřující stupeň obtíží (bez obtíží, mírné obtíže, těžké obtíže). Celkem vzniká 243 kombinací zdravotního stavu. Výstupem je EQ-5D skóre (dimenze kvality života) nabývající hodnot 0-1 (0 – nejhorší zdravotní stav, 1 - nejlepší zdravotní stav). Subjektivní ukazatel zahrnuje vizuální analogovou škálu (hodnota 100 - nejlepší zdravotní stav, hodnota 0 - nejhorší stav), respondent vyznačí svůj subjektivně vnímaný zdravotní stav na stupnici tzv. termometru. Výstupem je EQ-5D VAS (subjektivní zdravotní stav) nabývající hodnot 0-100. Dotazníky s průvodním dopisem vysvětlující danou akci a s ofrankovanou obálkou byl zaslán na adresu respondentů. Vyhodnocení dotazníků bylo provedeno deskriptivní analýzou - v souladu s metodikou European Quality of Life Group.

### *Analýza dat:*

Vliv sledovaných vybraných aspektů (**věk, pohlaví, vzdělání, rodinný stav, polymorbidita, nikonismus, religiozita, typ transplantace krvinek a časový odstup od provedení transplantace krvinek**) na globální kvalitu života nemocných s akutní myeloidní leukémií po transplantaci krvinek byl proveden analýzou rozptylu ANOVA. Hladina statistické významnosti byla zvolena 5% (0,05).

### *Výsledky:*

Z výše uvedených aspektů jsme prokázali statisticky velmi významnou závislost EQ-5D skóre a EQ-5D VAS na **věku** (v obou případech  $p < 0,01$ ), statisticky významnou závislost EQ-5D skóre a EQ-5D VAS na **religiozitě** (v obou případech  $p < 0,05$ ), statisticky velmi významnou závislost EQ-5D skóre a EQ-5D VAS na **nikonismu** (v obou případech  $p < 0,01$ ) a statisticky významnou závislost EQ-5D skóre a EQ-5D VAS na **vzdělání** a **polymorbiditě** (v obou případech  $p < 0,05$ ).

S přibývajícím věkem a počtem přidružených onemocnění je signifikantně nižší globální kvalita života. Věfící nemocní mají vyšší globální kvalitu života v porovnání s nemocnými bez náboženského vyznání. Nižší globální kvalita života byla zaznamenána u nekuřáků. Vyšší globální kvalita života byla zaznamenána u nemocných se středoškolským a vysokoškolským vzděláním.

### *Diskuse a závěr:*

Globální kvalita života nemocných s akutní myeloidní leukémií po transplantaci krvinek na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci králové je na velmi dobré úrovni, o čemž vypovídají i průměrné hodnoty EQ-5D skóre (75,1%) a EQ-5D VAS (67,5%).

V klinické praxi je běžné posuzovat zdravotní stav pacienta a úspěšnost léčby pouze v jedné medicínské rovině, nejčastěji pomocí somatických, laboratorních a zobrazovacích markerů. Trendem moderní medicíny však je posuzovat stav pacienta komplexněji, za pomoci i dalších aspektů. Více dimenzionální měřítko k posouzení celé řady životních

aspektů představuje kvalita života. Různé aspekty mohou být v různé fázi onemocnění a léčby rozdílně zasaženy. A právě tyto informace obohacují naše poznání o potřebách pacienta a mohou tak významně přispět ke zkvalitnění péče. Také nám mohou odhalit mechanismy, které modifikují vznik a průběh onemocnění.

V zahraničí jsou velmi dobré zkušenosti s tzv. „Quality of Life Team“ personálně obsazených ošetřujícím lékařem - hematolog / onkolog s erudicí pro transplantologii krvetvorných buněk, střední a vyšší zdravotnický personál edukovaný v problematice kvality života nemocných, klinický psycholog, psychoterapeut, sociální pracovník a data manager. Důvodem zřízení těchto speciálních týmů je zajištění péče o nemocného a jeho rodinu s přípravou prostředí, do kterého se nemocný vrací po proběhlé transplantaci krvetvorných buněk a které ovlivňuje jeho adaptaci.

Do budoucna bychom rádi navázali na tuto studii prospektivní studií longitudinálního charakteru zaměřenou na hodnocení kvality života ve vztahu ke zdraví, která bude více orientovaná na charakteristiky příslušných onemocnění, způsobů předtransplantačních cytostatických režimů a typu transplantace.

#### **Literatura:**

1. Hacker ED. *Quantitative measurement of quality of life in adult patients undergoing bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation: a decade in review. Oncol Nurs Forum 2003, 30 (4): 613-29*
2. Wong R, Giralt SA, Martin T et al. *Reduced-intensity conditioning for unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation as treatment for myeloid malignancies in patients older than 55 years. Blood 2003, 102 (8): 3052-9*

*Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.*

## GLOBÁLNÍ KVALITA ŽIVOTA NEMOCNÝCH S MNOHOČETNÝM MYELOMEM A MALIGNÍM LYMFOMEM PO TRANSPLANTACI KRVETVORNÝCH BUNĚK: RETROSPEKTIVNÍ ANALÝZA

L. Slováček<sup>1,2</sup>, B. Slováčková<sup>3</sup>, L. Jebavý<sup>1,2</sup>, J. M. Horáček<sup>1,2</sup>, M. Blažek<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové

<sup>2</sup> II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové

<sup>3</sup> Psychiatrická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové

### **Cíle studie:**

1. analyzovat vliv vybraných faktorů na globální kvalitu života nemocných s mnohočetným myelomem a maligním lymfomem po transplantaci krvetvorných buněk na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové.

2. zhodnotit globální kvalitu života nemocných s mnohočetným myelomem a maligním lymfomem po transplantaci krvetvorných buněk na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové.

### **Typ studie, sběr dat:**

-lokální, transverzální, retrospektivní, deskriptivní. Data získaná v průběhu roku 2004 (září – prosinec) od 56 nemocných s mnohočetným myelomem a maligním lymfomem po transplantaci krvetvorných buněk. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

### **Pacienti a metodika:**

Celkový počet nemocných a mnohočetným myelomem a maligním lymfomem po transplantaci krvetvorných buněk na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové v letech 2001-2003 byl **122** (70 nemocných s mnohočetným myelomem, 52 nemocných s maligním lymfomem, z toho 46 autologně a 6 alogenně transplantovaných). Počet zemřelých nemocných byl **36** (16 nemocných s mnohočetným myelomem, 20 nemocných s maligním lymfomem). Počet retransplantovaných nemocných byl **6** (3 nemocní s mnohočetným myelomem, 3 nemocní s maligním lymfomem). Počet nemocných k otestování byl **80** (51 nemocných s mnohočetným myelomem, 29 nemocných s maligním lymfomem). Počet respondentů byl **56** (70% návratnost dotazníků), tj. **32** nemocných s mnohočetným myelomem (18 mužů, 14 žen), **24** nemocných s maligním lymfomem (11 mužů, 13 žen, všichni po autologní transplantaci krvetvorných buněk). Věkový medián u nemocných s mnohočetným myelomem byl 60 let, u nemocných s maligním lymfomem 44,5 roku. Hodnotitelných dotazníků bylo 100%.

### **Metoda:**

Byla použita česká verze mezinárodního generického dotazníku European Quality of Life Questionnaire - Version EQ-5D. Dotazník hodnotí 2 ukazatele, objektivní a subjektivní. Objektivní ukazatel zahrnuje 5 dimenzí kvality života: pohyblivost, sebeobsluha, obvyklá činnost, bolest / obtíže, úzkost / deprese. Ke každé otázce jsou nabídnuty tři stupně odpovědi vyjadřující stupeň obtíží (bez obtíží, mírné obtíže, těžké obtíže). Celkem vzniká 243 kombinací zdravotního stavu. Výstupem je EQ-5D skóre (dimenze kvality života) nabývající hodnot 0-1 (0 – nejhorší zdravotní stav, 1 - nejlepší zdravotní stav). Subjektivní

ukazatel zahrnuje vizuální analogovou škálu (hodnota 100 - nejlepší zdravotní stav, hodnota 0 - nejhorší stav), respondent vyznačí svůj subjektivně vnímaný zdravotní stav na stupnici tzv. termometru. Výstupem je EQ-5D VAS (subjektivní zdravotní stav) nabývající hodnotu 0-100. Dotazníky s průvodním dopisem vysvětlující danou akci a s ofrankovanou obálkou byl zaslán na adresu respondentů. Vyhodnocení dotazníků bylo provedeno deskriptivní analýzou - v souladu s metodikou European Quality of Life Group.

#### ***Analýza dat:***

Vliv sledovaných vybraných faktorů (věk, pohlaví, vzdělání, rodinný stav, polymorbidita, nikonismus, religiozita, typ onemocnění a časový odstup od provedení transplantace krvevorných buněk) na globální kvalitu života nemocných po transplantaci krvevorných buněk byl proveden analýzou rozptylu ANOVA. Hladina statistické významnosti byla zvolena 5% (0,05).

#### ***Hlavní výsledky studie:***

Z výše uvedených faktorů jsme prokázali statisticky velmi významnou závislost EQ-5D skóre a EQ-5D VAS na **věku** u obou kohort nemocných (v obou případech  $p < 0,01$ ), statisticky významnou závislost EQ-5D skóre a EQ-5D VAS na **abusu kouření** u nemocných s mnohočetným myelomem (v obou případech  $p < 0,05$ ) a statisticky velmi významnou závislost EQ-5D skóre a EQ-5D VAS na **typu onemocnění** (v obou případech  $p < 0,01$ ).

S přibývajícím věkem je signifikantně nižší globální kvalita života u obou kohort nemocných. Vyšší kvalita života byla zaznamenána u nekuřáků v kohortě nemocných s mnohočetným myelomem. Nižší kvalita života byla zaznamenána u nemocných s mnohočetným myelomem v porovnání s nemocnými s maligním lymfomem. Z dimenzí kvality života podílejících se na tomto nepříznivém výsledku u nemocných s mnohočetným myelomem se jedná zejména o dominující bolest a obtížnou sebeobsluhu. Vliv ostatních faktorů na EQ-5D skóre a EQ-5D VAS se jako statisticky významný neprokázal.

#### ***Diskuse a závěr:***

Při porovnání kohorty nemocných s mnohočetným myelomem a maligním lymfomem byla prokázána statisticky velmi významná závislost globální kvality života nemocných po transplantaci krvevorných buněk na typu onemocnění. Zaznamenali jsme nižší globální kvalitu života u kohorty nemocných s mnohočetným myelomem (EQ-5D skóre **68,9** a **EQ-5D VAS 66,6**) v porovnání s kohortou nemocných s maligním lymfomem (EQ-5D skóre **82,7** a EQ-5D VAS **76,7**).

Dominujícími obtížemi u kohorty nemocných s mnohočetným myelomem jsou: 1. obvyklá činnost s potížemi 81,2% (26/32 respondentů), 2. středně závažná bolest / obtíže 68,8% (22/32 respondentů), 3. pohyblivost s potížemi 59% (19/32 respondentů), 4. středně závažná úzkost / deprese 59% (19/32 respondentů).

Dominujícími obtížemi u kohorty nemocných s maligním lymfomem jsou: 1. středně závažná bolest / obtíže 33,3% (8/24 respondentů), 2. pohyblivost s potížemi 29,2% (7/24 respondentů), 3. obvyklá činnost s potížemi 25% (6/24 respondentů), 4. středně závažná úzkost / deprese 20,8% (5/24 respondentů).

Pokud je nám známo, je naše studie spolu se studií České myelomové společnosti z roku 2002 hodnotící kvalitu života a toleranci udržovací léčby u nemocných s mnohočetným myelomem jednou z mála českých studií týkající se kvality života u hematologických nemocných. Studie mapuje kvalitu života u nemocných s mnohočetným myelomem

a maligním lymfomem po transplantaci krvetvorných buněk. Do budoucna bychom rádi navázali na tuto studii longitudinální studií, zaměřenou na hodnocení kvality života ve vztahu ke zdraví, která bude více orientovaná na charakteristiky příslušných onemocnění, způsobů předtransplantační přípravy a typu transplantace.

**Literatura:**

1. Boyle D, Blodgett L, Gnesdiloff S et al. Caregiver quality of life after autologous bone marrow transplantation. *Cancer Nurs* 2000, 23 (3): 193-203
2. Van Agthoven M, Vellens E, Fibbe WE et al. Cost analysis and quality of life assessment comparing undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation or autologous bone marrow transplantation for refractory or relapsed non-Hodgkins lymphoma or Hodgkins disease, a prospective randomised trial. *Eur J Cancer* 2001, 37 (14): 1781-9.

**PLASMA LEVELS OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF), BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR (bFGF) AND SOLUBLE ENDOGLIN (sCD105) IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA: IMPACT OF TREATMENT WITH IMATINIB MESYLATE.**

L. Smolej<sup>1</sup>, J. Voglová<sup>1</sup>, C. Andrýs<sup>2</sup>

<sup>1-2nd</sup> *Department of Internal Medicine, Department of Clinical Hematology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové, Czech Republic*

<sup>2</sup> - *Institute of Clinical Immunology and Allergology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové, Czech Republic*

Introduction: Angiogenesis is nowadays considered an important factor in biology of various hematological malignancies including chronic myeloid leukemia (CML). Several studies have recently reported elevated levels of angiogenic activators such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in CML patients. However, there have been only few data on the influence of imatinib mesylate (IM) treatment on the levels of angiogenic cytokines in CML. Aims: To analyze peripheral blood levels of angiogenic activators in patients with newly diagnosed CML and during imatinib treatment. Methods: We measured plasma concentrations of VEGF, bFGF and soluble endoglin (sCD105) using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 16 patients with chronic-phase CML and 80 healthy blood donors; furthermore, repeated samples during the therapy with (IM) were analyzed. Results: We found a statistically significant increase in VEGF (mean +/- SD [standard deviation], 491.0 +/- 365.3 vs. 64.2 +/- 69.5 pg/ml, 95% CI [confidence interval] of mean, 296.4-685.7 vs. 51.0-77.5 pg/ml,  $p < 0.0001$ ) and sCD105 (mean +/- SD, 7.0 +/- 1.95 vs. 4.57 +/- 1.51 ng/ml, 95% CI of mean, 5.83-8.18 vs. 4.20-4.93 ng/ml,  $p < 0.0001$ ) but not bFGF ( $p = 0.606$ ) in comparison to the control group. VEGF levels significantly decreased in 7 patients who achieved hematological remission (6 complete remissions, 1 partial remission) during therapy with IM (mean +/- SD, 679.6 +/- 431.5 vs. 132.7 +/- 63.3 pg/ml, 95% CI, 280.6-1078.6 vs. 74.1-191.3 pg/ml,  $p = 0.015$ ). There was no significant change in bFGF or sCD105 ( $p = 0.938$  and  $0.125$ , respectively). Conclusions: We found significantly elevated VEGF and sCD105 levels in CML patients. In addition, successful treatment with IM resulted in significant decrease of VEGF. These data lend further support to the importance of angiogenesis in pathophysiology of CML. Further studies incorporating larger number of patients are needed to confirm our findings.

*Supported by research project MZO 00179906 from Ministry of Health of Czech Republic*

## KOMPLEXNÍ HODNOCENÍ ANGIOGENEZE U CHRONICKÉ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE: MIKROVASKULÁRNÍ DENZITA, ANGIOGENNÍ CYTOKINY A CÍRKULUJÍCÍ MIKROPARTIKULE.

L. Smolej<sup>1</sup>, C. Andrýs<sup>2</sup>, P. Kašparová<sup>3</sup>, D. Vokurková<sup>2</sup>, D. Belada<sup>1</sup>, P. Žák<sup>1</sup>,  
M. Hrudková<sup>1</sup>, J. Krejsek<sup>2</sup>, O. Široký<sup>1</sup>, J. Malý<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*II.interní klinika, Oddělení klinické hematologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové*

<sup>2</sup>*Ústav klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové*

<sup>3</sup>*Fingerlandův ústav patologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové*

**Úvod:** Angiogeneze (AG), tedy tvorba cév z existující vaskulatury, hraje významnou roli v patogenezi a progresi zhoubných nádorů. V posledních 10 letech došlo k mohutnému rozvoji výzkumu AG v oblasti hematologických malignit. Zvýšená AG byla prokázána u akutních i chronických leukémií, lymfomů, mnohočetného myelomu, myelodysplastických i myeloproliferativních onemocnění. Charakteristickým rysem chronické lymfocytární leukémie (CLL) je vysoká různorodost stran prognózy – třetina nemocných nikdy nevyžaduje léčbu a délka jejich přežití je prakticky shodná se zdravými vrstevníky, naproti tomu někteří nemocní s agresivním průběhem choroby žijí méně než 5 let. Dosavadní stagingové systémy dle Raie a Bineta nejsou schopny identifikovat nemocné prezentující se v úvodu nízkou nádorovou masou, kteří mají přesto velmi nepříznivou prognózu a chemorezistentní onemocnění. Proto se hledají nové prognostické faktory, které by napomohly k přesné stratifikaci nemocných dle rizika a umožnily více individualizovat intenzitu a typ léčby. Recentní publikace vyzdvihují v tomto smyslu význam AG pro progresi CLL a citlivost na léčbu. Cílem studie bylo komplexní hodnocení angiogeneze v periferní krvi i kostní dřeni u nemocných s CLL. Metodiky: AG jsme hodnotili třemi odlišnými metodami: 1) stanovením koncentrací angiogenních cytokinů (VEGF, bFGF, sCD105, endostatin) v periferní krvi, pomocí sendvičové ELISA; 2) hodnocením neovaskularizace v kostní dřeni pomocí imunohistochemického průkazu endoteliálního antigenu vWF a stanovením tzv. mikrovaskulární denzity (MVD); 3) analýzou fragmentů endoteliálních buněk, tzv. endoteliálních mikropartikulí v plazmě CLL pacientů pomocí vícebarevné průtokové cytometrie. Výsledky: U všech cytokinů měřených ELISA v periferní krvi bylo nalezeno statisticky signifikantní zvýšení v porovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků; nejvyšší rozdíl byl zjištěn v koncentracích zásaditého růstového faktoru pro fibroblasty (bFGF). MVD byla statisticky signifikantně zvýšena u CLL v porovnání s kontrolními preparáty; zjistili jsme signifikantní zvýšení neovaskularizace ve dřeni CLL pacientů nezávisle na typu infiltrace. Počet endoteliálních mikropartikulí stanovených pomocí znaku CD144 a kombinace znaků CD41/144 byl také signifikantně zvýšen u pacientů s CLL. Závěr: Zjistili jsme zvýšení angiogenních cytokinů a endoteliálních mikropartikulí v periferní krvi i zvýšenou neovaskularizaci ve dřeni u nemocných s CLL a tím potvrdili významnou úlohu angiogeneze v patogenezi CLL. Tento výzkum je důležitý nejen diagnosticky a prognosticky, ale do budoucna bude přínosný i pro volbu typu léčby, terapii, neboť již nyní se v rámci klinických studií používají preparáty s antiangiogenním působením, např. thalidomid a lenalidomid.

*Podpořeno grantem č. 8373-3 IGA MZ ČR a grantem Ligy proti rakovině Praha.*

## VZNIK OXIDAČNĚ MODIFIKOVANÝCH BÍLKOVIN BĚHEM AKTIVACE KREVNÍCH DESTIČEK

A. Sobotková, J. Suttnar, J. E. Dyr  
*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, ČR*

Interakce krevních destiček s endotelem cévní stěny slouží řadě fyziologických (tvorba trombu) ale i pathofyziologických (atherotrombotické choroby) procesů. Aktivační kaskáda destiček je velmi přesně regulována, zahrnuje interakci destičkových receptorů s endotelem, „rolování“ destiček po povrchu endotelu, adhezi, agregaci a finální tvorbu trombu<sup>1</sup>. Mezi dobře známé regulační faktory patří oxid dusnatý (NO) spadající do skupiny reaktivních forem dusíku (RNS), prostacyklin (PGI<sub>2</sub>) a reaktivní formy kyslíku (ROS). ROS a RNS mohou být jak exogenního tak endogenního původu. Intracelulárně vzniklé ROS se zapojují do signalizačních mechanismů. Tyto látky mohou způsobit oxidační modifikaci přítomných destičkových bílkovin a tím vstupovat do mechanismů ovlivňujících aktivaci.

Cílem této práce bylo zjistit, který z agonistů aktivace krevních destiček způsobuje vznik oxidační modifikace bílkovin. Destičky jsme aktivovali pěti různými agonisty kolagenem, trombinem, kyselinou arachidonovou, ADP a TRAPem (thrombin receptor activating peptide) jako kontrolu jsme použili neaktivované krevní destičky.

Promyté krevní destičky zdravých dárců v Tyrodovém pufru za přítomnosti fibrinogenu byly aktivovány, agregační odezvu jsme měřili turbidimetrickou metodou. Sediment aktivovaných destiček i kontrol byl lyzován dodecylsulfátem sodným (SDS) a pro průkaz karbonylových skupin v bílkovinách byl přidán dinitrofenyl hydrazin (DNPH). Destičkové bílkoviny byly rozděleny jednorozměrnou elektroforézou v gradientovém polyakralamidovém gelu za přítomnosti SDS (SDS-PAGE). Dinitrofenylhydrazinové produkty karbonylovaných derivátů bílkovin byly detegovány imunoblottingem. Zóny karbonylovaných bílkovin obarvené koloidní Coomassie Blue byly zpracovány pro analýzu metodou hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF<sup>2</sup>. Naměřené výsledky jsme vyhodnotili pomocí databáze Swiss-Prot ([www.expasy.org/sprot](http://www.expasy.org/sprot)).

Při aktivaci trombinem byly identifikovány 3 zóny modifikovaných bílkovin. Jedná se o talin, vinkulin a integrin  $\alpha$ IIb. Integrin  $\alpha$ IIb je oxidován i během aktivace kyselinou arachidonovou. Cytoskeletární bílkoviny vinkulin a talin se spolu s dalšími ( $\alpha$ -actinin, actin atd.) podílejí na aktivaci integrinu  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Z výsledků je patrné, že oxidace těchto cytoskeletárních bílkovin je pravděpodobně nedílnou součástí reorganizace cytoskeletonu a je pravděpodobně významná pro následné procesy aktivační kaskády krevních destiček.

### Literatura:

1. Krötz F., Sohn H., Pohl U.: *Reactive Oxygen Species; Players in the Platelet Game. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1988-1996 (2004).
2. Maguire P.B.: *Platelet Proteomics: Identification of Potential Therapeutic Targets. Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33, 481-486 (2003/2004).

*Tato práce vznikla za podpory grantu VZ ÚHK MZ 00002373601.*



## LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA RELAPSU AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKEMIE V CNS: KAZUISTIKA.

M. Špaček<sup>1</sup>, L. Bezdíčková<sup>1</sup>, H. Machová<sup>2</sup>, S. Peková<sup>3</sup>, P. Lemež<sup>1</sup>, P. Pavlíček<sup>1</sup>, T. Kozák<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady, Praha a 3. lékařská fakulta UK

<sup>2</sup> Klinika neurologie FN Královské Vinohrady, Praha

<sup>3</sup> Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie, Nemocnice Na Homolce, Praha

**Úvod.** Extramedulární (EM) relaps akutní promyelocytární leukemie (AML M3) je relativně vzácný. Pravděpodobně v souvislosti se zlepšeným přežíváním pacientů po zavedení terapie kombinací all-*trans* retinové kyseliny (ATRA) a chemoterapie bylo v posledním desetiletí publikováno více případů izolovaného EM relapsu i EM postižení spojeného s relapsem v kostní dřeni (KD). V 6/2006 jsme prokázali relaps AML M3 v centrálním nervovém systému (CNS) u 71-letého muže. Nemocný byl diagnostikován v 5/2004 s 9,6 G/l leukocytů (34,5 % atypických promyelocytů), PML/RAR $\alpha$ (bcr3), CD33+34+2+cyMPO+ HLA-DR- imunofenotypem leukemických buněk jako AML M3v. Byl léčen indukci dle protokolu AIDA, modifikovanou vzhledem k věku a komorbiditám: ATRA 45 mg/m<sup>2</sup>/d + idarubicin 12 mg/m<sup>2</sup>/d D2, 4, 6. Kompletní hematologické i molekulární remise bylo dosaženo 41. den indukce (Real-Time PCR). Pro kardiální selhávání a infekční komplikace nebyla podána konsolidace. Byla indikována udržovací terapie kombinací ATRA, methotrexátu a 6-merkaptopurinu. V 6/2006 byl pacient hospitalizován pro alteraci celkového stavu a difúzní kognitivní deficit. **Metody.** Mozkomíšni mok byl vyšetřen standardními technikami, preparáty k morfologickému hodnocení byly připraveny sedimentací buněk. Průtokovou cytometrií byly analyzovány 2 ml čirého likvoru, periferní krev (PK) a KD, panel monoklonálních protilátek byl zvolen dle imunofenotypu při diagnóze (3-barevné značení: anti-CD13/14/45, 45/34/2, 8/4/3, 15/33/45). Pro molekulárně-biologické vyšetření byly leukemické buňky ze vzorku likvoru izolovány centrifugací a lyzovány v roztoku TriReagent. Izolovaná RNA byla pomocí náhodných hexamerů transkribována do cDNA, která byla následně použita jako templát pro kvantitativní Real-Time PCR k detekci transkriptu PML/RAR $\alpha$ (bcr3). Jako kontrolní gen byl použit ABL. KD byla zpracována obdobně, navíc byla provedena kvantifikace PML/RAR $\alpha$ (bcr3). **Výsledky.** Morfologické a imunofenotypizační vyšetření KD i PK v době CNS relapsu neprokázalo přítomnost leukemických promyelocytů. V KD byl detekován transkript PML/RAR $\alpha$ (bcr3). V likvoru bylo nalezeno erytrocytů 40/3  $\mu$ l, leukocytů 154/3  $\mu$ l; 38 % leukocytů činily atypické promyelocyty, ojediněle s Auerovými tyčemi. Průtokovou cytometrií bylo na populaci leukocytů likvoru detekováno 9,4 % atypických mononukleárů, které vykazovaly >30% pozitivitu CD33, 15, 34, 2. Molekulárně-geneticky byla potvrzena přítomnost PML/RAR $\alpha$ (bcr3). **Závěr:** Morfologickými, imunofenotypizačními a molekulárně-biologickými metodami se nám podařilo prokázat relaps AML M3v v mozkomíšním moku. Současně byl v KD zachycen tento relaps pouze Real-Time PCR. Kombinací intrathékální chemoterapie a radioterapie krania došlo k vymizení leukemické infiltrace z likvoru a úpravě klinického stavu. Pacient měl 2/3 rizikových faktorů EM postižení: >10 G/l, bcr3 izoforma PML/RAR $\alpha$ , AML M3v (de Botton et al). Relaps navíc mohl být usnadněn léčbou s nedostatečným průnikem do CNS.

### Literatura:

1. de Botton S, Sanz MA, Chevret S et al. Extramedullary relapse in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy. *Leukemia* 2006;20:35-41.
2. Breccia M, Carmosino I, Diverio D et al. Early detection of meningeal localization in acute promyelocytic leukaemia patients with high presenting leucocyte count. *British Journal of Haematology* 2003; 120:266-270.

## HODNOCENÍ INTERNÍCH KONTROL KVALITY V KOAGULAČNÍ LABORATOŘI

P. Straková, J. Zavřelová, M. Méhešová, M. Matýšková, M. Penka  
*Oddělení klinické hematologie, FN Brno*

K provádění interní kontroly kvality (IKK) v hemokoagulační laboratoři se používá sestava kontrolních materiálů, které se analyzují současně se vzorky pacientů. Kontrolní vyšetření nestačí pouze provádět, ale je nutné je bezprostředně vyhodnocovat. Způsob hodnocení IKK včetně zodpovědností pro konkrétní metodu v dané laboratoři musí být popsán ve standartním operačním postupu. V koagulační laboratoři se provádí nejen kontroly přesnosti (v sérii, čase), ale i správnosti, v případě používání více přístrojů po dané vyšetření i porovnatelnost přístrojů.

V rámci kontroly správnosti se vyšetřují většinou dva nezávislé komerční kontrolní materiály (normální a patologické) s přesně udanou hladinou testovaného parametru a uvedením povolených odchylek. Vyhodnocení kontrol správnosti se provádí porovnáním naměřené hodnoty s povoleným rozmezím.

Kontrola přesnosti je opakovaná analýza (v sérii, v čase) stejného kontrolního materiálu, který nemusí mít určený obsah analyzovaného parametru. Číselný vyjádřením těsnosti shody mezi výsledky opakovaných měření (přesnosti) je směrodatná odchylka (SD) od aritmetického průměru ( $\bar{x}$ ) nebo variační koeficient (CV). K vyhodnocení kontrol přesnosti jsou potřeba speciální statistické programy. Při kontrole přesnosti v čase se bezprostředně po analýze kontrolních materiálů statisticky vyhodnotí také tzv. kontrolní ( $\bar{x} \pm 2SD$ ) event. varovné rozmezí ( $\bar{x} \pm 3SD$ ). Praktický význam má grafické znázorňování výsledků kontrol do Levey- Jenninsových grafů. Aplikace Westgardových pravidel při vyhodnocování kontrol není v koagulaci běžná. Výsledky kontrol by se měly pohybovat v kontrolním rozmezí, výjimečně v rámci varovného rozmezí, překročení varovného rozmezí není přípustné vůbec. Naměřené hladiny by měly kolísat kolem aritmetického průměru, neměly by vykazovat stoupající ani klesající trend. Při hodnocení kontrol přesnosti se řídíme doporučenými údaji (CV) výrobce koagulometrů a diagnostických setů. Laboratoř si však může stanovit vlastní, třeba i přísnější kritéria (povolené rozmezí, CV).

Porovnatelnost přístrojů se provádí většinou vyšetřením čerstvě odebraných vzorků, po kalibracích vyšetřením komerčních materiálů v rámci kontroly správnosti a následným statistickým výpočtem CV. Hodnocení porovnatelnosti přístrojů se provádí dle doporučených nebo vlastních kritérií.

Pokud výsledky kontrolních měření (správnosti, přesnosti, porovnatelnosti) vychází mimo povolená rozmezí, je nutné hledat příčinu a celou sérii vyšetření zopakovat.

Na našem pracovišti provádíme, kromě bezprostředního vyhodnocení výsledků kontrol po analýze, také čtvrtletní přezkoumávání výsledků kontrol vedením, které umožňuje kvantitativní i kvalitativní porovnání s předchozími obdobími, mezi jednotlivými koagulometry.

V naší práci prezentujeme příklady IKK včetně vyhodnocení výsledků kontrolních měření.

### Literatura:

1. Plzák Z., Koruna I., Friedecký B., Kratochvíla J.: *Metrologická terminologie v analytické laboratoři*. SEKK Pardubice 2003.
2. Matýšková M., Zavřelová J., Matýšek S.: *Systém managementu jakosti: Využití v laboratoři*, IDVPZ Brno 2002.

## VLIV PRODUKTŮ OXIDAČNÍHO STRESU NA FUNKČNÍ VLASTNOSTI FIBRINOGENU

J. Štikarová, M. Chytilová, A. Sobotková, J. Suttnar  
*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, ČR*

Oxidační stres je stav organismu, jehož příčinou je nerovnováha mezi oxidačně a antioxidačně působícími látkami. Během něj dochází k nekontrolovatelnému vzniku volných radikálů, které po překročení určitého množství mohou přispívat ke vzniku nebo rozvoji různých onemocnění (rakovina, infarkt myokardu). Mezi nejsnáze modifikovatelné plazmatické bílkoviny patří fibrinogen. Fibrinogen (Fbg) je glykoprotein o relativní molekulové hmotnosti 343 000. Skládá se ze tří neidentických párů řetězců spojených disulfidovými vazbami. Působením trombinu dochází k odštěpení fibrinopeptidů, tvorbě fibrinmonomeru a následně polymerizaci až na fibrinovou síť.

V této práci jsme studovali změny Fbg způsobené látkami vznikajícími při oxidačním stresu. Tyto modifikace mohou mít vliv na funkční vlastnosti Fbg nutné pro tvorbu fibrinové sítě a interakci s krevními destičkami.

Jako model oxidačního stresu v organismu byly použity dva systémy. Chlornan sodný simulující působení chlornanových anionů uvolněných při aktivaci buněk imunitního systému a metmyoglobin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> představující působení peroxyproteinradikálů na ostatní bílkoviny. Metmyoglobin byl připraven působením hexakvanoželezitanu draselného na myoglobin a následně přečištěn gelovou filtrací na koloně Sephadexu G-10.

Pomocí zákalových křivek byla sledována kinetika vzniku fibrinové sítě působením trombinu na oxidovaný a nativní fibrinogen. Zároveň byla pomocí HPLC sledována kinetika odštěpování fibrinopeptidů trombinem. Dále byla sledována adheze izolovaných krevních destiček na oxidovaný a nativní Fbg sorbovaný na mikrotitrační destičce. Oxidační modifikace aminokyselin Fbg byly sledovány spektrofotometricky stanovením karbonylových skupin derivatizovaných dinitrofenylhydrazinem (DNPH) při 370 nm. Pro sledování modifikace jednotlivých řetězců Fbg byla využita SDS-PAGE s následnou imunochemickou detekcí.

Z měření vyplývá, že použité modifikační systémy mají schopnost oxidovat Fbg a tím ovlivnit jak jeho strukturu, tak jeho funkci. Ve Fbg oxidovaném zvolenými systémy byl detegován nárůst obsahu karbonylových skupin oproti kontrolnímu Fbg. Po působení obou modifikačních systémů byl ve Fbg zjištěn vznik tyrosylových radikálů. Modifikace Fbg oběma systémy vedla k poklesu počtu adherovaných destiček. Uvedená data ukazují na možnost ovlivňování tvorby fibrinové sítě a adheze destiček v místě tvorby reaktivních kyslíkových a dusíkatých látek.

### Literatura:

1. Vadseth C., Souya J.M., Thomson L., Seagraves A., Nagaswami Ch., Scheiner T., Torbet J., Vilaire G., Bennett J.S., Murciano J.-C., Muzykantov V., Penn M.S., Hazen S.L., Weisel J.W., Ischiropoulos H.: *J. Biol. Chem.* **279**, 8820 (2004).
2. Shacter E., Williams J.A., Levine R.L.: *Free Rad. Biol. & Med.* **18**, 815 (1995).

*Tato práce vznikla za podpory grantu VZ ÚHK MZ 00002373601.*

## VYUŽITÍ IN VITRO EXPANDOVANÝCH TUMOR INFILTRUJÍCÍCH LYMFOCYTŮ U PACIENTŮ S METASTAZUJÍCÍM MELANOMEM.

P.Vidláková<sup>1</sup>, J.Smejkalová<sup>1</sup>, D.Očadlíková<sup>1</sup>, L.Kovářová<sup>1</sup>, L.Hanák<sup>5</sup>, R.Hájek<sup>1</sup>, M.Penka<sup>1</sup>, A.Oltová<sup>4</sup>, I.Kocák<sup>5</sup>, V.Fait<sup>5</sup>, J.Žaloudík<sup>5</sup>, J.Michálek<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno*

<sup>2</sup> *I. dětská interní klinika, Fakultní nemocnice Brno*

<sup>3</sup> *Univerzitní onkologické centrum, Masarykova univerzita Brno*

<sup>4</sup> *Oddělení lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Brno*

<sup>5</sup> *Masarykův onkologický ústav, Brno*

**Cíl:** Cílem této pilotní studie je využití protinádorového potenciálu expandovaných Tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) u pacientů s metastatickým melanomem. Účinnost adoptivního převodu T lymfocytů při léčbě nádorového onemocnění byla prokázána u laboratorních zvířat a v současné době také u pacientů s metastatickým melanomem.

**Metodika:** V naší studii byla nejprve prospektivně validována expanze lymfocytů periferní krve pěti zdravých dárců a poté šesti pacientů s metastazujícím melanomem. Nejprve byly lymfocyty zdravých dárců stimulovány in vitro nádorovým antigenem. Stimulované aktivované klony T lymfocytů exprimují celou řadu aktivačních markerů, včetně interferonu gama a lze je tudíž separovat pomocí imunomagnetických interferon gama pozitivních kuliček. Takto separované aktivované T lymfocyty byly stimulovány vysokými dávkami IL-2 (1000U/ml) 2-3x týdně a jednorázově phytohemaglutininem (10ug/ml) in vitro za přítomnosti tzv. „feeder cells“. Na základě těchto úspěšných experimentů bylo přistoupeno k expanzi TIL u 7 pacientů s metastazujícím melanomem pomocí stejného postupu (6x lymfatická uzlina, 1x primární ložisko kožního melanomu).

**Výsledky:** Úvodní počet separovaných T buněk činil  $0,56 \pm 0,13 \times 10^6$  a po 4-týdenní expanzi dosáhl počtu  $214,00 \times 10^6 \pm 103,46 \times 10^6$ . V případě šesti nádorem infiltrovaných uzlin pacientů s metastazujícím melanomem byla expanze TIL zahajována s počtem buněk  $2,9 \times 10^6$  -  $15,8 \times 10^6$  a po 5-7 týdenní kultivaci došlo k nárůstu na  $27,0 \times 10^9$ ,  $56,0 \times 10^9$ ,  $3,4 \times 10^9$ ,  $45 \times 10^9$ ,  $28 \times 10^9$  a  $22 \times 10^9$  TIL buněk. Při kultivaci TIL z primárního ložiska nádoru došlo pouze k minimálnímu nárůstu z  $2,2 \times 10^6$  na  $12,1 \times 10^6$  TIL po 8-týdenní kultivaci.

Ve všech 7 případech byl proveden endotoxinový test a vyšetření sterility bezprostředně před hlubokým zmrazením přípravku TIL. U třech posledních pacientů byla provedena doplňující vyšetření. Jednalo se o rozšířené mikrobiologické vyšetření na přítomnost *Mycoplasma* sp., HBV, HCV, Parvoviru B19, HIV, mykobakterie. Pro sledování případných cytogenetických změn v průběhu kultivace bylo provedeno cytogenetické vyšetření periferní krve pacientů před začátkem kultivace a onkocytogenetické vyšetření expandovaných TIL

**Závěr:** Takto připravený přípravek expandovaných TIL lze snadno připravit in vitro a je možno jej využít klinicky jako buněčná imunoterapie metastazujícího melanomu.

**Literatura:**

1. Greenberg PD.: *Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. Adv Immunol 1991, 49: 281-9.*
2. Michálek J., Svoboda M.: *Buněčná imunoterapie nádorů. Klinická onkologie, 2003, 16: 145-148.*
3. Yee C, et al.: *Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99: 16168-73.*

*Podporováno grantem GAČR 301/04/1387*

**MONITOROVÁNÍ HLADINY TRANSKRIPTŮ BCR-ABL  
U PACIENTŮ S CML:  
POROVNÁNÍ METOD KOMPETITIVNÍ RT-PCR  
A REAL-TIME RT-PCR.**

K. Vlčanová, V. Zmeková, J. Rulcová, J. Moravcová  
*Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha*

**Úvod:** Chronická myeloidní leukemie (CML) je charakterizována přítomností hybridního genu BCR-ABL, který vzniká v důsledku translokace t(9;22)(q34;11). Gen BCR-ABL je nejen molekulárním markerem CML, ale hraje důležitou roli v patogenezi onemocnění. Monitorování hladiny transkriptu BCR-ABL slouží ke sledování úspěšnosti léčby CML. Na oddělení molekulární genetiky ÚHKT v Praze monitorujeme pacienty od roku 1994 pomocí kompetitivní RT-PCR. Do současnosti bylo vyšetřeno více než 4000 vzorků. Od loňského roku provádíme u některých pacientů paralelní vyšetření pomocí kvantitativní Real-Time RT-PCR a v průběhu následujícího roku bychom chtěli plně přejít na monitorování transkriptů BCR-ABL pomocí metody Real-Time.

**Cíl práce:** Porovnání metod Real-Time RT-PCR a kompetitivní RT-PCR pro zajištění návaznosti monitorování hladiny transkriptů BCR-ABL.

**Metodika:** U obou metod se detekce provádí z leukocytů periferní krve pacienta. Kompetitivní metoda (Leukemia 1998; 12:1303) využívá přirozených kompetitorů připravených z linií K562 a BV173. Kompetitory jsou používány ve formě nepurifikované RNA stabilizované v guanidinium-thiokyanátovém lyzátu a jsou přidávány k testovanému vzorku ještě před izolací RNA. To zajišťuje kontrolu kvality i kvantity extrahované RNA a úspěšnosti reverzní transkripce.

Metoda Real-Time RT-PCR (Leukemia 2003; 17:2318) využívá ke kvantifikaci záznam nárůstu fluorescence po každém cyklu PCR. Množství fluorescence je přímo úměrné množství vznikajícího produktu. Používáme metodu podle protokolu Europe Against Cancer (EAC) s kontrolním genem beta-2-mikroglobulinem (B2M) (Leukemia 2003; 17:2474), který jsme vybrali z doporučených kontrolních genů jako nejvhodnější. Měření jsou prováděna na přístroji Rotor Gene 3000.

**Výsledky a Závěr:** Vyšetřili jsme 45 pacientů (3 až 10 vzorků od každého). Výsledky zpracovaných vzorků ukázaly, že číselné hodnoty získané pomocí obou metod se mohou lišit, avšak kinetika hladiny genu BCR-ABL je u většiny pacientů zachována. Pouze u 4 pacientů byla zjištěna mírná nekorelace kinetik získaných oběma metodami. Citlivost dosahovaná kompetitivní metodou byla zhruba 10x vyšší než metodou Real-Time RT-PCR. Naopak metoda Real-Time RT-PCR byla méně pracná a za stejnou dobu umožňovala zpracování většího množství vzorků.

*Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZ ČR č. 00023736.*

**POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ FUNKČNÍHO TESTU REZISTENCE K  
AKTIVOVANÉMU PROTEINU C A MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉHO  
VYŠETŘENÍ KOAGULAČNÍHO  
FAKTORU FV LEIDEN**

Vrbáček F., Dytrychová V., Pazlarová J., Pecka M., Malý J.

*II. interní klinika – OKH, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařské fakulty  
Univerzity Karlovy v Hradci Králové*

Nejrozšířenějším geneticky podmíněným rizikovým faktorem žilní trombózy v bělošské populaci je mutovaný koagulační faktor V, který je zodpovědný za více než 90 % případů rezistence k aktivovanému proteinu C (APC-R) [1]. Mutace způsobuje expresi funkčního koagulačního faktoru V, který nemůže být inaktivován štěpením aktivovaným proteinem C (tzv. koagulační faktor V Leiden) [1].

V naší laboratoři jsme u vyšetřených pacientů provedli porovnání výsledků molekulárně genetického vyšetření koagulačního faktoru V Leiden a funkčního testu pro stanovení APC-R založeného na aktivaci koagulačního faktoru X hadím jedem. Naším cílem bylo stanovení korelace mezi výsledky obou testů a stanovení senzitivity a specifity námi používané funkční metody.

Vyšetřeno bylo 73 pacientů, kteří byli rozděleni na skupiny podle výsledků molekulárně genetického vyšetření. Statistické vyhodnocení ukázalo významný rozdíl ( $p < 0,01$ ) mezi hodnotami funkčního testu zdravých jedinců ( $150,8 \pm 19,6$  s) a heterozygotů ( $83,8 \pm 5,5$  s). Jedinci s oběma alelami mutovanými nebyli do statistické analýzy zahrnuti pro nízký počet případů.

Naše výsledky ukazují na klíčovou roli Leidenské mutace koagulačního faktoru V v rozvoji APC-R. Zároveň potvrzují vysokou specifitu (100 %) i senzitivitu (100 %) námi používané funkční metody kvantitativního stanovení APC-R pro detekci této mutace při použití rozhodovací hodnoty pozitivivity testu, která je výrobce stanovena na 120 s. Ani přes tyto výsledky však není možné nahradit nákladné molekulárně genetické vyšetření koagulačního faktoru V Leiden levnější funkční metodou, neboť přibližně 10 % APC-R není touto mutací způsobeno [1].

**Literatura:**

1. Dahlback, B.: *New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. Thromb Haemost. 1995 Jul;74(1), 139-48*

## ZAVÁDĚNÍ PERSPEKTIVNÍ METODY „TROMBIN GENERAČNÍ TEST“

S. Vytisková <sup>1</sup>, M. Slánská <sup>1</sup>, O. Zapletal <sup>1</sup>, J. Blatný <sup>1</sup>, J. Jarkovský <sup>2</sup>, M. Penka <sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno, Pracoviště dětské medicíny*  
<sup>2</sup>*Centrum biostatistiky a analýz, Lékařská a Přírodovědecká fakulta MU v Brně*

**Úvod:** Trombin je aktivní forma protrombinu, která má enzymatické i neenzymatické funkce. V koagulaci hraje klíčovou roli, ve svých mnoha funkcích působí dle potřeby jak prokoagulačně, tak antikoagulačně. Proto je sledování generace trombinu v čase díky nové metodice “Trombin generační test - TGA” vynikajícím nástrojem k získání celkového obrazu o hemostáze.

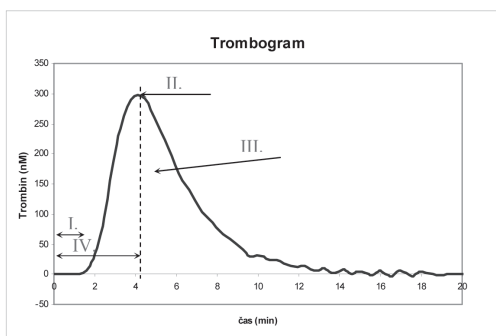
**Cíl:** Standardizační komise (SSC) Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu (ISTH) nedávno dospěla k názoru, že díky standardizovaným reagensům je metoda TGA spolehlivá, reprodukovatelná a schopna porovnat data mezi všemi uživateli na světě. Proto má OKH FN Brno eminentní zájem zavést tuto metodu na své pracoviště jako rutinní vyšetření, které by poskytovalo globální obraz koagulability a tudíž by bylo jediným dostupným funkčním testem pro trombózu a hemostázu.

**Metodika:** Princip metody je založen na měření fluorescence produktu aminomethylkumadinu, který vzniká přeměnou fluorogenního substrátu působením trombinu. Fluorogenní signál není úměrný aktivitě trombinu (závisí na spoustě faktorů jako je např. barva plazmy, se snižující se koncentrací substrátu klesá rychlost jeho přeměny, apod.), proto je nutné při měření používat trombinový kalibrátor, což je modifikovaný trombin schopný přeměňovat fluorogenní substrát. Tento modifikovaný trombin se neúčastní koagulační kaskády a není inhibován plazmatickými inhibitory.

**Výsledky a závěr:** Výstupem tohoto testu je trombogram, který popisuje koncentraci trombinu v čase ve srážející se plazmě a je tedy obecným funkčním testem tromboticko-hemostatického systému (viz obrázek). TGA je schopný detekovat jak trombofilní, tak krvácivou tendenci a může být využit k měření jakýchkoliv genetických nebo získaných nemocí (např. deficit antitrombinu), ke sledování léčby hemofilie (léčba FVIII, FIX nebo rFVIIa), sledování léčby tromboembolických nemocí (léčba kumariny, hepariny), k získání celkového obrazu trombotické tendence u pacientů se zvýšeným rizikem trombózy a/nebo krvácení.

Autoři ve svém sdělení prezentují svoje poznatky a zkušenosti s metodou TGA a dále předkládají výsledky a další zajímavé nálezy pilotní studii





Sledované parametry trombogramu:

- I. čas iniciační fáze
- II. vrchol píku (největší koncentrace trombinu)
- III. plocha pod píkem ( $\text{nM} \cdot \text{min}$ )
- IV. čas do vytvoření největší koncentrace trombinu

#### Literatura:

1. T. Balgin: Review: The measurement and application of thrombin generation, *British Journal of Hematology*, 2005, 130, 653-661.
2. H.C. Hemker, P. Giesen, R. AlDieri, V. Regnault, E. de Smed, R. Wagenvoort, T. Lecomte and S. Béguin: The calibrated Automated Thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability, *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 2002, 32, 249-253.
3. H.C. Hemker, R. AlDieri, S. Béguin: Thrombin generation assays: accruing clinical relevance, *Current Opinion in Hematology*, 2004, 11, 170-175.

## VOŠETŘENÍ ROZPUSTNÉHO TRANSFERINOVÉHO RECEPTORU NA KOAGULAČNÍM AUTOMATU

J. Zavřelová, M. Matýšková, A. Buliková, M. Šlechtová, M. Méhešová, M. Penka  
OKH FN Brno

Metabolismus železa je komplikovaný proces, na kterém se podílí i celá řada bílkovin. Stanovení řady z nich má význam pro klinickou praxi. Měření koncentrací rozpustného transferinového receptoru (sTfR) poskytuje hodnotnou informaci o situaci se skladováním železa. Transferinový receptor (TfR) je transmembránový glykoprotein který zprostředkovává vstup transferinu do buňky. TfR je přítomen na povrchu mnoha typů buněk. Rozpustné transferinové receptory jsou uvolněné formy původem převážně z vyvíjejících se erytrocytů.

Zvýšení erythropoetické aktivity z důvodu deficiencie železa způsobuje urychlení syntézy transferinových receptorů a tím zvýšení sérových hladin sTfR. Naopak infekce nebo zánětlivá onemocnění nezpůsobují žádné výrazné změny sTfR. Vyšetření sTfR pomáhá v diferenciální diagnostice anémií především k odlišení sideropenie.

Samotné vyšetření sTfR však není dostačující. STfR může být zvýšen také u stavů s vyšší erythropoetickou aktivitou bez deficiencie železa – hemolytické anémie, myelodysplastický syndrom, megaloblastové anémie, polycytémie, a thalasémie.

Sledování sTfR během podávání erythropoetinu dává hodnotné informace pro prevenci deficiencie železa způsobené rychlou nebo zmenšenou mobilizací zásob železa.

Snížené hladiny sTfR nacházíme např. u aplastické anémie a chronického renálního selhání.

Stanovení sTfR je možné provádět různými metodami, pro klinickou praxi byly vyvinuty metody ELISA a imunoturbidimetrie (IT).

Na našem pracovišti provádíme vyšetření rozpustného transferinového receptoru imunoturbidimetrickou metodou na koagulačním automatu STA Compact. Test je založen na optickém sledování imunoreakce mezi sTfR přítomnými ve vzorku a protilátkami proti sTfR přítomnými na povrchu latexových částic. Množství vznikajícího imunoprecipitátu je úměrné koncentraci sTfR ve vzorku. Koncentrace sTfR je automaticky odečítána z kalibrační křivky.

Předností imunoturbidimetrického vyšetření oproti metodám ELISA je jednoduchost provedení, plná automatizace testu a také cena vyšetření. Metoda však vyžaduje vybavení pracoviště analyzátozem umožňujícím provedení imunologických testů při vlnových délkách 540 – 690 nm.

### Literatura:

1. Suiminen P., Punnonen K., Rajamaki A., Irjala K.: *Evaluation of new immunoenzymometric assay for measuring soluble transferrin receptor to detect iron deficiency in anemic patients. Clinical Chemistry* 43:9, 1641 – 1646 (1997)
2. Ščudla V.: *Anémie chronických nemocí – standard diagnostiky a terapie. Vnitřní lékařství*, 48, 2002, č.5, s. 422-426

## DG – CHROM AT: NOVÝ SET PRO STANOVENÍ ANTITROMBINU (ANTI-XA)

J. Zavřelová, P. Straková, L. Vrábel, M. Matýšková, M. Penka  
*Oddělení klinické hematologie, FN Brno*

Antitrombin (AT) je glykoprotein přítomný v plazmě, který reguluje některé kroky v procesu krevního srážení. Zabraňuje tvorbě anomálních trombotických procesů inhibicí důležitých koagulačních enzymů, zahrnujících trombin a faktor Xa (F Xa). AT udržuje hemostatickou rovnováhu. Pacienti s vrozeným deficitem AT mají zvýšené riziko venózní trombózy. Vyšetření funkční aktivity AT patří mezi rutinní koagulační vyšetření.

Set DG – Chrom AT firmy Grifols obsahuje tři reagenzie: F Xa, pufr pro rekonstituci reagenzie a chromogenní substrát specifický pro F Xa. Test je založen na chromogenní reakci, která je nepřímě úměrná přítomnosti AT v plazmě. Test probíhá ve dvou krocích:

1) inkubace vzorku s nadbytkem F Xa v přítomnosti heparinu za vzniku komplexu heparin-AT- FXa a zbytkového F Xa, 2) měření změn absorbance při 405 nm v důsledku uvolňování paranitroanilinu při hydrolyze specifického chromogenního substrátu zbytkovým F Xa.

Cílem práce bylo vytvořit adaptaci pro koagulační automaty STA Compact a STA R, ověřit rozsah linearity testu, otestovat stabilitu reagenzií v provozních podmínkách laboratoře, reprodukovatelnost, opakovatelnost a správnost stanovení a porovnat výsledky metodiky s jinou anti Xa metodikou (Coamatic LR Antitrombin firmy Chromogenix) u série vzorků pacientů.

Výsledky: Byla vytvořena adaptace pro koagulační automaty STA Compact a STA R: vzorky jsou inkubovány 120 s, reakce odečítána po dobu 120 s. 4 bodová kalibrace v rozsahu 0 – 110 % při použití kalibrační plazmy STA Unicibrator je lineární ( $r = 1.0, 0.99$ ). Stabilita reagenzií je výborná. Stabilita reagenzií testována: 1) za podmínek skladování reagenzií v lednici při teplotě 2-8 °C po ukončení série analýz, 2) za podmínek nepetržitého uložení reagenzií v zásuvce pro reagenzie koagulačního automatu při teplotě 15 – 19 °C. Kontroly správnosti normální i patologické vychází v povoleném rozsahu. Reprodukovatelnost výsledků analýz je výborná (variační koeficient pro normální AT: CV = 3.57 %, pro patologický AT: CV = 4.45 %). Přesnost metody je výborná (pro normální AT: CV = 3.76 a 5.66 %, pro patologický AT: CV = 6.80 a 6.82 %). Porovnání obou metod bylo provedeno pro soubory 58 vzorků v rozsahu 25 – 114 % a 75 vzorků v rozmezí 24 – 129 % s korelačním koeficientem  $r = 0.99$  a koeficientem spolehlivosti  $R^2 = 0.97$ .

Závěrem lze říci, že adaptace setu DG – Chrom AT na koagulometry STA poskytuje správné, přesné a reprodukovatelné výsledky s vynikající linearitou kalibrační křivky. Dlouhá stabilita reagenzií plně vyhovuje provozu koagulační laboratoře. Korelace mezi sety DG-Chrom AT a Coamatic LR Antitrombin je výborná.

### Literatura:

1. Kottke-Marchant K., Duncan A.: *Antithrombin deficiency issues in laboratory diagnosis. Arch. Pathol. Lab. Med.* 126(11): 1326–36, 2002.
2. Zurbano M.J., Bono M., Martorell D.: *DG-Chrom AT: A new commercial antithrombin assay (anti Xa). Journal of thrombosis and haemostasis, Abstracts XXth Congress of the ISTH Sydney, Australia, August 2005, 3 (1), 1725.*

## JE SNADNÁ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA SPECIFICKÉHO INHIBITORU?

L. Zoubková, J. Zavřelová, M. Méhešová, A. Buliková, M. Matýšková, M. Penka  
*Oddělení klinické hematologie, FN Brno*

Specifické inhibitory jsou imunoglobuliny, které reagují s jednotlivými koagulačním faktory. Dělí se na neutralizující inhibitory (ovlivňují funkční aktivitu) nejčastěji spojené s krvácivými projevy a na ne-neutralizující antikoagulanty (neovlivňují funkční aktivitu) často bez klinických projevů. Rozlišujeme alloprotilátky, které mohou vznikat při substituční léčbě u vrozených krvácivých defektů faktorů (např. hemofilie A, B) a autoimunitní protilátky, které vznikají u osob bez vrozené krvácivé choroby. Výskyt autoprotilátek je často v souvislosti s jiným autoimunitním onemocněním, lymfoproliferativním onemocněním, solidními nádory, těhotenstvím, polékovou reakcí, ale také bez zjiitelné příčiny. Nejčastěji se setkáváme s protilátkami proti faktoru VIII u pacientů s hemofilií, ale i u jedinců bez vrozeného defektu. Výskyt inhibitoru F IX u hemofiliků je méně častý, autoprotilátky jsou spíše raritou. Vzácně se vyskytují také inhibitory jiných faktorů FV, VII, X, XI, XII a XIII.

Laboratorní diagnostika těchto stavů je poměrně obtížná. V případě neutralizujícího inhibitoru zjišťujeme prodloužení základních koagulačních testů aPTT a /nebo PT, které není korigováno přidávkem normální plazmy. Vzhledem k časové závislosti specifických inhibitorů je doporučováno provedení speciálního korekčního testu „cirkulující antikoagulans“. Jedná se o vyšetření aPTT nebo PT testované plazmy, normální plazmy a směsí testované a normální plazmy před a po 2hodinové inkubaci při 37 °C. Test cirkulující antikoagulans je orientační vyšetření, kterým pouze prokazujeme přítomnost či nepřítomnost inhibitoru a jeho časovou závislost/nezávislost. K potvrzení specifického inhibitoru je pak nutné nejdříve prokázat deficit faktoru a následně provést kvantitativní stanovení specifického inhibitoru namířeno proti konkrétnímu koagulačnímu faktoru. Ke kvantitativnímu stanovení inhibitoru se nejčastěji používá Bethesda metoda. Principem metody je stanovení zbytkové aktivity faktoru po 2hodinové inkubaci plazmy pacienta (v různých ředěních) s normální plazmou při 37 °C. Aktivita inhibitoru se vyjadřuje v Bethesda jednotkách. 1 Bethesda jednotka (B.U.) je aktivita inhibitoru, která během 2.hodinové inkubace inaktivuje 50 % nabídnutého faktoru. Nakonec je však nutné vyloučit ovlivnění testů jinými koagulopatiemi, zejména přítomností inhibitoru typu lupus antikoagulans (LA). V případě pozitivit LA je nutné vyšetřovat hladinu faktorů vnitřního koagulačního systému za použití aPTT reagentie se sníženou citlivostí k LA a vyšetření hladiny faktorů v diluci (minimálně do titru 1:80).

V naší práci prezentujeme výsledky laboratorní diagnostiky vzácně se vyskytujícího specifického inhibitoru F XI u pacientky s autoimunitní hepatitidou a inhibitoru F V u pacientky s lymfoproliferativním onemocněním.

Závěrem lze říci že diagnostika specifického inhibitoru patří k časově i finančně nejnáročnějším vyšetřením v koagulační laboratoři. Správná diagnostika musí probíhat v několika krocích: průkaz prodloužení testů aPTT a /nebo PT, průkaz přítomnosti inhibitoru testem cirkulující antikoagulans, průkaz defektu faktoru, kvantitativní stanovení aktivity inhibitoru, vyloučení jiných koagulopatií zahrnující vyšetření LA, v případě pozitivit LA vyšetření hladiny FF vnitřního koagulačního systému, diluce faktorů a kvantitativní stanovení aktivity inhibitoru za použití LA necitlivé aPTT reagentie.

### Literatura:

1. Penka M., Buliková A., Matýšková M., Zavřelová J.: *Hematologie 1*, 2001.
2. Brown B.A.: *Hematology: Principles and procedures*, 1993.

# **LABORATORNÍ HEMATOLOGIE**

## **2006**

Doc. RNDr. Miroslav Pecka, CSc., Prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

Vydavatel : HK CREDIT spol. s r.o., Hradec Králové, Škroupova 441

Grafická úprava : Sittaproduct, Hradec Králové

Vytiskla : Tiskárna Kostěnice

1. vydání

stran 160

Náklad : 550 kusů

**ISBN 80-86780-29-5**