

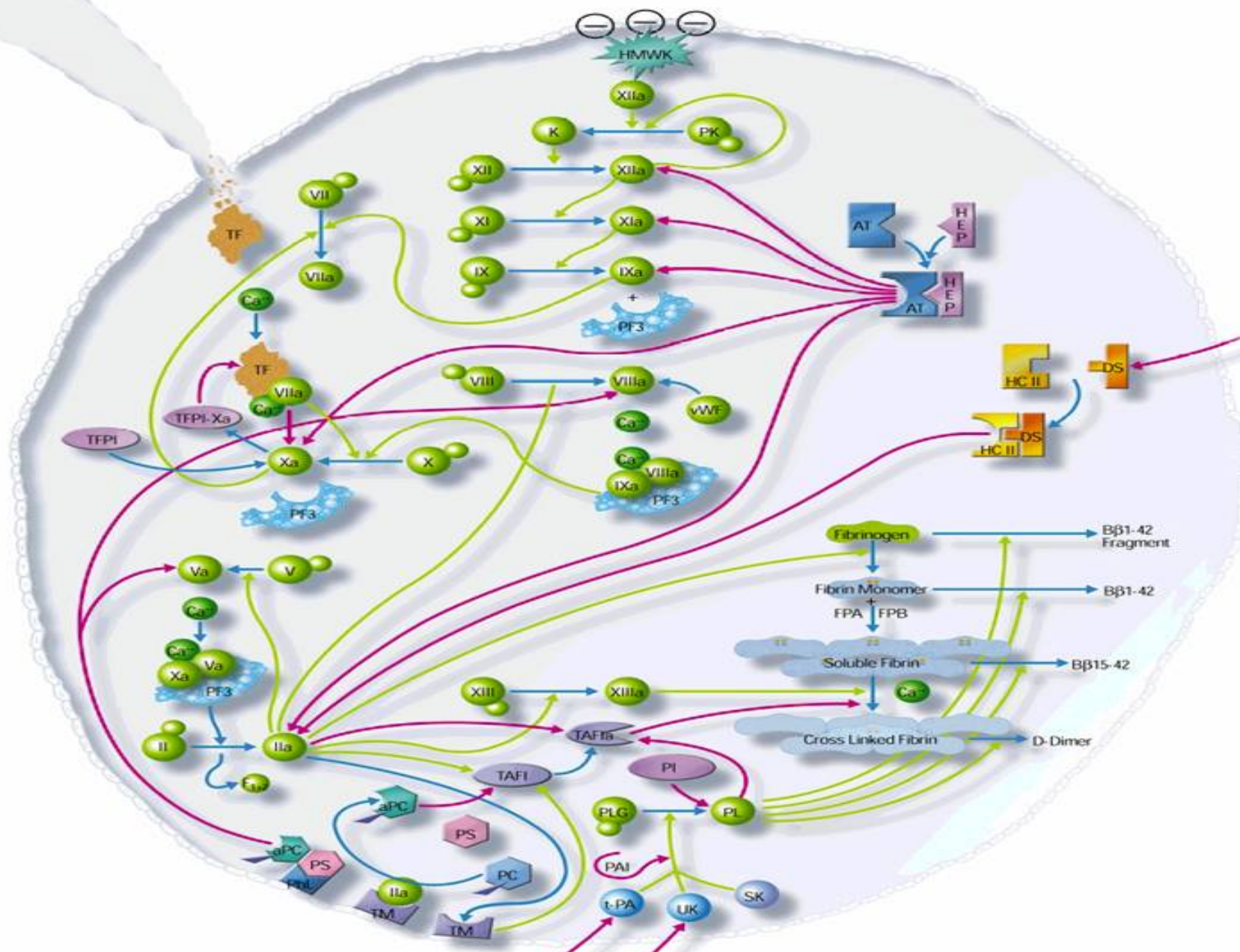


Nové přístupy k diagnostice trombofilních stavů



Slavík L., Krčová V., Hluší A.
Hemato-onkologická klinika
FN OLOMOUC

17.listopad 2005
Prostějov



Současná diagnostika trombofilních stavů

Stanovení jednotlivých rizikových faktorů pro ŽT resp. AT se provádí u vybrané skupiny rizikových pacientů na základě kliniky.

Rizikovost jednotlivých faktorů je následně hodnocena rozsáhlými klinickými studiemi, kdy je stanovováno relativní riziko jednoho každého faktoru příp. jejich kombinací. Na základě těchto výsledků jsou markery zařazovány do panelů.

Hlavní nevýhodou současného stavu diagnostiky je nemožnost jednoznačně prokázat nebo vyloučit trombofilní riziko, jelikož paleta vyšetření je sice obsáhlá , ale ne úplná.

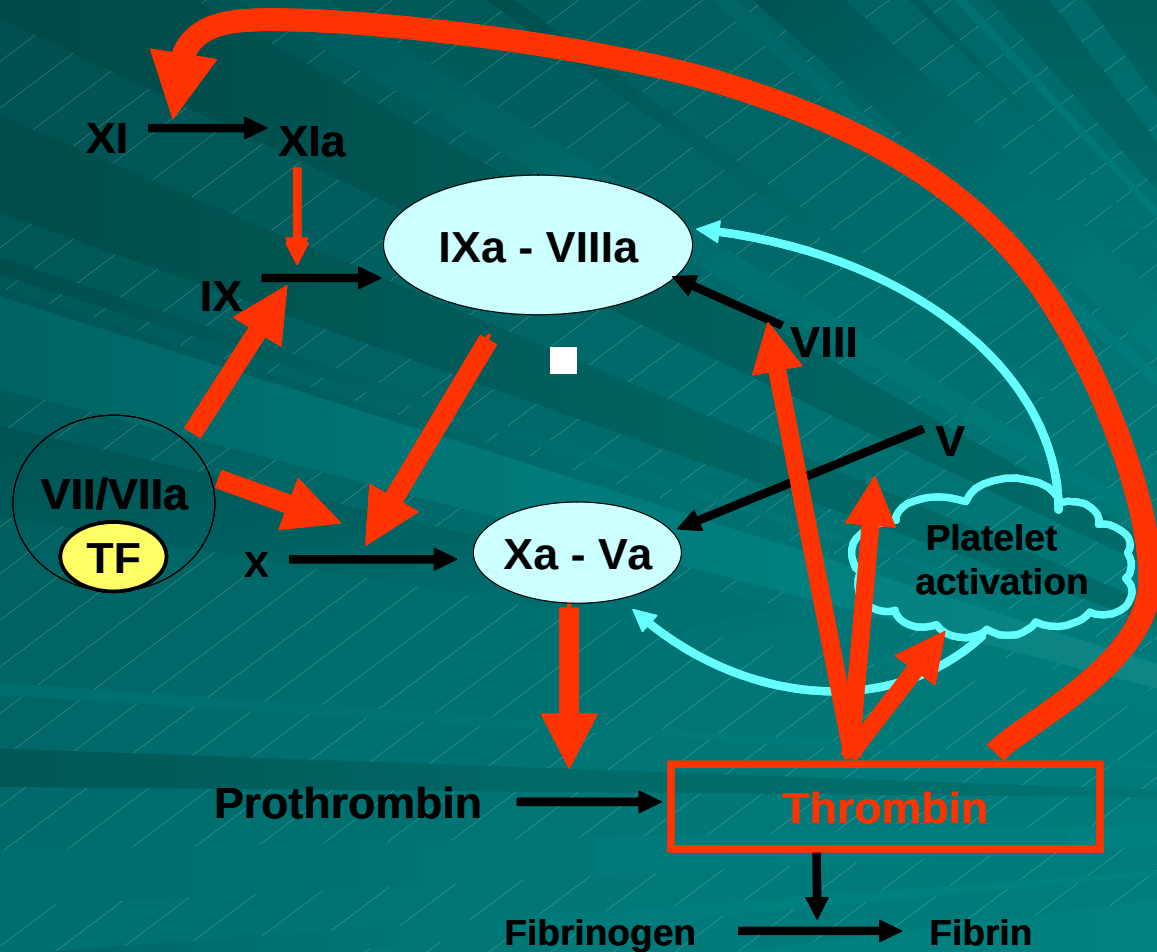
Testy pro stanovení trombotické aktivity

- Po dlouhou dobu jsou pro stanovování aktivity používány jednoduché testy se spouštěním pomocí tkáňového faktoru a negativně nabitých fosfolipidů (tromboplastin).
- Sofistikovanější testy jsou dostupné pouze pro vyhledávání geneticky podmíněných trombofilních stavů (FV Leiden, Protrombin 20210 atd.), pro stanovení aktivity jednotlivých faktorů a jejich inhibitorů.
- Nicméně neexistuje funkční test stanovující komplexní riziko těchto jednotlivých faktorů stejně jako neexistuje test na **kontrolu moderních antikoagulancií a substitučních preparátů**.
- Klasické screeningové testy (PT, aPTT, ecarin cl. t. a TT) jsou citlivé pro monitorování antikoagulační léčby nicméně velmi špatně postihují zvýšené trombotické riziko. Nicméně i citlivost pro kontrolu antikoagulační léčby nepokrývá celé spektrum používaných přípravků.

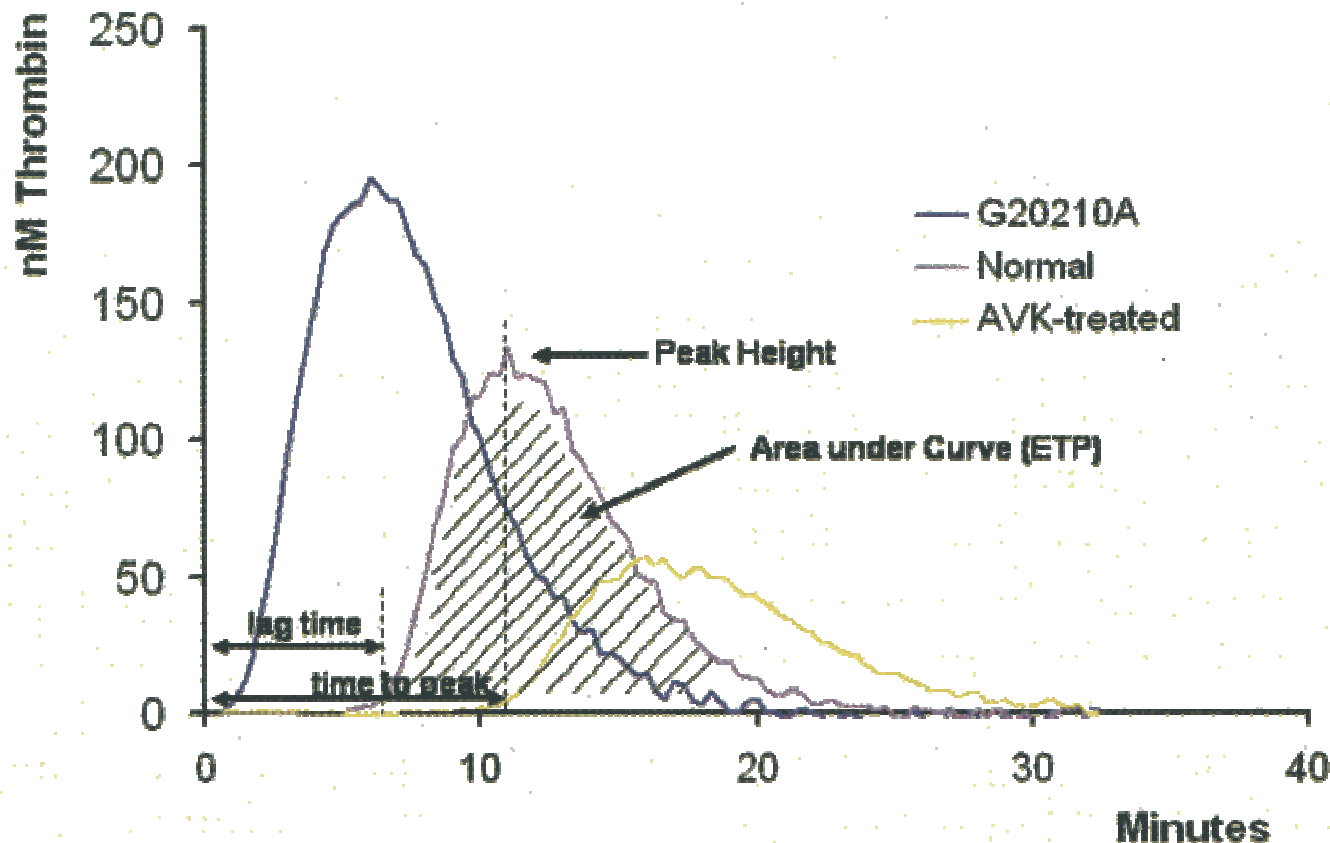
Trombin generační test

- Jeho použití je výhodné v případech, kdy potřebujeme monitorovat jak zvýšení tak snížení koagulační aktivity.
- V případě, že potřebujeme test citlivý na všechny druhy antitrombotické léčby včetně veškerých kombinací, na veškeré známé nebo neznámé patologie trombocytů nebo plasmatických faktorů.
- Výsledkem stanovení skutečný globální obraz hemostatického systému.

Princip testu



Kinetika uvolňování thrombinu



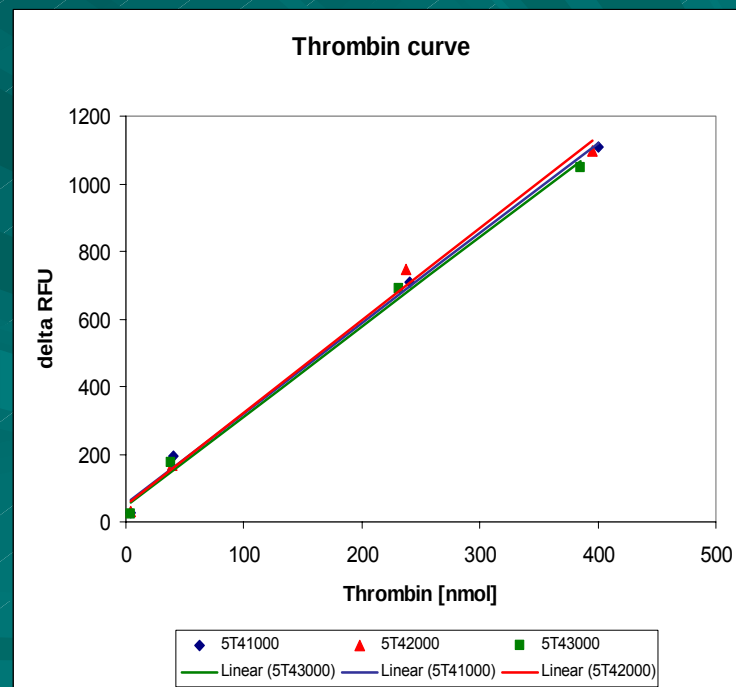
Podmínky pro provedení stanovení generace thrombinu

- Fluorimetr s excitační vlnovou délkou 360 nm a emisní detekcí 460 nm (+- 5 nm není žádným problémem).
- Stanovení je optimální provádět za fyziologických podmínek tj. 37°C
- Měřicí intervaly:
 - 1.) Thrombin kalibrační křivka: 10 min v 30 sec intervalech
 - 2.) vzorky a kontroly: 60 (120 resp. 240 min) min v 1 min intervalech

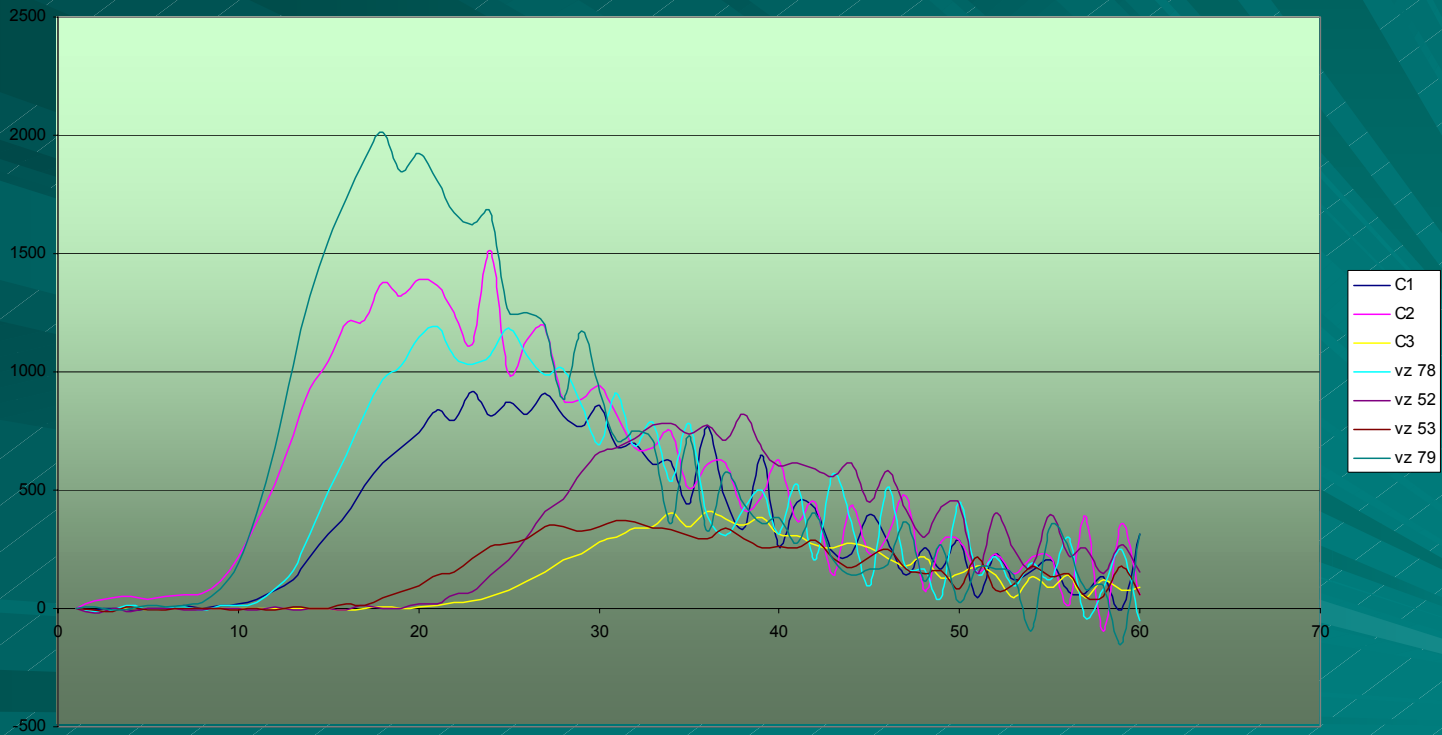


Kalibrační křivka thrombinu

5T41000		5T42000		5T43000	
nmol	Delta RFU	nmol	Delta RFU	nmol	Delta RFU
400	1109,0	395	1097,5	385	1047,7
240	710,3	237	745,4	231	690,4
40	193,7	39,5	168,5	38,5	174,5
4	26,1	3,95	28,7	3,85	21,1
Reg.	0,998	0,997	0,998		



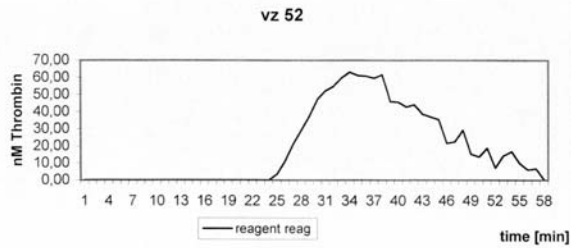
Integrované výsledky měření



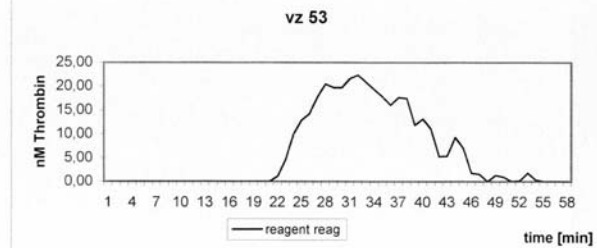
Grafické vyhodnocení výsledků generace trombinu

evaluation single

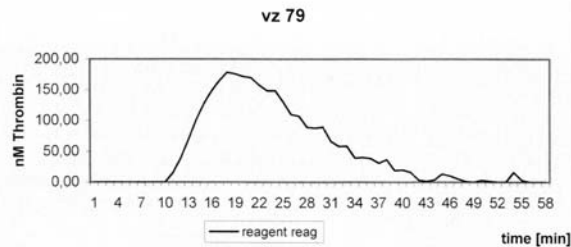
sample	lag phase		peak height		slope
	nM Thrombin	time	nM Thrombin	time	
vz 52	3,67	24	63,07	33	6,7801



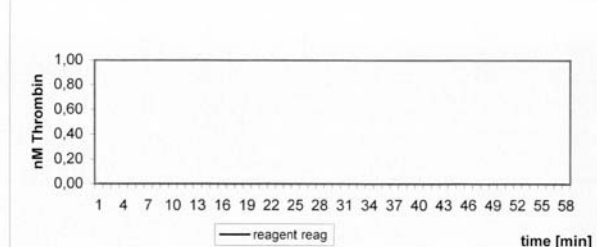
sample	lag phase		peak height		slope
	nM Thrombin	time	nM Thrombin	time	
vz 53	1,12	21	22,34	31	2,0341



sample	lag phase		peak height		slope
	nM Thrombin	time	nM Thrombin	time	
vz 79	0,04	9	178,49	17	23,9190



sample	lag phase		peak height		slope
	nM Thrombin	time	nM Thrombin	time	



Závěr I

- Pro využití testu se naskýtá široké pole použití – až budoucnost ukáže zda dominantním polem použití bude hodnocení projevu trombofilního stavu bez ohledu na příčinu poruchy nebo monitorace hypokoagulačních stavů.
 - Z tohoto pohledu se jedná o první test přibližující se in vivo podmínkám, kdy je možné hodnotit důsledky poruch nebo ovlivnění hemostázy.
 - Samozřejmě, že tento test není plně univerzální, což vychází z příčin trombofilie, jimiž může být poruch jak v plasmatickém systému tak v aktivaci na elementech krevního oběhu. Nicméně pokud využijeme široké spektrum koncentrací TF pro iniciaci reakce můžeme opravdu hodnotit plně in vitro projevy změn v koagulačním systému.
-