

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MRAMOR

DIPLOMSKA NALOGA

Visokošolski strokovni program
Laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2009

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

ANA MRAMOR

DIPLOMSKA NALOGA

**VPELJAVA IN OCENA PRESEJALNE PREISKAVE
UGOTAVLJANJA PODEDOVANIH ALI PRIDOBLENIH
MOTENJ V DELOVANJU PROTEINA C**

**DEPLOYMENT AND EVALUATION OF NEW SCREENING TEST
IDENTIFYING INHERITED OR ACQUIRED DISORDERS IN
THE FUNCTIONING OF THE PROTEIN C**

**Visokošolski strokovni program
Laboratorijske biomedicine**

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Petra Černelča, dr. med. in somentorstvom asist. mag. Tadeja Pajiča, univ.dipl.ing.kem. inž., spec.med.biokem.

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Petru Černelču, dr. med. ter somentorju asist.mag. Tadeju Pajiču, univ.dipl.ing.kem.inž., spec.med.biokem. za vodenje, strokovno pomoč in svetovanje pri izdelovanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi dr. Martini Fink, univ.dipl.kem. za pomoč pri pisanju in oblikovanju diplomske naloge ter Nadi Grbec, Valeriji Bogovčič in Slavici Markač za usmerjanje in pomoč pri izvajanju praktičnega dela diplomske naloge.

Posebna zahvala pa gre mojima staršema ki sta mi nudila podporo in dajala koristne nasvete skozi vsa leta šolanja ter Janji, Špeli, Boštjanu in Branki za vso podporo, vzpodbudo in pomoč.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Petra Černelča, dr. med. in somentorstvom asist. mag. Tadeja Pajiča univ.dipl.ing.kem. spec.med.biokem.

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Vojko Kmetec

Članica diplomske komisije: asist.dr. Barbara Mlinar

VSEBINA	Stran
POVZETEK	i
1. UVOD	1
1.1. HEMOSTAZA	1
1.1.1. PRIMARNA HEMOSTAZA	1
1.1.2. SEKUNDARNA HEMOSTAZA	4
1.2. URAVNAVANJE KOAGULACIJE	8
1.2.1. Antitrombin III	8
1.2.2. Protein C.....	8
1.2.3. Protein S	8
1.2.4. Heparinski kofaktor II	9
1.2.5. Alfa 2-makroglobulin	9
1.2.6. Inhibitor za VIIa + tkivni faktor (TFPI tissue factor pathway inhibitor)	9
1.2.7. Alfa-1- antitripsi).....	9
1.2.8. Inhibitor C1	9
1.3. FIBRINOLITIČNI SISTEM	10
1.4. TROMBOFI LIJA	10
1.4.1. Protein C.....	11
1.4.2. Določanje Proteina C.....	12
1.5. Protein S	13
1.5.1. Določanje antigena prostega proteina S	13
1.5.2. Določanje aktivnosti prostega proteina S	14
1.6. Antitrombin III (AT III)	14
1.6.1. Določanje AT III	14
1.7. Lupusni antikoagulant i (LA)	15
1.7.1. Določanje lupusnih antikoagulantov	15
1.8. Neodzivnost za aktivirani protein C	16
1.8.1. Določanje APCR	16
1.9. Preiskava za oceno delovanja poti proteina C (Trombopath)	16
2. NAMEN DELA	19
3. MATERIAL IN METODE	20
3.1. Preiskovanci	20
3.2. Odvzem vzorcev	20
3.3. Aparati in pribor	21
3.4. Reagenti	22

3.4.1.	Reagenti za Trombopath.....	22
3.5.	Reagenti za določevanje faktorja II	23
3.6.	Reagenti za določevanje faktorja VIII	24
3.7.	Reagenti za opredelitev trombofilij.....	25
3.7.1.	Aktivnost proteina S	25
3.7.2.	Antigen proteina S	26
3.7.3.	Protein C	27
3.7.4.	Antitrombin III	28
3.7.5.	Neodzivnost za aktivirani protein C	29
3.7.6.	Lupusni antikoagulanti	30
3.8.	Statistični postopki	31
4.	DELO.....	31
4.1.	Protein C.....	31
4.2.	Aktivnost proteina S.....	32
4.3.	Antigen proteina S.....	32
4.4.	Antitrombin III.....	32
4.5.	Lupusni antikoagulanti.....	33
4.6.	Neodzivnost za aktivirani protein C	33
4.7.	Trombopath	33
4.8.	Faktor II	34
4.9.	Faktor VIII.....	35
5.	REZULTATI.....	36
5.1.	Rezultati preiskav zdravih preiskovancev	37
5.2.	Rezultati preiskav bolnikov	40
5.3.	Primerjava izsledkov deleža zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %) med zdravimi preiskovanci in bolniki s potrjeno Trombofilijo	44
6.	RAZPRAVA.....	54
7.	SKLEPI	57
8.	LITERATURA	58

POVZETEK

Dedno ali pridobljeno pomanjkanje ali pomanjkljiva aktivnost inhibitorjev koagulacije, kot so antitrombin (AT III), protein C (PC), protein S (PS) in drugih ima lahko za posledico trombofilijo (nagnjenost k trombozi). Trombofilija se lahko pojavi tudi zaradi bolezni (rak), različnih fizioloških stanj, npr. nosečnost ali po operaciji. Takrat večinoma z običajnimi laboratorijskimi preiskavami ne ugotovimo sprememb v hemostazi.

Med pomembne laboratorijske preiskave za oceno trombofilije uvrščamo določitev aktivnosti AT III, aktivnosti PS, antigena PS, aktivnosti PC, neodzivnosti za aktivirani PC (mutacija *faktor V Leiden*), prisotnost lupusnih antikoagulantov in povečano aktivnost faktorja VIII (FVIII). Za opredelitev trombofilije običajno opravimo vse preiskave sočasno.

Nov način opredelitve motnje v delovanju PC (Trombopath) temelji na aktivaciji endogenega PC z izvlečkom kačjega strupa (Protac), ki zmanjša nastanek trombina v vzorcu citratne plazme. Meritev opravimo z in brez aktivacije PC z izvlečkom kačjega strupa ter v obeh primerih izmerimo spremembo absorbance, ki jo dobimo, ko trombin cepi kromogeni substrat. Izsledke izrazimo kot delež zavrte koagulacije, ki jo sprožimo z izvlečkom kačjega strupa.

Z novim načinom, ki je občutljiv na pomanjkanje aktivnosti PC, pomanjkanje aktivnosti PS, zmanjšano koncentracijo antigena PS ter neodzivnost za aktivirani PC, bi lahko k opredelitvi trombofilije pristopili stopenjsko, v dveh korakih. V prvem bi z novim načinom ugotovili, v drugem pa opredelili motnjo v delovanju PC s posameznimi laboratorijskimi preiskavami.

K vpeljavi in oceni primernosti načina smo pristopili z določitvijo mejne vrednosti deleža zavrte koagulacije po priporočilih proizvajalca kompleta, ki smo jo pridobili iz izsledkov 33 zdravih preiskovancev, in je bila 74,0 %. Smatramo, da imajo preiskovanci z vrednostjo manjšo od mejne, patološki rezultat. Izračunana specifičnost preiskave, ki smo jo opredelili kot delež zdravih, pri katerih je rezultat negativen, je 88 %.

Občutljivost preiskave smo izračunali na število vseh 53 bolnikov, poslanih v naš laboratorij za ocenitev trombofilije. Izračunali smo jo tudi za skupino 28 bolnikov z ugotovljenim pomanjkanjem in glede na posamezno preiskavo.

Celokupna občutljivost načina, ki smo jo opredelili kot delež bolnih, pri katerih je test pozitiven, je za 53 bolnikov bila 21 %.

Občutljivost načina, ki smo jo izračunali glede na 28 bolnikov z ugotovljeno patološko vrednostjo preiskav določitev aktivnosti PS, antigena PS, aktivnosti PC, neodzivnosti za aktivirani PC (mutacija *faktor V Leiden*), prisotnost lupusnih antikoagulantov in povečano aktivnost faktorja VIII (FVIII) je bila 41%

Občutljivost ugotavljanja posamezne motnje, ki smo jo opredelili kot delež bolnih, pri katerih je izsledek resnično pozitiven, je za aktivnost PC bila 100%, za aktivnost PS 75%, za antigen PS 80%, za FVIII 43% in za neodzivnost na aktivirani PC 100%.

Ugotovili smo, da je nov način zelo občutljiv le na posamezno ugotovljeno patološko vrednost posamezne preiskave za opredelitev trombofilije in to v primeru pomanjkanja PC, PS, in APCR ter kombiniranih motenj kar je v skladu z izsledki iz slovtva. Pri bolnikih s prisotnostjo LA preiskava ni dovolj občutljiva, da bi jo lahko uporabili za ta namen.

Za dokončno odločitev o primernosti načina kot presejalne preiskave za opredelitev motnje v delovanju proteina C bi potrebovali tako večje število zdravih preiskovancev za določitev natančnejše mejne vrednosti deleža zavrte koagulacije, kot tudi večje število bolnikov z ugotovljenimi patološkimi preiskavami za opredelitev trombofilije. Celokupna majhna občutljivost oz. zmanjšan delež zavrte koagulacije, ki smo ga ugotovili pri 2 % bolnikov, brez patoloških vrednosti preiskovanih posameznih preiskav kaže, da je preiskava zanimiva za nadaljnje preiskovanje dejavnikov, ki vplivajo na delovanje proteina C.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP – adenzin-difosfat

ATP – adenzin-trifosfat

vWF – von Willebrandov faktor

TF – tkivni faktor

F – faktor koagulacije

AT III – antitrombin III

PAI 1 – plazmin aktivator inhibitor

HC II – heparinski kofaktor

α 2M – alfa₂-makroglobulin

α 1AT – alfa₁-antitripsin

DIC – diseminirana intravaskularna koagulacija

PS – protein S

PC – protein C

PČ – protrombinski čas

PTČ – parcialni tromboplastniški čas

LA – lupusni antikoagulanti

SD – standardna deviacija, standardni odklon

X – aritmetična sredina

APCR – neodzivnost za aktivirani protein C

PiCi % – delež zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa

SHL – specializirani hematološki laboratorij

PF4 – trombocitni faktor 4

PGF – trombocitni rastni faktor

E/mL – mednarodnih enot/mL

1. UVOD

1.1. HEMOSTAZA

Hemostaza je splet reakcij med beljakovinami v krvi (faktorji in zaviralci koagulacije in fibrinolize) in žilni steni (tkivni faktor, tkivni aktivator plazminogena), med celičnimi elementi krvi (trombociti) in žilno steno (endotelijske celice, celice gladkega mišičja), ki zagotavljajo, da ostaja kri v žilah tekoča ali da se ob poškodbi žile strdi, da prepreči nadaljnjo krvavitev (1).

Krvavitev se začne zaustavljati takoj, ko je zaradi poškodbe prekinjena površina endotelijskih celic v žili. Kri pride v stik z subendotelijskim slojem žile. Na tem mestu nastane trombocitni čep, pride tudi do vazokonstrikcije (2) (Slika 2).

Motnje hemostaze lahko vodijo do prepočasnega strjevanja krvi in s tem do krvavitev (npr. hemofilija) ali do prehitrega strjevanja krvi in s tem do nastanka strdkov (trombov) v žilah (tromboze).

Pri hemostazi gre za proces nastanka in odstranjevanja krvnega strdka in remodeliranje žile.

1.1.1. PRIMARNA HEMOSTAZA

Primarna hemostaza je proces nastanka trombocitnega strdka na mestu poškodbe žilne stene, pri tem sodelujejo trombociti in žilna stena (2) (Slika 2).

Za učinkovito primarno hemostazo sta potrebna normalno število in normalna funkcija trombocitov. Ko nastaja trombocitni strdek, pride do sprememb trombocitov: adhezije (vezava na endotelij), sprememb oblike (številni psevdopodiji), agregacije (zlepljanje trombocitov), sekrecije (iz gostih teles, granul alfa in lizosomov) se sprostijo arahidonati (2) (Slika 1 in 2).

V normalnih fizioloških pogojih se trombociti ne lepijo (agregirajo) na nepoškodovano žilno steno zaradi antitrombolitičnih lastnosti endotelija. Pri poškodbi pa je prav adhezija trombocitov prvi odgovor na poškodbo (1).

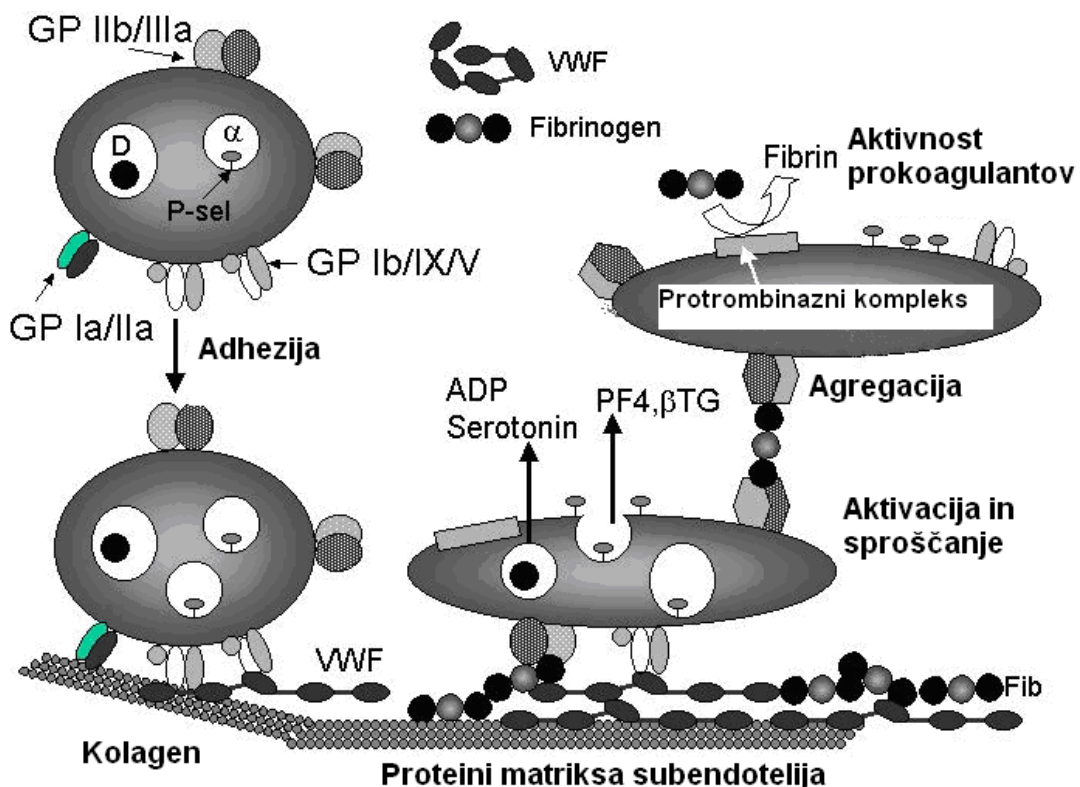
Adhezija trombocitov na kolagen v subendotelij je odvisna od receptorjev v membrani trombocitov: glikoproteina Ia (GP Ia), ki se neposredno veže na kolagen, ter glikoproteina

1b (GP Ib), ta pa se prek von Willebrandovega faktorja (vWf) veže na receptorska mesta na kolagenu. VWF je velika beljakovinska molekula, ki nastaja v endotelijskih celicah in trombocitih.

Adheziji sledi sprememba oblike trombocitov, iz diskoidne v sferično s psevdopodiji. Trombociti se razpotegnejo po poškodovanem delu žile in nato izločijo vsebino iz zrn α (vWf, fibrinogen, F V, rastni faktor trombocitov, trombocitni faktor 4-PF4) in vsebino iz gostih zrn (Adenozin difosfa – ADP, serotonin, kalcij). Sproščanje ADP povzroči konformacijsko spremembo (prostorsko preureditev) receptorja za fibrinogen, to je glikoprotein 2b/glikoprotein 3a (GP IIb/GP IIIa) kompleksa v membrani trombocitov. Sledi povezava dveh receptorjev GP IIb/GP IIIa na dveh sosednjih trombocitih, ki jih poveže molekula fibrinogena (agregacija trombocitov) (Slika 1).

Nastanejo agregati, sekrecija se nadaljuje in obnovlja proces povezave med trombociti, strdek se zvečuje...

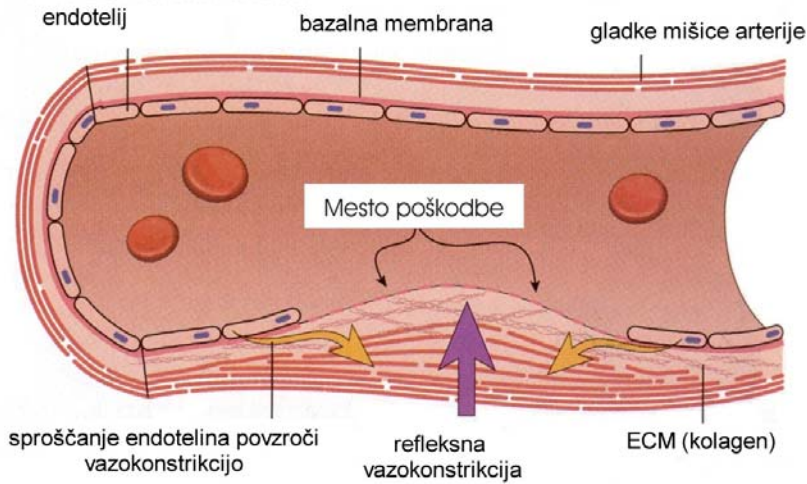
Motnje v primarni hemostazi so posledica spremenjenega števila trombocitov in njihovega delovanja ter spremenjenih žil.



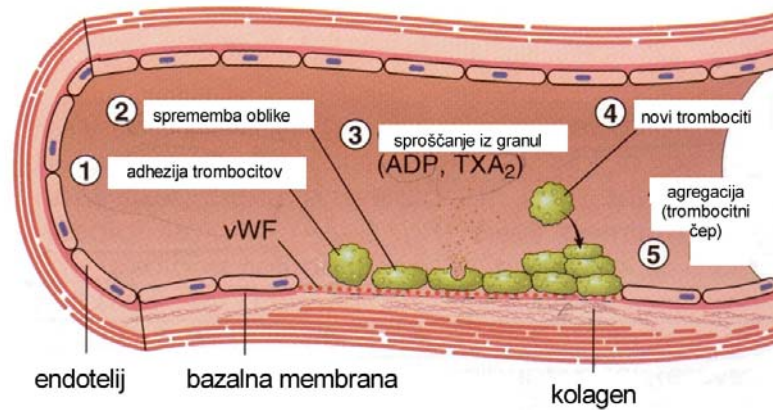
Slika 1: Prikazuje nastanek trombocitnega strdka. Prirejeno po :

(<http://referencelab.clevelandclinic.org/images/PlateletAdhesionActivationAggregation.jpg>)

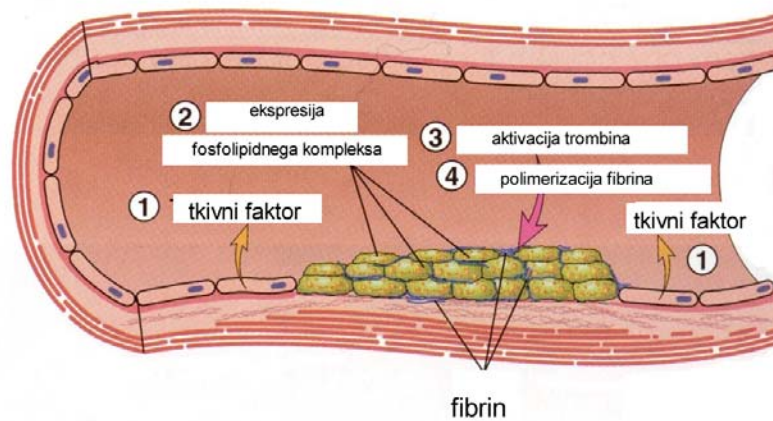
A. VAZOKONSTRIKCIJA



B. PRIMARNA HEMOSTAZA



C. SEKUNDARNA HEMOSTAZA



Slika 2: Mehanizem normalne hemostaze. Prirejeno po Cotran SR, Kumar V, Collins T (8).

1.1.2. SEKUNDARNA HEMOSTAZA

Sočasno z nastajanjem trombocitnega skupka nastaja fibrin. Gre za tako imenovano sekundarno hemostazo. Fibrin nastane v zaporedju reakcij, ki jih s skupnim imenom imenujemo koagulacija krvi (Slika 2).

Koagulacijski sistem sestavljajo beljakovine, lipoproteini in kalcijevi ioni. Pri koagulaciji sodeluje 13 faktorjev, ki jih označujemo z rimskimi številkami. Razen Ca^{2+} so vsi beljakovine. V krvnem obtoku so koagulacijski faktorji v neaktivni obliki, so proencimi (F XII, F XI, F X, F IX, F VII, F II) in kofaktorji (F V, F VIII). Pretvorba proencima v encim ne zadošča, da bi reakcija lahko potekla. Potrebna je prisotnost kofaktorja, ki nima lastnosti encima. Kofaktor omogoči:

- da encim prepozna substrat,
- večjo učinkovitost encima,
- specifičnost encima, da npr. razgradi vez arginin-izo-levcin le v FX, ne pa v FII;
- da je reakcija le na površini celic (tkivni faktor – TF je integralni del celičnih membran);

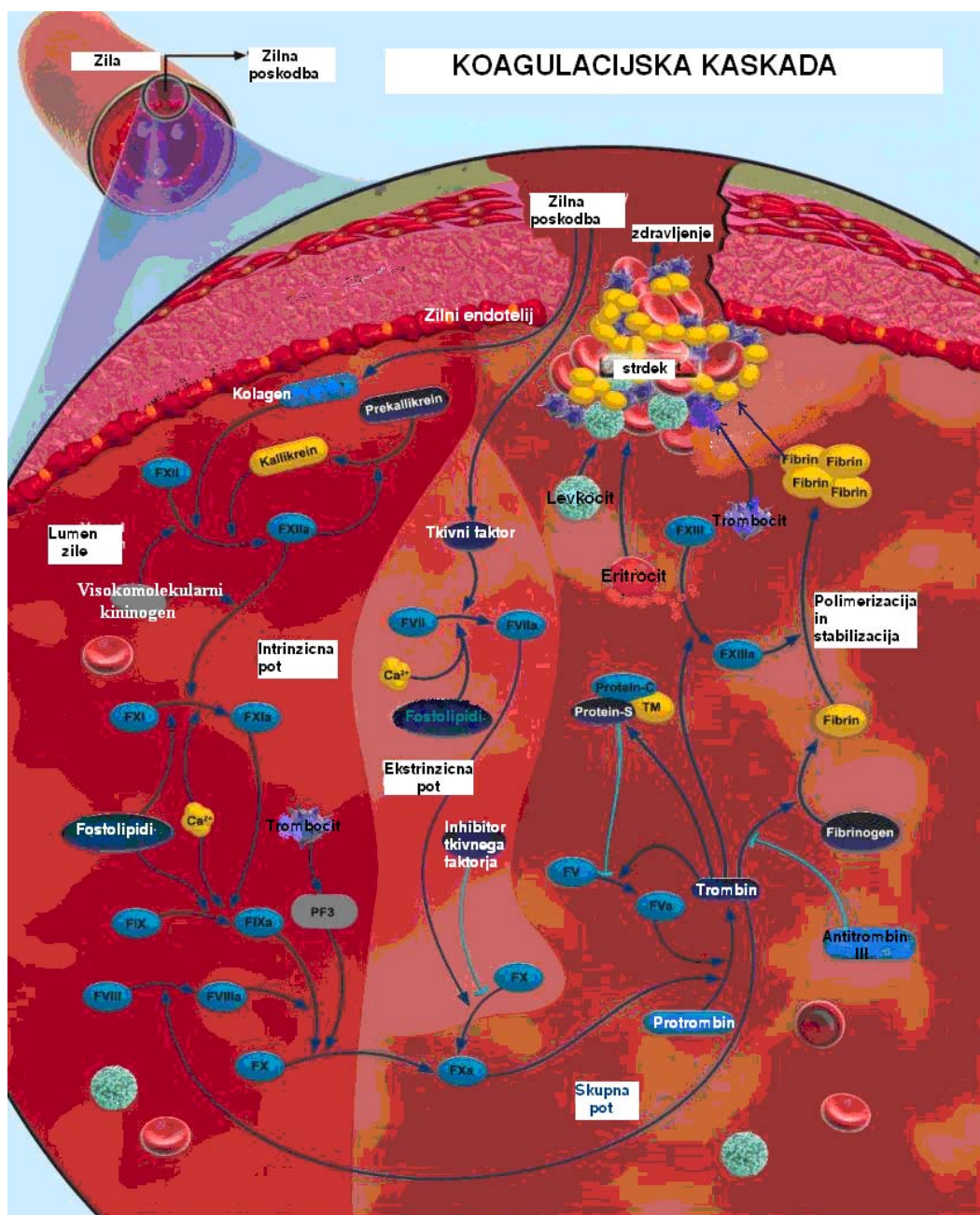
Koagulacijski faktorji so prisotni v krvnem obtoku, le FIII (tkivni tromboplastin, tkivni faktor TF) je sestavina celičnih membran. Je transmembranski glikoprotein in je na površini številnih celic, ki normalno niso v stiku s krvjo (2).

Koagulacijske beljakovine-tkivne faktorje (F) po dogovoru označujemo z rimskimi številkami, za aktivirano obliko tkivnega faktorja pa dodamo faktorju črko a, npr. FVa (Faktor pet a).

V nizu reakcij, ki jih imenujemo kaskada, en faktor aktivira drugega, drugi tretjega itd. Koagulacija in vivo poteka po dveh poteh, ki delujeta sočasno in ju zaradi lažjega razumevanja ločimo notranjo (intrinzično) in zunanjo (ekstrinzično) pot (3) (Slika 3).

1.1.2.1. NOTRANJA ALI INTRINZIČNA POT

Notranja pot se začne z aktiviranjem FXII in FXI na subendotelijskih strukturah v procesu, ki ga imenujemo kontaktna aktivacija. FXII se aktivira z delno proteolizo. Za reakcijo sta potrebna kalikrein in visokomolekularni kininogen (HMWK). Faktorji notranje poti (FXII, FXI, FIX in FX) se aktivirajo drug za drugim. FVIIIa skupaj s fosfolipidi in kalcijem pospeši aktivacijo FX v FXa. V tej reakciji je FIXa encim, FVIIIa pa kofaktor. FVIIIa nima kofaktorskih aktivnosti, dokler ga v aktivno obliko ne pretvori trombin (1) (Slika 3)



Slika 3: Prikazuje koagulacijsko kaskado (9).

1.1.2.2.***ZUNANJA ALI EKSTRINZIČNA POT***

Zunanja pot poteka preko FVII, ki se veže s tkivnim faktorjem. Tkivni faktor tvori skupaj s fosfolipidi tkivni tromboplastin. FVII je v majhnih koncentracijah vedno prisoten v krvi, kar vodi do pospeševanja aktivacije koagulacije. FVII aktivira FIX in FX. Skupaj s FX in tkivnim faktorjem se stvarja pospeševalna zanka, ki omogoča visoke aktivnosti FXa v kratkem času. FXa skupaj s FVa predstavlja tako imenovani protrombinazni kompleks-encimski kofaktorski kompleks, ki pretvarja FII (protrombin) v FIIa (trombin) (1).

(Slika 3)

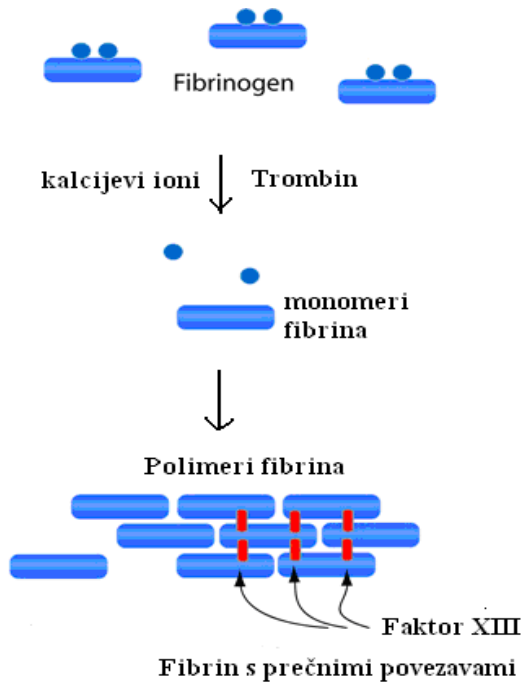
Faktor Xa nastane po 2 poteh:

- Prek ekstrinzične poti s katalitičnim kompleksom TF + FVIIa
- Prek intrinzične poti FXIIa katalizira pretvorbo FXI v FXI, ta pa aktivira FIX. Šele zatem FIXa aktivira FX.

Trombin je končni encim koagulacijske kaskade in nastane iz proencima protrombina (FII). FXa sproži pretvorbo protrombina ob prisotnosti FVa in Ca^{2+} . Za pretvorbo protrombina v trombin je potrebna negativno nabita celična površina s fosfolipidi. Gamakarboksiglutaminska konca molekul faktorjev II in Xa se povežeta prek kalcijevih ionov na fosfolipide na površini celic. Nastali kompleks cepi protrombin. To je tako imenovana skupna pot. Glavni učinek trombina je pretvorba fibrinogena v fibrin.

Fibrin nastane zaradi delovanja trombina na fibrinogen. Za to reakcijo so potrebni kalcijevi ioni.

Fibrinogen je glikoprotein in je dimer. Vsak od obeh enot je sestavljen iz treh verig: A alfa (α), B beta (β) in gama (δ). Posamezne verige so povezane prek disulfidnih vezi. S črkama A in B označimo peptide, ki so na središčnem in končnem delu verig alfa in beta. Trombin odcepi najprej peptid A, zatem pa še peptid B. Nastanejo monomeri fibrina, ki polimerizirajo v polimere fibrina, v obliki želatinastega strdka (fibrin brez prečnih povezav). Potem ko FXIIIa katalizira nastanek povezav med gama-gama, alfa-alfa stranskimi verigami polimerov, fibrinski strdek pridobi na trdnosti (fibrin s prečnimi povezavami) (2) (Slika 4).



Slika 4: Prikazuje nastanek fibrinskega strdka

Prيرهeno po: <http://www.platelets.se/resource/Coagulation.jpg> (10)

Motnje koagulacije imajo za posledico krvavitve ali trombozo. Nagnjenost h krvavitvi nastane zaradi pomanjkanja ali pomanjkljive aktivnosti koagulacijskih faktorjev ali zaradi prisotnosti protiteles z lastnostmi inhibitorjev faktorjev koagulacije. Pomanjkanje faktorjev koagulacije je lahko pridobljeno (jetrne bolezni, zdravila) ali pa prirojeno (2).

1.2. URAVNAVANJE KOAGULACIJE

V krvi kroži več zaviralcev koagulacije, prisotni pa so tudi v trombocitih. Ti zaviralci serinskih proteaz (serpini) omejujejo aktiviranje koagulacijskega sistema na ta način, da zavirajo ključne koagulacijske faktorje-encime. Zavrejo sistemsko aktiviranje in tako omejijo koagulacijo na področje, kjer je potrebna, npr. na področje poškodovane žile (1). Najpomembnejši zaviralci aktivnih encimov so antitrombin III, protein C in protein S. Njihovo delovanje je zlasti pomembno v krvnem obtoku (slika 3). Zdrava jetra lahko odstranjujejo aktivirane koagulacijske faktorje. Določene snovi iz krvnega obtoka zmanjšujejo koncentracijo reaktantov na mestu dogajanja, kjer je v začetku le majhna količina proencima aktivirana v encim. In končno se koagulacijski faktorji adsorbirajo na aktivne površine celic, da je nastajanje krvnega strdka normalno omejeno na mesto poškodbe (2).

1.2.1. Antitrombin III

Antitrombin III (AT III) je eden glavnih inhibitorjev koagulacije. Zavira delovanje serinskih proteaz, tako imenovanih encimov z aminokislino serin v aktivnem delu molekule, kot so trombin, FXa, FIXa, FXIa. AT III se počasi veže s temi encimi. Hitrost reakcije lahko bistveno poveča še heparin, ki pa ga v krvi ni, so pa njemu podobne molekule na površini endotelijskih celic, npr. heparan sulfat (2).

1.2.2. Protein C

Trombin, ki je vezan na trombomodulin, receptor v membrani endotelijskih celic, aktivira protein C. Aktivna oblika proteina C cepi kofaktorja FVa in FVIIIa in zavira pretvorbo protrombina v trombin. Za sintezo proteina C v jetrih je potreben vitamin K. Aktivirani protein C lahko zveča fibrinolizo, ker se veže v kompleks z inhibitorjem plazminskega aktivatorja PAI-1 (plasminogen activator inhibitor) in zavre ta inhibitor (2) (slika 5)

1.2.3. Protein S

Protein S je kofaktor proteina C. Izločajo ga trombociti in endotelijske celice. V plazmi ga je prostega 40 %, vezanega na protein C4b komplementarnega sistema pa 60 %. Vezani protein S je neaktiven (2).

1.2.4. Heparinski kofaktor II

Heparinski kofaktor (H CII) veže trombin in ga inhibira, ne reagira pa s FXa. Heparin, zlasti dermatan sulfat, pospeši učinkovitost HC II. Fiziološki pomen tega inhibitorja ni znan (2).

1.2.5. Alfa 2-makroglobulin

α_2 -makroglobulin (α_2 M) se nepovratno poveže s trombinom in ovira njegovo delovanje. α_2 M zaseda četrtno inhibicijske zmogljivosti za trombin v plazmi. Siceršnji pomen α_2 M ni znan (2).

1.2.6. Inhibitor za VIIa + tkivni faktor (TFPI tissue factor pathway inhibitor)

Je proteaza v plazmi, ki zavira kompleks F VIIa + TF. Za delovanje sta potrebna FXa in kalcijevi ioni. Ta inhibitor je za razliko od drugih inhibitorjev bivalenten, veže se na TF + FVIIa in FXa. Za njegovo aktivnost je vezava na FXa nujna. Ker FXa nastane zaradi delovanja TF + FVIIa, pomeni ta inhibitor negativno povratno zanko v sistemu (2).

1.2.7. Alfa-1- antitripsi)

α_1 -antitripsin (α_1 AT) je inhibitor trombina, pa tudi FXa in FIXa. Najverjetneje je α_1 AT glavni inhibitor F XIa (2).

1.2.8. Inhibitor C1

Izločajo ga trombociti iz zrnca alfa po stimulaciji s trombinom ali kolagenom. Inhibira F XIIa in kalikrein v plazmi.

Dedno ali pridobljeno pomanjkanje ali pomanjkljiva aktivnost inhibitorjev, kot so AT III, protein C, protein S in drugih ima lahko za posledico trombofilijo (nagnjenost k trombozi). Trombofilija se lahko pojavi tudi zaradi bolezni (rak) in različnih fizioloških stanj kot je nosečnost, ali pa se pojavi po operaciji. Takrat večinoma z laboratorijskimi preiskavami ne ugotovimo sprememb v hemostazi (2).

1.3. FIBRINOLITIČNI SISTEM

Fibrinoliza je pomemben fiziološki mehanizem, ki razgrajuje fibrinske strdke in omejuje njihovo širjenje po tem, ko so že opravili svojo fiziološko vlogo (1).

Fibrinolitični sistem se aktivira sočasno s koagulacijo. Endotelijske celice sprostijo tkivni aktivator plazminogena (tPA), ki aktivira plazminogen v plazmin. Ta hidrolizira fibrin v topne produkte razgradnje. Tako se trombus raztaplja in zmanjšuje. Plazminogen, ki kroži po krvi, je zajet v mreži fibrina v nastajajočem trombusu ali pa se ponovno veže nanj. Plazmin lahko razgradi fibrinogen in fibrin v t.i. fibrinske in fibrinogenske degradacijske produkte (D – dimer...) (4).

1.4. TROMBOFILIJA

Trombofilija je prirojena ali pridobljena nagnjenost k nastanku venskih ali arterijskih tromboz. Strdek, ki nastane, lahko zamaši veno ali arterijo. Pretežno je posledica motenj v koagulaciji in fibrinolizi in je zato stanje, pri katerem je dinamično ravnovesje med nastankom in razgradnjo fibrina nagnjeno v smer nastajanja fibrina. Ravnovesje se poruši bodisi zaradi sprememb v sestavi krvi, lastnosti žilne stene ali sprememb v toku krvi. Nastajanje fibrina je lahko pospešeno zaradi:

- pomanjkljivosti inhibitorjev trombina (antitrombina, proteina C in proteina S);
- pomanjkljivosti pri uravnavanju nastajanja trombina (negativna povratna zanka, ki vključuje trombomodulin, protein C in protein S);
- Povečane aktivnosti koagulacijskih faktorjev (protrombina, F VIII) (1).

Rizični dejavniki za trombofilijo so :

- pridobljeni: starost, operacije, imobilizacija, rak, peroralna kontracepcija, nosečnost, jetrne bolezni;
- prirojeni: pa so pomanjkanje proteina C in proteina S, mutacija Faktor V Leiden, mutacija protrombina, hiperhomocisteinemija.

Za kar 36 % trombofilij ne najdemo vzroka.

Mednarodna enota (E/mL) aktivnosti za posamezen parameter je definirana glede na določene aktivnosti ustreznega mednarodnega standarda.

E/mL je torej definirana kot vrednost aktivnosti ki je prisotna v 1 mL mednarodnega standarda (14).

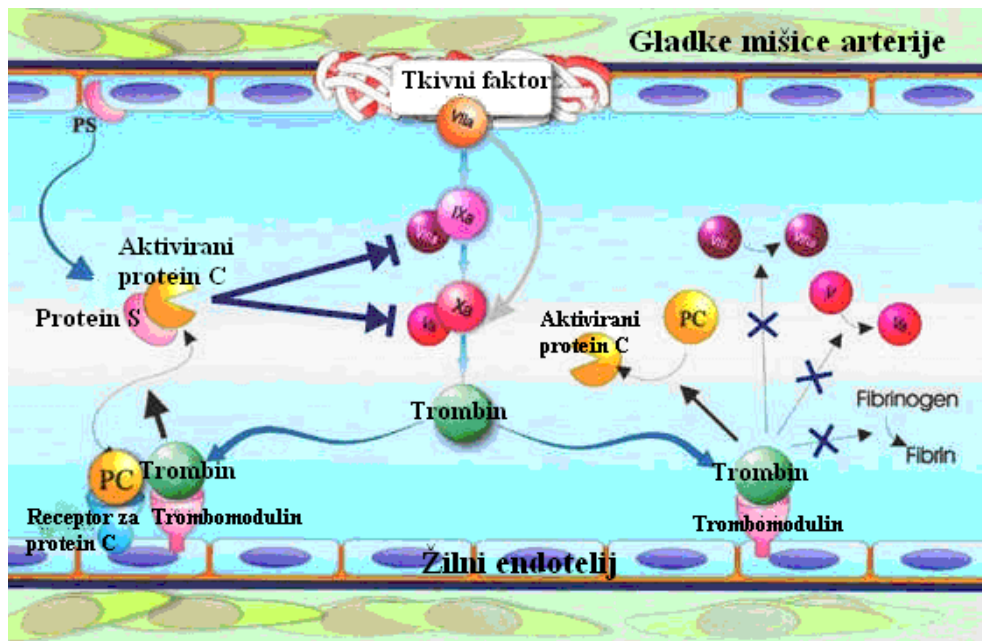
1.4.1. Protein C

Za normalno nastajanje proteina C v jetrih je potreben vitamin K. Protein C se veže na beljakovino na površini endotelijske celice, imenovano trombomodulin, ki ga aktivira trombin. V povezavi s proteinom S povzroči proteolizo F Va in F VIIIa (Slika 5). Pomanjkanje proteina C in proteina S se deduje avtosomno dominantno. Pri nekaterih bolnikih s trombozo so ugotovili funkcijsko neučinkovitost proteina C. Bolniki, ki so heterozigoti (okvarjen imajo en alel gena za protein C) in imajo za polovico zmanjšano raven proteina C, se nagibajo k možganski kapi že v otroštvu, k venskim trombozam in embolijam ter arterijskim trombozam.

Pri bolnikih s pomanjkanjem proteina C, ki so homozigotni (okvarjena sta oba alela gena za protein C), se lahko po porodu pojavi fulminantna diseminirana intravaskularna koagulacija. Lahko se konča s smrtjo, če pomanjkanja proteina C ne prepoznamo.

Pridobljeno pomanjkanje proteina C nastane lahko zaradi pomanjkanja vitamina K, jetrnih bolezni ali diseminirane intravaskularne koagulacije (DIC).

Odnos med ravniyo proteina C in S ter tveganjem za trombozo ni tako jasen kot pri antitrombinu III (AT III). Domnevajo, da je za nastanek tromboz potreben še dodaten dejavnik. Bolnikom s pomanjkanjem proteina C, ki so doživeli trombozo, se profilaktično daje kumarine. Pojav tromboz lahko preprečujemo tudi s dodajanjem heparina, jemanjem aspirina itd (4).



Slika 5: Prikazuje delovanje proteina C (11).

1.4.2. Določanje Proteina C

Protein C se *in vivo* aktivira s trombinom, v prisotnosti trombomodulina. Protein C se lahko aktivira tudi s proteinsko frakcijo strupa kače bronastega glaveža (*Agkistrodon contortrix contortix*), kar tudi v Specializiranem hematološkem laboratoriju (SHL) uporabimo za določanje proteina C.

Reagenčni kit Protein C, HemosIL™ (Instrumental Laboratory, kat. št: 0020300500) je osnovan na sintetičnem kromogenem substratu. Raven proteina C v pacientovi plazmi je merjena avtomatsko na Koagulacijskem sistemu IL v 2 stopnjah:

V prvi stopnji inkubiramo preiskovano plazmo z aktivatorjem proteina C, ki vsebuje strup bronastega glaveža. Pride do aktivacije proteina C.

V naslednji stopnji dodamo sintetičnim kromogeni substrat, sprosti se paranitroanilin. Merimo absorbanco paranitroanilina pri 405 nm, ki je sorazmerna koncentraciji proteina C v vzorcu (5).

Referenčno območje: (0,70 - 1,34) E/mL

E/mL = mednarodnih enot/ mL

1.5. Protein S

Protein S je kofaktor proteina C. Lahko je prost v plazmi ali pa vezan na protein C4b komplementnega sistema in kot tak neučinkovit. Vnetje lahko zveča raven proteina C4b in obenem tako tudi delež vezanega proteina S.

Večina heterozigotnih oseb s pomanjkanjem proteina S ima zmanjšano koncentracijo antigena proteina S, manjši del (30%) pa ima normalno koncentracijo antigena, vendar zvečan del vezanega proteina S. Določimo lahko koncentracijo antigena, nimamo pa zanesljivega postopka za merjenje funkcije proteina S.

Pridobljeno pomankanje proteina S se lahko opazi pri jetrnih boleznih, zaradi jemanja hormonskih kontraceptivov ali med nosečnostjo in zaradi nastanka inhibitorja proteina S pri sistemskem lupusu eritematozusu.

Bolnike s pomanjkanjem proteina S profilaktično zdravimo s kumarini. Trombozo zdravimo s heparinom, aspirinom... (4)

1.5.1. Določanje antigena prostega proteina S

Kvantitativno določanje antigena prostega proteina S je zasnovano na merjenju porasta motnosti, ki nastane v dveh korakih po aglutinaciji dveh lateks reagentov. V prvem koraku se protein S v plazmi adsorbira na delce lateksa prekrivane z naravnim ligandom C4bP, v prisotnosti Ca^{2+} .

V drugem koraku dodamo lateksove delce prekrivane z monoklonskimi protitelesi proti humanemu proteinu S. V prisotnosti prostega proteina S nastane aglutinacija C4bP-lateks in proti P-S Mab lateksovih delcev. Stopnja aglutinacije je sorazmerna koncentraciji prostega proteina S antigena.

Referenčno območje: M : (0,72- 1,23) E/mL

Ž : (0,57 – 1,12)E/mL

1.5.2. Določanje aktivnosti prostega proteina S

Funkcijo proteina S ovrednotimo z merjenjem podaljšanja protrombinskega časa – PČ. Plazmi z ugotovljenim pomanjkanjem PS (deficitni plazmi) dodamo bolnikovo plazmo, aktiviran PC in reagent za PČ (tkivni faktor, fosfolipid, in kalcijevi ioni). Stopnjo podaljšanja PČ, po dodatku bolnikove plazme deficitni plazmi, primerjamo s podaljšanjem, ki nastane po dodatku plazme z znano aktivnostjo proteina S.

Referenčno območje: (0,62 - 1,45) E/mL

1.6. Antitrombin III (AT III)

Je glavni inhibitor koagulacije in inhibira trombin, F VIIa, F IXa, F Xa, F XIa. Heparin je lahko učinkovit le v zvezi z AT III.

Obstaja zmanjšano tvorjenje AT ali pa nastajajo neučinkovite molekule inhibitorja. Dedovanje te motnje je avtosomno dominantno. Pri dednem pomanjkanju AT so pogoste tromboze, zlasti venske. Določimo aktivnost AT in koncentracijo antigena. Pri dedni neučinkoviti sintezi AT je koncentracija antigena normalna, aktivnost pa ne. Pridobljeno pomanjkanje AT je lahko zaradi jetrne bolezni in izgube beljakovin, če se z njimi izgublja tudi AT. Antitrombin določamo pri sumu na prirojeno ali pridobljeno pomanjkanje AT III in pri sumu na DIC (4).

1.6.1. Določanje AT III

Določanje antitrombina temelji na določanju posrednega zaviranja trombina ali faktorja Xa. Antitrombin, ki je v vzorcu, se pretvori v hitri zaviralec z dodatkom heparina. Preostalo aktivnost encima (trombina ali faktorja Xa) določimo z merjenjem razgradnje sintetičnega kromogenega substrata-paranitroanilina. Izmerjena sprememba optične gostote je obratno sorazmerna aktivnosti antitrombina (6).

Referenčno območje: (0,76 - 1,22) E/mL

1.7. Lupusni antikoagulanti (LA)

Lupusni antikoagulanti so avtoprotitelesa proti negativno nabitim fosfolipidom ali kompleksom med fosfolipidi in proteinom (npr. protrombin).

Ne le da prisotnost LA ni povezana z nagnjenostjo k krvavitvam, temveč so LA znani rizični dejavnik za trombozo. Mehanizem kako vplivajo LA na trombozo pa zaenkrat še ni dokončno pojasnjen. (14)

Preiskavo za lupusne antikoagulate opravimo pri podaljšanih koagulacijskih časih, kot so parcialni tromboplastinski čas (PTČ), pri povečanem nagnjenju k trombozi, avtoimunskih boleznih (eritomatozni lupus).

1.7.1. Določanje lupusnih antikoagulantov

V SHL se za določanja LA uporabljata 2 testa:

- LAC SCREEN = Presejalni test za prisotnost lupusnih antikoagulantov
- LAC CONFIRM = Potrditveni test za prisotnost lupusnih antikoagulantov

Reagent Lac Screen je reven s fosfolipidi in je tako bolj občutljiv na LA. Ko dodamo reagent Lac Confirm, ki je bogat s fosfolipidi, nevtraliziramo LA in tako dobimo krajši čas, potreben za nastanek strdka.

Strup Russelovega modrasa v prisotnosti kalcijevih ionov aktivira faktor X v vzorcu, kar vodi do nastanka strdka. Merimo čas, ki je potreben za nastanek strdka.

Rezultat izrazimo kot normalizirano razmerje (R):

Razmerje presejalnega testa = sekunde bolnika / sekunde kalibracijske plazme

Razmerje potrdilnega testa = sekunde bolnika / sekunde kalibracijske plazme

Normalizirano LA razmerje = razmerje potrdilnega testa / rezultat presejalnega testa

Razmerje:

Večje od 2 pomeni močno prisotnost LA

Med 1,5 in 2 pomeni zmerno prisotnost LA

Med 1,2 in 1,5 pomeni šibko prisotnost LA

Manj kot 1,2 pomeni da LA niso prisotni

1.8. Neodzivnost za aktivirani protein C

Nenormalnost faktorja V (FV) zaradi mutacije v genu za *FV* je lahko eden od vzrokov za neodzivnost za aktivirani protein C (APCR). Posledica tega je odsotnost cepitvenega mesta za protein C v FV. Ta nenormalni FV imenujemo FV Leiden. Bolniki se nagibajo k venski trombozi. Omenjeno mutacijo FV Leiden najdemo pri 3-5 odstotkih zdravih oseb in pri 20 odstotkih tistih, ki imajo vensko trombozo (4).

1.8.1. Določanje APCR

Določanje APCR je presejalni test za določitev *faktorja V Leiden*. Glede na občutljivost testa (nad 99 odstotkov) pomeni vrednost razmerje APC manjše od 2,3 visoko verjetnost za obstoj genske okvare.

Test je osnovan na PTČ - reakciji. Izvedemo dve reakciji APTT za posamezen vzorec. Oba vzorca razredčimo z reagentom brez FV in nato inkubiramo z PTČ reagentom določen čas. Strjevanje sprožimo z dodatkom CaCl_2 . V enem vzorcu je prisoten aktiviran protein C, v drugem pa ne.

Merimo čas, ki je potreben za nastanek strdka. Rezultat podamo kot razmerje, teh dveh časov potrebnih za nastanek strdka, imenovano razmerje APC.

Referentne vrednosti: razmerje APC med 2.3 – 3.2 (7).

1.9. Preiskava za oceno delovanja poti proteina C (Trombopath)

Hemosil TromboPath (ThP) je avtomatizirana kromogena metoda za ocenjevanje funkcije antikoagulacijske poti proteina C v človeški citratni plazmi na Koagulacijskem sistemu IL. Preiskava je namenjena kot dodatna preiskava pri diagnostiki trombofilij, kot so prirojena ali pridobljena pomankanja proteina S (PS) in proteina C (PC), neodzivnost za aktivirani protein C (mutacija *faktor V Leiden*) in prisotnost lupusnih antikoagulantov, ki so velikokrat povezani s povečanim tveganjem za nastanek tromboz.

Test je občutljiv tudi na povečane vrednosti protrombina (FII) in faktorja VIII, ki sta tudi znana dejavnika tveganja za nastanek tromboz.

Glavne značilnosti metode Trombopatha so:

- občutljiva na pomanjkanje proteina C, proteina S, neodzivnost za aktivirani PC, prisotnost LA;
- je visoko, enako občutljiva tako na pomanjkanje proteina S kot na pomanjkanje proteina C;
- 100-odstotno občutljiva na mutacijo FV Leiden in prisotnost lupusnih antikoagulantov;
- občutljiva na povišan FVIII in FII (nad 150 odstotkov zviša PiCi %);
- z metodo lahko ločimo večino zdravih od bolnikov z disfunkcijami, ki potrebujejo nadaljnje testiranje.

Visoka občutljivost in specifičnost bi omogočila uporabo TromboPatha kot prve preiskavo pri ocenjevanju trombotičnega tveganja in trombofilij.

HemosIL TromboPath določi motnjo v delovanju antikoagulacijske poti PC z merjenjem endogenega trombina.

Kot rezultat izrazimo PiCi %, kar pomeni delež zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa.

Način:

Nov način opredelitve motnje v delovanju PC (Trombopath) temelji na aktivaciji endogenega PC z izvlečkom kačjega strupa (Protac), ki zmanjša nastanek trombina v vzorcu citratne plazme. Meritev opravimo z aktivacije PC z izvlečkom kačjega strupa (aktivator A) in brez aktivacije (aktivator B) ter v obeh primerih izmerimo spremembo absorbance, ki jo dobimo, ko trombin cepi kromogeni substrat. Izsledke izrazimo kot delež zavrte koagulacije, ki jo sprožimo z izvlečkom kačjega strupa.

Aktivator A vsebuje kačji strup- Protac, ki aktivira PC. Reagent B je brez Protaca, zato se PC ne aktivira.

$$PiCi\% = \frac{(\text{optična gostota z aktivatorjem B} - \text{optična gostota z aktivatorjem A})}{(\text{optična gostota z aktivatorjem B})} \times 100$$

Če je popolna inhibicija trombina, je absorbanca z reagentom A= 0 delež zavrte koagulacije je 100 %.

Če pa do inhibicije ne pride je absorbanca z reagentom A enaka absorbanci z reagentom B, deleže zavrte koagulacije je 0 %.

V števcu zgornje enačbe ocenimo inhibicijo trombina, ki ga aktivira Protac, medtem ko imenovalc označuje nastajanje trombina.

Za preiskavo moramo določiti mejno vrednost na zdravih preiskovancih. Mejna vrednost je srednja vrednost PiCi %, zmanjšana za 1 standardno deviacijo (SD). Vrednosti ki jih dobimo pod to vrednostjo, se smatrajo za patološke. Za te vzorce se priporoča še dodatne preiskave za oceno trombofilij, kot so določanje aktivnosti proteina C, aktivnosti proteina S, rezistence za aktiviran protein C, ugotavljanje prisotnosti lupusnih antikoagulantov

(diskriminatorna meja se določi na vsakem inštrumentu. Pod diskriminatorno mejo so vzorci lahko patološki tudi za PC, PS, rezistenco za aktivirani protein C in lupusne antikoagulate.)

2. NAMEN DELA

Dedno ali pridobljeno pomanjkanje ali pomanjkljiva aktivnost inhibitorjev koagulacije, kot so antitrombin (AT III), protein C (PC), proteina S (PS) in drugih ima lahko za posledico trombofilijo (nagnjenost k trombozi).

Med pomembne laboratorijske preiskave za oceno trombofilije uvrščamo določitev aktivnosti AT III, aktivnosti PS, antigena PS, aktivnosti PC, neodzivnosti za aktivirani PC (mutacija faktor V Leiden), prisotnost lupusnih antikoagulantov in povečano aktivnost faktorja VIII (FVIII). Za opredelitev trombofilije običajno opravimo vse preiskave sočasno.

Nov način opredelitve motnje v delovanju PC (Trombopath) temelji na aktivaciji endogenega PC z izvlečkom kačjega strupa (Protac), ki zmanjša nastanek trombina v vzorcu citratne plazme. Meritev opravimo z in brez aktivacije PC z izvlečkom kačjega strupa ter v obeh primerih izmerimo spremembo absorbance, ki jo dobimo, ko trombin cepi kromogeni substrat. Izsledke izrazimo kot delež zavrite koagulacije, ki jo sprožimo z izvlečkom kačjega strupa.

Z novim načinom, ki je občutljiv na pomanjkanje aktivnosti PS, antigena PS, aktivnosti PC, neodzivnosti za aktivirani PC (mutacija Faktor V Leiden), prisotnost lupusnih antikoagulantov in povečano aktivnost faktorja VIII (FVIII), bi lahko k opredelitvi trombofilije pristopili stopenjsko, v dveh korakih. V prvem bi z novim načinom ugotovili, v drugem opredelili motnjo v delovanju PC s posameznimi laboratorijskimi preiskavami.

K vpeljavi in oceni primernosti načina bomo pristopili z določitvijo mejne vrednosti deleža zavrite koagulacije po priporočilih proizvajalca kompleta, ki jo bomo pridobili iz izsledkov zdravih preiskovancev. Za patološke vrednosti bomo smatrali tiste pod to mejo. Iz izsledkov bomo izračunali specifičnost preiskave, ki jo bomo opredelili kot delež zdravih, pri katerih je rezultat negativen. Občutljivost preiskave bomo izračunali na osnovi izsledkov bolnikov s sumom na trombofilijo in na osnovi potrjene patološke vrednosti posameznih preiskav pri teh bolnikih.

3. MATERIAL IN METODE

3.1. *Preiskovanci*

V preiskavo smo vključili 41 zdravih oseb, 37 žensk (90 %), ter 4 moške (10 %). Normalne vzorce oz zdrave smo dobili od sodelavcev iz Hematološkega laboratorija ter od medicinskih sester s KO za hematologijo, Interna klinika, UKC Ljubljana. Razpon starosti je bil od 20 let do 72 let, mediana pa je 28 let. Od preiskovancev smo dobili ustni pristanek pred pričami. Rezultati raziskave niso vplivali na zdravljenje bolnikov.

Iz statistične analize smo izključili dobljene vrednosti 7 normalnih preiskovancev, z aktivnostjo faktorja FII in FVIII pod 0,5 E/mL oziroma aktivnostjo nad 1,5 E/mL (po priporočilih proizvajalca Instrumentation Laboratory). Poleg tega smo iz statistične analize izključili preiskovanca zaradi prisotnosti lupusnih antikoagulantov.

V statistično analizo smo vključili 33 zdravih preiskovancev, 4 moški (12 %) in 29 žensk (88 %). Razpon starosti je od 20 let do 54 let. Mediana znaša 28 let.

Poleg zdravih smo v preiskavo vključili tudi 53 bolnikov s sumom oz. potrjeno trombofilijo, 20 moških (38 %) in 33 žensk (62 %). Razpon starosti bolnikov je od 22 do 79 let, mediana pa je 45 let. Uporabili smo kri bolnikov, kjer so bile naročene preiskave za oceno trombofilije.

Od preiskovancev smo dobili ustni pristanek pred pričami. Rezultati raziskave niso vplivali na zdravljenje bolnikov. Izvedeni postopki so bili v skladu z načeli Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah na človeku (1975).

3.2. *Odvzem vzorcev*

Vzorci krvi so bili odvzeti v epruvete, ki so vsebovale 0,105 M natrijev citrat (2 x 5mL). Razmerje med krvjo in natrijevim citratom je bilo 10:1. Odvzeta kri je bila v SHL dostavljena pri sobni temperaturi, nato smo jo centrifugirali 15 minut na 3000 obratov/min oziroma 1942 x g (centrifuga Multifuge 3S/3S-R Heraeus), pri 4°C. Dobljeno plazmo smo nato shranili v 2 epruveti in zamrznili na -20°C.

Zmrznjene plazme smo odmrznili v inkubatorju pri 37°C.

3.3. Aparati in pribor

- **aparat ACL TOP** (Instrumentation Laboratory) je sodoben, popolnoma avtomatiziran koagulacijski analizator, namenjen za rutinske ter specialne preiskave za oceno hemostaze. Na njem lahko izvedemo koagulacijske preskuse, preskuse z uporabo kromogenih substratov in avtomatizirane imunske preskuse z uporabo lateks delcev. Aparat izmeri čas, ki je potreben, da nastane strdek z načinom turbidimetrije. Strdek se tvori, ko se fibrinogen pretvarja v fibrin. Zaradi nastanka strdka se spremeni optična gostota vzorca. Na fotodetektorju, ki je nameščen pod kotom 180° glede na vir svetlobe z valovno dolžino 671 nm, merimo prepuščeno svetlobo. Vir svetlobe je LED dioda. Prepustnost svetlobe se zmanjšuje, ko se začne tvoriti fibrinski strdek. Spremeni se električni signal iz fotodetektorja. Ta signal se naprej obdela s serijo algoritmov, ki omogoči določitev časa nastanka strdka.

- **aparat ACL 9000** (Instrumentation Laboratory) je računalniško voden analizator na katerem lahko izvedemo koagulacijske preskuse, preskuse z uporabo kromogenih substratov in avtomatizirane imunske preskuse z uporabo lateks delcev. Čas do nastanka strdka izmeri z načinom nefelometrije pri valovni dolžini 660 nm. Vir svetlobe je LED dioda (Light emitting diode). Pri nastanku strdka narašča intenzivnost razpršene svetlobe.

- centrifuga Multifuge 3S/3S-R (Heraeus)
- epruvete, kivete
- pipete
- magnetna mešala

3.4. Reagenti

3.4.1. Reagenti za Trombopath

Reagenčni komplet HemosIL **TromboPath** (kataloška št: 0020005500) HemosIL TM, Instrumentation Laboratory vsebuje:

- **ThP diluent** (kataloška št: P/N 0020005521)
- **ThP substrat** (kataloška št: P/N 0020005522)
- **ThP Tromboplastin** (kataloška št: P/N 0020005523)
- **ThP aktivator A** (kataloška št: P/N 0020005524)
- **ThP aktivator B** (kataloška št: P/N 0020005525)
- **ThP nizka kontrolna plazma** (kataloška št: P/N 0020005526)

Potrebujemo še:

- **Normalna kontrola** (HemosIL, Instrumental laboratory kataloška št:0020003110)

Priprava in shranjevanje reagentov in kontrol:

reagenti	priprava/raztapljamo z:	priprava	shranjevanje/stabilnost
Diluent	le premešamo	/	2 dni pri 2-8°C oz. 3 tedni pri -20°C
Substrat	8 mL redestilirane vode	pustimo stati 30 minut na sobni temperaturi in premešamo z obračanjem	2 dni pri 2-8°C oz. 3 tedni pri -20°C
Tromboplastin	4mL redestilirane vode		2 dni pri 8°C, NE ZMRZUJEMO
Aktivator A in B	5 mL redestilirane vode		2 dni pri 2-8°C oz. 3 tedni pri -20°C
Thp nizka kontrola	1 mL redestilirane vode		7 dni pri -20°C oz. 4 ure pri 15-25°C
Normalna kontrola	1 mL redestilirane vode		24 ur pri 2-8°C oz. 4 ure pri 15-25°C

3.5. Reagenti za določevanje faktorja II

- Reagenčni komplet **RecombiPlasTin**, HemosIL™ (kataloška št: 0020003000)
HemosIL™, Instrumentation Laboratory vsebuje :
 - **RecombiPlasTin (RTF)** HemosIL™, vsebuje liofilizirani rekombinantni humani tkivni faktor, sintetične fosfolipide s stabilizatorji, konzervanse in pufer.
 - **RecombiPlasTin diluent (RTF dil.)**, HemosIL™ vsebuje enako razmerje kalcijevega klorida, polibrena (kationski polimer) in konzervansov.

Potrebujemo še:

- **Faktor II deficitna plazma**, HemosIL™ (IL, kataloška št: 0008466000)
Plazma vsebuje manj kot 1 % faktorja II
- **Kalibracijska plazma**, HemosIL™ (IL, kataloška št: 0020003700)
- **Normalna kontrola**, HemosIL™ (IL, kataloška št: 0020003110)
- **Specialna kontrola 2**, HemosIL™ (IL, kataloška št:002001200)

Priprava in shranjevanje reagentov, kontrol in kalibratorja:

reagenti	priprava/raztapljamo z:	priprava	shranjevanje/stabilnost
Recombiplastin	20 mL Recombiplastin diluenta odpipetiramo v Recombiplastin	Inkubiramo 15-20 min na sobni temperaturi	10 dni pri 2-8°C oz. 5 dni pri 15-25°C
Recombiplastin diluent			
Faktor II deficitna plazma	1 mL redestilirane vode	Inkubiramo na sobni temperaturi 30 min	24 ur pri 2-8°C
Kalibracijska plazma			8 ur pri 2-8°C
Normalna kontrola			
Specialna kontrola 2			8 ur pri 15-25°C

3.6. Reagenti za določevanje faktorja VIII

- Reagenčni komplet **APTT-SP** (Kataloška št: 002000630, HemosIL™, Instrumentation Laboratory) vsebuje:
 - **APTT reagent**
 - **Kalcijev klorid**

Potrebujemo še:

- **Deficitna plazma FVIII** (kataloška št: 0008466450), HemosIL™, Instrumentation Laboratory.
- **Kalibracijska plazma** : (kataloška št: 0020003700, HemosIL™)
- **Normalna kontrola**: (kataloška št: 0020003110, HemosIL™)
- **Specialna kontrola 2**: (kataloška št: 0020012000, HemosIL™)

Priprava in shranjevanje reagentov, kontrol in kalibratorja:

reagenti	priprava/raztapljamo z:	priprava	shranjevanje/stabilnost
APTT reagent	/	Le premešamo	2 dni pri 15°C
Kalcijev klorid	/		
Deficitna plazma FVIII	1mL redestilirane vode	Inkubiramo na sobni temperaturi 30 min in premešamo z obračanjem	24 ur pri 2-8°C
Kalibracijska plazma			8 ur pri 2-8°C
Normalna kontrola			4 ure pri 15-25°C
Specialna kontrola 2			8 ur pri 15-25°C

3.7. Reagenti za opredelitev trombofilij

3.7.1. Aktivnost proteina S

Reagenčni komplet **Pro S** (kataloška št: 0020002800), HemosIL™, vsebuje:

- **Protein S reagent** (kataloška št: 0020002810) vsebuje rekombinantni zajčji tkivni faktor, sintetične fosfolipide, kalcijeve ione, aktiviran Protein C, polibren, pufer.
- **Protein S deficitna plazma** (kataloška št: 0020002820) vsebuje plazmo z pomanjkanjem Proteina S.
- **Protein S kontrolna plazma** (kataloška št: 0020002830)

Potrebujemo še:

- **Normalna kontrola** (kataloška št: 0020003110), HemosIL™
- **Specialna kontrola 2:** (kataloška št: 0020012000), HemosIL™
- **Kalibracijska plazma** (kataloška št: 0020003700), HemosIL™

Priprava in shranjevanje reagentov, kontrol in kalibratorja:

reagenti	priprava/raztapljamo z:	priprava	shranjevanje/stabilnost
Protein S reagent	3 mL redestilirane vode	Inkubiramo 30 min na sobni temperaturi	1 uro na 15°C
Protein S deficitna plazma	1 mL redestilirane vode		4 ure pri 15-25°C oz. 7 dni pri -20°C
Protein S kontrolna plazma	1mL redestilirane vode		24 ur pri 2-8°C
Kalibracijska plazma		8 ur pri 2-8°C	
Normalna kontrola		Inkubiramo na sobni temperaturi 30 min	4 ure pri 15-25°C
Specialna kontrola 2			8 ur pri 15-25°C

3.7.2. Antigen proteina S

Reagenčni komplet **Free Protein S** (kataloška št. 20002700), HemosIL™, vsebuje:

- **C4BP pufer** vsebuje Borax pufer, bovini serum, albumin, stabilizatorje in konzervanse.
- **C4BP latex** je liofilizirana suspenzija polistiren lateks delcev, prevlečenih z humanimi C4BP, vsebuje bovini serum, albumin, stabilizatorje in konzervanse
- **Anti PS Mab lateks** je suspenzija polistirenskih lateks delcev prevlečenimi z monoklonskimi protitelesi proti humanemu PS, vsebuje bovini serum, albumin, stabilizatorje in konzervanse.

Kontrole:

- **Normalna kontrola** (kataloška št: 0020003110), HemosIL™
- **Specialna kontrola 1** (kataloška št: 0020011000), HemosIL™
- **Specialna kontrola 2** (kataloška št: 0020012000), HemosIL™
- **Kalibracijska plazma** (kataloška št. 0020003700), HemosIL™

Priprava in shranjevanje reagentov, kontrol in kalibratorja:

reagenti	priprava/raztapljamo z:	priprava	shranjevanje/stabilnost
C4BP lateks reagent	C4BP pufer prelijemo v C4BP lateks	Inkubiramo 30 min na sobni temperaturi	1 mesec pri 2-8°C oz 1 teden pri 15°C
C4BP pufer			
Anti PS Mab lateks	/	Le premešamo	1 mesec pri 2-8°C oz
Normalna kontrola	1 mL redestilirane vode	Inkubiramo 30 min na sobni temperaturi	24 ur pri 2-8°C
Specialna kontrola 1			8 ur pri 15-25°C
Specialna kontrola 2			24 ur pri 2-8°C
Kalibracijska plazma			24 ur pri 2-8°C

3.7.3. Protein C

Reagenčni komplet **Protein C**, HemosIL™ (kataloška št: 0020300500) vsebuje:

- **Topilo (Diluent)** (kataloška št: 002030530)
- **Protein C aktivator** (kataloška št: 0020300510)
- **Kromogeni substrat** (kataloška št: 002030500520)

Potrebujemo še:

- **Normalna kontrola** (kataloška št: 0020003110), HemosIL™
- **Specialna kontrola 1** (kataloška št: 0020011000), HemosIL™
- **Specialna kontrola 2** (kataloška št: 0020012000), HemosIL™
- **Kalibracijska plazma** (kataloška št: 0020003700), HemosIL™

Priprava in shranjevanje reagentov, kontrol in kalibratorja:

reagenti	priprava/raztapljamo z:	priprava	shranjevanje/stabilnost
Topilo (Diluent)	/	razredčimo z destilirano vodo v razmerju 1:10 (1+9).	/
Protein C aktivator	2,5 mL redestilirane vode	Inkubiramo 30 min na sobni temperaturi	7 dni pri 15°C oz 3 mesece pri 2-8°C
Kromogeni substrat	2 mL redestilirane vode		3 mesece pri 2-8°C
Normalna kontrola	1 mL redestilirane vode		24 ur pri 2-8°C
Specialna kontrola 1			8 ure pri 15-25°C oz 24 ur -20°C
Specialna kontrola 2			8 ur pri 15-25 °C oz 24 ur -20°C
Kalibracijska plazma			24 ur 2-8° C

3.7.4. *Antitrombin III*

Reagenčni komplet **Liquid antithrombin**, HemosIL™ (kataloška št:0020002500)

vsebuje:

- **Kromogeni substrat** (kataloška št: 0020002520)
- **Faktor Xa reagent** (kataloška št: 0020002510)

Potrebujemo še:

- **Normalno kontrolo** (kataloška št: 0020003110), HemosIL™
- **Specialna kontrola 1** (kataloška št: 0020011100), HemosIL™
- **Specialna kontrola 2** (kataloška št: 0020012100), HemosIL™
- **Kalibracijska plazma** (kataloška št: 0020003700), HemosIL™

Priprava in shranjevanje reagentov, kontrol in kalibratorja:

reagenti	priprava/raztapljamo z:	priprava	shranjevanje/stabilnost
Kromogeni substrat	/	Le premešamo	5 tednov pri 2-8°C
Faktor Xa reagent	/		
Normalna kontrola	1 mL redestilirane vode	Inkubiramo 30 min na sobni temperaturi	24 ur pri 2-8°C
Specialna kontrola 1			8 ur pri 15-25 °C oz
Specialna kontrola 2			24 ur -20°C
Kalibracijska plazma			24 ur pri 2-8°C

3.7.5. Neodzivnost za aktivirani protein C

Reagenčni komplet **Faktor V Leiden (APCTM resistance V)**, HemosILTM (kataloška št: 0020008700) vsebuje:

- **APTT reagent** (kataloška št: 0020008721)
- **Faktor V reagent** (kataloška št: 0020008723)
- **APC/Kalcijev klorid** (kataloška št: 00200087)22
- **Kalcijev klorid** (kataloška št: 0020008720)
- **APC kontrolna plazma 1** (kataloška št: 0020008724)
- **APC kontrolna plazma 2** (kataloška št: 0020008725)

Potrebujemo še:

- **Normal control** (kataloška št. 0020003110), HemosILTM

reagenti	priprava/raztapljamo z:	priprava	shranjevanje/stabilnost
APTT reagent	/	Le premešamo	1 teden pri 15 – 25°C oz 1 mesec pri - 20°C
Faktor V reagent	4 mL destilirane vode	Inkubiramo 30 min na sobni temperaturi	8 ur pri 15°C ali 24 ur pri 2 - 8°C oz 3 mesece pri - 20°C
APC/Kalcijev klorid	2 mL destilirane vode		8ur pri 15 – 25°C ali 5 dni pri 2 - 8°C oz 3 mesece pri - 20°C
Kalcijev klorid	/	Le premešamo	1 teden pri 15 – 25°C oz1 mesec pri - 20°C
APC kontrolna plazma 1	1 mL redestilirane vode	Inkubiramo 30 min na sobni temperaturi	6 ur pri 2- 8°C ali 3 mesece pri -20°C
APC kontrolna plazma 1			
Normalna kontrola			24 ur pri 2-8°C

3.7.6. *Lupusni antikoagulanti*

- **LAC Screen** (P/N 200080) Vsebuje Russellov modrasov strup, fosfolipide, kalcij, polibren, pufer
- **LAC Confirm** (P/N 200081) Vsebuje Russellov modrasov strup, fosfolipide, kalcij, polibren, pufer

- **Kontrola:**

Normal control (kataloška št: 0020003110), HemosIL™

reagenti	priprava/raztapljamo z:	priprava	shranjevanje/stabilnost
LAC Screen	2 mL destilirane vode	Inkubiramo 30 min na sobni temperaturi	24 ur pri 20 do 25°C ali
LAC Confirm			1 mesec pri -20°C
Normal control	1mL destilirane vode		24 ur pri 2-8°C

3.8. Statistični postopki

Statistično vrednotenje dobljenih rezultatov smo opravili s statističnim programom Windows Excel.

Vsem izmerjenim vrednostim smo določili aritmetično sredino, standardno deviacijo, mediano, ki predstavlja vrednost, od katere ima polovico enot manjše vrednosti, polovica enot pa večje. Poleg tega smo določili tudi minimalno vrednost, prvi kvartil (predstavlja vrednost, ki loči prvo spodnjo četrtino podatkov od zgornjih treh četrtin), tretji kvartil (predstavlja vrednost, ki loči spodnje tri četrtine podatkov od zgornje četrtine) in maksimalno vrednost.

Specifičnost je delež zdravih, pri katerih je rezultat negativen

Specifičnost = resnično negativni / vsi zdravi

Občutljivost je delež bolnih, pri katerih je test pozitiven

Občutljivost = resnično pozitivni / vsi bolniki

4. DELO

4.1. Protein C

Najprej smo raztopili potrebne reagente, ki so v liofilizirani obliki in sicer

- **Topilo (Diluent)** Topilo je koncentrirano, zato smo ga pred uporabo redčili z destilirano vodo 1:10 (1mL topila +9 mL destilirane vode).
- **Protein C aktivator** Vsebino smo raztopili z 2.5 mL destilirane vode
- **Kromogeni substrat** Vsebino smo raztopimo z 2 mL destilirane vode
- **Normalno control, Specialna kontrola 1, Specialna kontrola 2** ter kalibracijsko plazmo smo raztopili z 1 mL destilirane vode.
- Vse reagente smo pustili na sobni temperaturi 30 min, da se povsem raztopijo.

Po 30 minutah, ko so se reagenti raztopili smo vse reagente vstavili v aparat ACL TOP ter začeli s kalibracijo. Ko je aparat naredil kalibracijo smo jo validirali – potrdili, ter naredili še kontrole.

Potem ko smo naredili kalibracijo in kontrole smo zamrznjene vzorce odtajali v inkubatorju, pri 37°C nato pa smo jih prenesli v aparat in izvedli preiskavo.

4.2. Aktivnost proteina S

Protein S reagent smo raztopili z 3 mL redestilirane vode.

Protein S deficitno plazmo, protein S kontrolno plazmo ter **Low abnormalno kontrolo** smo raztopili z 1 mL redestilirane vode ter pustili na sobni temperaturi 30 minut, da so se popolnoma raztopili. Po 30 minutah smo vse reagente prenesli v aparat ACL TOP, potem pa izvedli kalibracijo in kontrole.

Ko je bila kalibracija uspešna in so bile vrednosti kontrol znotraj območja 3 standardnih devacij smo v aparat vstavili še vzorce.

4.3. Antigen proteina S

C4BP lateks reagent smo pripravili tako, da smo prenesli stekleničko vsebino pufra C4BP.

Anti PS Mab Latex smo pred uporabo le rahlo premešali.

Kalibracijsko plazmo, normalno kontrolo, specialno kontrolo 1 in specialno kontrolo 2 smo raztopili z 1 mL redestilirane vode in inkubirali na sobni temperaturi 30 minut.

Ko se se reagenti popolnoma raztopili, smo jih prenesli v aparat ACL TOP, nato pa smo naredili kalibracijo in kontrole. Ko je bil sistem kalibriran in preverjen smo v aparat vstavili še vzorčke.

4.4. Antitrombin III

Kromogeni substrat in Faktor Xa reagent smo pred uporabo le premešali.

Normalno kontrolo, Specialno kontrola 1 in Specialno kontrola2 smo raztopili z 1 mL redestilirane vode, ter inkubirali na sobni temperaturi. Po 30 minutah smo reagente vstavili v aparat ACL TOP, naredili kalibracijo, kontrole, nato pa še vzorce.

4.5. Lupusni antikoagulant

LAC Screen in **LAC Confirm** smo raztopili z 2 mL redestilirane vode.

Normalno kontrolo smo raztopili z 1 mL redestilirane vode.

Po 30 minutah inkubacije na sobni temperaturi smo reagente vstavili v aparat ACL TOP, ter naredili normalno kontrolo. Ko je bila kontrola znotraj vrednosti 3 SD smo na prisotnost LA ocenili še vzorce.

4.6. Neodzivnost za aktivirani protein C

- **APTT reagent in Kalcijev klorid** smo pred uporabo le premešali.
- **Reagent Faktor V** smo raztopili z 4 mL redestilirane vode.
- **APC/Kalcijev klorid** smo raztopili z 2 mL redestilirane vode.
- **APC kontrolno plazmo 1, APC kontrolno plazmo 2 in Normalno kontrolo** smo raztopili z 1 mL redestilirane vode.
- Reagente smo nato inkubirali 30 minut na sobni temperaturi.
- Nato smo jih vstavili v aparat ACL TOP ter izvedli kontrole, potem pa smo določili neodzivnost za aktivirani protein C še pri vzorcih.

4.7. Trombopath

ThP Diluent smo pred uporabo le premešali.

ThP Substrat smo raztopili z 8 mL z redestilirane vode.

ThP aktivator A in ThP aktivator B smo raztopili z 5 mL redestilirane vode.

Thp Tromboplastin smo raztopili vsebino z 4 mL redestilirane vode.

ThP nizko kontrolna plazma ter **normalno kontrolo** smo raztopili z 1 mL redestilirane vode.

Reagente smo nato inkubirali na 15- 25°C 30 minut, potem pa smo reagente vstavili v ACL TOP ter naredili kontroli, nato pa smo ocenili še vzorce.

4.8. Faktor II

- Iz reagenčnega kompleta smo odpipetirali 20 mL **RekombiPlastin diluenta** v vialo **RekombiPlastin**.
- **Faktor II deficitno plazmo, kalibracijsko plazmo, normalno kontrolo ter specialno kontrolo 2** smo raztopili z 1 mL redestilirane vode.
- Reagente smo inkubirali na sobni temperaturi 30 minut.
- Iz kalibracijske plazme smo pripravili še razredčeno kalibracijsko plazmo, za nižje točke kalibracijske premice: Redčili smo jo v razmerju 1 :16 – v epruveto smo odpipetirali 1500 µL Faktor diluenta ter 100 µL kalibracijske plazme ter prenesli v 500 µL kiveto, ter vstavili na pravilno pozicijo v aparat ACL 9000, kakor tudi vse druge reagente, vključeno z nerazredčeno kalibracijsko plazmo.
- Naredili smo kalibracijo aparata, ter nato kontrole
- Ko je bil sistem kalibriran in preverjen, smo lahko vzorce odtajali v inkubatorju pri +37°C.
- Aktivnost faktorja II na ACL 9000 smo določili v nerazredčeni plazmi dvakrat in v plazmi razredčeni 1: 2 in 1:4

Priprava redčitev vzorcev:

Epruvete	1	2	3
Plazma (mL)	0.5	0.5	
Faktor diluent		0.5	0.5
Prenesi			0.5 →
FII (E/mL)	1	0.5	0.25

- V 2 kiveti smo napipetirali nerazredčen vzorec, v 1 kiveto 2 x razredčen in v eno 4 x razredčen vzorec plazme preiskovanca. Kivete smo postavili na ustrezna mesta za vzorce, pritisnili start in aparat je analiziral vzorce ter tako določil aktivnost F II.

4.9. Faktor VIII

- reagent APTT in kalcijev klorid smo pred uporabo le premešali
- **Faktor VIII deficitno plazmo, kalibracijsko plazmo, normalno kontrolo ter specialno kontrolo 2** smo raztopili z 1 mL redestilirane vode.
- Reagente smo inkubirali na sobni temperaturi 30 minut.
- Iz kalibracijske plazme smo pripravili še razredčeno kalibracijsko plazmo, za nižje točke kalibracijske premice: Razredčili smo jo 1:16 – v epruveto smo odpipetirali 1500 μ L Faktor diluenta, ter 100 μ L kalibracijske plazme ter prenesli v 500 μ L kiveto in vstavili na pravilno pozicijo v aparat ACL 9000, kakor tudi vse druge reagente, vključeno z nerazredčeno kalibracijsko plazmo.
- Naredili smo kalibracijo aparata, ter nato analizirali kontrole
- Ko je bil sistem kalibriran in preverjen, smo lahko vzorce odtajali v inkubatorju pri + 37°C.
- Aktivnost faktorja VIII na ACL 9000 smo določili v nerazredčeni plazmi dvakrat in v plazmi razredčeni $\frac{1}{2}$ in $\frac{1}{4}$

Priprava redčitev vzorcev:

Epruvete	1	2	3
Plazma (mL)	0.5	0.5	
Faktor diluent		0.5	0.5
Prenesi			0.5 \longrightarrow
FVIII (E/mL)	1	0.5	0.25

- V 2 kiveti smo napipetirali nerazredčena vzorca, v 1 kiveto razredčen $\frac{1}{2}$ in v eno razredčen $\frac{1}{4}$. Kivete smo postavili v pozicije za vzorce, pritisnili start in aparat je določil aktivnost F VIII.

5. REZULTATI

Preiskavo za oceno motenj v delovanju proteina C, aktivnost proteina C, rezistence za aktivirani protein C, prostega proteina S, antigena proteina S, aktivnosti antitrombina III, prisotnost lupusnih antikoagulantov ter aktivnost faktorjev II in VIII smo določili z metodami in postopki, ki so opisani v poglavju 4. Statistično smo rezultate vrednotili z načini, ki so opisani v poglavju 3.8.

Zdravim preiskovancem smo najprej določili aktivnost proteina C in proteina S, preverili prisotnost lupusnih antikoagulantov, določili aktivnost antitrombina III ter aktivnost faktorja II in faktorja VIII ter z novo preiskavo za oceno motenj v delovanju proteina C določili delež zavrte koagulacije. Nato smo iz vrednosti deleža zavrte koagulacije preiskave za oceno motenj v delovanju proteina C zdravih preiskovancev, ki so imeli vse parametre v referenčnem območju za zdrave preiskovance (Poglavje 1.4 – 1.8) oziroma za faktor II in VIII v območju od 0,5 do 1,5 E/mL, ki smo ga povzeli po priporočilih proizvajalca Instrumentation Laboratory (PI 493, HemosIL TromboPath PN 0020005500), določili mejno vrednost. Vrednosti pod to mejo se smatrajo za patološke.

Delež zavrte koagulacije smo določili bolnikom z ugotovljenim pomanjkanjem proteina C, proteina S (aktivnost ali/in antigen), ali prisotnostjo rezistence za aktivirani protein C, prisotnostjo lupusnih antikoagulantov in bolnikov s sumom na trombofilijo. Na osnovi primerjave vrednosti smo ocenili primernost načina kot presejalne preiskave ali dodatne preiskave za oceno trombofilije ali drugih motenj v uravnavanju koagulacije.

5.1. Rezultati preiskav zdravih preiskovancev

Vrednosti določitve posameznih preiskav vseh zdravih preiskovancev opisuje preglednica I. Oceno motnje v delovanju proteina C opredelimo kot delež zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %-trombopath metoda).

Mejno vrednost za ločitev bolnikov z motnjami v delovanju proteina C od zdravih, smo dobili tako, da smo odšteli vrednost ene standardne deviacije od aritmetične sredine vrednosti PiCi % zdravih preiskovancev, ki smo jo dobili s preiskovano metodo po formuli ($X - 1 SD$). Vrednosti pod to mejo se smatrajo za patološke.

V ta izračun smo vključili samo zdrave preiskovance z aktivnostjo koagulacijskih faktorjev II in VIII med 0,5 in 1,5 E/mL in z vrednostmi preiskav aktivnosti proteina C, prostega proteina S, antigena proteina S, aktivnosti antitrombina III v mejah referenčnih vrednostih in brez prisotnih lupusnih antikoagulantov.

Tako smo iz statističnega vrednotenja izključili 2 zdrava preiskovanca z aktivnostjo preiskovanih faktorjev koagulacije pod 0,5 E/mL, 5 preiskovancev z aktivnostjo preiskovanih faktorjev koagulacije nad 1,5 E/mL ter enega preiskovanca s prisotnimi lupusnimi antikoagulanti.

V tej skupini zdravih preiskovancev smo izračunali srednjo vrednost določitve aktivnosti antitrombina III, ki je bila $1,02 \pm 0,11$ E/mL. Srednja vrednost aktivnosti proteina C je bila $1,02 \pm 0,16$ E/mL, srednja vrednost aktivnosti proteina S $0,97 \pm 0,19$ E/mL in proteina S antigena $0,96 \pm 0,14$ E/mL. Srednja vrednost neodzivnosti izsledka za aktivirani protein C je bila $2,83 \pm 0,12$ in srednja vrednost izsledka za prisotnost lupusnih antikoagulantov $0,94 \pm 0,07$. Srednja vrednost aktivnosti faktorja II je bila $1,04 \pm 0,10$ E/mL in faktorja VIII $0,90 \pm 0,19$ E/mL (preglednica II).

Srednja vrednost deleža zavrte koagulacije je bila $82,07 \pm 8,09$ %.

Mejno vrednost deleža zavrte koagulacije (PiCi %) za ločitev bolnikov z motnjami v delovanju proteina C od zdravih preiskovancev smo izračunali:

= Srednja vrednost PiCi % - 1 standardna deviacija = 82,07 % - 8,09 % = 73,98 % = **74,0%**

Od 33 zdravih preiskovancev imajo 4 preiskovanci vrednosti PiCi % pod mejno vrednostjo 74 %, drugih 29 preiskovancev pa nad to mejo, torej so resnično negativni.

Specifičnost načina Trombopath, torej delež zdravih ki so resnično negativen, je 88 %.

Preglednica I: Izsledki aktivnosti antitrombina III (AT III), aktivnosti proteina C (PC), aktivnosti proteina S (PS akt), antigena proteina S (PS ag), neodzivnosti za aktivirani protein C (APCR), prisotnosti lupusnih antikoagulantov (LA), deleže zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %), ter aktivnosti faktorjev II (FII) in VIII (FVIII), pri zdravih preiskovancih.

ŠT.	Spol	Starost [leta]	AT III [E/mL]	PC [E/mL]	PS – akt [E/mL]	PS – Ag [E/mL]	APCR [R]	LA [R]	PiCi% [%]	FII [E/mL]	FVIII [E/mL]
1	Ž	28	1,04	1,07	1,05	0,91	2,70	0,90	85,76	1,07	0,91
2	Ž	38	0,97	1,09	1,26	0,90	2,90	0,90	89,18	1,00	0,73
3	Ž	25	1,03	0,84	1,15	1,00	2,90	0,90	83,79	0,98	0,87
4	Ž	25	0,85	1,03	0,76	0,79	2,80	0,90	78,34	0,99	0,85
5	Ž	54	0,95	1,11	1,45	0,89	2,87	0,91	86,46	1,04	0,79
6	Ž	24	0,89	0,99	0,90	0,85	2,55	0,88	69,97	1,04	1,03
7	Ž	54	0,86	0,93	1,21	0,98	2,75	0,98	82,19	1,07	0,95
8	Ž	34	0,84	1,12	1,02	0,88	2,65	1,01	83,60	1,23	0,70
9	Ž	30	0,96	0,91	1,10	0,96	2,82	0,95	82,82	1,00	1,20
10	Ž	22	1,00	1,00	0,88	0,90	2,80	0,90	78,24	0,96	0,91
11	Ž	39	0,91	1,02	0,93	0,87	2,80	1,10	84,92	0,95	1,19
12	Ž	22	1,01	1,33	0,70	0,84	2,50	1,10	72,60	1,21	0,85
13	Ž	22	0,97	0,74	0,94	0,89	2,90	1,10	80,80	0,82	0,75
14	Ž	30	0,98	1,11	0,73	0,83	3,00	1,00	80,32	1,09	0,86
15	Ž	45	1,02	0,84	0,95	1,08	2,80	0,90	76,71	0,98	1,14
16	Ž	28	1,19	1,05	0,97	1,09	2,80	0,90	84,05	1,17	0,75
17	Ž	23	1,00	0,80	0,85	0,89	2,90	0,90	78,24	0,96	0,91
18	Ž	49	1,01	1,14	0,81	0,74	2,90	0,90	85,49	1,13	0,56
19	Ž	35	1,15	1,27	0,91	0,94	2,70	0,90	87,02	1,17	0,69
20	Ž	29	1,09	0,83	0,82	0,97	2,80	0,90	80,57	0,93	0,67
21	Ž	28	1,01	1,28	0,94	1,08	2,80	0,90	85,60	1,07	0,80
22	Ž	20	0,98	0,89	0,68	0,91	2,90	0,90	79,67	1,07	1,00
23	Ž	23	0,90	0,97	0,80	0,98	2,80	0,90	73,11	1,19	0,71
24	Ž	29	1,10	1,05	0,88	0,88	3,00	0,90	86,32	0,88	0,86
25	Ž	27	0,94	1,00	1,00	0,93	3,00	0,90	86,50	0,99	0,81
26	Ž	28	1,16	0,84	0,79	0,85	2,90	0,80	84,45	1,04	1,12
27	Ž	23	1,18	1,25	1,41	1,10	2,80	1,00	47,95	1,14	1,09
28	Ž	29	1,10	0,96	0,88	0,95	3,00	0,90	88,98	1,08	0,89
29	Ž	40	0,97	1,01	1,23	1,14	2,90	1,10	92,15	1,07	1,29
30	M	23	1,23	1,10	1,09	1,37	3,00	1,00	91,19	1,15	0,68
31	M	26	1,10	0,79	1,02	1,06	3,00	0,90	84,96	0,98	1,08
32	M	44	1,08	1,38	1,09	1,36	2,80	0,90	91,25	1,02	1,25
33	M	20	1,28	0,95	0,89	0,98	2,80	0,90	85,07	0,95	0,73

Preglednica II: Izsledki statističnega vrednotenja koncentracije antitrombina III (AT III), aktivnosti proteina C (PC), aktivnosti proteina S (PS akt), antigena proteina S (PS ag), neodzivnosti za aktivirani protein C (APCR), prisotnosti lupusnih antikoagulantov (LA), deleža zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %), ter aktivnosti faktorjev II (FII) in VIII (FVIII), pri zdravih preiskovancih - brez preiskovancev s patološkimi vrednostmi aktivnosti faktorja II in VIII.

N = 33

	Starost [leta]	AT III [E/mL]	PC [E/mL]	PS akt [E/mL]	PS Ag [E/mL]	APCR [R]	LA [R]	PiCi % [%]	FII [E/mL]	FVIII [E/mL]
X	31	1,02	1,02	0,97	0,96	2,83	0,94	82,07	1,04	0,90
SD	10	0,11	0,16	0,19	0,14	0,12	0,07	8,09	0,10	0,19
Min	20	0,84	0,74	0,68	0,74	2,50	0,80	47,95	0,82	0,56
Q1	23	0,96	0,91	0,85	0,88	2,80	0,90	79,67	0,98	0,75
Me	28	1,01	1,01	0,94	0,93	2,80	0,90	84,05	1,04	0,86
Q3	35	1,10	1,11	1,09	1,00	2,90	0,98	86,32	1,09	1,03
Max	54	1,28	1,38	1,45	1,37	3,00	1,10	92,15	1,23	1,29

5.2. Rezultati preiskav bolnikov

Vrednosti določitve posameznih preiskav pri bolnikih prikazuje preglednica III. Izsledke statističnega vrednotenja prikazuje preglednica IV.

Iz rezultatov smo izračunali srednjo vrednost določitve aktivnosti antitrombina III, ki je bila $0,97 \pm 0,12$ E/mL. Srednja vrednost aktivnosti proteina C je bila $1,06 \pm 0,25$ E/mL, srednja vrednost aktivnosti proteina S $1,10 \pm 0,27$ E/mL in antigena proteina S $0,94 \pm 0,27$ E/mL. Srednja vrednost razmerja za neodzivnost za aktivirani protein C je bila $2,83 \pm 0,32$ in srednja vrednost razmerja za prisotnost lupusnih antikoagulantov $0,90 \pm 0,13$. Srednja vrednost aktivnosti faktorja II je bila $1,06 \pm 0,18$ E/mL in faktorja VIII $1,44 \pm 0,52$ E/mL. Srednja vrednost deleža zavrte koagulacije je bila $78,18 \pm 13,41$ %.

Pri bolnikih smo ugotovili pomanjkanje antitrombina III v 5,7 odstotkih, pomanjkanje aktivnosti proteina C v 7,6 odstotkih in pomanjkanje aktivnosti proteina S v 7,6 odstotkih. Zmanjšan nivo antigena proteina S smo ugotovili v 9,4 odstotkih ter neodzivnost na aktivirani protein C v 2 odstotkih. Povečano aktivnost faktorja VIII je imelo 39 odstotkov, povečano aktivnost faktorja II pa 2 odstotka preiskovancev.

Kombinirana odstopanja od referenčnih vrednosti za aktivnosti proteina S, antigena proteina S, rezistenco za aktivirani protein C in hkrati tudi za faktor VIII, smo ugotovili pri 2 % preiskovancev.

Kombinirana odstopanja od referenčnih vrednosti za aktivnosti proteina S, antigena proteina S, aktivnosti proteina C in hkrati povišan faktor VIII smo ugotovili pri 2 % preiskovancev.

Pri 6 % preiskovancev smo ugotovili odstopanja od referenčnih vrednosti za aktivnosti proteina C in hkrati zmanjšano raven antigena proteina S.

Pri 4 % preiskovancev smo ugotovili odstopanja od referenčnih vrednosti za aktivnosti proteina C, zmanjšan nivo antigena proteina S in hkrati tudi za povišan faktor VIII.

Zmanjšan delež zavrte koagulacije pri oceni motnje v delovanju proteina C smo ugotovili pri 24 % bolnikov s sumom ali potrjeno trombofilijo.

Preglednica III: Izsledki aktivnosti antitrombina III (AT III), aktivnosti proteina C (PC), aktivnosti proteina S (PS akt), antigena proteina S (PS ag), neodzivnosti za aktivirani protein C (APCR), prisotnosti lupusnih antikoagulantov (LA), deleža zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %), ter aktivnosti faktorjev II (FII) in VIII (FVIII), pri bolnikih.

ŠT.	Spol	Starost [leta]	AT III [E/mL]	PC [E/mL]	PS – akt [E/mL]	PS – Ag [E/mL]	APCR [R]	LA [R]	PiCi % [%]	FII [E/mL]	FVIII [E/mL]
1	M	57	/	1,07	1,25	1,05	2,70	0,90	72,42	0,99	1,74
2	M	69	1,03	1,42	1,46	1,06	2,60	0,80	68,55	1,18	2,83
3	M	47	1,16	1,18	0,91	1,23	2,60	0,90	88,12	1,00	1,33
4	M	41	0,96	1,01	1,27	1,17	2,80	0,90	78,46	1,00	1,62
5	M	59	0,94	0,78	1,26	1,16	2,80	0,70	59,46	1,00	1,78
6	M	50	1,10	1,12	1,66	1,05	3,20	1,00	91,34	1,15	1,26
7	M	48	0,92	0,82	1,24	0,94	3,10	0,90	85,62	0,99	1,76
8	M	28	0,83	0,68	0,52	0,22	3,00	0,90	46,54	0,72	2,54
9	M	50	0,96	1,34	1,06	0,99	2,80	0,80	85,09	0,96	1,73
10	M	52	1,08	1,01	1,36	1,25	2,90	1,00	84,04	1,11	0,98
11	M	73	0,82	0,83	1,26	1,24	3,00	0,80	81,73	0,94	1,05
12	M	44	1,06	1,27	1,43	1,74	3,00	0,90	91,62	1,13	1,00
13	M	29	0,93	1,08	0,95	0,91	3,00	0,90	82,43	0,92	0,91
14	M	46	0,86	1,04	1,12	0,97	2,88	1,22	81,59	1,02	0,54
15	M	54	0,94	0,96	1,33	0,79	2,80	1,00	83,59	1,07	0,98
16	M	47	0,98	1,04	1,36	1,18	2,70	0,80	73,94	1,04	1,60
17	M	58	0,94	1,19	1,52	1,27	2,80	0,90	81,71	0,98	1,45
18	M	47	0,99	1,27	1,47	1,01	2,80	1,00	76,30	1,17	1,88
19	M	42	1,04	1,08	1,42	1,00	3,10	1,00	85,50	1,07	0,72
20	M	30	1,30	1,50	1,25	1,31	3,20	1,10	85,45	1,07	1,17
21	Ž	32	0,94	1,00	1,24	1,22	2,60	0,80	87,98	1,07	1,43
22	Ž	28	0,94	0,77	1,09	0,81	3,00	0,80	86,72	1,07	1,00
23	Ž	45	0,94	1,02	1,01	0,77	3,00	0,80	82,53	1,15	1,74
24	Ž	60	1,15	1,53	1,40	1,29	2,60	0,80	87,65	1,20	2,15
25	Ž	30	1,02	1,20	0,92	1,05	2,70	0,90	80,41	1,11	2,50
26	Ž	53	1,05	1,07	0,98	0,66	2,80	0,80	82,31	1,00	1,43
27	Ž	35	0,84	1,23	0,37	0,52	1,20	0,90	13,01	1,22	1,77
28	Ž	37	0,92	1,43	0,59	0,83	2,50	0,90	76,48	1,20	1,26
29	Ž	40	0,95	0,99	1,05	0,85	2,90	0,80	77,25	1,02	1,62
30	Ž	52	0,99	1,37	0,97	0,81	2,80	1,10	81,76	1,16	1,25
31	Ž	56	1,10	1,26	1,39	1,04	3,10	0,90	85,52	1,12	1,22
32	Ž	41	1,00	1,25	1,09	1,08	2,80	0,80	73,53	2,01	1,10
33	Ž	51	0,90	1,03	1,18	0,93	3,00	0,90	83,17	0,99	1,18
34	Ž	48	0,99	0,86	0,78	0,84	2,90	0,80	83,61	0,93	0,79
35	Ž	35	0,99	0,82	1,13	0,81	3,20	0,90	88,08	1,06	0,96
36	Ž	44	1,12	0,74	0,81	0,72	3,00	0,80	70,78	1,20	0,94
37	Ž	68	0,85	1,23	1,32	0,85	3,20	0,90	81,79	1,00	2,04

ŠT.	Spol	Starost [leta]	AT III [E/mL]	PC [E/mL]	PS – akt [E/mL]	PS – Ag [E/mL]	APCR [R]	LA [R]	PiCi % [%]	FII [E/mL]	FVIII [E/mL]
38	Ž	33	1,03	0,85	0,83	0,69	3,00	0,80	83,45	1,04	1,06
39	Ž	79	0,88	0,59	0,83	0,44	2,80	/	73,30	0,69	0,97
40	Ž	45	0,74	0,87	1,21	0,98	2,50	0,80	83,69	1,07	1,96
41	Ž	44	1,01	1,02	0,99	0,99	3,00	0,80	86,18	1,12	1,01
42	Ž	35	0,95	0,33	1,29	1,47	3,10	1,00	64,92	1,21	1,34
43	Ž	38	1,07	1,05	0,95	0,64	2,80	0,90	87,85	1,07	1,41
44	Ž	27	1,12	1,30	1,16	1,01	2,60	0,80	87,39	1,13	1,70
45	Ž	71	0,62	0,61	1,15	0,57	2,60	1,00	69,22	0,65	1,91
46	Ž	50	0,83	0,77	1,05	0,90	2,90	0,80	83,04	0,95	1,28
47	Ž	27	0,91	1,45	0,79	0,47	2,90	1,10	81,59	1,17	0,77
48	Ž	27	0,71	1,43	1,06	0,78	2,90	1,00	83,58	0,91	2,19
49	Ž	22	0,93	0,85	0,94	0,81	2,70	0,90	79,57	1,00	1,35
50	Ž	32	0,90	1,12	0,55	/	2,40	/	39,60	1,13	2,49
51	Ž	72	0,99	0,99	0,91	0,91	3,46	1,44	76,63	0,92	0,73
52	Ž	33	0,97	1,10	1,14	/	2,50	0,80	84,44	1,07	1,22
53	Ž	/	1,03	1,11	1,22	0,78	2,59	0,86	72,81	1,02	1,75

Preglednica IV: Izsledki statističnega vrednotenja koncentracije antitrombina III (AT III), aktivnosti proteina C (PC), aktivnosti proteina S (PS akt), antigena proteina S (PS ag), neodzivnosti na aktivirani protein C (APCR), prisotnosti lupusnih antikoagulantov (LA), deleže zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %), ter aktivnosti faktorjev II (FII) in VIII (FVIII), pri bolnikih.

	Starost [leta]	AT III [E/mL]	P C [E/mL]	PS akt [E/mL]	PS Ag [E/mL]	APCR [R]	LA [R]	PiCi % [%]	FII [E/mL]	FVIII [E/mL]
X	45	0.97	1.06	1.10	0.94	2.83	0.90	78.18	1.06	1.44
SD	14	0.12	0.25	0.27	0.27	0.32	0.13	13.41	0.18	0.52
Min	22	0.62	0.33	0.37	0.22	1.20	0.70	13.01	0.65	0.54
Q1	35	0.92	0.86	0.95	0.80	2.70	0.80	76.30	0.99	1.01
Me	45	0.96	1.05	1.13	0.94	2.80	0.90	82.31	1.07	1.34
Q3	52	1.03	1.24	1.27	1.07	3.00	0.95	85.45	1.13	1.75
Max	79	1.30	1.53	1.66	1.74	3.46	1.44	91.62	2.01	2.83

5.3. Primerjava izsledkov deleža zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %) med zdravimi preiskovanci in bolniki s potrjeno trombofilijo

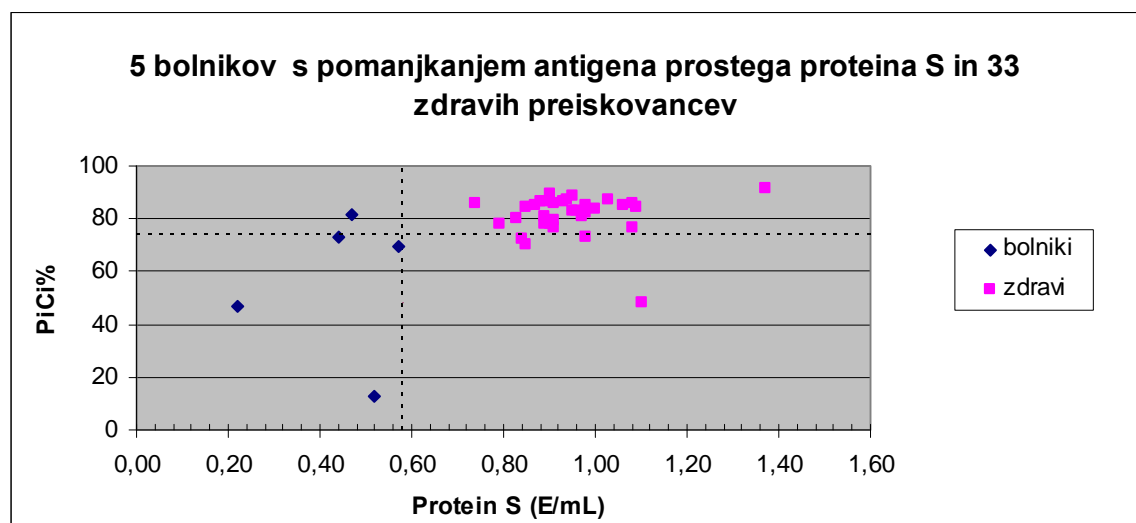
Na osnovi izračunane mejne vrednosti deleža zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa 74 % (poglavje 5.1) smo primerjali izsledke deležev zavrte koagulacije bolnikov z ugotovljenim pomanjkanjem proteina S, proteina C, neodzivnostjo za aktiviran protein C, prisotnimi lupusnimi antikoagulant, bolnikom katerim smo ugotovili pomanjkanje proteina S in neodzivnost za aktiviran proteina C in bolnikom, katerim smo ugotovili pomanjkanje proteina S in proteina C. Izračunali smo specifičnost preiskave ocena v delovanju proteina C (Thrombopath) in občutljivost preiskave glede na posamezno preiskavo.

Grafikon I prikazuje primerjavo deležev zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %), pri zdravih osebah in preiskovancih z ugotovljenim pomanjkanjem antigena proteina S.

Vodoravna črta predstavlja diskriminatorno mejo deleža zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi % = 74 %).

Navpična črta pa predstavlja spodnjo mejo referenčnega območje antigena proteina S (0,57 E/mL).

Za primerjavo so v grafikonu prikazane vrednosti zdravih preiskovancev. Od 33 zdravih preiskovancev imajo 4 preiskovanci vrednosti deleža zavrte koagulacije (PiCi %) manjše od mejne vrednosti 74 %. Ostalih 29 preiskovancev ima te vrednosti večje od mejne, torej so negativni. Specifičnost Trombopatha, torej delež zdravih, ki so resnično negativni je 88 %.



Grafikon I: Primerjava deležev zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %) pri zdravih osebah in preiskovancih z ugotovljenim pomanjkanjem antigena proteina S (Protein S)

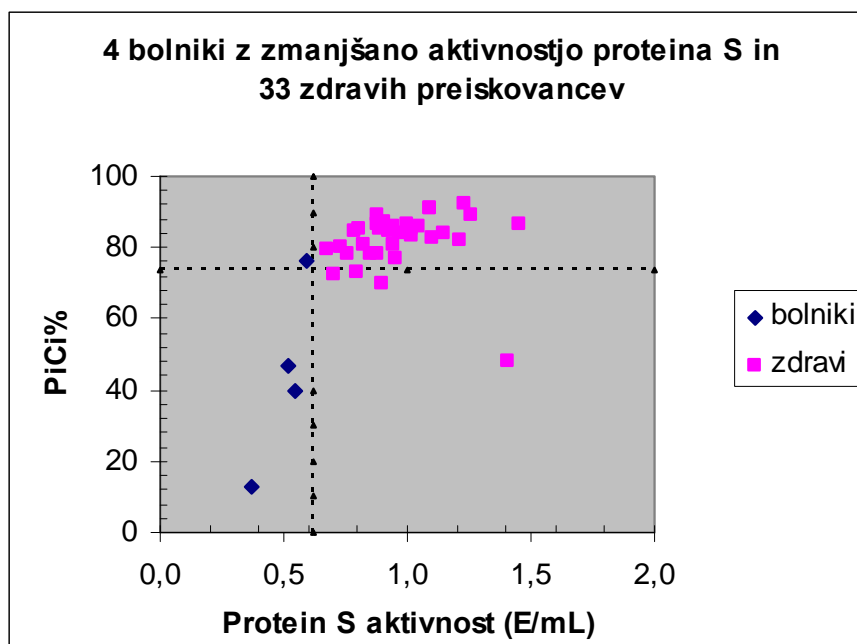
Iz grafikona I vidimo da so vrednosti deleža zavrte koagulacije pri 4 bolnikih manjše od mejne vrednosti deleža zavrte koagulacije 74 % in so resnično pozitivni. En bolnik je nad to mejo in je lažno negativen. Občutljivost načina (Trombopath) na pomanjkanje antigena PS je torej 80 %.

Grafikon II prikazuje primerjavo deležev zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %), pri zdravih osebah in preiskovancih z ugotovljenim pomanjkanjem aktivnosti proteina S.

Vodoravna črta predstavlja diskriminatorno mejo deleža zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi % = 74 %).

Navpična črta pa predstavlja spodnjo mejo referenčnega območja aktivnosti proteina S (0,62 E/mL).

Za primerjavo so v grafikonu prikazane vrednosti zdravih preiskovancev. Od 33 zdravih preiskovancev imajo 4 preiskovanci vrednosti deleža zavrte koagulacije (PiCi %) manjše od mejne vrednosti 74 %. Ostalih 29 preiskovancev ima te vrednosti večje od mejne, torej so resnično negativni.



Grafikon II: Primerjava deležev zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %) pri zdravih osebah in preiskovancih z ugotovljeno znižano aktivnostjo proteina S (Protein S aktivnost)

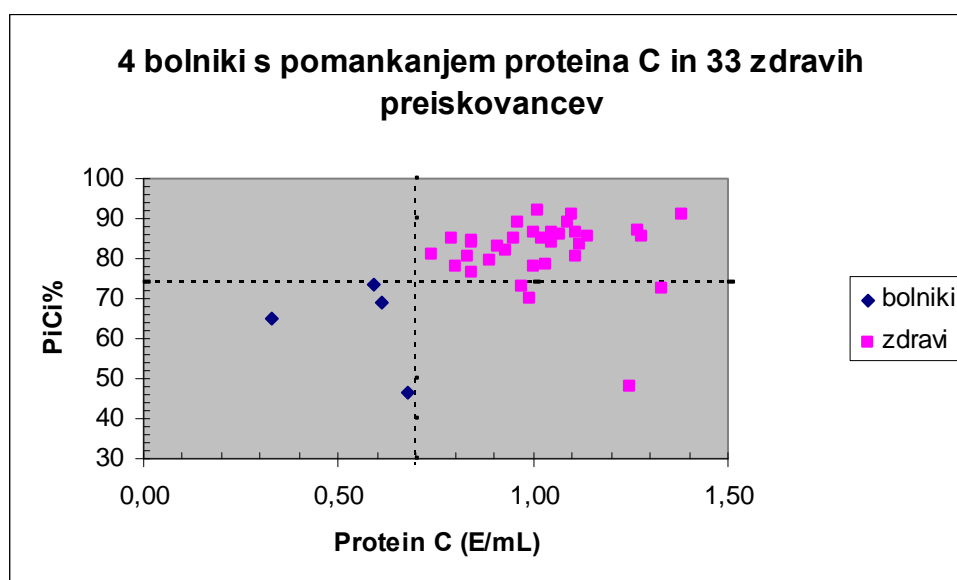
Iz grafikona II vidimo da so vrednosti zavrte koagulacije pri 3 bolnikih manjše od mejne vrednosti deleža zavrte koagulacije 74 % in so resnično pozitivni. En bolnik je nad to mejo in je lažno negativen. Občutljivost načina (Trombopath) na pomanjkanje aktivnosti PS je torej 75 %.

Grafikon III prikazuje primerjavo deležev zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %), pri zdravih osebah in preiskovancih z ugotovljenim pomanjkanjem proteina C.

Vodoravna črta predstavlja diskriminatorno mejo deleža zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi % = 74 %).

Navpična črta pa predstavlja spodnjo mejo referenčnega območja aktivnosti proteina C (0,70 E/mL).

Za primerjavo so v grafikonu prikazane vrednosti zdravih preiskovancev. Od 33 zdravih preiskovancev imajo 4 preiskovanci deleže zavrte koagulacije (PiCi %) manjše od mejne vrednosti. Ostalih 29 preiskovancev ima te vrednosti večje od mejne, torej so resnično negativni.



Grafikon III: Primerjava deležev zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %) pri zdravih osebah in preiskovancih z ugotovljenim pomanjkanjem proteina C (PC)

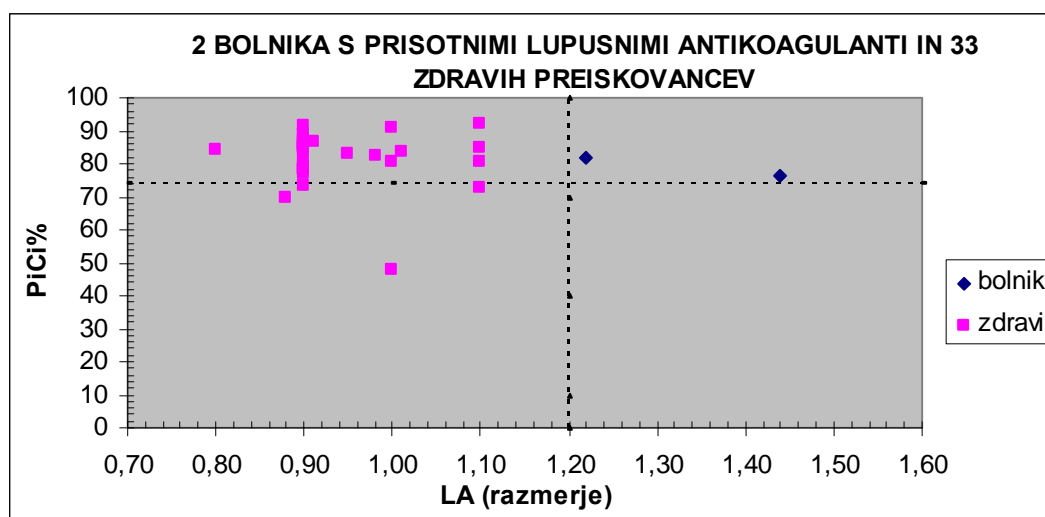
Iz grafikona III vidimo, da imajo vsi štirje bolniki z ugotovljenim pomanjkanjem proteina C tudi zmanjšan delež zavrte koagulacije pod mejno vrednostjo 74 % in so resnično pozitivni. Občutljivost načina (Trombopath) za pomanjkanje aktivnosti PC je 100 %.

V grafikonu IV primerjamo deleže zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %), pri bolnikih s prisotnimi lupusnimi antikoagulanti ter zdravimi preiskovanci.

Vodoravna črta predstavlja diskriminatorno mejo deleža zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi % = 74 %).

Navpična črta pa predstavlja spodnjo mejo referenčnega območja razmerja LA (razmerje LA 1,20). Nad to vrednostjo smatramo, da so lupusni antikoagulanti prisotni.

Za primerjavo so v grafikonu prikazane vrednosti zdravih preiskovancev. Od 33 zdravih preiskovancev imajo 4 preiskovanci vrednosti deleža zavrte koagulacije (PiCi %) manjše od mejne vrednosti. Ostalih 29 preiskovancev ima te vrednosti večje od mejne, torej so resnično negativni.



Grafikon IV: Primerjava deležev zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %) pri bolnikih s prisotnimi lupusnimi antikoagulanti (LA) ter zdravimi preiskovanci

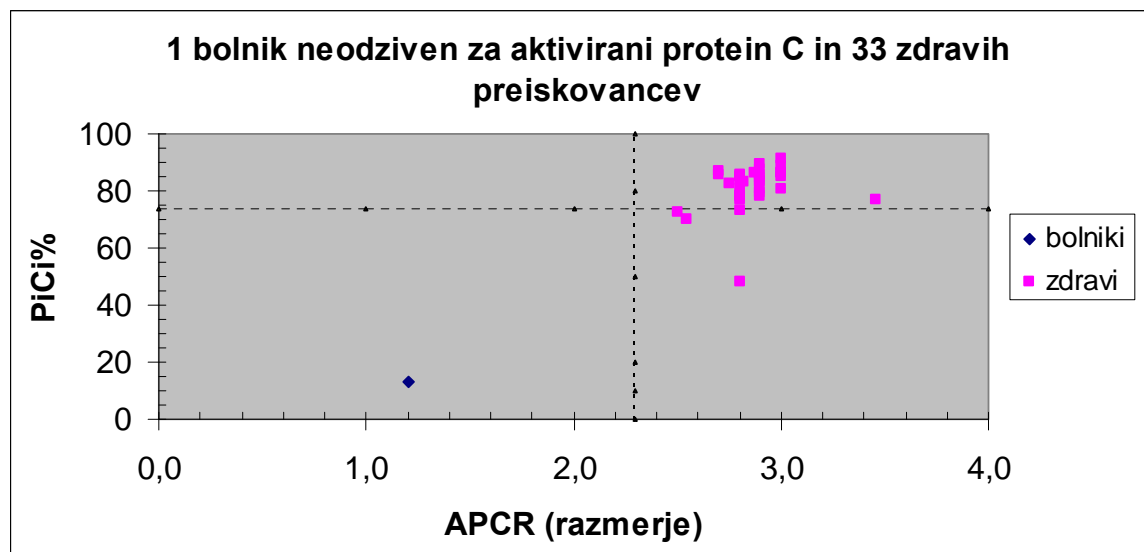
Iz grafikona IV vidimo, da imata oba preiskovanca s prisotnimi lupusnimi antikoagulanti, delež zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa nad mejno vrednostjo 74 % in ne pod njo. Izsledki se nikakor ne skladajo z našimi pričakovanji.

V grafikonu V je prikazana primerjava deležev zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %), pri bolnikih neodzivnih za aktiviran protein C in zdravimi preiskovanci.

Vodoravna črta predstavlja diskriminatorno mejo deleža zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi % = 74 %).

Navpična črta pa predstavlja spodnjo referenčno vrednost razmerja neodzivnosti na aktivirani protein C, APCR, kjer smatramo, da je rezultat pozitiven, bolniki imajo prisotno rezistenco za aktivirani protein C.

Za primerjavo so v grafikonu prikazane vrednosti zdravih preiskovancev. Od 33 zdravih preiskovancev imajo 4 preiskovanci deleže zavrte koagulacije (PiCi %) manjše od mejne vrednosti.



Grafikon V: Primerjava med deležem zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %), pri bolnikih neodzivnih za aktiviran protein C (APCR) in zdravimi preiskovanci.

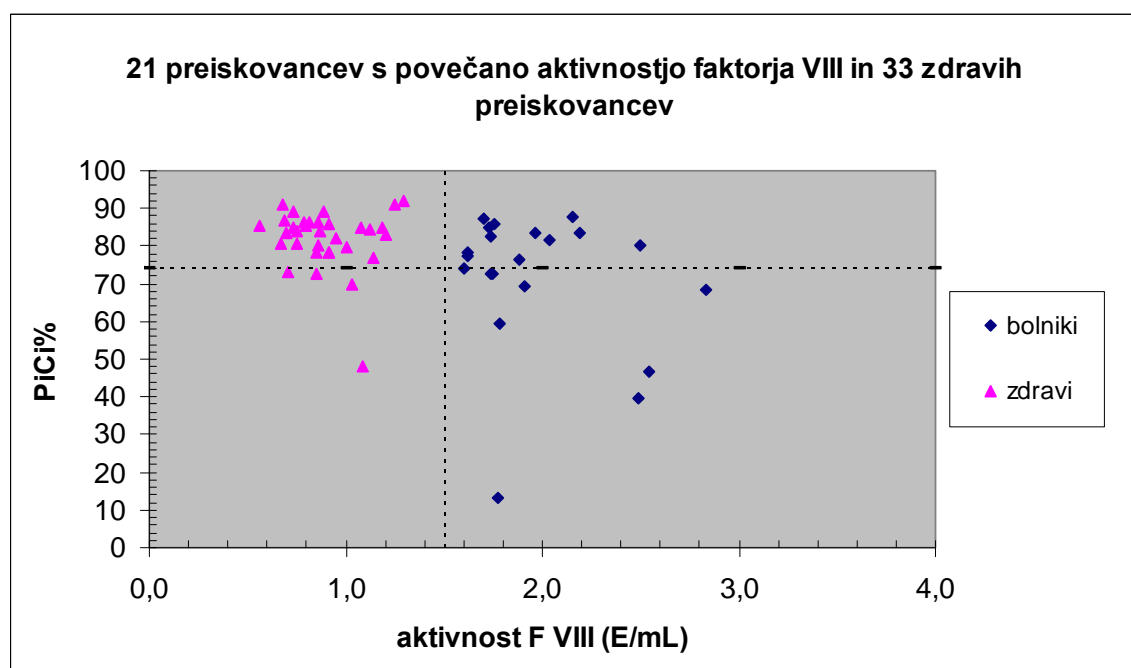
Iz grafikona V vidimo, da je eden preiskovanec resnično pozitiven, saj je pod diskriminatorno mejo 74 %, torej je občutljivost preiskave (Trombopath) v tem primeru 100 %.

V grafu VI je prikazana primerjava med deležem zavrte koagulacije, sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %), pri bolnikih s povečano aktivnostjo faktorja VIII (FVIII) in zdravimi preiskovanci.

Vodoravna črta predstavlja diskriminatorno mejo deleža zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi % = 74 %)

Navpična črta pa predstavlja spodnjo mejo referenčnega območja za FVIII (1,50 E/mL).

Za primerjavo so v grafikonu prikazane vrednosti zdravih preiskovancev. Od 33 zdravih preiskovancev imajo 4 preiskovanci delež zavrte koagulacije (PiCi %) manjši od mejne vrednosti.

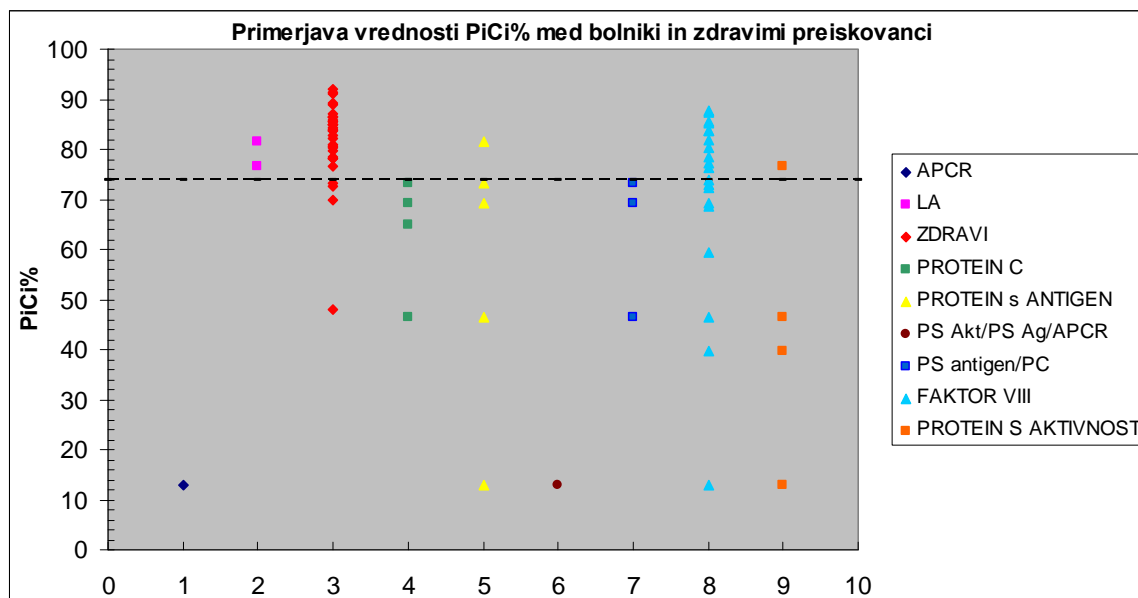


Grafikon VI: Primerjava deležev zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %) pri bolnikih s povečano aktivnostjo faktorja VIII ter zdravimi preiskovanci.

Iz grafikona VI vidimo, da je 9 preiskovancev s povečano aktivnostjo FVIII, vrednost deleža zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa pod mejno vrednostjo 74%. Občutljivost načina za povečano aktivnost FVIII je torej 43 %.

V grafikonu VII je prikazana primerjava vrednosti med deležem zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %) pri bolnikih s posameznimi ali kombiniranimi motnjami.

Vodoravna črta predstavlja mejna vrednost deleža zavrte koagulacije (PiCi %) 74 %.



Grafikon VII: Primerjava deležev zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %) pri bolnikih z neodzivnostjo za aktiviran protein C (APCR, pod št 1) in bolnikoma s prisotnimi lupusnimi antikoagulanti (LA, št 2). Vrednost deleža zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa pri zdravih preiskovancev je prikazana pod št 3. Pod št 4 so bolniki s pomanjkanjem proteina C (Protein C) in pod št 5 bolniki s zmanjšano ravniyo antigena proteina S (PS antigen). Pod št 6 so bolniki z ugotovljenim pomanjkanjem aktivnosti proteina S (PS Akt), znižano ravniyo antigena proteina S (PS Ag) in hkrati tudi neodzivnostjo za aktiviran proteina C (APCR). Pod št 7 pa so bolniki z zmanjšano ravniyo antigena proteina S (PS Ag) in zmanjšano aktivnostjo proteina C. Pod št 8 so bolniki s povečano aktivnostjo faktorja VIII (Faktor VIII) in pod št 9 bolniki z zmanjšano aktivnostjo proteina S (Protein S antigen)

Iz grafikona VII je razvidno, kako mejna vrednost PiCi % = 74 % razdeljuje patološke in zdrave preiskovance. Izračunali smo občutljivost in specifičnost za vsako preiskavo posebej.

Specifičnost, torej delež zdravih, pri katerih je rezultat resnično negativen, je 88 %.

Celokupna občutljivost načina (vseh 53 patoloških preiskovancev) torej delež bolnikov, pri katerih je rezultat resnično pozitiven za oceno v delovanju proteina C je 21 %.

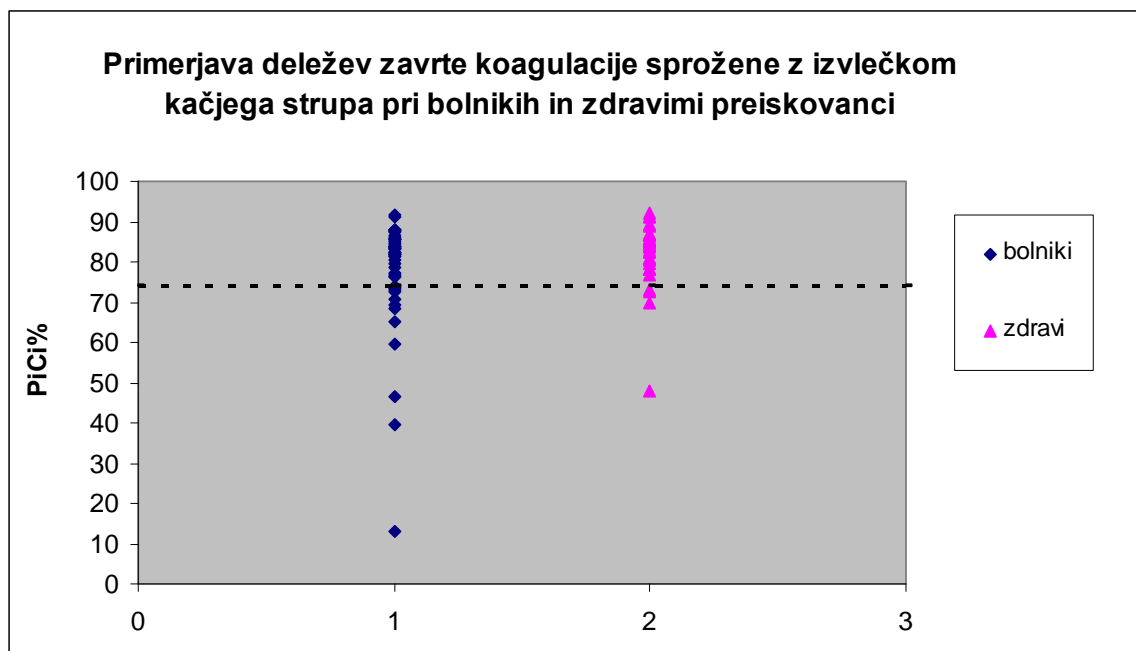
Občutljivost načina pri vseh 27 preiskovancih, kjer smo dokazali patološke rezultate, je 41 %.

Občutljivost načina za oceno v delovanju proteina C (Thrombopath) pri pomanjkanju proteina C je 100 % in pri pomanjkanju proteina S antigena 80%. Pri pomanjkanju aktivnosti PS je občutljivost 75 %.

Občutljivost načina za zvečano aktivnost FVIII je 43 %. Če ima bolnik pomanjkanje proteina C in tudi proteina S je občutljivost 100 %. Občutljivost načina za oceno delovanja proteina C (Thrombopath) je ravno tako 100 % občutljiva na neodzivnost za aktivirani protein C, kjer pa smo imeli samo enega preiskovanca.

Na osnovi izračunane mejne vrednosti zavrte koagulacije 74 % smo ugotovili, da ima 24 % bolnikov zmanjšano vrednost deleža zavrte koagulacije.

Grafikon VIII prikazuje primerjavo deleža zavrte koagulacije pri bolnikih pod št 1 in zdravih preiskovancev pod št 2.



Grafikon VIII: Primerjava deležev zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (PiCi %) med zdravimi osebami (1) in bolniki (2).

Iz grafa je razvidno, da je specifičnost dobra, velika večina rezultatov zdravih preiskovancev je nad mejno vrednostjo PiCi 74 % (diskriminatorsna meja).

Glede na vse preiskovane bolnike je izračunana občutljivost preiskave za oceno delovanja proteina C (Thrombopath) 21%.

Izračunana občutljivost preiskave za oceno delovanja proteina C (Thrombopath) je za 51 % bolnikov, katerim smo ugotovili patološke rezultate posameznih preiskav, 41 %.

6. RAZPRAVA

Dedno ali pridobljeno pomanjkanje ali pomanjkljiva aktivnost inhibitorjev koagulacije, kot so antitrombin (AT III), protein C (PC), proteina S (PS) in drugi ima lahko za posledico trombofilijo (nagnjenost k trombozi). Trombofilija se lahko pojavi tudi zaradi različnih fizioloških stanj (nosečnost), bolezni (rak) ali po operaciji. Takrat večinoma z laboratorijskimi preiskavami ne ugotovimo sprememb v hemostazi, saj so odkloni od referenčnih vrednosti premajhni pri uporabi enostavnih preiskovalnih načinov.

Protein C je eden glavnih zaviralcev koagulacije v krvi, ki omejuje nastanek strdka le na mesto poškodbe. Zato je pomembno, da ugotovimo motnjo v delovanju poti PC.

Med pomembne laboratorijske preiskave za oceno trombofilije uvrščamo določitev aktivnosti AT III, aktivnosti PS, nivo antigena PS, aktivnost PC, neodzivnost za aktivirani PC (mutacija *Faktor V Leiden*), prisotnost lupusnih antikoagulantov in povečano aktivnost faktorja VIII (FVIII). Za opredelitev trombofilije običajno opravimo vse preiskave sočasno.

Nov način opredelitve motnje v delovanju PC (Trombopath) temelji na aktivaciji endogenega PC z izvlečkom kačjega strupa (Protac), ki zmanjša nastanek trombina v vzorcu citratne plazme. Meritev opravimo z in brez aktivacije PC z izvlečkom kačjega strupa ter v obeh primerih izmerimo spremembo absorbance, ki jo dobimo, ko trombin cepi kromogeni substrat. Izsledke izrazimo kot delež zavrite koagulacije, ki jo sprožimo z izvlečkom kačjega strupa. V literaturi uvrščajo način (Trombopath) kot presejalno preiskavo ali kot dodatek k drugim preiskavam za oceno trombofilije.

Pri 36 % bolnikov s trombozo vzroka ne moremo ugotoviti (12). Z motnjo v delovanju PC, kot je pomanjkanje PC, pomanjkanje PS ali neodzivnost za aktivirani PC so pojasnili 30 % primerov bolnikov, ki so doživeli vensko tromboembolijo. Način Trombopath je tako primeren za presejanje bolnikov z motnjami v poti proteina C, saj je po podatkih iz literature (12) občutljiv na pomanjkanje aktivnosti PC, PS, znižan antigen PS, neodzivnost za aktivirani PC in prisotnost LA.

Z ekonomskega stališča je smiselno pristopiti k opredelitvi motnje v delovanju poti PC stopenjsko. V prvem koraku bi motnjo ugotovili, v drugem pa potrdili s posameznimi preiskavami.

Za ugotovitev motnje z novim načinom je potrebno izračunati mejno vrednost, dobljeno iz izsledkov preiskav pri zdravih preiskovancih. Pri 24 % zdravih preiskovancev smo ugotovili povečano in tudi zmanjšano aktivnost FVIII in FII. Po navedbah proizvajalca kompleta povečana aktivnost FVIII in FII nad 1,5 E/mL zmanjša delež zavrte koagulacije. Zmanjšana aktivnost FVIII in FII pa to vrednost zvečata. Iz tega razloga smo iz določitve mejne vrednosti (poglavje 1.9) iz izsledkov zdravih preiskovancev izključili zvečane ali zmanjšane vrednosti aktivnosti FVIII in FII. Iz tega izračuna smo izključili tudi preiskovance, ki so imeli patološke vrednosti preiskav aktivnosti proteina C, aktivnosti proteina S, antigena proteina S ter prisotnost lupusnih antikoagulantov in neodzivnost na aktivirani protein C (APCR).

Vrednost, ki smo jo dobili za mejno vrednost deleža zavrte koagulacije 74 % je manjša od tiste, ki je navedena v literaturi (12). Razliko smo pripisali dejstvu, da smo za analizo uporabili drug aparat in da smo iz izračuna deleža zavrte koagulacije izključili vrednosti zdravih preiskovancev, pri katerih smo ugotovili zvečane in zmanjšane vrednosti aktivnosti FVIII in FII (12, 13)

Specifičnost načina 88 % je primerljiva s podatki objavljene raziskave, kjer so v 3 različnih centrih dobili specifičnost načina 95,9 %, 95,8 % ter 85,2 %. Nižja specifičnost kaže, da je način občutljiv tudi na druge faktorje koagulacije, kot sta faktor X, XI, ki lahko vplivata na zmanjšano vrednost deleža zavrte koagulacije. Zvečane aktivnosti koagulacijskih faktorjev so znani rizični dejavniki za vensko trombozo. Znano je, da je protrombin (faktor II) močan inhibitor aktiviranega proteina C, tako lahko povečane aktivnosti faktorja II zmanjšajo vrednosti PiCi % pri sicer zdravih preiskovancih.

Domnevamo lahko, da je razlog za manjši PiCi % tudi trenutno še nepoznan dejavnik, ki vpliva na motnjo v delovanju poti PC.

Občutljivost preiskave smo izračunali na število vseh bolnikov, poslanih v naš laboratorij za ocenitev trombofilije. Izračunali smo jo tudi za skupino 28 bolnikov z ugotovljenim pomanjkanjem aktivnosti PC, zmanjšano ravnijo antigena PS, prisotnost LA ter neodzivnostjo za aktivirani PC in glede na posamezno preiskavo (poglavje 5.3, grafikon VII, VIII).

Ugotovili smo, da je nov način zelo občutljiv le za posamezno ugotovljeno patološko vrednost posamezne preiskave za opredelitev trombofilije in to v primeru pomanjkanja PC, PS, in APCR ter kombiniranih motenj kar je v skladu z izsledki iz literature (12,13). Pri bolnikih s prisotnostjo LA preiskava ni dovolj občutljiva, da bi jo lahko uporabili za ta namen (poglavje 5.3, grafikon IV). V objavljeni raziskavi (12) je bila občutljivost za prisotnost lupusnih antikoagulantov kar 100%. Da bi bil način lahko kot presejalni za prisotnost lupusnih antikoagulantov, pa iz naših izsledkov ne moremo reči, saj nimamo skladnih izsledkov, oziroma se sploh ne skladajo z našimi pričakovanji, zato bi morali analizo ponoviti.

Za dokončno odločitev o primernosti načina kot presejalne preiskave za opredelitev motnje v delovanju proteina C bi potrebovali tako večje število zdravih preiskovancev za določitev natančnejše mejne vrednosti deleža zavrte koagulacije, kot bolnikov z ugotovljenimi patološkimi preiskavami za opredelitev trombofilije. Glede na to, da smo pri 2% preiskovancev ki so imeli normalne vrednosti za aktivnost PC, aktivnost PS, antigen PS, brez neodzivnosti za aktivirani protein C in brez prisotnih LA, a vendar patološki delež zavrte koagulacije sprožene z izvlečkom kačjega strupa (poglavje 5.2, grafikon III), brez patoloških vrednosti preiskovanih posameznih preiskav kaže, da je preiskava zanimiva za nadaljnje preiskovanje dejavnikov, ki vplivajo na delovanje proteina C.

7. SKLEPI

- Ugotovili smo, da je nov način zelo občutljiv le na posamezno ugotovljeno patološko vrednost posamezne preiskave za opredelitev trombofilije in to v primeru pomanjkanja PC, PS, in APCR ter pri kombiniranih motnjah, kar je v skladu z izsledki iz literature.
- Pri bolnikih s prisotnostjo LA preiskava ni dovolj občutljiva, da bi jo lahko uporabili za ta namen.
- Za dokončno odločitev o primernosti načina kot presejalne preiskave za opredelitev motnje v delovanju proteina C bi potrebovali tako večje število zdravih preiskovancev za določitev natančnejše mejne vrednosti deleža zavrte koagulacije, kot tudi bolnikov z ugotovljenimi patološkimi preiskavami za opredelitev trombofilije.
- Zmanjšan delež zavrte koagulacije, ki smo ga ugotovili pri 2 % bolnikov brez patoloških vrednosti preiskovanih posameznih preiskav, kaže da je preiskava zanimiva za nadaljnje preiskovanje dejavnikov, ki vplivajo na delovanje proteina C.

8. LITERATURA

- (1) Stegnar M: Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami, *Littera picta*, 2005: 9- 51.
- (2) Andoljšek D, Preložnik Zupan I: Hemostaza. V: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D: *Interna medicina*, 3. izd., DZS, 2005: 1286- 1301
- (3) Pivk B: *Laboratorijska hematologija*, Elanda, Ljubljana 2003: 107- 124
- (4) Andoljšek D, Preložnik Zupan I: Motnje koagulacije krvi V: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D: *Interna medicina*, 3. izd., DZS, 2005: 1302- 1314
- (5) Navodila proizvajalca za Protein C (kataloška št. 0020300500), HemosIL™ R1 10/2007
- (6) Navodila proizvajalca HemosIL™ 302923 R6 10/2006 za antitrombin
- (7) APC resistance, Product Monograph 1997, Frank Axelsson, Steffen Rosén, Copyright © 1996, 1997 Chromogenix AB. Version 2.1
(<http://www.chromogenix.com/monographs/010%20-%20APC%20Resistance.pdf>)
- (8) Cotran SR, Kumar V, Collins T: *Pathologic basis of disease*, 6th ed., W.B.,Saunders Company, Philadelphia, 1999: 118.
- (9) http://www.sapphirebioscience.com/images/wallcharts/abcam_blood_coagulation_cascade_detail.jpg
- (10) <http://www.platelets.se/resource/Coagulation.jpg>

- (11) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=eurekah&part=A6855&rendertype=figure&id=A6860>
- (12) Toulon P: A new chromogenic assay (HemosIL TromboPath) is sensitive to major protrombotic risk factors affecting the protein C pathway. Journal Elsevier- Results of a multicenter study, Tromb Res (2009), doi:10.1016/j.thromres, 2008.11.017
- (13) Toulon P, Bouziane K: Analytical performance of new screening assay to evaluate the functionality of the protein C anticoagulant pathway, and effect of pre-analytical variables on the result, Tromb Haemost 2005;3 (Suppl 1): P0691 (Abstract)
- (14) Kitchen S, Olson D. J, Preston F. E: International standards in hemostasis V: Quality in laboratory hemostasis and thrombosis:24-26, 1 izdaja, Blackwell publishing, 2009