

## ProC<sup>®</sup>global u pacientů s antifosfolipidovými protilátkami

Buliková A.<sup>1</sup>, Némethová D.<sup>2</sup>, Penka M.<sup>1</sup>, Zavřelová J.<sup>1</sup>, Dušek L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno

<sup>2</sup>Centrum biostatistiky a analýz, Masarykova Univerzita Brno

### Souhrn

Antifosfolipidové protilátky (APA) jsou spojeny s trombotickými příhodami a opakovanými ztrátami plodu. Jejich možné působení na koagulační systém je zřejmě různorodé a může vést k protrombotické dispozici. Důležitý mechanismus, který je zmiňován v těchto procesech, je vliv na systém inhibitoru proteinu C. Cílem naší studie bylo určit změny systému proteinu C u nemocných s antifosfolipidovými protilátkami za použití testu ProC<sup>®</sup>global. Bylo vyšetřeno 126 pacientů a 64 osob kontrolní skupiny. Hodnoty ProC<sup>®</sup>global byly signifikantně nižší u pacientů nežli u zdravých osob ( $p < 0,001$ ) a u pacientů, kteří prodělali žilní tromboembolismus ( $p < 0,001$ ) při srovnání s osobami bez této komplikace. Za použití ROC analýzy jsme mohli stanovit rozhraní pacientů s vyšším rizikem trombózy. Hodnoty ProC<sup>®</sup>global  $< 0,8$  byly u žen spojeny s 1,8násobným zvýšením rizika trombózy, u mužů hodnoty  $< 0,71$  s 1,7násobným.

**Klíčová slova:** antifosfolipidové protilátky, ProC<sup>®</sup>global, trombóza, predikce rizika

### Summary

Buliková A., Némethová D., Penka M., Zavřelová J., Dušek L.: ProC<sup>®</sup>global in patients with antiphospholipid antibodies

Antiphospholipid antibodies (APA) are known to be associated with thrombotic events and/or recurrent foetal loss. Their possible action to the blood coagulation system seems to be various and could lead to prothrombotic tendency. An important mechanism involved in this process has been referred – the influence on the protein C inhibiting pathway. The aim of our study was to determine abnormalities in protein C pathway by the test ProC<sup>®</sup>global in patients with antiphospholipid antibodies. 126 patients and 64 controls were evaluated. ProC<sup>®</sup>global values were significantly lower ( $p < 0.001$ ) in patients than in healthy persons and in patients who underwent venous thromboembolism ( $p < 0.001$ ) when comparing them with persons without this complication. Using ROC analysis we could determine cut off patients with higher risk of the thrombosis. In women ProC<sup>®</sup>global value  $< 0.8$  were associated with the 1.8-fold thrombotic risk increasing, in men ProC<sup>®</sup>global value  $< 0.71$  with 1.7-fold.

**Key words:** antiphospholipid antibodies, ProC<sup>®</sup>global, thrombosis, risk prediction

*Trans. Hemat. dnes, 11, 2005, No. 4, p. 154–161.*

## Úvod

Trombofilní tendence je u antifosfolipidových protilátek (APA) důsledkem mnohočetného vlivu na koagulační kaskádu. Významnou roli hraje ovlivnění náležité funkce systému proteinu C, a to buď přímo, nebo častěji ovlivněním jeho kofaktorů (1-6). V roce 1995 byl vyvinut jednoduchý test k zjištění funkčních odchylek systému proteinu C - test ProC<sup>®</sup>global (7, 8). Zachycuje jednak funkční ovlivnění krevního srážení v přítomnosti Leidenské mutace faktoru V, získané rezistence k aktivovanému proteinu C, deficitu proteinu C, deficitu proteinu S, ale také odráží vychýlení hemokoagulační rovnováhy u stavů, provázených zvýšenou aktivitou faktoru VIII. Dokonce po vyloučení všech těchto jednotlivých možností je snižena hodnota testu ProC<sup>®</sup>global stále spojena s vyšším rizikem trombózy (9, 10). Leidenská trombofilní skupina udává u tohoto testu při použití hodnoty „cut-off“  $< 0,68$  riziko trombózy s OR 4,3 po vyloučení deficitů proteinu C, proteinu S a Leidenské mutace FV.

Při použití u pacientů s antifosfolipidovými protilátkami jsou výsledky tohoto testu rozdílné. Někteří autoři

neprokázali statisticky významné rozdíly v hodnotě testu ProC<sup>®</sup>global u pacientů s lupus antikoagulans mezi skupinou s klinickou manifestací trombózy a nemocnými bez klinických příznaků (10). Jiné nálezy dokladují, že skupina nemocných s inhibitory typu lupus antikoagulans, které více ovlivňují test s jedním Russelovým zmižem (dRVVT), nežli test s kaolinovou suspenzí (KCT), a tím jsou považovány za více asociované s trombózou (11-15), mají významněji ovlivněn ProC<sup>®</sup>global test (16). Ani v této studii však jasná korelace poklesu ProC<sup>®</sup>global s klinickou manifestací trombózy nebyla prokázána se statistickou významností. Naše vlastní předchozí práce však prokazovaly statisticky významný pokles testu ProC<sup>®</sup>global u klinické manifestace trombózy při primárním výskytu lupus antikoagulans, tedy u nemocných bez průkazu přítomnosti revmatického či nádorového procesu (17, 18).

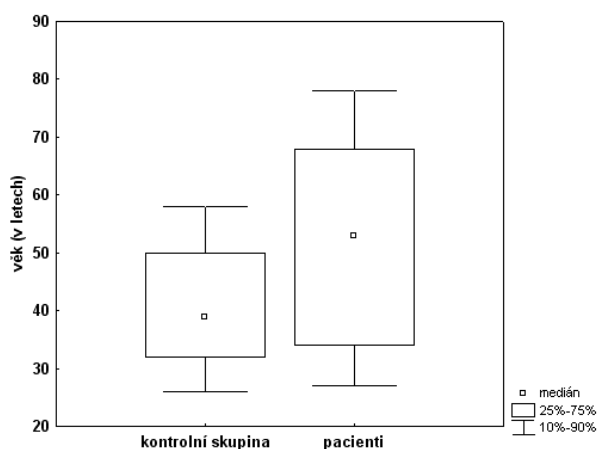
## Soubor pacientů

Do hodnocení bylo zařazeno 126 nemocných s přítomností antifosfolipidových protilátek tj. s lupus antikoagulans

Tab. 1. Charakteristika souboru.

|               | jen LA | LA + ACLA | jen ACLA* | jen anti $\beta_2$ -GPI | žádné APA | Celkem |
|---------------|--------|-----------|-----------|-------------------------|-----------|--------|
| pacienti ženy | 29     | 40        | 13        | 2                       | 0         | 84     |
| pacienti muži | 19     | 21        | 2         | 0                       | 0         | 42     |
| kontroly ženy | 0      | 0         | 0         | 0                       | 38        | 38     |
| kontroly muži | 0      | 0         | 0         | 0                       | 26        | 26     |
| celkem        | 48     | 61        | 15        | 2                       | 64        | 190    |

\*slabá pozitivita ACLA zařazena mezi negativní nálezy



Obr. 1. Věk ve skupině kontrolní a u nemocných s antifosfolipidovými protilátky.

a/nebo s průkazem antikardiolipinů ve třídě IgM a/nebo IgG, případně s průkazem protilátek proti  $\beta_2$ -glykoproteinu I. Současně bylo vyšetřeno 64 zdravých dobrovolníků, u nichž byla přítomnost antifosfolipidových protilátek testováním vyloučena. U těchto probandů nikdy nedošlo ke klinické manifestaci trombozy či ke spontánním ztrátám plodu.

Pacienti byli podle klinické manifestace rozděleni do skupin; MV+ při anamnéze prodělané žilní trombozy, případně MV-, pokud ke klinické manifestaci v žilním řečišti nedošlo. Analogicky byla vytvořena skupina MA+ z nemocných, u nichž došlo k manifestaci trombozy v arteriálním řečišti, pacienti, kteří tento typ trombotických příhod neprodělali, byli zařazeni do skupiny MA-. Ženy, které prodělaly minimálně jednu ztrátu plodu, byly zařazeny do skupiny SPA+, zatímco ženy bez těchto porodnických komplikací, tvoří skupinu označenou SPA-.

Popisnou charakteristiku souboru udává tabulka 1.

Zastoupení pohlaví se ve skupině pacientů a ve skupině kontrolní neliší (test dobré shody:  $\chi^2 = 0,982$ ;  $p = 0,322$ ). Průměrný věk nemocných byl 51,7 let (medián 53 let, minimum 18, maximum 88 roků), ve skupině kontrolní 41,08 let (medián 39 let, minimum 19, maximum 78 let). Ve skupině kontrolní byl tedy věk významně nižší (Mannův-Whitneyův U test;  $U = 2732,5$   $p < 0,001$ , obr. 1). Na základě statisticky nevýznamné korelace mezi věkem a hodnotou ProC®global ovšem můžeme tvrdit, že věk neovlivňuje hodnotu testu (ve skupině pacientů:  $r_s = 0,013$ ;  $p = 0,884$ ; v kontrolní skupině:  $r_s = 0,043$ ;  $p = 0,734$ ) a tak jsou použité soubory srovnatelné.

## Materiál a metodika

### Stanovení antifosfolipidových protilátek

Na našem pracovišti používáme pro stanovení inhibitoru LA vícestupňovou diagnostiku

navrženou standardizačním výborem Mezinárodní společnosti pro trombozu a hemostázu s ohledem na další modifikace (19, 20). Jako screeningové testy jsou to ředěný aktivovaný parciální tromboplastinový test – PTT-LA (Diagnostica Stago), ředěný test s jedním Russelovým zmijem – reagentie Russel viper venom (Diagnostica Stago) a kaolinový čas za použití 2% kaolinové suspenze (Kaolin Diagnostica Stago). V případě pozitivního nálezu ve screeningovém testu je proveden korekční test normální směsnou plazmou. Ve vzorcích, v nichž nedochází ke korekci, je přítomnost inhibitoru ověřena nebo vyloučena konfirmačním testem – neutralizací inhibitoru fosfolipidy trombocytů. U nejednoznačných výsledků je doplněn další konfirmační test s neutralizací fosfolipidy v hexagonální fázi II -Hexagonal Neutralization Procedure (HNP) – Staclot®LA (Diagnostica Stago). Toto diagnostické schéma je od ledna 2002 na našem pracovišti doplněno o použití aPTT s diagnostickým reagens necitlivým k přítomnosti LA (Actin® FS, Dade Behring). Veškeré testy jsou prováděny ze speciálně preanalyticky připravené bezdestičkové plazmy; stejná příprava je použita pro přípravu normální plazmy používané ke směsným studiím. Do studie byli zařazeni pacienti, u nichž byla přítomnost inhibitoru opakovaně ověřena v časovém odstupu 6 a více týdnů.

Stanovení protilátek proti kardiolipinům a proti  $\beta_2$ -glykoproteinu I bylo provedeno mimo naše pracoviště užitím ELISA techniky a pro vyhodnocení výsledků jsme použili škálu doporučenou laboratoří, která výsledky provádí. Ta poskytuje hodnocení pro antikardiolipinové protilátky  $< 10$  U/ml jako negativní, hraniční nález zahrnuje rozmezí 10–19 U/ml, nálezy 20–39 U/ml jako nález slabě pozitivní. Pozitivní nálezy pak zahrnují titry protilátek 40–79 U/ml, hodnoty nad 80 U/ml jsou hodnoceny jako silná pozitivita. Pokud byl průkaz antikardiolipinů izolovaný, tj. bez přítomnosti lupus antikoagulans resp. protilátek proti  $\beta_2$ -glykoproteinu I, pak bylo pro zařazení do studie nutno prokázat opakovaný nález positivity ACLA IgM nebo ACLA IgG v titru nejméně 40 U/ml.

Výsledky protilátek proti  $\beta_2$ -glykoproteinu I jsou spolupracující laboratoří vyjadřovány pouze v semikvantitativní škále hodnocení jako negativní, slabě pozitivní, pozitivní a silně pozitivní. Pokud byl průkaz těchto protilátek izolovaný, pak pro zařazení pacienta byl nutný opakovaný průkaz nejméně pozitivního nálezu.

### Stanovení ProC®Global

Ke stanovení hodnoty testu ProC®global byla u nemocných bez zavedené antikoagulační léčby warfarinem odebírána venózní krev do plastických odběro-

vých zkumavek s obsahem 3,8% citronanu sodného v poměru 1:10, centrifugována při 2500 g po 20 minut při pokojové teplotě, šokově zmrazena a následně uchovávána v plastických zásobnících při -70 °C do doby provedení vyšetření. K laboratorní diagnostice byl použit původní kit ProC®global (Dade Behring), stanovení bylo provedeno na koagulačním analyzátoru STA-Compact.

**Princip testu:** test odráží globální aktivitu systému proteinu C, ke které dochází po aktivaci endogenního proteinu C ve vzorku plazmy po přidání hadího jedu Protac (jed Agkistrodon contortrix). Takto aktivovaný protein C vede k prodloužení aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT); z poměru aPTT před a po aktivaci je vypočítán poměr R. Normalizovaný poměr R (NR) je stanoven vynásobením poměru R kalibračním faktorem, který je určen pro každou šarži reagensie. Vyjadřování výsledků v NR snižuje ovlivnění konečných výsledků použitým koagulačním analyzátozem, šarží testu a podobně. Normální hodnoty poměru NR dané firemním nastavením testu jsou > 0,8.

U nemocných, u nichž byla stanovena hodnota, která je považována za patologickou resp. pozitivní tj. méně než 0,8, byla v dalším průběhu doplněna vyšetření, která blíže tuto pozitivitu analyzují – stanovení případné přítomnosti Leidenské mutace FV, deficitu proteinu C, deficitu proteinu S a zvýšené aktivity FVIII.

#### *Stanovení Leidenské mutace FV*

Izolace DNA byla provedena standardní metodou, pomocí izolačního kitu „QIA Blood Mini Kit“ firmy Qiagen, umožňující rychlou izolaci DNA z malého množství periferní krve (200 µl) odebrané do odběrových zkumavek obsahující K<sub>3</sub>EDTA.

Vlastní průkaz Leidenské mutace FV byl proveden metodou PCR-RFLP, která je založena na amplifikaci známé sekvence genu pomocí dvou specifických primerů (21) FVL1 a FVL2 (Metabion International AG). Výsledkem amplifikace jsou amplikony (PCR produkty o stejné délce), které jsou detekované elektroforeticky na agarózovém gelu, po předchozím enzymatickém štěpení pomocí restrikčních endonukleáz (Promega Corporation) za specifických podmínek.

#### *Stanovení aktivity proteinu C a proteinu S*

Venózní krev odebraná do plastických zkumavek s obsahem citronanu sodného v poměru 1:10 byla centrifugována po 15 minut při 2500 g, šokově zmrazena a uchována při -70 °C do doby vyšetření. Aktivita proteinu C byla stanovena za pomoci reagenčního setu STA Staclot Protein C (Diagnostic Stago) na koagulačním analyzátoru STA-Compact nebo analyzátoru STA-R. Aktivita proteinu S byla stanovena za stejných podmínek pomocí reagenčního setu STA Staclot Protein S (Diagnostic Stago).

#### *Stanovení aktivity FVIII*

Venózní krev odebraná do plastických zkumavek s obsahem citronanu sodného v poměru 1:10 byla centrifugována po 15 minut při 2500 g, šokově zmrazena a uchovávána do doby vyšetření při -20 °C do doby vyšetření (ne déle než 4 týdny). Aktivita faktoru VIII

byla stanovena standardní metodikou zavedenou na pracovišti v ředění plazmy 1:20 resp. podle zjištěné hodnoty i v ředění 1:40 event. i 1:80 k zabezpečení přesného odečtu vysokých hodnot aktivity. Stanovení bylo provedeno na koagulačním analyzátoru STA Compact nebo STA-R za použití diagnostik PTT-Automete 10 (Diagnostic Stago), FVIII deficitní plazmy DG-FVIII (Grifols s.r.o), STA Unicalibrator (Diagnostic Stago) a STA System Control N+P (Diagnostic Stago).

## Statistické zpracování

Ke srovnání hodnot ProC®global mezi pacienty a kontrolní skupinou byl vzhledem k normalitě rozložení hodnot ProC®global použit t-test. T-test byl rovněž použit ke srovnání hodnot ProC®global u pacientů s manifestací žilní trombózy a pacientů bez této manifestace, ke srovnání hodnot ProC®global u pacientů s manifestací arteriální trombózy a pacientů bez této manifestace, dále pak ke srovnání hodnot ProC®global u pacientek, které měly samovolný potrat a pacientek bez samovolného potratu. Podobně byl t-test použit ke srovnání hodnot ProC®global u pacientů s lupus antikoagulans a bez lupus antikoagulans, také ke srovnání hodnot ProC®global u pacientů s přítomností antikardiolipinových protilátek a bez těchto protilátek. T-test byl použit také ke srovnání hodnot ProC®global mezi muži a ženami a to jak u souboru pacientů tak i v kontrolní skupině a dále ke srovnání hodnot ProC®global u pacientů s klinickou manifestací trombózy a bez této manifestace. Toto srovnání bylo provedeno zvlášť pro muže a zvlášť pro ženy. U pacientů s hodnotou ProC®global nižší než 0,8 byl ke srovnání hodnot ProC®global mezi pacienty s Leidenskou mutací FV a pacienty bez Leidenské mutace použit také t-test.

Ke srovnání hodnot ProC®global u pacientů s přítomností pozitivivity, slabé pozitivivity a nepřítomností protilátek proti β<sub>2</sub>-glykoproteinu I byla použita analýza rozptylu. Analýza rozptylu byla použita také ke srovnání hodnot ProC®global mezi pacienty s přítomností/nepřítomností Leidenské mutace a jiného koagulačního nálezu. K určení významnosti rozdílů mezi jednotlivými skupinami byl dále použit Fisherův LSD test.

ROC analýza byla použita k určení takové hodnoty ProC®global, která nejlépe rozliší pacienty s žilní a/nebo arteriální trombózou a pacienty bez manifestace trombózy. Diskriminační hodnota testu ProC®global byla určena zvlášť pro muže a zvlášť pro ženy.

Závislost manifestace trombózy na hodnotě ProC®global vzhledem ke hraniční hodnotě určené ROC analýzou byla sledována pomocí testu dobré shody.

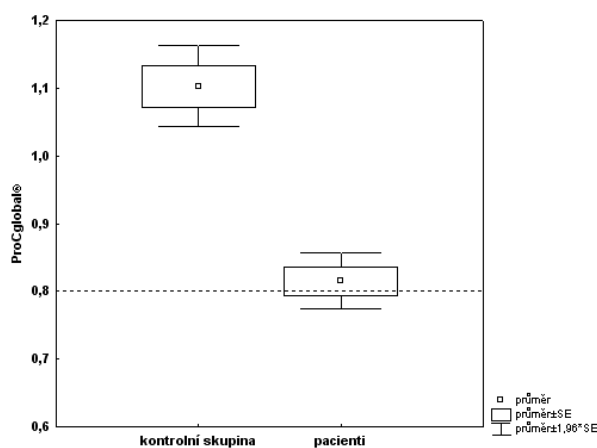
## Výsledky

Hodnota ProC®global se statisticky významně lišila mezi skupinou pacientů a skupinou kontrolní (t-test, p < 0,001). Při analýze jednotlivých skupin nemocných lze zjistit statisticky významný rozdíl v hodnotě testu při srov-

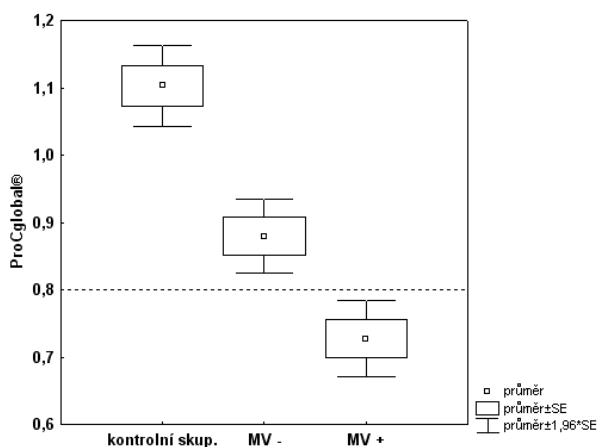
**Tab. 2.** Hodnoty NR testu ProC<sup>®</sup>global v jednotlivých skupinách.

| skupina  | N  | ProC <sup>®</sup> global |        | skupina  | N   | ProC <sup>®</sup> global |        | t-test |     | p      |
|----------|----|--------------------------|--------|----------|-----|--------------------------|--------|--------|-----|--------|
|          |    | průměr                   | sm.od. |          |     | průměr                   | sm.od. | t      | df  |        |
| kontrola | 64 | 1,10                     | 0,25   | pacienti | 126 | 0,82                     | 0,24   | -7,767 | 188 | <0,001 |
| K - ženy | 38 | 1,13                     | 0,27   | k - muži | 26  | 1,06                     | 0,20   | 1,149  | 62  | 0,255  |
| P - ženy | 84 | 0,85                     | 0,24   | p - muži | 42  | 0,76                     | 0,23   | 1,994  | 124 | 0,048  |
| MV-      | 73 | 0,88                     | 0,24   | MV+      | 53  | 0,73                     | 0,21   | 3,691  | 124 | <0,001 |
| MA-      | 96 | 0,83                     | 0,23   | MA+      | 30  | 0,78                     | 0,26   | -0,821 | 124 | 0,413  |
| SPA-     | 65 | 0,85                     | 0,24   | SPA+     | 19  | 0,83                     | 0,23   | 0,344  | 82  | 0,732  |
| LA-      | 17 | 0,91                     | 0,24   | LA+      | 109 | 0,80                     | 0,24   | -1,747 | 124 | 0,083  |
| ACLA-    | 43 | 0,85                     | 0,25   | ACLA+    | 80  | 0,81                     | 0,24   | -0,913 | 121 | 0,363  |

**Vysvětlivky:** sm. od. = směrodatná odchylka



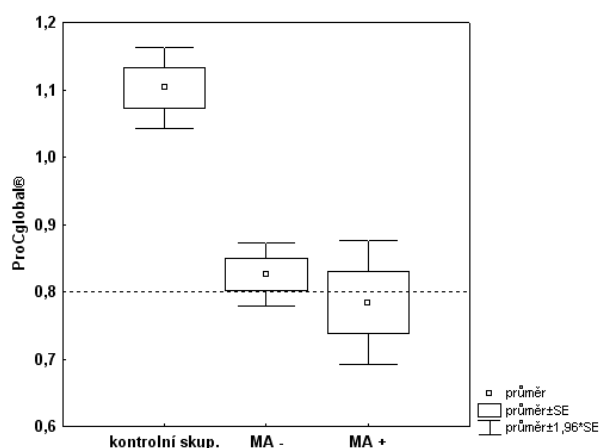
**Obr. 2.** Hodnota ProC<sup>®</sup>global ve skupině kontrolní a u nemocných s antifosfolipidovými protilátkami.



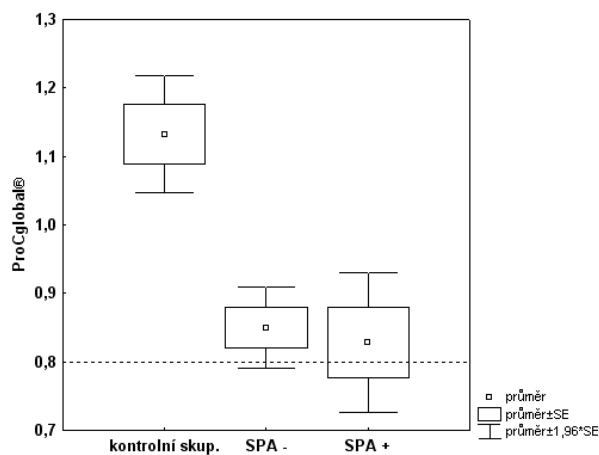
**Obr. 3.** Hodnota ProC<sup>®</sup>global ve skupině kontrolní a u nemocných s antifosfolipidovými protilátkami bez klinické manifestace žilní trombózy (MV-) a u nemocných s touto klinickou manifestací (MV+).

nání skupiny nemocných s žilní trombózou a skupiny bez této manifestace (skupiny MV+ a MV-, t-test,  $p < 0,001$ ), rozdíl však nebyl zjištěn při klinické manifestaci arteriální trombózy (skupiny MA+ a MA-, t-test,  $p = 0,413$ ) a samovolné ztráty plodu (t-test,  $p = 0,732$ ). Výsledky hodnoty NR testu ProC<sup>®</sup>global shrnuje tabulka 2 a obrázky 2–5.

Hodnota ProC<sup>®</sup>global se zdála být více ovlivněna přítomností lupus antikoagulans, ale ani zde nedosáhl rozdíl statistické významnosti (t-test,  $p = 0,083$ ). Také při srovnání pacientů s přítomností antikardiolipinových



**Obr. 4.** Hodnota ProC<sup>®</sup>global ve skupině kontrolní a u nemocných s antifosfolipidovými protilátkami bez klinické manifestace arteriální trombózy (MA-) a u nemocných s touto klinickou manifestací (MA+).



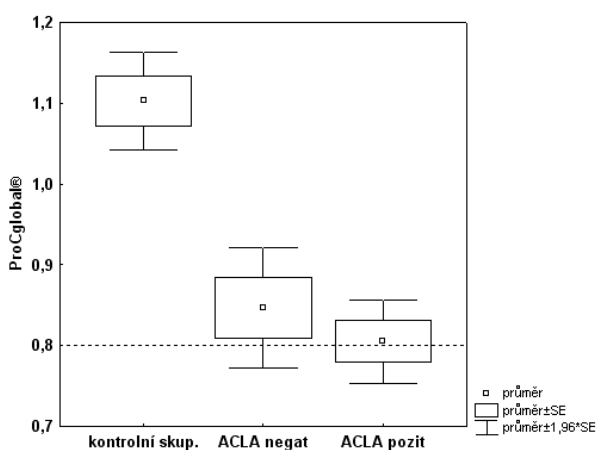
**Obr. 5.** Hodnota ProC<sup>®</sup>global ve skupině kontrolní a u pacientek s antifosfolipidovými protilátkami bez prodělané ztráty plodu (SPA-) a u nemocných s touto klinickou manifestací (SPA+).

protilátek a nemocných bez tohoto nálezu, nebyla hodnota NR ProC<sup>®</sup>global testu odlišná (t-test,  $p = 0,363$ ). Stejně tak přítomnost pozitivita, slabé pozitivita, případně nepřítomnost protilátek proti  $\beta_2$ -glykoproteinu I neovlivňovala hodnotu testu se statistickou významností (ANOVA;  $F = 0,157$ ;  $df_1 = 2$ ;  $df_2 = 80$ ;  $p = 0,855$ ).

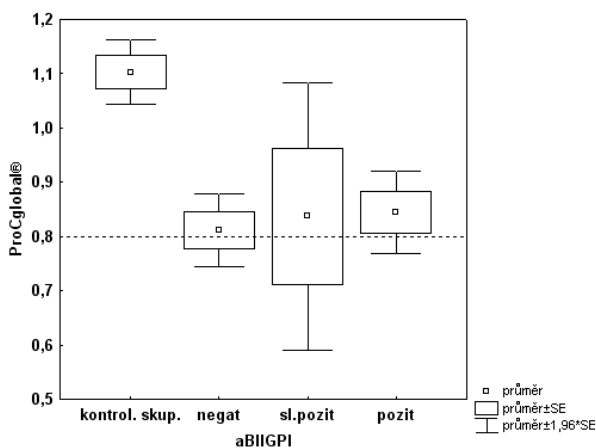
Hodnoty ProC<sup>®</sup>global v přítomnosti či nepřítomnosti jednotlivých typů antifosfolipidových protilátek shrnuje tabulka 2 a obr. 6–8).



Obr. 6. Hodnota ProC<sup>®</sup>global ve skupině kontrolní a u nemocných s lupus antikoagulans a bez tohoto laboratorního nálezu.



Obr. 7. Hodnota ProC<sup>®</sup>global ve skupině kontrolní a u nemocných s nálezem silné a střední pozitivitu antikardiolipinových protilátek a bez tohoto laboratorního nálezu.



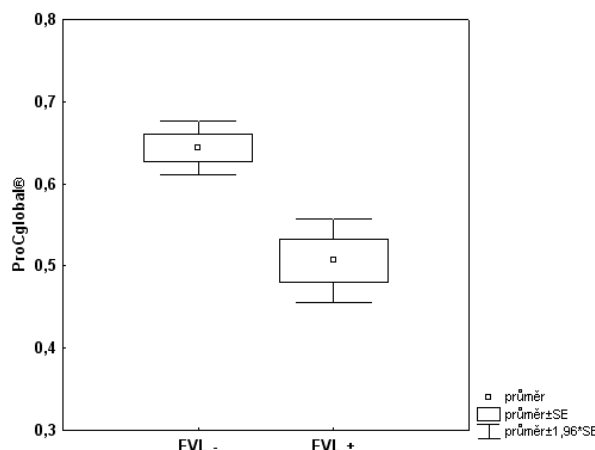
Obr. 8. Hodnota ProC<sup>®</sup>global v kontrolní skupině a u nemocných při různé pozitivitě protilátek proti bbb<sub>2</sub>-glykoproteinu I.

Při bližší analýze příčin poklesu ProC<sup>®</sup>global na hodnotu 0,8 NR a méně jsme vyšetřili 59 nemocných na přítomnost Leidenské mutace FV (FVL+), deficit proteinu C resp. S a zvýšení aktivity FVIII nad 150 % (pro potřeby další analýzy byly tyto tři odchylky zahrnuty do skupiny ostatní).

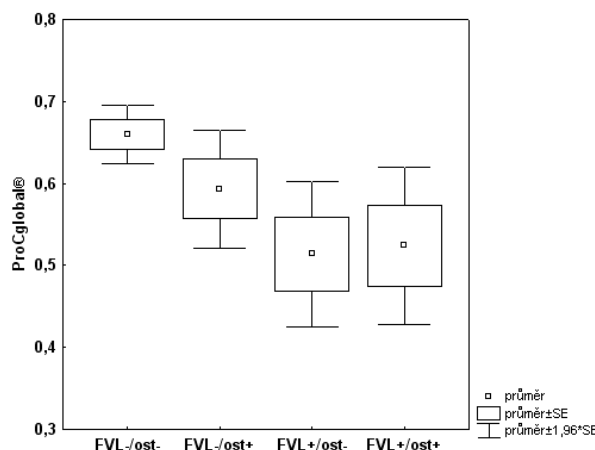
V tomto vyšetřování jsme zjistili u 13 nemocných

Tab. 3. Hodnoty NR při pozitivním nálezu ProC<sup>®</sup>global testu v jednotlivých skupinách.

| Skupina         | N  | ProC <sup>®</sup> global průměr | ProC <sup>®</sup> global sm. odch. |
|-----------------|----|---------------------------------|------------------------------------|
| FVL -           | 46 | 0,64                            | 0,11                               |
| FVL +           | 13 | 0,51                            | 0,09                               |
| FVL +/ostatní - | 5  | 0,51                            | 0,10                               |
| FVL +/ostatní + | 5  | 0,52                            | 0,10                               |
| FVL -/ostatní - | 32 | 0,66                            | 0,10                               |
| FVL -/ostatní + | 12 | 0,59                            | 0,13                               |



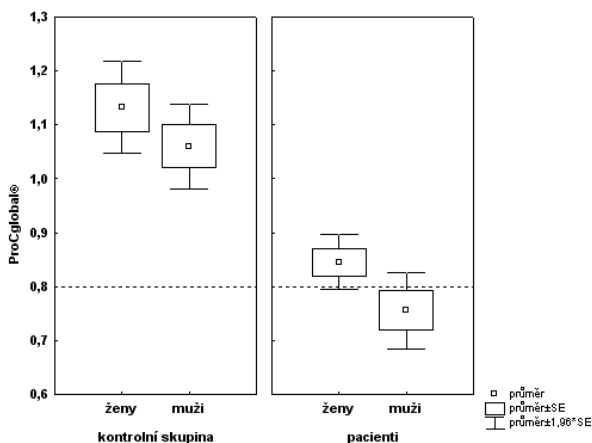
Obr. 9. Hodnota ProC<sup>®</sup>global s NR < 0,8 u pacientů bez Leidenské mutace FV a s touto vrozenou trombofilií.



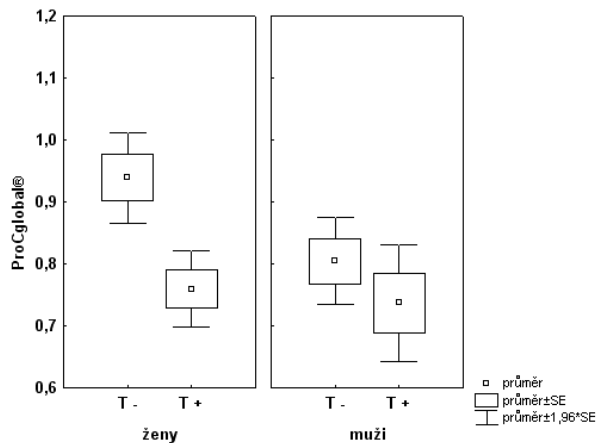
Obr. 10. Hodnota ProC<sup>®</sup>global s NR < 0,8 podle příčiny.

nález Leidenské mutace FV, všechny v heterozygotní formě. V 17 případech pak byly nalezeny další koagulační odchylky – 4krát kombinovaná odchylka se zvýšením aktivity FVIII nad 150 % a snížením proteinu S, 8x snížení proteinu S, 4krát zvýšení aktivity FVIII a jednou kombinace deficitu proteinu S, deficitu proteinu C a zvýšení aktivity FVIII. Změny, které byly nalezeny, byly spíše méně významné – nejvyšší dosažená hodnota FVIII byla 282 %, nejnižší zjištěná aktivita proteinu S dosahovala 50 %. Jediný deficit proteinu C v kombinaci s jinými faktory byl 69 %. U pěti nemocných byla přítomnost Leidenské mutace kombinována s jiným koagulačním nálezem.

Hodnoty ProC<sup>®</sup>global v jednotlivých skupinách blíže určených nemocných shrnuje tabulka 3. U tří nemocných s pozitivním nálezem ProC<sup>®</sup>global bylo provedeno



**Obr. 11.** Porovnání průměrné hodnoty ProC<sup>®</sup>global v obou skupinách (kontrolní a pacienti s antifosfolipidovými protilátkami) podle pohlaví.



**Obr. 12.** Průměrná hodnota ProC<sup>®</sup>global ve skupině pacientů s antifosfolipidovými protilátkami podle pohlaví a klinické manifestace trombózy (T- bez trombózy v žilním a arteriálním řečišti, T+ s trombózou v žilním a/nebo v arteriálním řečišti).

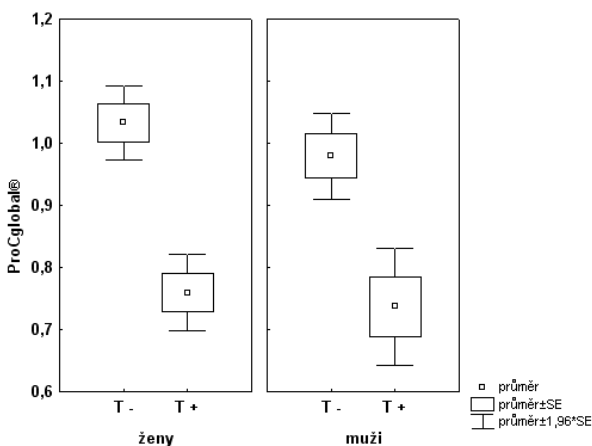
**Tab. 4.** Hodnoty NR ProC<sup>®</sup>global ve vztahu ke klinické manifestaci žilní nebo tepenné trombózy.

| skupina                                     | N  | ProC <sup>®</sup> global |        | skupina | N  | ProC <sup>®</sup> global |        | t      | df  | p      |
|---|----|--------------------------|--------|---------|----|--------------------------|--------|--------|-----|--------|
|   |    | průměr                   | sm.od. |         |    | průměr                   | sm.od. |        |     |        |
| pacienti s antifosfolipidovými protilátkami |    |                          |        |         |    |                          |        |        |     |        |
| ženy T-                                     | 40 | 0,94                     | 0,24   | ženy T+ | 44 | 0,76                     | 0,21   | -3,713 | 82  | <0,001 |
| muži T-                                     | 12 | 0,80                     | 0,12   | muži T+ | 38 | 0,74                     | 0,27   | -0,843 | 40  | 0,404  |
| celý vyšetřený soubor (včetně kontrol)      |    |                          |        |         |    |                          |        |        |     |        |
| ženy T-                                     | 78 | 1,03                     | 0,27   | ženy T+ | 44 | 0,76                     | 0,21   | -5,837 | 120 | <0,001 |
| muži T-                                     | 38 | 0,98                     | 0,22   | muži T+ | 30 | 0,74                     | 0,27   | -4,157 | 66  | <0,001 |

**Vysvětlivky:** sm. od. = směrodatná odchylka

**Tab. 5.** Počet žen a mužů podle kritické hodnoty ProC<sup>®</sup>global.

|         | počet žen s hodnotou ProC <sup>®</sup> global |            | počet mužů s hodnotou ProC <sup>®</sup> global |             |
|---------|---|------------|--|-------------|
|         | do 0,8 NR                                     | nad 0,8 NR | do 0,71 NR                                     | nad 0,71 NR |
| ženy T- | 10  | 30         | 2  | 10          |
| ženy T+ | 25  | 19         | 19   | 11          |



**Obr. 13.** Průměrná hodnota ProC<sup>®</sup>global v celém vyšetřeném souboru podle pohlaví a klinické manifestace trombózy (T- bez trombózy v žilním a arteriálním řečišti, T+ s trombózou v žilním a/nebo v arteriálním řečišti).

pouze stanovení Leidenské mutace FV, zatímco koagulační faktory vyšetřeny nebyly.

Porovnání hodnot ProC<sup>®</sup>global se statisticky významně liší při srovnání nemocných, kteří kromě přítomnosti antifosfolipidových protilátek případně dalších koagulačních

odchylek s trombofilní tendencí byli současně nositeli Leidenské mutace FV a těch, kteří tuto vrozenou náchylnost neměli (t-test; t = 4,033; df = 57; p < 0,001, obr. 9).

Hodnoty ProC<sup>®</sup>global se mezi pacienty s výskytem Leidenské mutace a/nebo jiným koagulačním nálezem lišily (ANOVA, F = 4,466; df<sub>1</sub> = 3, df<sub>2</sub> = 50; p = 0,007; obr. 10). Pomocí Fisherova LSD testu byl statisticky významný rozdíl zjištěn mezi skupinou pacientů FVL-/ostatní- a skupinou FVL+/ostatní- a také skupinou FVL+/ostatní+.

Z toho plyne, že s pozitivitou FVL se hodnota ProC<sup>®</sup>global snižuje. Tento nálezn se odráží i v klinické manifestaci – pouze jeden ze třinácti nositelů Leidenské mutace se současnou přítomností antifosfolipidových protilátek neměl žádnou trombotickou komplikaci tj. 7,69 % v porovnání 53 (tj. 41,73 %) pacienty s APA bez trombotické manifestace v celém souboru pacientů. Pozitivita dalších koagulačních odchylek nemá na snižování ProC<sup>®</sup>global statisticky významný vliv.

Hodnota testu se však v námi vyšetřovaných souborech lišila i dle pohlaví (tab. 2), a to se statistickou významností ve skupině pacientů s antifosfolipidovými protilátkami (t-test, p = 0,048). Podobně ve skupině kon-

trolní lze vysledovat tento trend, ale zřejmě díky menšímu počtu probandů nebylo statistické významnosti dosaženo (t-test,  $p = 0,255$ ). Rozdíly ukazuje obrázek 11.

Při analýze vztahu hodnoty ProC<sup>®</sup>global a klinické manifestaci trombozy u nemocných s antifosfolipidovými protilátkami jsme zjistili statisticky významný rozdíl u žen, které prodělaly žilní či arteriální trombotickou komplikaci (T+) ve srovnání se skupinou žen, které žádnou klinickou manifestaci trombozy neměly (T-) (t-test,  $p < 0,001$ ). Tento rozdíl však nebyl zjištěn u mužů (t-test,  $p = 0,404$ ), zřejmě díky malému počtu mužů bez klinické manifestace arteriální či venózní trombozy v této skupině. Je-li toto porovnání provedeno v celém vyšetřovaném souboru, je statisticky významného rozdílu dosaženo v obou pohlavích (t-test, v obou případech  $p < 0,001$ ). Výsledky shrnuje tabulka 4, obrázky 12 a 13.

Pomocí ROC analýzy jsme se u obou pohlaví pokusili nastavit diskriminační hodnotu testu ProC<sup>®</sup>global tak, aby byla schopna predikce manifestace trombozy. Toto stanovení je smysluplné pouze na celém souboru, protože u mužů není rozdíl v hodnotách statisticky významný mezi T+ a T- pacienti. Pro skupinu žen se jako nejlepší jeví hraniční hodnota 0,80 NR, při které je 76 % případů klinické manifestace trombozy správně zařazeno. Ve skupině mužů byla určena hraniční hodnota 0,71 NR, při které je 81 % případů klinické manifestace trombozy správně zařazených.

Ve skupině žen s ProC<sup>®</sup>global do 0,8 byl zaznamenán 1,8krát vyšší výskyt trombozy ve srovnání se ženami s ProC<sup>®</sup>global nad 0,8 (tab. 5). Ve skupině mužů s ProC<sup>®</sup>global do 0,71 byl zjištěn 1,7krát vyšší výskyt trombozy ve srovnání s muži s ProC<sup>®</sup>global nad 0,71 (tab. 5). U žen i u mužů byla potvrzena závislost výskytu trombozy na hodnotě ProC<sup>®</sup>global vzhledem ke hraniční hodnotě určené ROC analýzou (test dobré shody; ženy:  $\chi^2 = 8,727$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,003$ ; muži:  $\chi^2 = 7,467$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,006$ ).

## Diskuse

ProC<sup>®</sup>global se jeví jako jednoduchý screeningový test, který je schopen predikovat náchylnost zejména k žilnímu tromboembolismu v různých situacích. Více prací dokladuje, že jeho patologická hodnota může být po vyloučení dalších trombofilních dispozic nezávislým rizikovým faktorem žilní trombozy (22, 23).

V naší práci jsme u pacientů s antifosfolipidovými protilátkami našli nižší hodnoty testu ProC<sup>®</sup>global nežli v kontrolní skupině zdravých jedinců bez těchto autoprotilátek. S poklesem této hodnoty navíc narůstala četnost případů klinické manifestace žilní trombozy. Hodnota testu byla současně významně ovlivněna přítomností Leidenské mutace faktoru včetně klinické manifestace. V soulase s jinými nálezy (24) je i podle našich výsledků přítomnost Leidenské mutace významným přídatným rizikovým faktorem u osob s pozitivním

průkazem antifosfolipidových protilátek. Protože ProC<sup>®</sup>global je považován za test s vysokou senzitivitou k odhalení přítomnosti této vrozené trombofilie (22, 25), lze předpokládat, že pokles jeho hodnoty upozorní i na riziko možnosti takto kombinované trombofilie.

Přítomnost jiných odchylek krevního srážení ovlivňujících hodnotu ProC<sup>®</sup>global tj. deficitu proteinu C, proteinu S, případně zvýšení aktivity FVIII byla prokázána v 17 nálezech. Hodnota testu v těchto případech však již nebyla statisticky významně nižší ve srovnání se 32 případy, kdy kromě přítomnosti antifosfolipidových protilátek nebyla zjištěna jiná koagulační odchylka a také zastoupení trombotických komplikací nebylo významně vyšší. Zjištěné změny zřejmě druhotně odráží jak vliv vlastních APA na systém krevního srážení, ale stejně tak je možný i vliv základního onemocnění, které tvorbu APA indukuje (zánětlivé či nádorové procesy). Těmito faktory navozené sekundární změny koagulace již dle našich výsledků riziko trombozy dále nezvyšují a jednoznačný vrozený deficit přirozených inhibitorů krevního srážení v našem souboru prokázán nebyl.

Nález závislosti hodnoty ProC<sup>®</sup>global na pohlaví ve skupině nemocných byl spíše překvapivý, i když o trendu nižších hodnot u mužů bylo již referováno v práci Matýškové 2001 (25). Zde však na souboru 565 osob s trombofilií nenabyl rozdíl statistické významnosti ( $p = 0,275$ ) při průměrných hodnotách 0,80 zjištěných u mužů a 0,82 zjištěných u žen. Statisticky významný rozdíl mezi ženami a muži ve skupině nemocných nás vedl k rozdílnému nastavení „cut-off“ hodnoty, která v jednotlivých skupinách predikuje riziko trombozy. U žen se tato hodnota rovnala firemně nastavené tj. 0,8 NR, zatímco u mužů námi zjištěná hodnota schopná predikovat riziko trombozy je 0,71 NR.

Vzhledem k tomu, že pokles hodnoty ProC<sup>®</sup>global je spojen s významně vyšším rizikem žilní trombozy u nemocných s antifosfolipidovými protilátkami, že test s vysokou citlivostí zachycuje přítomnost Leidenské mutace FV, že odráží vliv sekundárních změn koagulačního systému (deficity C, S a zvýšení FVIII) i blíže neurčený zásah antifosfolipidových protilátek do krevního srážení, jeví se tento test jako výhodné screeningové vyšetření v této skupině nemocných.

## Literatura

1. **de Groot PG, Horbach DA, Derksen RHWM.** Protein C and other cofactor involved in the binding of antiphospholipid antibodies: relation to the pathogenesis of thrombosis. *Lupus* 1996; 5: 488–493.
2. **Esmon LN, Smirnov MD, Esmon CHT.** Thrombogenic mechanisms of antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997; 78: 79–82.
3. **Parke AL, Weinstein RE, Bona RD, et al.** The thrombotic diathesis associated with the presence of phospholipid antibodies may be due to low levels of free protein S. *Am J Med* 1992; 93: 49–56.
4. **Oostin JD, Derksen RHWM, Bobbink IWG, et al.** Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: An explanation for their pathogenetic mechanisms? *Blood* 1993; 81: 2618–2625.

5. **Ames PRJ, Tommasino C, Iannaccone L, et al.** Coagulation activation and fibrinolytic imbalance in subjects with idiopathic antiphospholipid antibodies. A crucial role for acquired free protein S deficiency. *Tromb Haemost* 1996; 76: 190–194.
6. **Mori T, Takeya H, Nishioka M, et al.**  $\beta_2$ -glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protein C on the phospholipid surface. *Thromb Haemost* 1996; 75: 49–55.
7. **Kraus M, Noah M, Fickenscher K.** The PCAT – a simple screening assay for assessing the functionality of the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Res* 1995; 80: 217–222.
8. **Kraus M, Zadner M, Fickenscher K.** Coagulation assay with improved specificity to factor V mutants insensitive to activated protein C. *Thromb Res* 1995; 80: 255–264.
9. **Kemkes-Matthes B, Matzdorff A, Niemann F.** Differentialdiagnostik zur Beurteilung des Thromboserisikos mit ProC<sup>®</sup>global. *Hamostaseologie* 1999; 19: 153–156.
10. **Siegemund A, Vorberg B, Siegemund T, et al.** Einsatz des ProC<sup>®</sup>global-Test zum Thrombophisiescreening. *Hamostaseologie* 1999; 19: 157–167.
11. **Galli M, Finazzi G, Norbis F, et al.** The risk of thrombosis in patient with lupus anticoagulants is predicted by their specific coagulation profile. *Thromb Haemost* 1999; 81: 695–700.
12. **Pengo V, Biastolo A, Rampazzo P, Brocco T.** dRVVT is more sensitive than KCT or TTI for detecting lupus anticoagulant activity of anti- $\beta_2$ -glycoprotein I autoantibodies. *Thromb Haemost* 1999; 81: 258–258.
13. **Galli M, Dlott J, Norbis F, et al.** Lupus anticoagulants and thrombosis: clinical association of different coagulation and immunologic tests. *Thromb Haemost* 2000; 84: 1012–1016.
14. **Buliková A, Matýšková M, Dušek L, et al.** Význam screeningových testů pro diagnostiku lupus antikoagulantů. *Hematológia a transfuziologie* 2000; 10: 102–111.
15. **Galli M, Beretta G, Daldossi M, et al.** Kaolin clotting time and dilute Russel's viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and  $\beta_2$ -glycoprotein I dependent antiphospholipid antibodies. *Blood* 1995; 86: 617–623.
16. **Ruggeri L, Barbui T, Galli M.** Acquired resistance to activated protein C due to specific subset of lupus anticoagulants: Evaluation by means of ProC<sup>®</sup>global test. *Thromb Haemost* 1999; Suppl.: 102–103.
17. **Buliková A, Matýšková M, Zavřelová J, et al.** Stanovení rizika trombózy u osob s pozitivními antifosfolipidovými protilátkami. Závěrečná zpráva grantu č. IZ/4263–3 IGA Ministerstva zdravotnictví ČR.
18. **Buliková A, Penka M, Zavřelová J, et al.** Protein C pathway abnormalities in patients with antiphospholipid antibodies. *Thrombophilia and atherothrombosis* 2001; lectures and abstracts: 58.
19. **Brandt JT, Barma LK, Triplett DA, et al.** Laboratory identification of lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1597–1603.
20. **Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al.** International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumat* 1999; 42: 1309–1311.
21. **Janků L, Bartoníčková A.** Rizikový faktor trombózy – bodová mutace G1691A v genu faktoru V a její prevalence v České republice. *Hematológia a transfuziologie* 2000; 2: 91–95.
22. **Rosendaal FR, van der Meer FJM, Visser TH, et al.** ProC Global screening test and risk of thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 82 (Suppl): 731.
23. **Grand'Maison A, Bates SM, Johnston M, et al.** „ProC Global“: A functional screening test that predicts recurrent venous thrombembolism. *Thromb Haemost* 2005; 93: 600–604.
24. **Galli M, Finazzi G, Duca F, et al.** The G1691→A mutation of factor V, but not the G20210→A mutation of factor II or the C677→T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase genes, is associated with venous thrombosis in patients with lupus anticoagulant. *British J Haematol* 2000; 108: 865–870.
25. **Matýšková M, Zavřelová J, Méhešová M.** ProC<sup>®</sup>Global - laboratorní screeningový test pro trombofilii. *Praktický lékař* 2001; 12: 697–700.

*MUDr. A. Buliková  
Oddělení klinické hematologie  
Fakultní nemocnice Brno  
Jihlavská 20  
625 00 Brno  
abulik@fnbrno.cz*

*Došlo do redakce: 27. 7. 2005  
Přijato: 14. 10. 2005*

### Errata

V článku Za profesorem MUDr. Mikulášem, 2005, 11(3): 133-134 bylo uvedeno, že prof. MUDr. Mikuláš Hrubíško, DrSc. se narodil v Jihlavě. Jeho rodným městem je Ilava na Slovensku. Čtenářům se omlouváme.

Prof. MUDr. Ladislav Chrobák, CSc.