

Dysfibrinogenemie a afibrinogenemie v České republice

Kotlín R., Ceznerová E., Loužil J., Štikarová J., Pastva O., Suttnar J., Salaj P., Dyr J. E.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Transfuzní Hematol. dnes, 23, 2017, suplement 1, p. 8-19

SOUHRN

Fibrinogen je klíčový glykoprotein krevní koagulace, během níž je přeměňován na fibrin. Vrozená dysfibrinogenemie je choroba charakterizovaná funkční poruchou molekuly vedoucí k abnormální tvorbě fibrinu. Vrozená hypofibrinogenemie je vzácné onemocnění charakterizované sníženou hladinou funkčního i celkového fibrinogenu v plazmě.

Vyšetřili jsme 36 nepříbuzných rodin z celé České republiky s diagnózou suspektní dysfibrinogenemie či afibrinogenemie. Čtyři pacienti měli trombotické komplikace, osm pacientů se manifestovalo krvácivě a ostatní byli asymptomatici. Genetické vyšetření odhalilo vrozenou mutaci u třinácti nepříbuzných rodin, u nichž způsobuje vrozenou dysfibrinogenemii. Pomocí genetických, proteomických a funkčních vyšetření bylo odhaleno osm případů dysfibrinogenemie v $\text{A}\alpha$ řetězci, konkrétně se jedná o mutace $\text{A}\alpha$ Arg16Cys; $\text{A}\alpha$ Arg16His; $\text{A}\alpha$ Gly13Glu; $\text{A}\alpha$ Phe98Ile; $\text{A}\alpha$ Asn106Asp; a kombinovanou mutaci $\text{A}\alpha$ Gly13Glu a $\text{A}\alpha$ Ser314Cys. Jeden případ byl nalezen v $\text{B}\beta$ řetězci – $\text{B}\beta$ Arg237Ser a čtyři případy byly odhaleny v γ řetězci – γ Ser313Gly, γ Tyr262Cys, γ Tyr363Asn a γ Arg275His.

V jednom případě byla identifikována molekulární příčina vrozené afibrinogenemie. V jednom případě byla zjištěna příčina získané dysfibrinogenemie v souvislosti s produkcí autoprotilátek proti fibrinogenu u pacienta s mnohočetným myelomem.

KLÍČOVÁ SLOVA

fibrinogen – dysfibrinogenemie – afibrinogenemie – koagulace

SUMMARY

Kotlín R., Ceznerová E., Loužil J., Štikarová J., Pastva O., Suttnar J., Salaj P., Dyr J. E.

Dysfibrinogenaemia and afibrinogenaemia in the Czech Republic

Fibrinogen is a key glycoprotein of blood coagulation. During haemocoagulation fibrinogen is converted to fibrin. Congenital dysfibrinogenemia is a disease wherein an inherited abnormality in the fibrinogen molecule results in defective fibrin clot formation. Hereditary hypofibrinogenemia is a disease wherein an inherited abnormality in the fibrinogen molecule results in low fibrinogen level in plasma.

36 unrelated families in the Czech Republic suspected with either dysfibrinogenemia or afibrinogenemia were examined. Four patients presented with thrombosis, eight patients presented with bleeding tendencies and others were asymptomatic. Heterozygous point mutations $\text{A}\alpha$ Arg16Cys (Fibrinogen Nový Jičín, Ostrava I), $\text{A}\alpha$ Arg16His (Fibrinogen Praha II, Ostrava II), $\text{A}\alpha$ Asn106Asp (Fibrinogen Plzeň), γ Tyr363Asn (Fibrinogen Praha III), γ Tyr262Cys (Fibrinogen Liberec) and γ Arg275His (Fibrinogen Brno) were found to be the direct causes of dysfibrinogenemias in the carriers.

Molecular genetics experiments revealed inherited mutations in 13 unrelated families causing hereditary dysfibrinogenemia. In one case acquired dysfibrinogenemia secondary to multiple myeloma was found.

KEY WORDS

fibrinogen – dysfibrinogenaemia – afibrinogenaemia – coagulation

ÚVOD

Hemokoagulace je součástí hemostázy, komplexního procesu, jehož fyziologickou úlohou je zabránit ztrátě krve při poškození krevních cév. Klíčovým dějem hemokoagulace je přeměna plazmatického glykoproteinu fibrinogenu na fibrin. Tento děj je výsledkem kaskádovitě aktivace koagulačních faktorů, z nichž klí-

čové místo zaujímá trombin katalyzující hydrolytické štěpení fibrinogenu na fibrinový monomer. Vznikající fibrinové monomery spontánně polymerují a vytvářejí fibrinový klot (z anglického *clot* – výraz nejlépe vystihující strukturu fibrinu jako polymerního gelu tvořeného fibrinovými vlákny, vodou a dalšími složkami), který je součástí hemostatické zátky.

Vrozená dysfibrinogenemie je vzácná choroba koagulace, u níž mutace v některém z genů FGA, FGB či FGG způsobuje funkční poškození molekuly fibrinogenu. V závislosti na umístění mutace a funkčnímu poškození se může vrozená dysfibrinogenemie klinicky manifestovat rozdílně – protromboticky, hemoragicky, či asymptomaticky. Vrozená afibrinogenemie je vzácná choroba koagulace charakterizovaná sníženou koncentrací fibrinogenu v cirkulaci pod 0,5 g/l. Mírnější podobou této choroby je vrozený nedostatek fibrinogenu – hypofibrinogenemie, charakterizovaná hladinou fibrinogenu v rozpětí 0,5–2 g/l.

U získaných forem dysfibrinogenemie je typické, že se vyskytují nejčastěji v souvislosti jaterními chorobami, mnohočetným myelomem, či užíváním některých léků.

Prevalence vrozených forem dysfibrinogenemie se udává 1 : 1 000 000 a jsou řazeny jako vzácné choroby. Klinická závažnost některých mutací může být až život ohrožující (trombózy, závažné krvácivé projevy).

Celosvětově bylo popsáno více než 600 vrozených afibrinogenemií, dysfibrinogenemií nebo hypofibrinogenemií. Z tohoto počtu bylo více než 350 případů zjištěno v genu FGA, 82 případů v genu FGB a více než 170 případů v genu FGG. V České republice se nám podařilo zjistit příčinu poruchy fibrinogenu u 35 pacientů a jejich rodinných příslušníků. Z tohoto počtu bylo diagnostikováno 23 pacientů s vrozenou dysfibrinogenemií, jeden pacient s vrozenou afibrinogenemií, 9 pacientů s vrozenou hypofibrinogenemií a dva pacienti se získanou dysfibrinogenemií.

MATERIÁL A METODIKA

Odběr vzorků krve

Vzorky krve byly získány od informovaných zdravých dárců nebo od vybraných pacientů s jejich souhlasem. Krev byla odebírána do 3,8% roztoku citrátu sodného v objemovém poměru 1 : 9.

Koagulační vyšetření plazmy

Základní koagulační vyšetření bylo prováděno na automatickém koagulometru STA-R v Laboratoři pro poruchy hemostázy Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT).

Imunoturbidimetrické stanovení hladiny fibrinogenu

K imunoturbidimetrickému stanovení koncentrace fibrinogenu v plazmě byl použit komerční kit Fibrinogen K-Assay obsahující kozí polyklonální protilátku proti lidskému fibrinogenu.

Měření fibrinových polymeračních křivek

Pro získání informací o rychlosti a průběhu polymerace fibrinu byla měřena optická hustota (OD) vzorků při vlnové délce 350 nm. Polymerace fibrinogenu v chudé plazmě pacientů a zdravých dárců byla iniciována trombinem nebo reptilázou. Pro měření byly použity roztoky trombinu se dvěma různými aktivitami. Při výsledné aktivitě trombinu 0,1 U/ml lze z průběhu polymerizačních křivek posuzovat funkční vlastnosti fibrinogenu. Toto stanovení však může být ovlivněno vysokou koncentrací nízkomolekulárních inhibitorů trombinu přítomných v plazmě. Abychom vyloučili vliv inhibitorů, použili jsme trombin s výslednou aktivitou 0,9 U/ml. Turbidimetrické křivky fibrinogenu byly měřeny při 37 °C, po každých 20 s byla odečítána a zapisována optická hustota. Reakce byla sledována 40 minut. Jednotlivá měření každého vzorku byla vždy provedena v dubletu. Výsledek byl vyjádřen jako průměr.

Měření kinetiky odštěpování fibrinopeptidů

Reakční směs obsahující plazmu, TRIS pufr a o-fenatrolin hydrát byla promíchána a vzorky byly inkubovány s trombinem s aktivitou 10 U/ml (výsledná aktivita ve vzorku byla 0,9 U/ml) při 25 °C. Jednotlivé reakce byly zastaveny přidávkem 20% kyseliny trichloroctové ve zvolených časech 0; 0,5; 1; 3; 5; 10; 20; 30; 60 a 120 min. Množství uvolněných fibrinopeptidů A a B v supernatantu bylo stanoveno pomocí kapalinové chromatografie [1].

DNA analýza

Jednotlivé exony genů FGA, FGB a FGG byly namnoženy pomocí PCR a následně byly produkty přečištěny pomocí kitu ExoSAP IT podle návodu výrobce. Sekvence přečištěných produktů PCR probíhala Sangerovou dideoxysekvenační metodou pomocí DTCS kitu (Beckman Coulter, USA). Sekvence byly čteny pomocí sekvenátoru CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, USA).

Klotabilita

Ke vzorku plazmy byl přidán TRIS pufr pH 7,4 a EDTA. Polymerace fibrinu byla spuštěna přidávkem trombinu (2 U/ml finální koncentrace). Polymerace probíhala 120 minut při laboratorní teplotě. Vytvořený fibrinový klot byl promyt 5krát v TRIS pufru pH 7,4 a rozpuštěn v 5 mol/l močovíně. Koncentrace fibrinových monomerů byla určena spektrofotometricky při $\lambda = 280 \text{ nm}$ a $\epsilon_{\text{fbg}, 1\%} = 15,1$. Klotabilita byla vypočtena jako poměr změřené koncentrace fibrinových monomerů k celkové koncentraci fibrinogenu zjištěné imunoturbidimetrickou metodou.

Fibrinolýza

Pro získání informací o rychlosti a průběhu fibrinolýzy byla měřena optická hustota (OD) vzorků při vlnové délce 350 nm. Turbidimetrické křivky fibrinu byly měřeny při 37 °C, po každých 20 s byla odečítána a zapisována optická hustota. Reakce byla sledována 40 minut. Jednotlivá měření každého vzorku byla vždy provedena v dubletu a výsledek byl vyjádřen jako průměr.

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Ke vzorku plazmy byl přidán trombin (výsledná koncentrace 2 U/ml) a polymerace probíhala 2 hodiny ve vlhké komůrce. Fibrinový klot byl promyt 3krát 5 min Q vodou, dehydrován etanolovou řadou (25 %, 50 %, 75 %, 100 % etanolu po 30 minutách) a dosušen metodou CO₂ kritického bodu. Takto upravené vzorky byly potaženy vrstvou platiny o tloušťce 8 nm a morfologie fibrinové sítě byla sledována ve skenovacím elektronovém mikroskopu VEGA Plus TS5135 (Tescan, ČR).

Konfokální laserová mikroskopie

Ke vzorku plazmy byl přidán trombin (výsledná koncentrace 2 U/ml) a polymerace probíhala 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po promytí PBS pufrům byly vzniklé sítě barveny fluorescenčním barvivem FITC po dobu 60 minut. Nenavázaný FITC byl odstraněn několikanásobným promýváním pomocí PBS. Struktura fibrinové sítě byla sledována na mikroskopu Olympus Fluoview FV1000 a výsledky vyhodnoceny v programu ImageJ. Průměry vláken byly statisticky porovnány s průměrem kontrolního vzorku na hladině významnosti 0,05.

Agregace krevních destiček

Měření agregace v plazmě bylo prováděno na čtyřkanálovém agregometru PAP-4 optickou metodou. Po přidání aktivátoru agregace k míchané plazmě narůstá se vznikem agregátů intenzita světla procházející vzorkem. Výstupní signál je úměrný diferencí v průchodu světla mezi testovaným a referenčním vzorkem. Vzorky byly vloženy do měrné cely a nástřikem aktivátorů (20 μmol/l ADP či 10 μmol/l TRAP (peptid SFLLRNP aktivující trombinový receptor)) byla spuštěna agregační reakce v agregometru PAP-4. Doba měření byla 6 minut.

Statistická analýza

Šířka vláken byla naměřena pomocí programu ImageJ a statisticky vyhodnocena pomocí dvouvýběrového t-testu rovnosti středních hodnot dvou základních souborů s nulovou hypotézou $H_0: S_1^2 = S_2^2$. V každém vzorku byla naměřena šířka 100 vláken a pomocí ná-

stroje Analýza dat v excelu byl proveden dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

K výpočtům byly použity následující vzorce:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$S^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2$$

$$S = \sqrt{S^2}$$

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$R = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_p} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$W_\alpha : |R| > t_\alpha (n_1 + n_2 - 2)$$

kde n je počet naměřených hodnot, S^2 je rozptyl, S je směrodatná odchylka, R je testovací statistika, W_α je kritický obor testu, t_α je kritická hodnota Studentova t-rozdělení [2] (pro 100 měření a hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ je $t_{0,05}(198) = 1,985$).

Izolace fibrinogenu

Fibrinogen byl z plazmy izolován precipitací 25% saturovaným síranem amonným. Po přidavku síranu amonného se fibrinogen srážel 30 minut při 4 °C, následně byl oddělen odstředováním. Peleta byla dvakrát promyta 25% síranem amonným a odstředěna. Izolovaný fibrinogen byl rozpuštěn v TRIS pufru pH 7,4 a šokově zmražen.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS PAGE)

SDS PAGE byla provedena v uspořádání podle Laemliho [3] v redukcujícím i neredukujícím prostředí a obarvena Coomassie Blue.

Western blotting

Gely po SDS PAGE byly ponořeny na 5 minut do blotovacího pufru. PVDF membrány byly ekvilibrovány 5 min v metanolu. Blotování probíhalo v semi-dry uspořádání. Membrány byly následně obarveny koloidním stříbrem.

Imunoblotting

Membrány byly pasivovány buď 5% roztokem mléka, nebo 5% roztokem Tweenu 20 přes noc. Následně byly membrány promyty 3 x 10 minut v roztoku 0,1% Tween 20/PBS. Reakce s primární protilátkou proti fibrinogenu probíhala 30 min a poté byly membrány promyty 3 x 10 minut v roztoku 0,1% Tween 20/PBS. Sekundární protilátka byla na membrány aplikována na 30 min a poté byla odmyta 3 x 10 minut roztokem 0,1% Tween 20/PBS. Membrány byly následně vizualizovány přídavkem substrátu pro fosfatázou značenou protilátkou.

Hmotnostní spektrometrie

In-gel digest jednotlivých řetězců fibrinogenu po SDS PAGE byl proveden podle Shevchenka et al. [4]. Před vlastním měřením byly vzorky přečištěny pomocí mikrokolonek s reverzní fází. Vzorky na MALDI-TOF byly smíchány s matricí a spotovány na desku. Po vykrystalizování matrice s peptidy byla deska umístěna do hmotnostního spektrometru Biflex IV (Bruker Daltonics, Německo) a hmotnostní spektrum bylo získáno v reflexním modu.

ELISA

Lidský fibrinogen byl imobilizován na povrch jamek mikrotitrační destičky po dobu 1 hodiny a zbývající povrch byl blokován 1% sérovým albuminem po dobu jedné hodiny. Byly přidány plazmy pacienta, popř. kontroly a jamičky byly 10krát promyty TRIS pufrům pH 7,4 po hodinové inkubaci. Kozí protilátka proti lidským IgG konjugována s alkalickou fosfatázou byla přidána do jameček a po hodinové inkubaci byl přidán 4-nitrofenylfosfát. Množství uvolněného 4-nitrofenolu bylo sledováno po 30 minutách při vlnové délce 405 nm.

Molekulární modelování

Molekulární modelování bylo provedeno s využitím softwaru Vector NTI 10 (Informax, USA), a Deepview/Swiss-PDBViewer 3.7 a dostupných rentgenostrukturalních dat pro jednotlivé oblasti fibrinogenu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Nejdůležitější fyziologickou úlohou fibrinogenu je jeho participace v hemostáze. Během poranění dochází k poškození cévního endotelia a expozici proteinových struktur, které aktivují krevní destičky a další faktory účastníci se hemostázy. Postupnou aktivací jednotlivých koagulačních faktorů dochází k tvorbě velkého množství trombinu, který katalyzuje hydrolytické štěpení fibrinogenu. Vzniká tak fibrinová síť, která se spolupodílí na zástavě krvácení a zároveň poskytuje dočasnou degradovatelnou podpůrnou matrici pro

následně prorůstání buněk. Současně s tím jsou aktivovány krevní destičky, které agregují prostřednictvím molekul fibrinogenu.

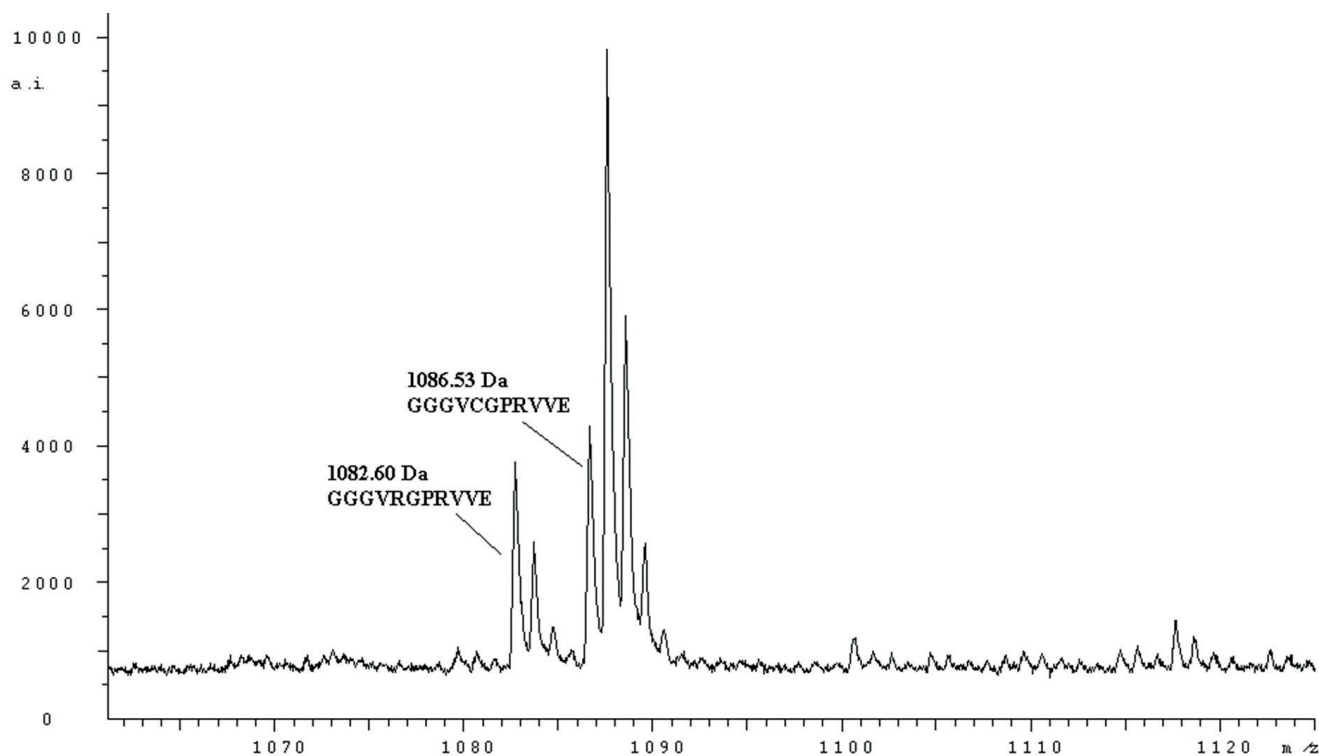
Vrozené dysfibrinogenemie

Vrozená dysfibrinogenemie je vzácné onemocnění, které se vyznačuje vrozenou abnormalitou v některém z genů kódujících jednotlivé polypeptidové řetězce fibrinogenu resultující v poruše fyziologické funkce molekuly fibrinogenu. V případě dysfibrinogenemií jsou molekuly se zaměněnými aminokyselinovými zbytky sekretovány do krevního řečiště. Dědičné záměny aminokyselinových zbytků bývají nejčastěji lokalizovány v FGA genu, který kóduje α řetězec fibrinogenu [5]. Druhým nejčastěji mutovaným genem je FGG, který kóduje γ řetězec. Nejméně mutací bylo doposud popsáno v FGB genu, který kóduje β řetězec. Nejvíce frekvencované jsou záměny aminokyselinového zbytku argininu v pozici α 16.

Záměny v α řetězci

Záměny v α řetězci jsou celosvětově nejčastější. Nejvíce zastoupená je mutace α 16 arginylu za cysteinyl, histidyl, popř. seryl. V české populaci se jedná také o nejrozšířenější molekulární příčinu vrozených dysfibrinogenemií. Záměnu α 16Arg se nám podařilo prokázat u devíti nepříbuzných rodin. Ve dvou případech se jednalo o záměnu arginylu za cysteinyl a v sedmi případech o záměnu arginylu za histidyl. Záměna za cysteinyl způsobuje konformační změnu zodpovědnou za neschopnost trombinu katalyzovat hydrolytické štěpení peptidové vazby α 16Arg- α 17Gly. Výsledkem je prodloužení lag fáze polymerace fibrinu a abnormální kinetika odštěpování fibrinopeptidů podobně jako v případě fibrinogenu Nový Jičín [6] a Ostrava II [7].

Klinická manifestace této záměny může být asymptomatická, jako v případě fibrinogenu Bergamo I [8] a Ostrava II, nebo krvácivá jako v případě fibrinogenu Kaiserslautern III [9] a Nový Jičín [6]. Hemoragické projevy jsou dány tím, že molekuly fibrinogenu s touto záměnou nejsou schopny odkrýt polymerační místo. Argininový zbytek na C-konci fibrinopeptidu A je silně konzervován a záměna α Arg16Cys je nejčastější záměnou v α řetězci. U sedmi nepříbuzných rodin se nám podařilo zjistit mutaci α Arg16His. V tomto případě jde o nejčastější mutaci v české populaci vůbec. Jedním z případů je fibrinogen Praha II [6]. Pacientem byl v tomto případě jedenatřicetiletý muž z Prahy, u něhož se v roce 1995 objevila hematurie s podezřením na glomerulonefritidu. Mutace byla prokázána také u jeho jedenáctileté dcery, která udává větší krvácení při drobných poraněních.



Obr. 1. MH⁺ spektrum peptidů fibrinogenu Nový Jičín (štěpeno endopeptidasou Glu-C) odpovídající sekvenci A α 12 – 22. Jsou zobrazeny píky normálního (1082,60 Da, GGGVRGPRVVE) a abnormálního S-karboxamidometylovaného (1086,53 Da, GGGVCGPRVVE) peptidu.

Druhým pacientem, o němž se zde zmíníme, je dvouletý asymptomatický chlapec se stejnou mutací [7]. Jeho matka udává snadnou tvorbu hematomů po úderu. Sledování kinetiky tvorby fibrinové sítě indukované jak trombinem, tak reptilázou ukázalo prodlouženou lag fázi a sníženou celkovou turbiditu u obou pacientů v porovnání se zdravou kontrolou. Průběh kinetiky odštěpování fibrinopeptidů byl podobný jako u pacientů s mutací A α 16 Arg \rightarrow Cys. Výsledné množství odštěpených fibrinopeptidů B z fibrinogenu Praha II, Praha II D1 a Ostrava I bylo signifikantně vyšší než množství odštěpených fibrinopeptidů A.

Pomocí hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF byla v plazmě pacienta s fibrinogenem Praha II prokázána přítomnost obou forem A α řetězce – normálního (peptid GGGVRGPRVVE o hmotnosti 1082,60 Da) a zaměněného (peptid GGGVHGPRVVE o hmotnosti 1063,65 Da) – obrázek 1.

Záměna A α Arg16His je celosvětově druhou nejčastější záměnou v A α řetězci. A α 16Arg se nachází na C-konci fibrinopeptidu A. Trombin štěpí peptidovou vazbu mezi arginylem 16 a glycyem 17 a štěpení této vazby je esenciální pro následnou polymeraci fibrinu. Záměna arginylu 16 histidylem sice neznemožňuje trombinu tuto vazbu štěpit, ale výrazně zpomaluje

kinetiku odštěpování fibrinopeptidu A. Klinická manifestace této záměny může být asymptomatická, jako v případě fibrinogenu Tahiti, Poissy III [10], Bern IV [11] a Ostrava I nebo krvácivá jako v případě fibrinogenu Giessen I [12] a Praha II.

Další mutací ve fibrinopeptidu A, kterou se nám podařilo nalézt, je záměna glycyly 13 za glutamyl [13]. Šestatřicetiletá pacientka s touto mutací prodělala závažné gynekologické krvácení v šestém týdnu prvního těhotenství. Dítě však úspěšně porodila. V letech 2007 a 2008 prodělala dva spontánní aborty s masivním krvácením a hematodem v děložní stěně. Podobně jako v předchozích případech byla mutací ovlivněna kinetika odštěpování fibrinopeptidů a polymerace fibrinu.

Mutace se nachází v místě, které zapadá do aktivního katalytického místa trombinu. V důsledku pozměněné konformace této části fibrinopeptidu A dochází k ovlivnění interakcí mezi fibrinopeptidem A a aktivním místem trombinu, což ovlivňuje katalytickou aktivitu trombinu a vede k poruše odštěpování fibrinopeptidu A.

Velice vzácně se objevují kombinované záměny. Nám se podařilo odhalit u jedné pacientky kombinaci dvou mutací A α Gly13Glu a A α Ser314Cys [14]. Dvaapadesátiletá pacientka trpěla krvácivými projevy

od dětství (tvorba hematomů, purpura, menoragie). Operační výkony u pacientky byly komplikovány velkým krvácením, stejně jako těhotenství. Díky masivnímu krvácení pacientka potratila první plod v třetím týdnu těhotenství. Druhé těhotenství bylo komplikováno šesti-týdenním krvácením, porod byl ale úspěšný; při třetím těhotenství již byla připravována koncentráty fibrinogenu. Její matka a babička trpěly krvácivými projevy, stejně jako obě její děti. U pacientky byla zjištěna jak porucha polymerace fibrinu, tak kinetiky odštěpování fibrinopeptidů. Navíc měla pacientka také poruchu fibrinolýzy, kde byla zjištěna prodloužená lytická fáze.

Zatímco mutace α Gly13Glu byla již dříve popsána, tak mutace α Ser314Cys byla zjištěna poprvé. Geneticky byl z rodiny pacientky vyšetřen ještě její bratr, u kterého byla prokázána pouze mutace α Gly13Glu. Bratr pacientky měl také krvácivé projevy, porušenou polymeraci fibrinu a kinetiku odštěpování fibrinopeptidů, avšak měl normální průběh fibrinolýzy. Morfologie fibrinové sítě u obou členů rodiny se také lišila. Zatímco u bratra měla síť normální parametry, síť pacientky byla rigidnější a vlákna byla širší. Kombinace těchto dvou mutací tedy měla za následek jak ovlivnění prvotní fáze polymerace, tedy odštěpení fibrinopeptidů A, tak laterální agregaci protofibril.

Další dříve nepopsanou mutací v α řetězci je záměna α Phe98Ile [15]. Tato mutace byla nalezena u dva-

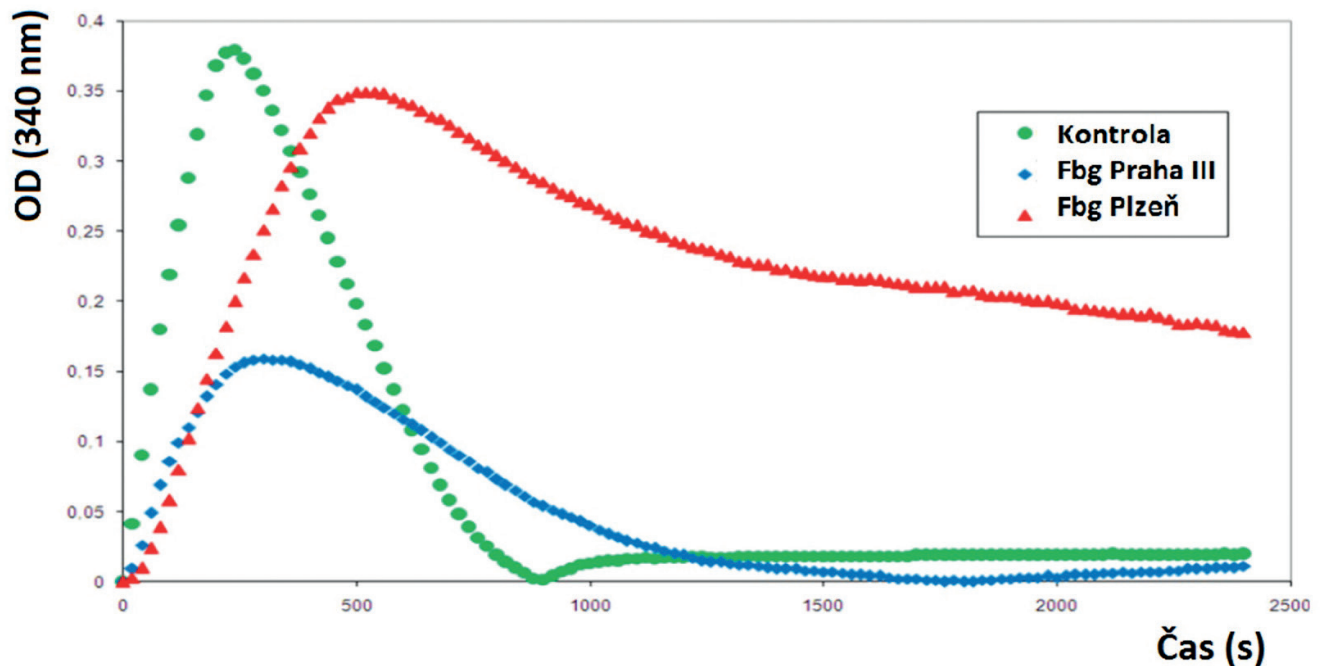
ačtyřicetileté ženy s dvěma aborty. U pacientky byla zjištěna abnormální polymerace fibrinu, fibrinolýza, morfologie fibrinové sítě a agregace krevních destiček.

Mutace se nachází v helikální oblasti *coiled-coil* regionu fibrinogenu, která je důležitá pro správnou laterální agregaci protofibril. Mutace se také nachází v RGDF sekvenci (α 95-98), která zprostředkovává interakci s krevními destičkami a endotheliálními buňkami. Pomocí agregace krevních destiček bylo zjištěno, že v přítomnosti aktivátorů TRAP, ADP a kolagen dochází vlivem mutace ke zvýšené agregaci krevních destiček. To má zřejmě za následek tvorbu mikrotrombů, které způsobily aborty u pacientky.

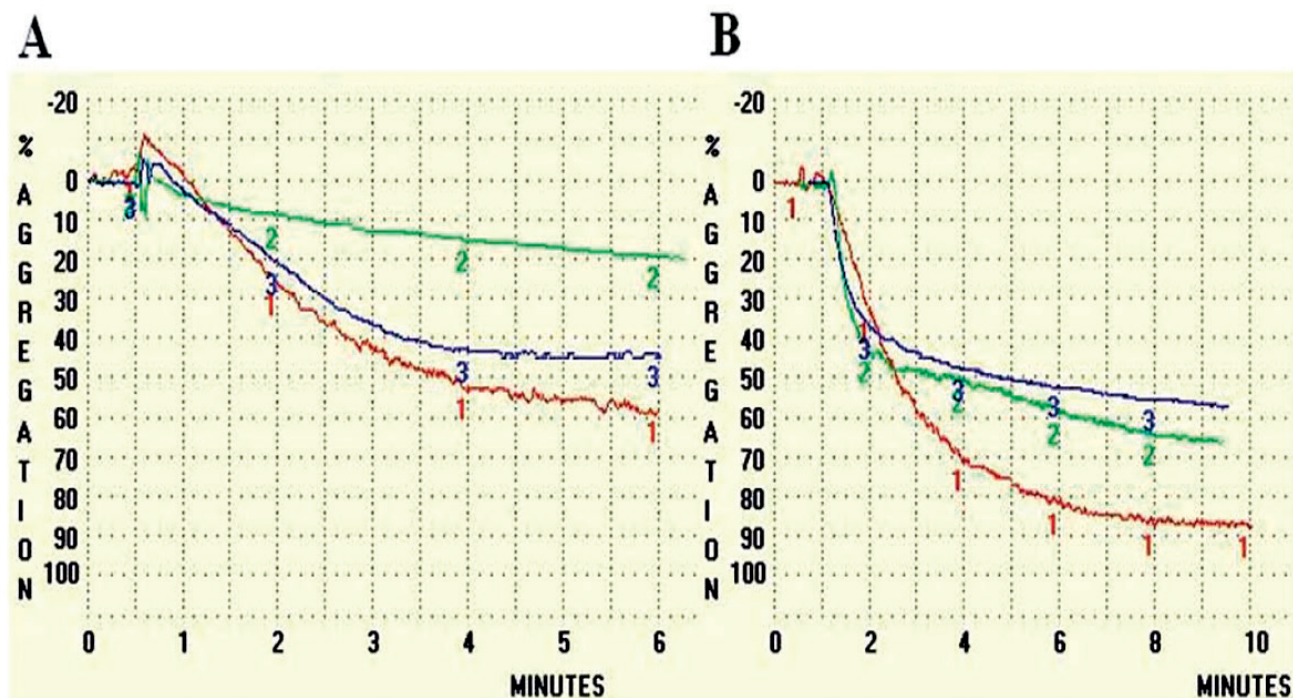
Poslední mutací v α řetězci, kterou jsme doposud popsali, je záměna α Asn106Asp [16]. Mutace byla objevena u jedenašedesátiletého pacienta, který prodělal plicní embolií, hlubokou žilní trombózu a několik tromboflebitů. U pacienta byla zjištěna abnormální morfologie fibrinové sítě, fibrinolýza (obr. 2) a agregace krevních destiček (obr. 3). Fibrinová síť pacienta byla velmi rigidní s velkým počtem volných konců.

V případě obou aktivátorů (A – 20 μ M ADP, B – 10 μ M TRAP) byla zjištěna snížená agregace v přítomnosti jak fibrinogenu Plzeň (zeleně) tak fibrinogenu Praha III (modře) v porovnání s kontrolním fibrinogenem.

To je zřejmě způsobeno změnou konformace *coiled-coil* oblasti, která vede k poruše laterální agregace



Obr. 2. Fibrinolytické křivky pacientů s trombózami
Jak u pacienta s mutací Praha III, tak i u pacienta s mutací Plzeň je patrná prodloužená lytická fáze.



Obr. 3. Agregace krevních destiček v přítomnosti různých aktivátorů

protofibril a následné poruše fibrinolýzy způsobující prodloužení lytické fáze fibrinolýzy a rozvoj trombotických komplikací u pacienta.

Záměny v B β řetězci

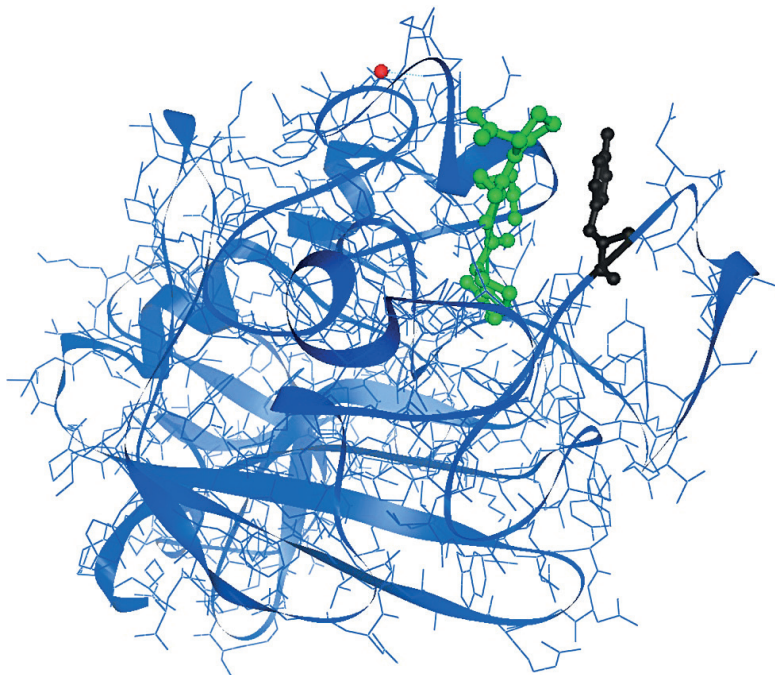
Záměny v B β řetězci jsou nejméně časté. Doposud se nám podařilo nalézt jeden případ dysfibrinogenemie způsobený záměnou v B β řetězci. Jedná se o záměnu B β Arg237Ser, kterou jsme identifikovali u pětadesátiletého pacienta, který prodělal hlubokou žilní trombózu a plicní embolií [17]. U pacienta byla porušena fibrinolýza a morfologie fibrinové sítě. Záměna arginylu za seryl zřejmě změnila konformaci části molekuly fibrinogenu, která způsobila poruchu správné tvorby protofibril spojenou s poruchou fibrinolýzy a zapříčinila trombotické komplikace u pacienta. Tato mutace nebyla dosud popsána, avšak bylo popsáno několik mutací v jejím okolí, které také způsobují trombózy. Například Morris et al. popsali mutaci B β Pro235Leu, která je zodpovědná za chronickou trombotickou plicní hypertenzi [18], či Hanss et al. popsali záměnu B β Tyr236Stop způsobující žilní trombózu [19].

Záměny v γ řetězci

V γ řetězci fibrinogenu se nám podařilo identifikovat několik mutací způsobujících dysfibrinogenemii. První z nich je nejčastější záměna v řetězci γ Arg275His [20].

Tato mutace byla objevena u pětadvacetileté pacientky se silnou menoragií. U pacientky byla mutací ovlivněna polymerace fibrinu; fibrinolýza, morfologie fibrinové sítě i odštěpování fibrinopeptidů byly normální. Dříve již bylo popsáno 11 případů záměny Arg275His, 16 případů záměny Arg275Cys, a jeden případ záměny Arg275Ser [5]. Arginyl v pozici 275 je silně konzervován. Během polymerace fibrinu dochází ke spontánní asociaci koncových D-domén různých molekul fibrinogenu. Pro tuto interakci je důležitá přítomnost γ 275Arg, neboť guanidinová skupina jedné molekuly fibrinogenu tvoří vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou γ 300Ser druhé molekuly fibrinogenu, γ 275Arg druhé molekuly fibrinogenu tvoří vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou γ Tyr280 první molekuly fibrinogenu [21]. Tyto interakce se tvoří na rozhraní dvou sousedních koncových domén protofibril, nezávisle na interakci centrální domény s koncovou [22]. Záměna Arg275His způsobuje tedy poruchu tvorby protofibril.

Dalším případem γ dysfibrinogenemie je fibrinogen Praha III [16]. Nositelkou mutace γ Tyr363Asn byla šestadvacetiletá žena z Prahy. V roce 2003 prodělala plicní embolií s akutní dysfunkcí pravé komory, od té doby je na antikoagulační terapii. V roce 2004 u ní byla zjištěna hluboká žilní trombóza v oblasti třísla vlevo. Polymerace fibrinu i fibrinolýza byly porušeny (viz obr. 2). Kinetika odštěpování fibrinopeptidů měla normální



Obr. 4. Krystalografická struktura γ C domény s GPRP peptidem navázaným v polymeračním místě „a“ γ Tyr363 (černě) je součástí polymerační prohlubně „a“ γ C domény. GPRP peptid je znázorněn zeleně. Červeně je zvýrazněn ion Ca^{2+} .

průběh, u pacientky však bylo zjištěno vyšší zastoupení fosforylovaného fibrinopeptidu A (42 %) oproti kontrole (22 %). Fosforylovaný fibrinopeptid A tvoří přibližně 25 % všech fibrinopeptidů zdravého člověka [23]. Jeho zvýšené množství bylo zjištěno u fetálního fibrinogenu [24] a po některých operacích [25]. Bylo zjištěno, že fosfoserinový zbytek na pozici $\text{A}\alpha$ 3 může moderovat interakci $\text{A}\alpha$ řetězce s trombinem, avšak nemá vliv na polymeraci fibrinu [26].

Tyrosinový zbytek γ 363 je situován v polymeračním místě „a“ γ C domény [27] a je součástí γ ohybu Tyr363-Asn365 inverzního typu (obr. 4). Polymerační prohlubeň je tvořena zbytky D297, E323, N325, Q329, D330, K338, C339, H340, H343, Y363, D364, G366 a R375 g Yetzce [27]. Tyr363 netvoří s GPRP peptidem (tetrapeptid vázající se do polymeračního místa „a“, má stejnou sekvenci jako první čtyři aminokyselinové zbytky $\text{A}\alpha$ řetězce po odštěpení FPA, které se váží do polymeračního místa „a“) vodíkovou vazbu. Záměna Tyr363 za Asn363 vytváří nové vodíkové vazby v polymeračním místě „a“, Asn363 tvoří vodíkovou vazbu s Gln329 a s arginylovým zbytkem GPRP peptidu.

Přítomnost Asn363 v polymeračním místě mění konformaci polymeračního místa, což během polymerace není ideální a má to nejspíše za následek pomalejší polymeraci a vznik menšího počtu širších fibrinových vláken. To zřejmě vede k pomalejší a nedokonalé fibrinolýze. Na druhou stranu přítomnost nové vodíkové

vazby s GPRP peptidem indikuje pevnější vazbu fibrinu. To zřejmě způsobuje vznik trombů u pacientky.

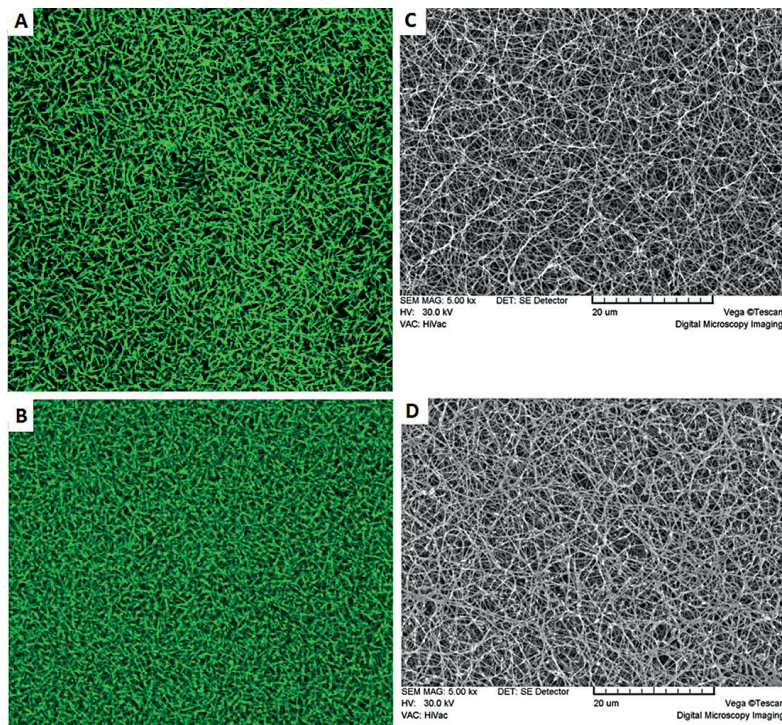
Fibrinogen Liberec je dalším případem dysfibrinogenemie, která nebyla dosud publikována [28]. V tomto případě se jedná o mutaci γ Tyr262Cys, která byla nalezena u dvaadvacetileté ženy během předoperačního vyšetření. Pacientka udávala snadnou tvorbu hematomů a silnou menoragii. U pacientky byla zjištěna porucha polymerace fibrinu. Tyrosinový zbytek 262 se nachází v β -ohybu typu IV γ 262-265 (sekvence YAMF), blízko polymeračního i vápenatého ionty vázajícího místa. Pomocí elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že fibrinová síť z fibrinogenu Liberec má signifikantně tlustší vlákna a je více porézní. Tyto parametry hrají klíčovou úlohu ve viskoelastických vlastnostech klotu. V případě fibrinogenu Bicêtre II (γ 308Asn/Lys) bylo zjištěno, že klot má větší póry a širší vlákna, což vedlo ke snížení storage modulu (odrážejí elasticitu klotu), zvýšení loss tangentu (odrážejí neelastické vlastnosti klotu) a zvýšení

Darcyho konstanty (odrážejí permeabilitu klotu) a to vedlo k trombotickým epizodám [29]. Vlákna fibrinu Bicêtre měly průměrnou šířku 357 nm, která je podobná šířce vláken fibrinu Liberec (443 ± 98 nm).

Tyrosin 262 je lokalizován uvnitř γ C domény. Hydroxylová skupina Tyr262 tvoří vodíkovou vazbu s Asp288. V případě Cys262 nebyla nalezena žádná potencionální vodíková vazba. Protože Tyr262 má aromatický postranní řetězec, může být zapojen do π - π interakcí s aromatickými aminokyselinovými zbytky v okolí. Oba typy interakcí jak vodíkové vazby, tak π - π interakce mohou hrát důležitou roli ve správné konformaci celé domény. Záměna ve fibrinogenu Liberec může alosterickým efektem indukovat konformační změny v polymeračním místě.

Posledním případem vrozené dysfibrinogenemie v γ řetězci je fibrinogen Praha IV [30]. V případě tohoto fibrinogenu byla nalezena mutace γ Ser313Gly u dvaadvacetiletého pacienta, který prodělal hlubokou žilní trombózu po běžkování a také uvádí častou tvorbu hematomů. Polymerace i fibrinolýza byly normální. Elektronovou a konfokální mikroskopií byla zjištěna abnormální morfologie fibrinové sítě, která je zřejmě zodpovědná za trombotické projevy u pacienta (obr. 5).

V místě mutace byly dříve popsány jiné záměny. Meyer et al. popsali mutaci γ 313 Ser \rightarrow Asn, která se projevovala jako hypofibrinogenemie [31]; Brennan et



Obr. 5. Struktura fibrinových sítí připravených z kontrolního fibrinogenu (A, C) a fibrinogenu Praha IV (B, D) sledovaných elektronovou mikroskopií a konfokální mikroskopií s flourescenčním barvením

evakuován epidurální hematom a pacient se stabilizoval [35]. Genetické vyšetření odhalilo u pacienta homozygotní delecí v FGA genu 6477delA, která měla za následek zkrácení α řetězce a novou C-koncovou sekvenci. S ohledem na celkové chybění fibrinogenu, které bylo prokázáno také pomocí HPLC nebylo možné provést další funkční vyšetření. Zkrácení α řetězce a nová C-koncová sekvence mají evidentně za následek poruchu v biosyntéze či sekreci fibrinogenu pacienta.

Získané dysfibrinogenemie

Získané dysfibrinogenemie se projevují jako sekundární onemocnění vyvolané primárním onemocněním. Nejčastěji se získané dysfibrinogenemie vyskytují u pacientů s poruchami funkce jater, ve kterých dochází k biosyntéze fibrinogenu a kde vlivem jaterní choroby dochází nejčastěji k poruše biosyntézy sacharidické složky fibrinogenu.

Na ÚHKT jsme vyšetřili pacienta se získanou dysfibrinogenemií v souvislosti s mnohočetným myelomem [36]. Při koagulačním vyšetření byla zjištěna porucha koagulace (tab. 1). Jaterní testy pacienta byly v normě, byla však zjištěna vysoká hladina paraproteinu. Pacient byl léčen kombinací prednisonu a melfalanu. Po půl roce léčení došlo ke snížení hladiny paraproteinu a částečné normalizaci koagulace (viz tab. 1).

Sledováním kinetiky polymerace fibrinu bylo zjištěno, že před léčbou nedocházelo k polymeraci fibrinu. Po léčbě došlo k normalizaci polymerace. Skenovací elektronová mikroskopie odhalila amorfní, houbovitou fibrinovou síť připravenou z plazmy pacienta před léčbou. Po léčbě došlo k normalizaci morfologie fibrinové sítě.

al. popsali mutaci γ 313 Ser \rightarrow Arg, která se projevovala jako hypodysfibrinogenemie [32]. Je zřejmé, že postranní řetězec má zásadní vliv na klinické projevy záměny.

Vrozené afibrinogenemie

Vrozená afibrinogenemie je vzácné onemocnění charakterizované sníženou hladinou celkového fibrinogenu pod 0,5 g/l. V České republice se nám zatím podařilo identifikovat jeden případ afibrinogenemie.

Vrozenou afibrinogenemii se nám podařilo popsat u chlapce narozeného v roce 2011 [33]. Koagulační vyšetření u tohoto chlapce ukázalo neměřitelné hladiny funkčního a celkového fibrinogenu. Od narození prodělával různě závažná krvácení. V 11 měsících života byl pro poruchy vědomí přijat na dětské oddělení, odkud byl urgentně letecky transportován na klinické oddělení, kde byl pomocí CT zjištěn rozsáhlý hematom v okcipitální oblasti se známkami nitrolební hypertenze. Neurochirurgicky mu byl

Tab. 1. Výsledky koagulačního vyšetření u získané dysfibrinogenemie

	Před léčbou	Po léčbě	Normální hodnoty
aPTT	35,2 s	34,8 s	28,8–37,2 s
PT	23,3 s	14,9 s	11,9–14,9 s
TT	64,1 s	26,1 s	13,4 - 17,4 s
RT	57,6 s	n. d.	14–18 s
Fbg (Claus)	4,35 g/l	5,40 g/l	2,0–4,2 g/l
Fbg (Imunologicky)	4,39 g/l	5,26 g/l	2,0–4,2 g/l
Paraprotein	85,75 g/l	19,48 g/l	0 g/l
Klotabilita	96 %	96 %	> 93 %

Vysvětlivky: aPTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas; PT – protrombinový čas; TT – trombinový čas; RT – reptilázový čas; Fbg (Claus) – funkční hladina fibrinogenu stanovená metodou podle Clausse; Fbg (Imunologicky) – celková hladina fibrinogenu stanovená imunologicky.

Imunoblot izolovaných řetězců fibrinogenu na PVDF membráně odhalil interakci γ řetězce fibrinogenu se sérem pacienta a následnou interakcí s protilátkou proti lidským IgG konjugovanou s alkalickou fosfatázou, která ukazuje na interakci paraproteinu s γ řetězcem fibrinogenu.

Mnohočetný myelom je zhoubné nádorové onemocnění vycházející z patologického klonu plazmocytů, charakterizované nadprodukcí monoklonálního imunoglobulinu (paraproteinu), nejčastěji třídy IgG, dále IgA, IgM eventuálně jiné (Bence-Jonesova bílkovina) [37]. Příčina onemocnění není známá, vyskytuje se spíše ve vyšším věku, častěji u mužů. Paraproteiny mohou inhibovat koagulaci buď zabráněním polymerace fibrinu, nebo interakcí s krevními destičkami [38].

U pacienta byla zjištěna získaná dysfibrinogenemie v souvislosti s produkcí monoklonálních protilátek proti γ řetězci fibrinogenu. Ty zřejmě bránily polymeraci tím, že se vážali na γ řetězec a stericky bránili interakci s další molekulou fibrinogenu. Vznikala tak amorfní síť, která nebyla schopna stabilizovat primární fibrinovou zátku. K tomuto vysvětlení inhibice polymerace fibrinu působením paraproteinu se přiklání i O’Kane et al. [39]. Ruiz-Arguelles popsal případ získané dysfibrinogenemie způsobené autoprotilátkami proti fibrinogenu s podobným mechanismem účinku na polymeraci fibrinu [40].

ZÁVĚR

Fibrinogen plní mnoho fyziologických funkcí, z nichž nejdůležitější je jeho účast v hemostáze (hemokoagulaci a interakci s krevními destičkami). Molekulární záměny ve struktuře fibrinogenu mohou vést k různě závažným poruchám jeho biosyntézy, sekrece, degradace nebo funkce.

Vyšetřili jsme 36 různých rodin s podezřením na dysfibrinogenemii či afibrinogenemii. Popsali příčiny vrozených dysfibrinogenemií u 13 pacientů. Pomocí genetických, proteomických a funkčních vyšetření bylo odhaleno osm případů dysfibrinogenemie v α řetězci, konkrétně se jedná o mutace α Arg16Cys (fbg Nový Jičín, fbg Ostrava II); α Arg16His (fbg Praha II, fbg Ostrava I); α Gly13Glu (fbg Olovnice); α Phe98Ile (fbg Vizovice); α Asn106Asp (fbg Plzeň); a kombinovanou mutací α Gly13Glu a α Ser314Cys (fbg Šumperk II). Jeden případ byl nalezen v β řetězci – β Arg237Ser (fbg Znojmo) a čtyři případy byly odhaleny v γ řetězci – γ Ser313Gly (fbg Praha IV), γ Tyr262Cys (fbg Liberec), γ Tyr363Asn (fbg Praha III) a γ Arg275His (fbg Brno). Dále jsme specifikovali jeden případ vrozené afibrinogenemie – FGA 6477delA (fbg Poděšín). V jednom případě byla zjištěna příčina získané dysfibrinogenemie

v souvislosti s produkcí autoprotilátek proti fibrinogenu u pacienta s mnohočetným myelomem.

Klinicky se nalezené mutace projevovaly různě, většina pacientů byla asymptomatická a k vyšetření byli indikováni na základě rutinního vyšetření koagulace. Čtyři pacienti prodělali trombotické komplikace, osm pacientů vykazovalo hemoragické projevy. U jedné pacientky se objevily jak hemoragické, tak trombotické komplikace.

Studium vrozených i získaných poruch fibrinogenu nám přináší mnoho užitečných dat o struktuře a funkci molekuly fibrinogenu a pomáhá zlepšovat péči o pacienty s těmito vzácnými onemocněními hemostázy. Studium abnormálních fibrinogenů se nám podařilo potvrdit některá dřívější data, především strukturně důležité části molekuly fibrinogenu potřebné pro správnou biosyntézu a sekreci fibrinogenu z hepatocytů.

Protože stále neznáme příčinu u zhruba 50 % trombotických příhod pacientů (idiopatické trombofilie), otevírá studium fibrinogenu další možná vysvětlení některých život ohrožujících komplikací. Jak bylo v této práci popsáno, našli jsme nové mutace v molekule fibrinogenu, které mohou být odpovědné za trombotické příhody u pacientů, u nichž nebyl nalezen žádný běžný trombotický marker. Běžné koagulační testy jsou primárně zaměřeny na sledování krvácivých příznaků, přičemž trombotické komplikace jsou laboratorně většinou nezachycené a mohou být v mnoha případech závažnější než komplikace hemoragické.

LITERATURA

1. Suttner J, Dyr JE, Fořtová H, Pristach J. Determination of fibrinopeptides by high performance liquid chromatography. *Biochem Clin Bohemoslov* 1989;18:17-25.
2. Pavlík J, Jaroš F, Loučka M, Veselý P. Aplikovaná statistika, Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha, 2005.
3. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
4. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained Polyacrylamide Gels. *Anal Chem* 1996;68:850-858.
5. Hanss M, Biot F. A database for human fibrinogen variants. *Ann New York Acad Sci* 2001;936:89-90.
6. Kotlín R, Chytilová M, Suttner J, et al Fibrinogen Nový Jičín and Praha II: Cases of hereditary α 16 Arg \rightarrow Cys and α 16 Arg \rightarrow His dysfibrinogenemia. *Thromb Res* 2007;121:75-84.
7. Kotlín R, Blažek B, Suttner J, Kvasnička J, Dyr JE. Dysfibrinogenemia in childhood: two cases of congenital dysfibrinogens. *Blood Coagul Fibrinolys* 2010;21:640-648.
8. Reber P, Furlan M, Beck EA, Finazzi G, Buelli M, Barbui T. Fibrinogen

ZVLÁŠTNÍ VYDÁNÍ SUPLEMENTU K 65. VÝROČÍ ÚHKT

- Bergamo I (A alpha 16Arg→Cys): susceptibility towards thrombin following aminoethylation, methylation or carboxamidomethylation of cysteine residues. *Thromb Haemost* 1985;54:390–393.
9. Loreth RM, Meyer M, Albert FW. Fibrinogen Kaiserslautern III: a new case of congenital dysfibrinogenemia with Aalpha 16 Arg→Cys substitution. *Haemostasis* 2001;31:12–17.
 10. Mathonnet F, Peltier JY, Roda L, et al. Three new cases of dysfibrinogenemia: Poissy III, Saint-Germain I and Tahiti. *Thromb Res* 2001;103:201–207.
 11. Stucki B, Zenhäusern R, Biedermann B, et al. Fibrinogens Bern IV, Bern V and Milano XI: three dysfunctional variants with amino acid substitutions in the thrombin cleavage site of the Aalpha-chain. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999;10:93–99.
 12. Alving BM, Henschen AH. Fibrinogen giessen I: a congenital homozygously expressed dysfibrinogenemia with A alpha 16 Arg→His substitution. *Am J Hematol* 1987;25:479–482.
 13. Kotlín R, Zichová K, Suttner J, et al. Congenital dysfibrinogenemia Aα Gly13Glu associated with bleeding during pregnancy. *Thromb Res* 2011;127:277–278.
 14. Kotlín R, Suttner J, Čápková I, Hrachovinová I, Urbánková M, Dyr JE. Fibrinogen Šumperk II: Dysfibrinogenemia in an individual with two coding mutations. *Am J Hematol* 2012;87:555–557.
 15. Riedelová-Reicheltovej Z, Kotlín R, Suttner J, et al. A novel natural mutation AαPhe98Ile in the fibrinogen coiled-coil affects fibrinogen function. *Thromb Haemost* 2014;111:79–87.
 16. Kotlín R, Reicheltovej Z, Malý M, et al. Two cases of congenital dysfibrinogenemia associated with thrombosis: Fibrinogen Praha III and Fibrinogen Plzen. *Thromb Haemost* 2009;102:479–486.
 17. Kotlín R, Reicheltovej Z, Suttner J, et al. Two novel fibrinogen variants in the C-terminus of the Bbeta-chain: fibrinogen Rokycany and fibrinogen Znojmo. *J Thromb Thrombolys* 2010;30:311–318.
 18. Morris TA, Marsh JJ, Chiles PG, et al. High prevalence of dysfibrinogenemia among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood* 2009;114:1929–1936.
 19. Hanss MML, Ffrench PO, Mornex JF, et al. Two novel fibrinogen variants found in patients with pulmonary embolism and their families. *J Thromb Haemost* 2003;1:1251–1257.
 20. Kotlín R, Reicheltovej Z, Sobotková A, et al. Three cases of abnormal fibrinogens: Šumperk (Bbeta His67Leu), Uničov (Bbeta Gly414Ser), and Brno (gammaArg275His). *Thromb Haemost* 2008;100:1199–1200.
 21. Spraggon G, Everse SJ, Doolittle RF. Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature* 1997;389:455–462.
 22. Olexa SA, Budzynski AZ. Evidence for four different polymerization sites involved in human fibrin formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:1374–1378.
 23. Blombäck B, Blombäck M, Edman P, Hessel B. Human fibrinopeptides. Isolation, characterization and structure. *Biochim Biophys Acta* 1966;115:371–396.
 24. Witt I, Müller H. Phosphorus and hexose content of human foetal fibrinogen. *Biochim Biophys Acta* 1970;221:402–404.
 25. Seydewitz HH, Kaiser C, Rothweiler H, Witt I. The location of a second in vivo phosphorylation site in the A alpha-chain of human fibrinogen. *Thromb Res* 1984;33:487–498.
 26. Maurer MC, Peng JL, An SS, Trosset JY, Henschen-Edman A, Scheraga HA. Structural examination of the influence of phosphorylation on the binding of fibrinopeptide A to bovine thrombin. *Biochemistry* 1998;37:5888–5902.
 27. Pratt KP, Côté HCF, Chung DW, Stenkamp RE, Davie EW. The primary fibrin polymerization pocket: three-dimensional structure of a 30-kDa C-terminal gamma chain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7176–7181.
 28. Kotlín R, Sobotková A, Suttner J, et al. A novel fibrinogen variant – Liberec: dysfibrinogenemia associated with gamma Tyr262Cys substitution. *Eur J Haematol* 2008;81:123–129.
 29. Marchi R, Loyau S, Angles-Cano E, Weisel JW. Structure and properties of clots from fibrinogen Bicêtre II (gamma 308 Asn→Lys). Increased permeability due to larger pores, thicker fibers, and decreased rigidity. *Ann New York Acad Sci* 2001;936:125–128.
 30. Kotlín R, Pastva O, Štikarová J, et al. Two novel mutations in the fibrinogen γ nodule. *Thromb Res* 2014;134:901–908.
 31. Meyer M, Bergmann F, Brennan SO. Novel fibrinogen mutation (γ 313 Ser → Asn) associated with hypofibrinogenemia in two unrelated families. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2006;17:63–67.
 32. Brennan SO, Davis RL, Chitlur M. New fibrinogen substitution (γSer313Arg) causes diminished γ chain expression and hypodysfibrinogenemia. *Thromb Haemost* 2010;103:478–479.
 33. Štikarová J, Blatný J, Kotlín R, et al. Novel homozygous fibrinogen Aa chain truncation causes severe afibrinogenemia with life threatening complications in a two-year-old boy. *Thromb Res* 2013;132:490–492.
 34. Zapletal O, Blatný J, Köhlerová S, Fiamoli V, Kotlín R, Dyr JE. Závažné spontánní intrakraniální krvácení u 11měsíčního chlapce s vrozenou afibrinogenemií. *Čes Slov Pediat* 2014;69:291–294.
 35. Kotlín R, Sobotková A, Riedel T, et al. Acquired dysfibrinogenemia secondary to multiple myeloma. *Acta Haematol* 2008;120:75–81.
 37. Vokurka M, Hugo J a kol. Velký lékařský slovník On-line. 5. Vydání. Maxdorf, 2002. Dostupné z: <<http://www.maxdorf.cz/maxdorf/vls/index.php?action=detail&id=019178&what=myelom&ctest=1>>, staženo: 11. 8. 2017.
 38. DiMinno G, Coraggio F, Cerbone AM, et al. A myeloma paraprotein with specificity for platelet glycoprotein IIIa in a patient with a fatal bleeding disorder. *J Clin Invest* 1986;77:157–164.
 39. O’Kane MJ, Wisdom GB, Desai ZR, Archbold GPR. Inhibition of fibrin monomer polymerisation by myeloma immunoglobulin. *J Clin Pathol* 1994;47:266–268.
 40. Ruiz-Arguelles A. Spontaneous reversal of acquired autoimmune dysfibrinogenemia probably due to an antiidiotypic antibody directed to an interspecies cross-reactive idiotype expressed on antifibrinogen antibodies. *J Clin Invest* 1988;82:958–963.

Podíl autorů na rukopisu

RK – provádění vyšetření, napsání rukopisu

EC – provádění vyšetření, revize rukopisu

JL - léčba nemocných, revize rukopisu
 JŠ - provádění vyšetření, revize rukopisu
 PO - provádění vyšetření, revize rukopisu
 JS - provádění vyšetření, revize rukopisu
 PS - léčba nemocných, revize rukopisu
 JED - revize rukopisu

Tato práce vznikla za podpory grantů Ministerstva Zdravotnictví ČR pro konceptuální rozvoj číslo 00023736, grantem GAČR P205/12/G118 a grantem ERDF OPKK CZ.2.16/3.1.00/28007.

Čestné prohlášení autorů

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

Poděkování

Rádi bychom na tomto místě poděkovali všem lékařům, kteří nám dodávají vzorky pacientů, dr. Ingrid Hrachovinové za provádění koagulačních vyšetření a dr. Tomáši Riedelovi za elektronovou mikroskopii.

doc. Mgr. Ing. Bc. Roman Kotlín, Ph.D., MHA

Oddělení biochemie
 Ústav hematologie a krevní transfuze
 U Nemocnice 1
 128 20 Praha 2
 e-mail: roman.kotlin@uhkt.cz

Prestižní akreditace JCI

- Ústav hematologie a krevní transfuze je od roku 2007 držitelem světového certifikátu kvality **Joint Commission International (JCI)**
- Nejpřísnější světová akreditace zdravotnických zařízení je udělována na tři roky, ÚHKT ji naposledy obhájil v květnu 2016
- Přísné mezinárodní standardy JCI splňují v České republice kromě ÚHKT jen dvě další zdravotnická zařízení

Joint Commission International (JCI) je nezávislá mezinárodní organizace s padesátiletou celosvětovou zkušeností akreditace zdravotnických zařízení. Hodnotí systém řízení kvality a bezpečnosti zdravotnických služeb podle mezinárodních akreditačních standardů. Tyto standardy stanoví postupy v oblasti péče o pacienty – především jde o dostupnost péče a její kontinuitu, vyšetření a léčbu pacientů, dodržování jejich práv, ale také o celoživotní vzdělávání zdravotnických pracovníků. Standardy rovněž stanovují pravidla provozu nemocnice a řízení kvality, bezpečí pacientů a zaměstnanců, ochraně informací, kvalifikaci personálu a prevenci nemocničních infekcí.

 Více na www.uhkt.cz

