

# 1. POSTGRADUÁLNÍ SEKCE 1

## HEMOFILIE A GENETIKA K SOBĚ NEROZLUČNĚ PATŘÍ

Blatný J.

FN Brno

Hemofilie je vrozené, geneticky podmíněné onemocnění. Často bývá nazývána královskou nemocí. Ne snad proto, že by jí trpěli jen vladaři, ale proto, že ji někteří z nich proslavili. Byli to zejména potomci královny Viktorie. Posledním z nich byl pak carevič Alexej. Někteří dokonce uvádí, že to byla právě nemoc mladého careviče, která zaměstnávala cara Mikuláše II natolik, že podcenil nebezpečí nastupujícího bolševismu. To se jemu i jeho rodině stalo osudným. Carevič Alexej trpěl hemofilií B.

Hemofilie je známa již z Talmudu, či Bible. V centru zájmu vědy se objevuje od 19. století. V roce 1820 název „Hemofilie“ poprvé použil Schoenlein. V roce 1893 byl u osob s hemofilií prokázán prodloužený čas srážení krve a deficit FVIII jako příčina hemofilie A byl objeven v roce 1947. O 5 let později byla objasněna příčina hemofilie B. Oba dva typy této nemoci jsou dány alterací jednoho z genů, nacházejících se na chromozomu X. Její dědičnost je tedy gonozomálně recesivní. Jedná se tím pádem o nemoc, která je vhodná ke studiu i výkladu vlastností dědičnosti a která je rovněž velmi dobrým adeptem pro genovou léčbu, jenž je dnes snad již na dohled. Léčba hemofilie ale nebyla v minulosti taková, jakou ji známe dnes.

První léčebné pokusy nebyly založeny na vědeckých poznatcích a patřilo k nim i zařikávání. Později následovala podpůrná léčba, která měla omezit vlastní krvácení, nebo jeho následky. Ani ta ale neměla dostatečný efekt. Vědeckými poznatky podložená léčba se datuje od doby objevu, že plazma koriguje prodloužený čas krvácení u osob s hemofilií, tedy od první poloviny minulého století. Ve 30. letech byla poprvé k léčbě použita plná krev, později pak plazma zdravých dárců. V roce 1964 byl objeven kryoprecipitát, který se stal první cílenou a opravdu účinnou léčbou. Následoval vývoj a masivní použití plazmatických koncentrátů krevního srážení. Tento pokrok zbrzdila celosvětová epidemie HIV v 80. letech 20. století, která právě hemofilickou komunitu zasáhla velmi podstatně. Když byly v roce 1985 klonovány geny pro FVIII a FIX otevřela se cesta k vývoji rekombinantních léčiv, která kromě léčebného efektu přinášela i vysokou bezpečnost.

V Evropě od 70. let, v ČR od konce 90. let 20. století se standardem léčby hemofilie stala tzv. profylaxe. Jedná se o opakované nitrožilní podávání koncentrátů chybějícího faktoru ve snaze udržet vyšší hladinu v plazmě a tím snížit počet a závažnost krvácení. Místo léčby vlastního krvácení je snaha mu předejít. Původní práce prof. Nilsson hovořila o potřebě udržet hladinu chybějícího faktoru nad 1 %. Princip profylaktické léčby od té doby zůstal zachován, jen se mění její vnímání a doporučení s tím spojená. Například poslední jednání EDQM (*The European Directorate for the Quality of Medicines*

& *HealthCare*) poradního orgánu Rady Evropy z roku 2020 hovoří již o minimální hladině 3–5 %. To je možno zejména díky koncentrátům faktorů s prodlouženým účinkem – tzv. EHL (*extended half life*) koncentrátům. Ty se před nedávnou dobou staly první předzvěstí přicházející (r)evoluce v léčbě hemofilie. Po desítkách let stagnace se nyní něco zásadního děje.

**Faktory s prodlouženým účinkem** – EHL koncentráty využívají různý způsob, jak ochránit vulnerabilní molekulu FVIII či FIX a prodloužit tak její poločas. Daří se to zejména u EHL FIX, kde je možné nyní lék podávat v intervalu jednoho až dvou týdnů a minimální hodnoty se bezpečně drží nad 3 %, často i násobně výše. Díky tomu, že poločas FIX není na rozdíl od FVIII ovlivněn jinou molekulou, jej lze prodloužit až 5x. U FVIII, jehož poločas je ovlivněn zejména vazbou na vWF lze poločas prodloužit cca 1,5x. V klinickém zkoušení je pak i EHL FVIII efanesoctocog alfa (BIVV001) s modifikací nejen FVIII, ale právě i vWF, který umožní prodloužit poločas faktoru podobně, jako u FIX, tedy zhruba 4x. Díky EHL je tak možno interval podávání léků prodloužit na maximálně 2x týdně a minimálně (zatím zejména u FIX) 1x za dva týdny. EHL preparáty jsou rovněž velmi dobře použitelné pro ITI (*immune tolerance induction*) tam, kde vznikl při léčbě FVIII inhibitor.

**Nefaktorová léčba (*non-factor treatment* – NFT)** – Zásadní změnou je však zavedení NFT. Prvním z takových léčiv, které je navíc již i registrováno pro klinické použití, je bi-specifická monoklonální protilátka – emicizumab. Je schopna vazbou na FIX a FX zajistit generaci trombinu i bez přítomnosti FVIII. Jeho efekt není tím pádem ani závislý na přítomnosti inhibitoru FVIII. Co je snad největší změnou je, že lék je podáván podkožně s intervalem, který lze prodloužit až na 1x za 28 dní. Podle studií řady HAVEN je redukce počtu léčených krvácení vyšší, než 90 %. To potvrzují i data z reálné praxe. Navíc se zdá, že tento lék bude účinný nejen u osob s těžkou hemofilií, ale i se střední a lehkou. Emicizumab navíc zbavil hemofilii jejího největšího postrachu v posledních desítkách let – inhibitorů.

Další z NFT je fitusiran, jedna z molekul, která nemá nahradit funkci chybějícího faktoru ale snížením inhibice krevního srážení nastolit novou rovnováhu. Nedostatečný potenciál krevního srážení tak není kompenzován jeho znovuoobnověním, ale snížením potenciálu antikoagulačního. Fitusiran – malá RNA molekula interferující s tvorbou Antitrombinu má takové ambice. Nyní probíhají klinické studie fáze 3 s tímto lékem. Původní klinický program spojený s vývojem tohoto léku cílil na snížení AT k hodnotám kolem 10 %. Poté, co v roce jeden z pacientů ve studii zemřel na následky krvácení, který bylo způsoben CNS trombózou, byl projekt pozastaven. Nové studie cílí na redukci AT na hodnoty mezi 15 a 35 %. Stále se ale jedná o hodnoty, které bychom za jiných okolností považovali za těžký deficit antitrombinu. Nyní probíhající klinické studie prokazují snížení ABR (*annual bleeding rate*) u osob s hemofilií A či B až o 90 % ve srovnání s léčbou OD (*on-demand*) u osob s těžkou formou nemoci s nebo bez inhibitorů.

Concizumab je posledním z nejčastěji citované trojice podkožně podávané NFT. Jedná se o protilátku proti TFPI. I zde je snahou nastolit novou rovnováhu snížením antikoagulačního efektu, v tomto případě TFPI. I tuto molekulu provázelo pozastavení klinických studií fáze 3 pro tromboembolické příhody, které však v tomto případě nebyly fatální.

**Genová léčba** – Genová léčba hemofilie spočívá nejčastěji v transfekci daného genu pomocí virového vektoru, nejčastěji AAV (*adeno-associated virus*). Slibnější je v této fázi zejména genová léčba hemofilie B

V současné době proběhly studie fáze 1 a 2 s různými vektory a s různými genovými konstrukty. Některé používají běžné geny pro daný faktor, některé – např. studie B-AMAZE – gen exprimující faktor FIX se zvýšenou aktivitou (*gain-of-function*), tzv. „Padua“ variantu. To umožňuje dosáhnout s relativně nízkou náloží vektoru uspokojivé a dlouhodobě (2–3 roky) udržitelné hladiny FIX. Jiná, ale podobně koncipovaná studie potvrzuje hladiny FIX v době až 5 let od podání vektoru. Probíhají i klinické studie fáze 3.

Pokud se týká hemofilie A, je konstrukce vektoru díky velikosti genu FVIII složitější, nicméně i zde je efekt léčby u některých pacientů dlouhodobý. Problematický je nicméně fakt, že exprese dotčeného faktoru je u různých jednotlivců rozdílná a není predikovatelná. I tak je nicméně povzbudivé, že i u genové léčby hemofilie A je exprese faktoru patrná minimálně v horizontu několika let. Problémem genové léčby je zatím stále nutnost steroidní léčby pro elevaci jaterních testů u nemalé části pacientů. Není předem jasné, který pacient na léčbu zareaguje a jak. Podání genové léčby (např. formou klinické studie) může pacienta vyřadit z možnosti podání jiné genové léčby v budoucnosti.

Hemofilie je onemocněním, na němž lze sledovat rozvoj genetiky. Genetika umožnila poznat jeho patofyziologii. Genetika umožnila vyvinout bezpečnou substituční léčbu. Díky genetice jsou zkoumány a realizovány některé z možností nefaktorové léčby. A bude to právě genová léčba, která snad v budoucnu toto onemocnění vyřeší zcela. Hemofilie a genetika tedy patří nerozlučně k sobě.

## TROMBOFILIE

Penka M., Matýšková M.

FN Brno

Poruchy hemostázy můžeme dle typu postižení dělit na krvácivé stavy a stavy se zvýšeným rizikem trombózy, tedy trombofilie. Vrozené krvácivé stavy jsou vzácné, vrozené lehké trombofilie poměrně časté (faktor V Leiden, mutace protrombinu G20210A), většinou ale nemusí být doprovázeny klinickými projevy. Závažné trombofilie (defekt antitrombinu, proteinu C či S, homozygotní defekty nebo kombinace) jsou vzácné. Významně častější jsou získané poruchy, které provázejí celou řadu chorob.

Trombofilie jsou vrozeným nebo získaným defektem hemostázy, který je s největší pravděpodobností příčinou zvýšeného sklonu k trombóze. O klinické trombofilii mluvíme, pokud se trombóza

projeví v mladším věku (žilní před 40.–45. rokem věku, tepenná před 35. rokem věku, vč. trombóza u novorozence), zejména tzv. idiopatická trombóza, pokud je trombóza v atypické lokalizaci, migrující, při mnohočetné lokalizaci, recidivách, pokud jsou kombinovány tepenné i žilní. Dále v případě významně pozitivní rodinné anamnézy (projevy u nejbližších příbuzných). U žen při opakovaných ztrátách plodu (tři a více následných samovolných potratů před 10. týdnem gestace, jedno a více úmrtí morfologicky normálního plodu po 10. týdnu gestace), příp. u komplikací těhotenství. Tato klinická definice nás může upozornit na jedince, u kterých je vhodné zvážit vyšetření laboratorních rizikových faktorů.

Trombóza jako symptom je závažnou komplikací mnoha klinických stavů, nevzniká ale v důsledku vlivu jednoho rizikového faktoru. Její patogeneze je vždy komplexní, multifaktoriální.

Žilní tromboembolismus (*venous thromboembolism* – VTE) je třetí nejčastější onemocnění cévního systému a nejčastější příčina smrti (0,5 milionu/rok v EU). Pojem VTE pokrývá široké spektrum od asymptomatických trombóz lýtkových po klinicky významné hluboké žilní trombózy (*deep vein thrombosis* – DVT) vč. plicní embolie (*embolie pulmonaire* – EP). Incidence trombózy závisí na rase, a u různých ras je také rozdílný výskyt především vrozených rizikových faktorů. Riziko recidivy trombózy je asi o 60 % vyšší u mužů než u žen; riziko je vyšší 6–12 měsíců po ukončení antitrombotické léčby bez ohledu na její trvání. Je známá celá řada faktorů, které se u jedinců s trombózou vyskytují častěji.

Poněkud překvapující je, že i přes narůstající poznatky o rizicích trombózy a tím i lepší možnosti prevence/profylaxe incidence TEN neklesá.

Rizikové faktory pro tepenné a žilní tromboembolické stavy jsou rozdílné. Pro VTE jsou to především infekční choroby a sepe, nádorová onemocnění, chirurgické zákroky, těhotenství, užívání HAK. Pro tepenné především kouření, hypertenze, diabetes, metabolický syndrom, a hyperlipidemie. Epidemiologické studie z posledního desetiletí však ukazují, že řada rizikových faktorů může být společná – např. věk, metabolický syndrom.

Pokud se na pojem trombofilie podíváme z širšího pohledu, tj. vč. získaných faktorů, které riziko trombózy zvyšují, tak nejdůležitější, a hlavně neovlivnitelný, je věk, rasa, pohlaví, výška jedinců a krevní skupina AB0 systému.

Celková incidence VTE se významně dle pohlaví neliší, pokud se ale porovnává výskyt v jednotlivých věkových skupinách, ukazuje se, že rozdíly jsou významné. Trombóza je častější u žen do věku cca 60 let (za důvod se považuje těhotenství a užívání hormonální kontracepce – HAK), poté je však častější u mužů. Riziko recidivy trombózy je asi o 60% vyšší u mužů než u žen. Příčina není jasná, zvažuje se vliv výšky u mužů, nebo např. vliv genetických polymorfismů vázaných na X či Y chromozom. F9 Malmö (rs6048 A>G) je jeden z polymorfismů, který je asociován se zvýšeným rizikem DVT. Mechanismus působení však dosud není objasněn

Incidence trombózy také závisí na rase. Nejvyšší je u černé rasy, a to asi o 30–60 % vyšší v porovnání s bílou rasou. Tento vyšší výskyt je ve všech věkových skupinách, bez ohledu na pohlaví, je i vyšší incidence VTE v souvislosti s těhotenstvím. Obdobně je u černé rasy

i vyšší frekvence plicní embolie vč. tzv. idiopatické. Smrtné plicní embolie se u nehospitalizovaných pacientů černé rasy vyskytují v mladším věku oproti bílé populaci (v průměru o 9 let), podobně jako u Hispánců. Nejnižší výskyt VTE je u asijské populace.

Vyšší incidence VTE u černé rasy není dosud objasněna – FVL, PT20210A se nalézají výjimečně, častěji se ale vyskytuje zvýšená hladina FVIII a VWF, a to i přes vyšší výskyt krevní skupiny 0 a je také popsána nižší hladina proteinu C.

**Krevní skupina** – Krevní skupina v AB0 systému je opomíjeným rizikovým faktorem. V roce 1969 zjistili Jick et al. nižší výskyt KS 0 ve skupině osob s antikoagulační léčbou. Toto vedlo k další studii se závěrem, že ve skupině jedinců s trombozou je krevní skupina 0 zastoupena méně, než je v dané populaci. Tato anomálie je zřetelnější, pokud se tromboza vyvinula u žen při podávání HAK nebo v souvislosti s těhotenstvím. Hlavně u žen s trombozou při HAK a v graviditě je výrazně nižší zastoupení krevní skupiny 0 oproti A, lépe oproti jiné krevní skupině než 0 (ne-0). Obecně se udává, že osoby se skupinou A, B či AB (ne-0) mají cca 2x vyšší riziko trombozy oproti osobám s krevní skupinou 0. Tento vliv je pozorován i u tepenných trombóz. Vrozené trombofilie vliv krevní skupiny dále zvyšují. Příčina není zcela jasná. Je známo, že osoby s krevní skupinou 0 mají v průměru o 25 % nižší hladinu faktoru VIII a von Willebrandova faktoru. Rozdíl se zvyrazňuje, pokud se nepoužívá dělení pouze dle fenotypu (tj. A, B, AB a 0), ale podle genotypu (tj. AA, AH, ...). Antigeny A, B a H jsou exprimovány na povrchu mnoha buněk, nejen červených krvinek, ale i trombocytů, endotelu a např. i na molekule VWF. Předpokládá se, že se vyskytují v blízkosti vazebného místa pro ADAMTS13 (enzym štěpící VWF) na A2 doméně. A ukazuje se, že antigeny A a B snižují schopnost VWF vázat ADAMTS13, a tím zpomalují jeho štěpení, na rozdíl od antigenu H (fenotypicky krevní skupina 0). Zvýšené riziko ne-0 krevní skupiny však přetrvává i po korekci FVIII a VWF a je zřejmě závislé na antigenu 0(H).

**Faktor V Leiden** – Pokud zůstaneme u neovlivnitelných faktorů, je nutné sem zařadit i vrozené mutace/polymorfismy. Jako genetické rizikové faktory především žilní trombozy (VT) jsou uznávány faktor V Leiden (FVL), protrombin (PT) G20210A, defekt antitrombinu (AT), proteinu C či S (PC, PS), krevní skupina AB0 systému, a vzácná dysfibrinogenémie.

V Evropě patří mezi nejčastější rizikový faktor tzv. rezistence na aktivovaný protein C (APCR) v důsledku polymorfismu faktoru V – FVL. Prevalence je udávána 3–8 % v populaci, v ČR 4,5 až cca 7 %. Výskyt FVL u etnik mimo bílou rasu je vzácný. Bodová mutace v místě rychlého štěpení faktoru Va (Arg506Gln – R506Q; G1691A) vede k delšímu setrvání FVa v plazmě, a tím i většímu množství generovaného trombinu. Tento polymorfismus také ovlivňuje funkci FV jako kofaktoru aktivovaného proteinu C při štěpení FVIIIa, což opět zvyšuje generaci trombinu, a tím pokračování krevního srážení.

FVL je balanční, resp. adaptační polymorfismus s některými výhodami pro své nositele, např. nižší krevní ztráty, bylo popsáno i menší riziko mozkových krvácení.

Klinicky se defekt projevuje většinou distální žilní trombozou (hlavně hlubokou, ale je popsána i povrchová), která se

objeví v zátěžových (rizikových) situacích. Riziko trombozy se u heterozygotní formy zvyšuje cca 3–8x, u homozygotní cca 20–50x. FVL není rizikový faktor pro EP. Riziko recidivy trombozy není zvýšené nebo pouze mírně. FVL nezvyšuje významně riziko tepenných trombóz s výjimkou mladých žen kuřáček.

Řada prací upozornila na to, že APCR (vrozená nebo získaná) sama o sobě, tj. bez leidského polymorfismu, riziko trombozy také zvyšuje.

Se získanou APCR se setkáváme např. při užívání HAK, HRT, v těhotenství, u nádorových onemocnění, v přítomnosti antifosfolipidových protilátek, zvýšené hladiny FVIII.

Haplotyp HR2 faktoru V nemá klinický význam.

**Protrombin G20210A** – U polymorfismu PT G20210A, který se nalézá cca u 6 % jedinců s VTE, se vedle 2–3x vyššího rizika DVT, zvyšuje i výskyt EP. PT20210A se také vyskytuje především u bílé rasy a výskyt klesá v Evropě od jihu k severu. PT není považován za rizikový faktor infarktu myokardu.

Přestože asociace těchto defektů s VT je jasně prokázána, ukazuje se, že většina osob s FVL či PT20210A nikdy v životě trombozu neměla a mít nebude. V rodinách bez trombozy je riziko menší. Tyto defekty neovlivňují ani mortalitu – výskyt v různých věkových skupinách je stejný.

FVL, PT20210A jsou dominantně dědičné, podobně jako většina defektů přirozených inhibitorů (antitrombin, protein C, protein S). Tyto jsou také primárně sdruženy s žilními trombozami a zvyšují riziko EP. Klinická manifestace a její tíže vždy závisí na typu defektu. Typ I je vlastní nedostatek, je proporcionálně snížena inhibiční aktivita i antigen (kvantitativní); typ II je funkční (kvalitativní) defekt – je porušena aktivita, koncentrace proteinu bývá v normě. U jednotlivých defektů se setkáváme s velkou heterogenitou projevů, typ I má většinou těžší a časnější projevy.

**Antitrombin** – Antitrombin (AT) je serpin (inhibitor serinových proteáz – SERPINC1), který inhibuje především trombin a FXa zejména v přítomnosti heparinu a jemu podobných látek. Typ II se dělí na tři podtypy, dle poruchy funkčního místa – porucha reakčního místa (RS), místa pro vazbu heparinu (HBS) a pleiotropní defekt. Klinicky se jeho defekt projevuje trombozami hlubokých žil hlavně dolních končetin a plicní embolií, ev. atypickou lokalizací trombóz (trombozy splanchniku, mozkových splavů). Riziko trombozy je udáváno různě – 8–19x, závisí na typu defektu – zejména některé typy I patří k těžkým rizikovým faktorům. Riziko trombozy je v dětství malé a významně stoupá kolem 20. roku věku. Tj. první manifestace se může objevit v období puberty, obvykle bez zjevné příčiny nebo po lehčím úraze. U žen se setkáváme s TEN v těhotenství a šestinedělí. Většina nositelů defektu AT má první projevy trombozy do 50 let věku, medián je udáván cca 28 let. I když defekt antitrombinu není řazen mezi RF tepenných trombóz, upozorňují nově někteří autoři na možnost zvýšení rizika nejen žilních trombóz, ale např. i infarktu myokardu (např. antitrombin Cambridge II (A384S).

Defekt zjistíme přímým stanovením AT, u podezření na vrozený defekt je vhodné i stanovení antigenu. Jak se ukazuje, některé variantní antitrombiny nemusí být při běžném stanovení zjistitelné.

Aktivita při použití reagentie na bázi anti-Xa aktivity i anti-IIa aktivity může dávat výsledky ve fyziologických mezích a při důvodném podezření na defekt je nezbytné molekulárně genetické vyšetření s cílem nalezení kauzální mutace. Získaný defekt AT vidáme např. u polytraumat, sepse, hepatopatie, při nefrotickém syndromu, při podávání heparinu.

Podstatou většiny defektů AT, vč. typů I, jsou bodové mutace. Přehled popsanych genetických defektů je na internetu k dispozici v „Antithrombin Mutation Database“.

**Protein C a S** – Protein C a S, K-dependentní faktory, jsou další důležité přirozené inhibitory krevního srážení. Klinicky se jejich defekt může projevit již v dětství; bývají žilní trombózy hlavně dolních končetin, ale i trombózy v netypických místech (horní končetiny), vč. žil povrchových, jsou popsány i tepenné trombózy. U homozygotních jedinců se defekt v raném dětství může projevit stavem nazvaným „purpura fulminans“ (mikrotrombózy kapilár, jejichž následkem dojde k poškození cévní stěny prokrvácením). U dospělých se i u heterozygotů můžeme setkat s kožní nekrózou po kumarinech, opět v důsledku poklesu PC, kdy dochází k mikrotrombózám cév kůže s následnou nekrózou v těchto místech. PC má kratší poločas než většina ostatních faktorů na K vitamínu závislých, a proto se v úvodu podávání dikumarinů může takto projevit jeho defekt.

Genetickým podkladem defektů PC jsou nejčastěji, jako u většiny trombofilních defektů, bodové mutace, kterých je popsáno více než 160. Klinicky je důležité, že defekty PC se v různých rodinách chovají jako autozomálně dominantní (AD) nebo recesivní (AR). AR defekty jsou poměrně časté a mají relativně nízké riziko trombózy (frekvence v populaci je udávána až 0,5 %). Dosud není vysvětleno, proč se geneticky tentýž defekt v různých rodinách projevuje různě. Pravděpodobně jde o interakce s jinými, dosud nepopsanými defekty nebo polymorfismy.

U defektů proteinu C je situace komplikována tím, že se aktivita proteinu C u některých defektů překrývá se zdravou populací (někdy se mluví o šedé zóně). V těchto případech je interpretace laboratorního nálezu bez genetického vyšetření velmi obtížná.

Laboratorní diagnostiku defektu proteinu S komplikuje skutečnost, že cca 60 % PS koluje v plazmě navázaná na C4bBP. Proto se také vrozené defekty proteinu S se dělí na klasický typ I – kvantitativní defekt, a typ II – snížení aktivity, ale hladina celkového i volného antigenu je v normě (kvalitativní) a typ III, kdy je snížení aktivity a volného proteinu S, ale normální celkový protein. Gen PS = *PROS1* se nachází na dlouhém raménku 3 chromozomu. Genetickou diagnostiku ale významně komplikuje přítomnost pseudogenu *PROS2*, který je také lokalizován na 3. chromozomu. U defektů PS je popsáno již více než 130 mutací.

Vzácné jsou vrozené dysfibrinogenémie, které mohou být doprovázeny jak krvácením, tak i trombózami. Prevalence tohoto vrozeného defektu u osob s TEN v anamnéze se odhaduje pod 1 %, prevalence trombózy mezi pacienty s dysfibrinogenémií je neznáma, odhaduje se na 10–20 %.

Smíšené rizikové faktory – Mezi rizikové faktory smíšené etiologie (tj. kombinace vrozené dispozice a získaných faktorů) jsou řazeny

zvýšené hladiny koagulačních faktorů, především FVIII, fibrinogenu a hyperhomocysteinémie.

Zvýšená hladina FVIII je nezávislý rizikový faktor trombózy i její recidivy; relativní riziko (RR) VT 3x vyšší (FVIII > 150 % x < 150 %) a 6x vyšší (FVIII > 150 % x < 100 %), navíc riziko stoupá o 10 % s vzestupem FVIII o 10 %. Hladina není závislá na reakci akutní fáze, je prokázáno minimální kolísání hladiny FVIII a rodinná závislost. FVIII zvyšuje i riziko recidivy TEN po první trombotické příhodě. V posledních letech se v rámci GWAS (*genome-wide association studies*) našlo několik polymorfismů, v jiných genech, příp. jejich kombinací, které hladinu faktoru VIII ovlivňují. Jedná se např. o kombinaci SNP rs9804128-AG (nalézá se v promotorové oblasti genu IGSF21 – immunoglobulin superfamily, member 21) a rs4784279-AG (*Iroquois homeobox gene family* – IRX3). Interakce těchto dvou polymorfismů moduluje hladinu FVIII – nejvyšší je nalézána u nositelů rs9804128-G a rs4784279-A.

Zvýšená hladina fibrinogenu je také diskutována jako rizikový faktor jak tepenných, tak žilních trombóz.

Homocystein (Hc) je metabolit metioninu, k jeho přeměně jsou jako kofaktory nezbytné vitaminy skupiny B. Příčin vrozené či získané hyperhomocysteinémie (HHc) je celá řada. Nejčastější vrozenou příčinou jsou defekty enzymů, hlavně cystathion- $\beta$ -syntetázy (CBS) a metylen-tetrahydrofolát reduktázy (MTHFR). HHc je spojována s kardiovaskulárním postižením a s hlubokými žilními trombózami, vztah mírné HHc (16–30  $\mu\text{mol/l}$ ) k žilní tromboembolické nemoci je však stále kontraverzní. Hladinu Hc významně ovlivňuje strava (vitaminy B), léky, klinický stav, věk a pohlaví. Genetické vyšetření není běžně indikováno. Zejména stále stanovené polymorfismy MTHFR C677T a A1298T nejsou rizikovými faktory TEN.

GWAS (celogenomové asociční studie) – Pátrání po vrozených rizikových faktorech trombóz je věnováno v posledních letech velké úsilí, zatím však bez významnějších výsledků.

V současnosti ani rozsáhlé tzv. celogenomové asociční studie (GWAS) zatím nevedly k identifikaci faktorů zvyšujících riziko TEN a současně natolik rozšířených, aby se vyplatilo je rutinně testovat. Je vytipováno několik „kandidátních genů“, nalezena řada polymorfismů nejrůznějších proteinů, které se v některých studiích ukazují jako sdružené s vyšším rizikem trombóz.

Řada studií přináší velmi zajímavé výsledky. Např. jsou popsány další polymorfismy AB0 genu na chromozomu 9, které zvyšují riziko trombózy nezávisle na krevní skupině. V genu *F11* je popsána řada polymorfismů a jejich haplotypy, které zřejmě také hrají roli při zvýšení rizika VTE (Germain 2011). Mezi geny, které jsou podezřelé z ovlivňování rizika TEN, jsou i takové, které, dle dosavadních znalostí, většinou s krevním srážením souvisí jen nepřímo – např. *STAB2* (stabilin 2), *CYP4V2*, *STXBP5* (syntaxin-binding protein 5 – tomosyn), *HIVEP1* (HIV type I enhancer binding protein 1), *TC2N* (tandem C2 domains nuclear protein). Nové práce se také zabývají možnými interakcemi mezi jednotlivými polymorfismy. Zatím se zdá být důležitá pouze interakce zvyšující hladiny FVIII, který je řazen mezi tzv. smíšené rizikové faktory – viz výše (Grelliche N et al. 2013, Morange PE. JTH 2011).

**Indikace vyšetření trombofilie** – Není žádná absolutní indikace vyšetření trombofilie. Většina osob s laboratorní trombofilii nebude mít v životě trombotickou příhodu.

Problematice vyšetřování vrozených trombofilních dispozic je v literatuře věnována řada publikací, část z nich se přiklání k indikaci vyšetření při splnění klinických kritérií (většinou vedle věku minimálně jedno další), zčásti je vyšetření zcela zpochybňováno. Obecně je přijímáno, že vyšetření na vrozené trombofilie není indikováno u osob nad cca 45 let. Klinický význam tohoto vyšetření je však diskutován.

Vyšetření vrozené trombofilie je vhodné v případech, že nositel bude z vyšetření profitovat, tj. pokud bude mladší 40–45 let bude možná lepší prevence v zátěžových situacích (vč. těhotenství), případně zvažování indikace HAK či substituce. Ve vyšším věku se profylaxe už běžně podává. Tj. pátrání po defektu je vhodné u osoby do cca 45 let (většinou udávané rozmezí 40–50), hlavně pokud se jedná o tzv. idiopatickou trombózu nebo o recidivující stavy, pokud jde o tepennou i VT bez známé jiné choroby v anamnéze, nebo u ženy s opakovanými potraty, zejména s pozitivní rodinnou anamnézou (RA). Před nasazením HAK či v graviditě je detekce FVL indikována pouze v případě pozitivní osobní či RA.

Nalezený defekt neovlivní postup při léčbě akutní TEN a nemá význam pro určení délky trvání antikoagulace. Délka léčby se bude řídit tíží příhody, tj. klinickým nálezem, souběžnými chorobami, komplikacemi léčby, anamnézou či přidatnými rizikovými faktory (budeme jinak postupovat při trombóze po operaci a jinak u tzv. „idiopatické“). Další profylaxe se doporučuje pouze, pokud první příhoda byla život ohrožující či idiopatická. Při zvažování ukončení léčby je třeba zohlednit nejen aktuální klinický stav, ale i aktuální laboratorní výsledky. Význam má zejména stanovení D-dimerů, které může upozornit na vyšší riziko trombózy v případě vysazení antikoagulační léčby. Laboratorní trombofilie má vyšší riziko recidivy TEN v případě vysazení antikoagulační léčby po třech měsících. V případě vysazení po jednom roce nehraje vrozená trombofilie žádnou roli v riziku recidivy.

Po jedné trombotické příhodě většinou není indikována doživotní antikoagulační léčba, ani v případě nemocného s nalezeným vrozeným rizikovým faktorem. A už vůbec není nález defektu důvodem pro nasazení této léčby u osob bez projevů TEN.

Vyšetření není doporučeno u bezpříznakových členů rodin zejména vyššího věku.

Vyšetřování trombofilie není zdůvodnitelné u zdravých jedinců do cca 15 let, je ale vhodný v rizikových situacích. V rodině by prováděné vyšetření mělo být vždy cílené, není indikováno vyšetření celého spektra trombofilních faktorů. Při zvažování indikace vyšetření bychom měli dle typu trombózy rozlišovat, které faktory vyšetřit. Tj. nevyšetřovat např. celé spektrum rizikových faktorů pro VTE u jedinců po infarktu myokardu.

Na získané trombofilní stavy je vhodné myslet u pacientů v každém věku.

Práce z poslední doby ukazují na vhodnost identifikace somatické mutace Janusovy tyrozin kinázy 2 (JAK2 V617F). Mutace se vyskytuje v různě velké frakci granulocytů periferní krve u drtivě většiny (65–

97 %) pacientů s polycytemia vera (PV), a je jí přisuzován zásadní význam v patogenezi tohoto onemocnění. Mutace se vyskytuje i u 30–57 % pacientů s esenciální trombocytémií a 35–95 % pacientů s chronickou idiopatickou myelofibrózou. Pozitivní nález může signalizovat časně stádium myeloproliferativní nemoci. U nosičů této mutace se obecně předpokládá vyšší riziko komplikací (trombózy, potraty apod.). Mutace by vždy měla být vyšetřena v případě výskytu trombóz v oblasti splachnicku či mozku.

Nádorové onemocnění, zejména maligní, je doprovázeno řadou primárních i sekundárních projevů z postižených tkání či systémů, které často zvyšují riziko trombózy.

Mezi rizikové faktory trombóz patří i antifosfolipidové protilátky, na které je třeba pamatovat zejména v případě prodloužení APTT, lehčí trombocytopenie, zejména u osob s proběhlou trombózou, příp. u žen s opakovanými potraty či komplikacemi gravidity.

V případě trombózy zcela zapomínáme na skutečnost, že mikroangiopatické hemolytické anémie, např. i paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH) mohou být jednou z příčin proběhlé trombózy. Klinická TEN je u 40 % pacientů s PNH (nepoznaná až u 60 %), u 21 % předchází TEN diagnóze PNH. Patogeneticky se jedná o nekontrolovanou aktivaci komplementu (C5b-9, C5a) s následným poškozením cévního endotelu a aktivací krevních buněk s expresí tkáňového faktoru. Poškození je na úrovni glykosylfosfatidyl inositolu (GPI), který váže k buněčné membráně řadu proteinů. Nejčastěji je mutace v genu *PIG-A*. Tento gen je lokalizován na X chromozomu, a u nemocných s PNH jde nejčastěji o mutaci jedné báze nebo delecii či inserci několika bází, u těžkých forem choroby bývají přítomny i rozsáhlejší defekty, vznikající např. chybným sestřihem nepřepisovaných částí genomu.

Incidence trombózy u nositelů vrozených defektů je velmi variabilní. Řada nikdy trombózu neměla a mít nebude, a naopak někteří mají těžké trombotické příhody již v mladém věku. Incidence trombózy u nositelů FVL z rodin, kde anamnesticky trombóza nebyla, mají nižší incidenci než jedinci s pozitivní rodinnou anamnézou.

Potvrzuje to multifaktoriální patogenezi trombózy a vzájemného ovlivňování rizikových faktorů (interakce genové, prostředí, ovlivnění věkem). Vyšetření vrozených rizikových faktorů trombózy by mělo být prováděno u mladších jedinců s významně pozitivní rodinnou anamnézou. Vyšetření není indikováno u starších osob. Ve většině případů však nález trombofilního defektu neovlivní léčebné postupy. Sama anamnéza trombotických příhod je indikací k důslednější prevenci/profylaxi v zátěžových situacích. Nikdy bychom neměli provádět vyšetření bez toho, abychom vyšetřovanému nevysvětlili důvod vyšetření. Neměli bychom provádět vyšetření pro vyšetření, kdy závěrem je pouze sdělení, že polymorfismus/ mutace je či není přítomna a neobjasníme význam daného stanovení. V indikovaných případech by měly být vyšetřeny všechny známé faktory, nejen polymorfismy FV Leiden či PT20210A. Pacientům je nezbytné poskytnout řádnou informaci o vyšetření, o rizicích, o možné prevenci/profylaxi. I u bezpříznakových „pacientů“ (jedná se o zdravé jedince) bychom si na vysvětlení vždy měli najít čas a neměli bychom je bezpředmětně vystrašit.

## Literatura

1. Eldor A. Thrombophilia, thrombosis and pregnancy. *Thromb Haemost.* 2011;86(1):104–111.
2. Ginsberg JS. Thromboembolism and pregnancy. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):620–625.
3. Haas S. Management of venous thromboembolism. *Hamostaseologie* 1998;18:18–26.
4. Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR, et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical Effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* 2001;119(1 Suppl):8S–21S. doi: 10.1378/chest.119.1\_suppl.8s.
5. Hyers TM, Agnelli G, Hull RD, et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease. *Chest* 2001; 119(1 Suppl):176S–193S. doi: 10.1378/chest.119.1\_suppl.176s.
6. Prins MH, Hutten BA, Koopman MWH, Buller HR. Long-term treatment of venous thromboembolic disease. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):892–898.
7. Rosendaal FR. Risk factors in venous thrombotic disease. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):610–619.
8. Falanga A, Marchetti M. Thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(3):348–358. doi: 10.1055/s-0034-1370794.
9. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2014;124(18):2804–2811. doi: 10.1182/blood-2014-02-522128.
10. Gavriilaki E, Brodsky RA. Complementopathies and precision medicine. *J Clin Invest.* 2020;130(5):2152–2163. doi: 10.1172/JCI136094.

## GENETICKY PODMÍNĚNÉ CYTOPENIE

Pospíšilová D.

Dětská klinika LF UP a FN Olomouc

I přes obrovské pokroky v diagnostice a léčbě hematologických maligních onemocnění, především leukémií a lymfomů, stále zůstává skupina vzácně se vyskytujících heterogenních nemocí s atypickými hematologickými projevy, u kterých vzhledem k jejich mnohdy ojedinělému výskytu teprve dnes postupně poznáváme jejich podstatu. Společným rysem této heterogenní skupiny nemocí jsou izolované a kombinované cytopenie charakterizované deficitem buněk jedné nebo více buněčných linií.

Tato skupina nemocí zahrnuje geneticky podmíněné poruchy struktury a funkce erytrocytů, leukocytů a trombocytů, ale také syndromy selhání kostní dřeně, mitochondriopatie, primární imunodeficity a jiná onemocnění. Pacientům s vzácným onemocněním nemůžeme vždy nabídnout adekvátní léčbu, protože nejsou k dispozici doporučené postupy ani léčebné protokoly. K objasnění jejich etiologie je nezřídka nutno použít řadu speciálních vyšetření vyžadujících interdisciplinární spolupráci cytogenetiků, biologů, chemiků, imuno-

logů, molekulárních a klinických genetiků, kteří musí zajistit analýzu nalezené změny genomu a vyšetření celé rodiny. Odhalení správné diagnózy pacienta, často až po dlouhém pátrání, umožňuje v mnoha případech najít adekvátní léčbu.

K příkladům vzácných a mnohdy až raritních geneticky podmíněných cytopenií diagnostikovaných v našem centru patří např.:

1. erytrocytární enzymopatie, manifestující se jako hemolytická anémie, způsobená mutací v genu pro *pyrimidine-5-nukleotidázu* (P5'N-1), která vede k depozici pyrimidin-nukleotidů v erytrocytech;
2. hypochromní mikrocytární anémie s přetížením organismu železem, která vznikla na podkladu mutace v genu kódujícím membránový přenašeč železa – divalent metal transporter 1 (DMT1) a která způsobuje poruchu transportu železa v erytroidních buňkách;
3. vzácná *dyserythropoetická anémie typu IV* s neobvykle těžkým průběhem způsobená zárodečnou mutací genu pro KLF1;
4. hypochromní mikrocytární anémie bez odpovědi na perorální podávání železa, tzv. *iron-refractory iron deficiency anemia* (IRIDA), způsobená mutací genu pro Tmprss6, která má za následek zvýšení hladiny hepcidinu vedoucí ke sníženému vstřebávání železa ve střevě;
5. chronická neutropenie s pankreatickou insuficiencí – Shwachmanův-Diamondův syndrom s rozvojem Akutní lymfoblastické leukémie;
6. chronická trombocytopenie spojená s imunodeficitem, asociovaná se zárodečnou mutací genu pro GATA2;
7. vzácné onemocnění *Pseudoxanthoma elasticum*, zapříčiněné mutací genu pro ABCC6 protein a vyznačující se kalcifikacemi a postižením cév pojivové tkáně a kůže, nalezené u pacienta s mírnou erytrocytózou a neobvykle výraznou hypertenzí (190/150 mmHg).

Úskalí diagnostiky a léčby těchto vzácných případů hematologických defektů budou detailněji prezentována v průběhu přednášky. Vzhledem k omezenému počtu případů různých typů a kombinací cytopenií je při objasnění jejich podstaty kromě interdisciplinární komunikace nezbytná i mezinárodní spolupráce s možností kooperace mezi evropskými hematologickými centry. K této spolupráci významně přispívá evropská síť center vzácných hematologických onemocnění **EuroBloodNet** zabývající se problematikou velmi vzácných onemocnění, do které od roku 2022 patří i hematologické centrum Fakultní nemocnice v Olomouci.