

## Antitrombin

Antitrombin (dříve nazývaný antitrombin III, AT) je hlavním fyziologickým koagulačním inhibítozem. Inhibuje aktivované serinové proteázy, zejména trombin, faktory Xa (FXa), IXa (FIXa), XIa (FXIa) a XIIa (FXIIa). Reguluje koagulační kroky a zamezuje trombóze. Inhibiční schopnost je potencována heparinem. V komplexu s heparinem se AT stává silným a rychle účinkujícím inhibítozem především trombinu a FXa.

### Referenční rozmezí:

plazma: 70 – 125 %

### Klinický význam:

**vrozený deficit:** vzácný (0,02 % populace)

**získaný deficit:** diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC), sepse  
hluboká žilní trombóza (DVT)  
onemocnění jater, nefrotický syndrom  
plicní embólie, mrtvice  
hypoproteinémie  
léčba heparinem  
perorální kontraceptiva  
gravidita  
novorozenci v prvních dnech života

**zvýšená hladina:** akutní hepatitida, cholestáza  
transplantace ledvin  
deficit vitamínu K  
antikoagulační léčba warfarinem

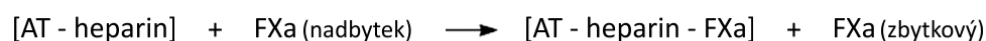
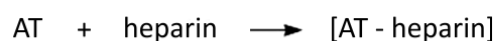
## PRAKTICKÁ ČÁST

### ÚKOL: Kvantitativní stanovení aktivity antitrombinu v plazmě chromogenní metodou

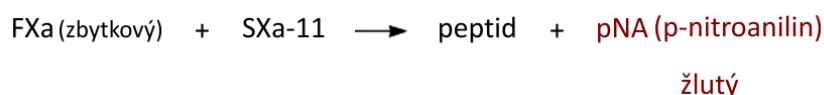
#### PRINCIP METODY

Tato dvoufázová metoda je založena na schopnosti plazmy inhibovat FXa za přítomnosti heparinu. Do zředěné plazmy obsahující AT se přidá za přítomnosti heparinu nadbytek FXa o konstantní koncentraci. Po úvodní inkubaci (**fáze 1**) se pomocí chromogenního substrátu specifického na FXa (**fáze 2**) určí zbytková aktivita FXa. Tato zbytková aktivita FXa je nepřímo úměrná koncentraci AT ve vzorku.

#### ***fáze 1***



#### ***fáze 2***



#### POMŮCKY A PŘÍSTROJE

BIOPHEN AT (LRT) kit, zkumavky, pipeta automatická, kyveta, spektrofotometr SPEKOL 1300

#### CHEMIKÁLIE

reagent 1 (R1) – Hovězí FXa (hovězí FXa, heparin, azid sodný; pH 7,85)

reagent 2 (R2) – Sxa-11 (chromogenní substrát specifický na FXa)

referenční plazma (BIOPHEN Plasma Calibrator Ref 222101)

kyselina citronová (2 %)

fyzilogický roztok (0,9 % NaCl)

krvní plazma ředěná v poměru 1:10 fyzilogickým roztokem

*Před použitím ponechejte reagenty R1 a R2 po dobu 30 minut vytemperovat na laboratorní teplotu.*

## KALIBRACE

1. Zhotovte kalibrační křivku naředěním referenční plazmy fyziologickým roztokem v poměrech uvedených v tabulce.

aktivita (% AT)	$V_{\text{referenční plazma}} (\mu\text{l})$	$V_{\text{fyziologický roztok}} (\mu\text{l})$
0	0	500
25	125	375
50	250	250
100	500	0

2. Naměřené hodnoty zapište do předem připravené tabulky.
3. Do grafu vynesete závislost hodnot absorpací získaných pro každý AT kalibrační standard na množství AT v %.

## POSTUP

### SROVNÁVACÍ VZOREK (BLANK)

1. Pipetujte do označené zkumavky dle následující tabulky.

<b>fyziologický roztok</b>	<b>500 <math>\mu\text{l}</math></b>
<b>kyselina citronová</b>	<b>500 <math>\mu\text{l}</math></b>
<i>Promíchejte a 120 sekund inkubujte při 37 °C. Poté přidejte:</i>	
<b>reagent (R2) - preinkubace při 37 °C</b>	<b>100 <math>\mu\text{l}</math></b>
<i>Promíchejte a 90 sekund inkubujte při 37 °C. Poté přidejte:</i>	
<b>reagent (R1) - preinkubace při 37 °C</b>	<b>300 <math>\mu\text{l}</math></b>
<b>vzorek (krevní plazma)</b>	<b>50 <math>\mu\text{l}</math></b>
<i>Promíchejte.</i>	

**TESTOVANÝ VZOREK**

1. Pipetujte do označené zkumavky dle následující tabulky.

<b>vzorek (krevní plazma)</b>	<b>50 µl</b>
<b>reagent (R1) - preinkubace při 37 °C</b>	<b>300 µl</b>
<i>Promíchejte a 90 sekund inkubujte při 37 °C. Poté přidejte:</i>	
<b>reagent (R2) - preinkubace při 37 °C</b>	<b>100 µl</b>
<i>Promíchejte a 120 sekund inkubujte při 37 °C.</i>	
<i>Pro zastavení reakce přidejte:</i>	
<b>kyselina citronová</b>	<b>500 µl</b>
<i>Promíchejte a poté přidejte:</i>	
<b>fyzilogický roztok</b>	<b>500 µl</b>
<i>Promíchejte a odečtěte absorbanci vzorku při 405 nm proti blanku.</i>	

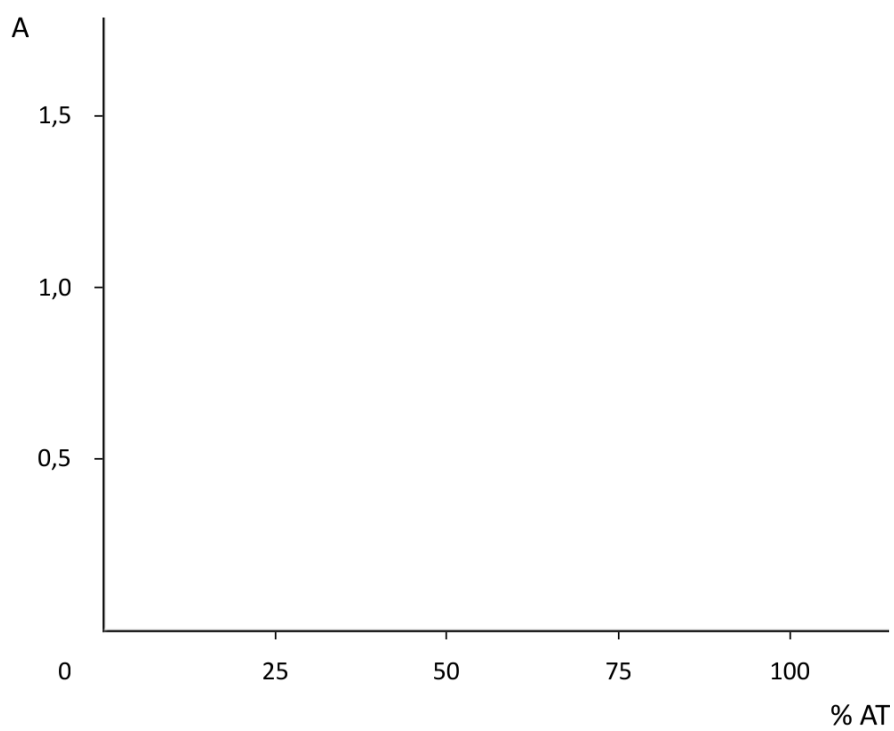
2. Aktivitu AT v testované plazmě odečtěte přímo z kalibrační křivky.

**NAMĚŘENÉ HODNOTY****KALIBRAČNÍ KŘIVKA**

<b>absorbance (A)</b>	<b>aktivita (% AT)</b>
	0
	25
	50
	100

**TESTOVANÝ VZOREK**

absorbance (A)	aktivita (% AT)

**GRAFICKÉ VYJÁDŘENÍ****VYHODNOCENÍ**