

Preeklampsie a trombin generační test

Preeclampsia and thrombin generation test

Lattová V.¹, Procházka M.¹, Procházková J.¹, Úlehlová J.², Slavík L.², Lubušký M.¹, Brychtová P.³

¹Porodnicko-gynekologická klinika LF UP a FN, Olomouc, přednosta prof. MUDr. R. Pilka, Ph.D.

²Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc, přednosta prof. MUDr. K. Indrák, Ph.D.

³Baťova nemocnice Zlín

ABSTRACT

Objective: Acquiring new information to allow prediction of the development of diseases associated with impaired coagulation. Design effective preventive measures most serious diseases (TEN) in the fields of gynecology and obstetrics. For pregnant women with preeclampsia, hypertension compared with women with normal pregnancies could lead to increased thrombin generation due to the synergistic effect of thrombotic risk factors. Based on the results and found statistically significant differences between the groups among pregnant can select for a higher risk of developing deep vein thrombosis. This risk group could then greatly benefit from more stringent follow-up and possible preventive treatment prophylactic doses of LMWH in reducing maternal and perinatal morbidity and mortality.

Design: Prospective study.

Setting: Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Olomouc.

Methods: In early pregnancy – during pregnancy standard samples (up to the end of the first trimester) patients venous blood was sampled and they completed information questionnaire. A second sampling was carried out between 24 to 28 week, the third sample and between 36th to 40th week. Obtained blood samples were subsequently processed in the coagulation laboratory Hemato-Oncology Clinic and Olomouc. The blood samples were investigated protein C and S, antithrombin, FVIII level, FII, Leiden, and plasma endothelial microparticles, and lupus anticoagulant and APC resistance standardized methodologies. Thrombin generation was determined thrombin generation test. Thrombin generation was measured fully automatically using a kit (Technothrombin TGA, Technoclone, Vienna, Austria) and analyzer Ceveron Alpha (Technoclone, Vienna, Austria) with fully automatic analysis software. As the main parameter is evaluated by the maximum thrombin generation, at the same time, however, was also detected in the total amount of thrombin and the time until the beginning of the formation of thrombin.

Results: In the period 2008–2011 were analyzed blood samples of 303 healthy pregnant women. 215 women, ie 71% were nuliparas, 60 women, ie 19.8% were primiparas, 28 women, 9.2% were secundiparas.

The average age of pregnant women was 28.6 years (\pm 3.8 years). The average maternal weight at the beginning of pregnancy was 63.6 kg (\pm 7.8 kg). Of the 303 women in 18 (6%) developed slight to moderate degree of preeclampsia or HELLP syndrome with varying severity of clinical manifestations. 20 mothers (6.6%) gave birth prematurely terminated before 37 week of pregnancy. 3 pregnancies (0.9%) were discontinued due to genetic indication for fetal birth defect. The complete study protocol (sampling in all three trimesters) thus completed 280 pregnancies. Of the three evaluated, parameter Lag time, ETP and peak we observed significant differences when comparing physiological pregnancies and pregnancies with preeclampsia (Table 3 and Figure 5-7), the statistical level of $p < 0.01$. In pregnancies with chronic hypertension, these differences were not significant. Comparison of 18 pregnancies, in which the III. trimester developed preeclampsia with other pregnant with physiological pregnancy did not show statistically significant differences in I. and II. trimester. The results suggest the activation of coagulation through the late stages of pregnancy. Results are influenced by strong clinical variability of disease. In severe and early preeclampsia this activation and significant differences begin much earlier.

Conclusion: We demonstrated significantly higher activation of thrombin generation in women with preeclampsia [10]. Changes in preeclampsia are characterized by increased generation of thrombin in plasma. This fact may explain the partial success of the clinical use of aspirin in preeclampsia. In the third trimester, during the manifestation of the disease, patients with preeclampsia have significantly higher ETP compared to patients with a normal pregnancies. Pregnant women with chronic hypertension also show a slight increase in the activation of thrombin. However, these results are not statistically significant. Examination of coagulation in the first and second trimester in women who later developed preeclampsia, showed no statistically significant differences and thus can not be used in this case as predictive, but only as a diagnostic test.

KEYWORDS

thrombin generation test – gravidity – coagulation – preeclampsia

SOUHRN

Cíl studie: Získání nových informací umožňujících predikci rozvoje chorob spojených s poruchou koagulace. U gravidních žen s preeklampsií a hypertenzí ve srovnání s ženami s normálním těhotenstvím by mohlo docházet k vyšší generaci trombinu v důsledku synergického působení jednotlivých rizikových faktorů. Tato riziková skupina by pak mohla výrazně profitovat z přísnější dispenzarizace a eventuální preventivní terapie profylaktickými dávkami LMWH, a mohlo by tak dojít ke snížení mateřské a perinatální morbidity a mortality.

Typ studie: Prospektivní studie.

Název a sídlo pracoviště: Porodnicko-gynekologická klinika LF UP a FN, Olomouc.

Metodika: Na začátku gravidity - v době standardních těhotenských odběrů (do konce I. trimestru) byla pacientkám odebrána venózní krev a vyplnily informační dotazník. Druhý odběr byl proveden v období 24.-28. týdne, třetí vzorek potom mezi 36.-40. týdnem. Získané krevní vzorky byly následně zpracovávány v koagulační laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP Olomouc. Z krevních vzorků byl vyšetřován protein C a S, antitrombin, hladina FVIII, FII, leidská mutace, plazmatické a endoteliální mikropartikule, a dále lupus antikoagulans a APC rezistence standardizovanými metodikami. Generace trombinu byla stanovena trombin generacním testem plně automaticky pomocí kitu (Technothrombin TGA, Technoclone, Vienna, Austria) a analyzátoru Ceveron Alpha (Technoclone, Vienna, Austria) s automatickým vyhodnocovacím softwarem. Jako hlavní parametr je vyhodnocováno maximum generace trombinu, současně však bylo detekováno také celkové množství trombinu a doba do počátku tvorby trombinu.

Výsledek 2 ýyuetSKÚÚíc7 ýekýý²S¹¹n,zkýý¹ ¹¹,zýkýýlýbz,zlýkýý²l¹ ýýulýkýýlýbz,zlýkkÚÚ²kýýbu¹bz,zlýkýý²S¹¹n,Ú²kÚÚul¹ ýýl²kEÚul¹ ýýl¹

podmínkách dobu od zahájení koagulační reakce do vytvoření fibrinové sraženiny. Tyto testy jsou vhodné k orientačnímu zhodnocení případného rizika krvácení nebo k monitorování příslušné antikoagulační terapie. K hodnocení trombotického stavu je užít nelze. Další širokou skupinou laboratorních vyšetření představují testy sloužící ke kvantitativnímu, popř. kvalitativnímu stanovení jednotlivých koagulačních faktorů nebo inhibitorů, složek fibrinolytického systému a přítomnosti nespecifických (antifosfolipidové protilátky) nebo specifických inhibitorů krevního srážení. Moderní molekulárně genetické testy již rutinně umožňují vyšetření vrozených trombofilních dispozic, jako jsou mutace faktoru V Leiden nebo protrombinová mutace [1, 2, 13]. K vyšetření funkce krevních destiček je k dispozici několik možností. Mezi klinicky nejužívanější patří vyšetření agregace trombocytů nebo funkční test PFA-100; měření času krvácení (krvácivost) patří mezi testy hrubě orientační. Zavedené laboratorní koagulační metody vždy postihují pouze část hemostatického systému a vůbec neodrážejí vztah plazmatických a buněčných složek. Přes nesporné pokroky v laboratorní hemostazeologii ale stále zůstává část pacientů, u kterých závažný klinický průběh nekoreluje s výsledky dostupných vyšetření. Jde především o idiopatické či recidivující tromboembolické komplikace bez laboratorního průkazu trombofilního stavu.

MĚŘENÍ GENERACE TROMBINU

Filozofie měření trombinové generace vychází z postavení trombinu v koagulačním procesu, kde představuje centrální enzym. Trombin zajišťuje aktivaci krevního srážení, zároveň ale v pokročilých fázích procesu zprostředkovává samotnou inhibici hemostatických pochodů, hraje významnou roli v mezibuněčné signalizaci, ovlivňuje fibrinolýzu a zánětlivé procesy. Uvedené funkce jsou realizovány skrze plejádu enzymatických reakcí, které vyžadují těsnou koordinaci. V řadě reakcí vystupuje trombin jako enzymatický substrát, jindy působí jako kofaktor. Jeho úloha v hemostáze je multifunkční, občas i bivalentní. Monitorování tvorby trombinu se jeví jako vhodný postup pro globální vyšetření funkce hemostázy.

Laboratorní sledování generace trombinu jednoduchým testem bylo poprvé popsáno Macfarlanem a Pitneym již v roce 1953 [11, 12]. Principem dnes používaných automatizovaných měření je in vitro monitorace vzniku trombinu v plazmě po aktivaci koagulační kaskády tkáňovým faktorem (TF). Reakce probíhá za účasti negativně nabitých fosfolipidů a Ca^{2+} . TF a koncentrace fosfolipidů se používá v různých koncentracích v závislosti na

typu používané plazmy a charakteru vyšetření (by-passová léčba u hemofiliků, trombofilní stav, antikoagulační léčba). Generovaný trombin štěpí chromogenní nebo fluorogenní substrát, který je odpovídající metodou detekován. Nevýhodou chromogenních substrátů je jejich pomalejší štěpení trombinem, nižší afinita k trombinu a potřeba blokáce vzniku fibrinu ve vyšetřované plazmě. Použití fluorogenního substrátu je vhodnější navíc i proto, že generovaný fluorogenní signál není rušen vznikající sraženinou ani přítomností trombocytů.

Výsledkem měření je křivka odrážející aktuální kapacitu systému pro generaci trombinu, která je charakterizována třemi hlavními parametry: dobou do nástupu generace trombinu (lag fáze), maximální koncentrací trombinu (peak) a plochou pod křivkou, odrážející celkové množství vzniklého trombinu (endogenní trombinový potenciál, ETP). K vyšetření lze použít plazmu chudou na destičky (PPP) nebo plazmu na destičky bohatou (PRP). Z technického hlediska během vývoje vznikla řada variant testu, používajících různé koncentrace tkáňového faktoru a fosfolipidů, přidání inhibitoru kontaktní fáze nebo trombomodulinu [4-6, 8, 15, 16].

Cílem naší práce bylo porovnání generace trombinu u žen s preeklampií a žen s fyziologickým těhotenstvím. Mělo by docházet ke zvýšení TGT vlivem synergického působení jednotlivých trombofilních rizikových faktorů.

V období let 2008-2011 byly analyzovány krevní vzorky celkem 303 zdravých těhotných. Rodičky zařazené do této skupiny měly negativní osobní a bezvýznamnou rodinnou anamnézu. Celkem 215 žen, tj. 71 %, byly primipary, 60 žen, tj. 20 %, byly sekundipary, 28 žen, tj. 9,2 %, byly terciipary. Průměrný věk těhotných žen byl 28,6 let ($\pm 3,8$ let). Průměrná hmotnost rodiček na začátku gravidity

Tab. 1 Porovnání analýzy trombin generačního testu v jednotlivých trimestrech u fyziologické gravidity

| | Lag time | 25.-75. percentil |
|---------------|----------|-------------------|
| I. trimestr | 2,9 | 2,6-3,1 |
| II. trimestr | 2,8 | 2,4-2,9 |
| III. trimestr | 2,7 | 2,3-2,8 |
| | ETP | 25.-75. percentil |
| I. trimestr | 2010 | 1980-2280 |
| II. trimestr | 2250 | 2015-2448 |
| III. trimestr | 2611 | 2168-2732 |
| | Peak | 25.-75. percentil |
| I. trimestr | 451 | 420-470 |
| II. trimestr | 522 | 499-548 |
| III. trimestr | 578 | 525-609 |

Tab. 2 Koagulační parametry v jednotlivých trimestrech

| | Faktor II | Faktor VIII | Protein C | Protein S | Antitrombin |
|---------------|-----------|-------------|-----------|-----------|-------------|
| I. trimestr | 95 | 112 | 110 | 73 | 96 |
| II. trimestr | 110 | 143 | 98 | 61 | 105 |
| III. trimestr | 136 | 178 | 102 | 49 | 102 |

byla 63,6 kg ($\pm 7,8$ kg). Průměrný váhový přírůstek činil 12,03 kg ($\pm 3,4$ kg), průměrná výška rodiček byla 168 cm ($\pm 4,6$ cm).

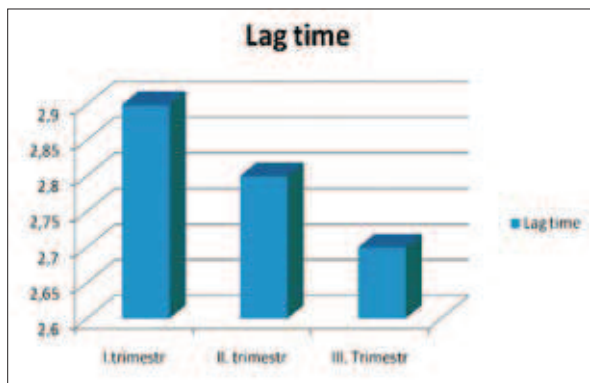
Z celkového počtu 303 žen se u 18 (6 %) vyvinul lehčí až středně těžký stupeň preeklampsie nebo HELLP syndrom s různou tíží klinické manifestace. Dvacet tři rodiček bylo zařazeno do studie ve III. trimestru při manifestaci preeklampsie. Dvacet rodiček (6,6 %) porodilo předčasně před ukončeným 37. týdnem gravidity. Tři těhotenství (0,9 %) byla ukončena z genetické indikace pro vrozenou vadu plodu. Kompletní protokol studie (odběry ve všech třech trimestrech) tedy absolvovalo 280 těhotných. Dále jsme vyšetřili v jednotlivých trimestrech 15 tě-

hotných s chronickou hypertenzí, 40 gestačních diabetiček a 30 těhotných žen s diabetem I. typu.

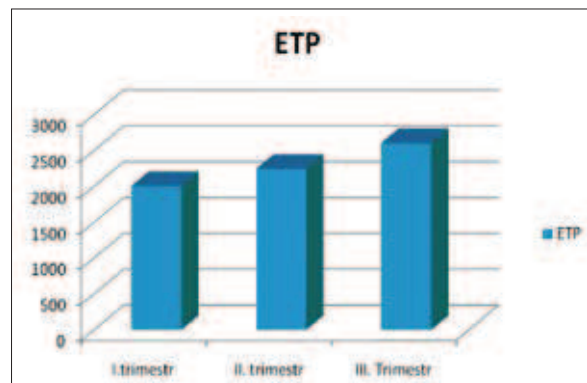
LABORATORNÍ VÝSLEDKY

shrnují tabulky 1 a 2 a grafy 1-4.

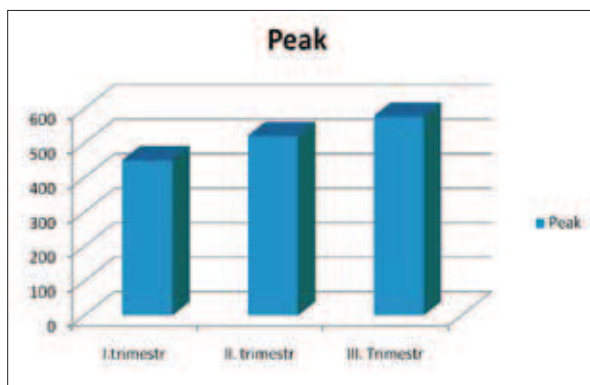
Výsledky hodnocení generace trombinu u fyziologických gravidit odpovídají údajům v literatuře. **Lag time**, tedy doba do začátku tvorby trombinu zůstává po celou dobu těhotenství stabilní a výsledky, resp. rozdíly nejsou statisticky signifikantní. **ETP** (endogenní potenciál trombinu neboli plocha pod křivkou) odpovídající množství aktivo-



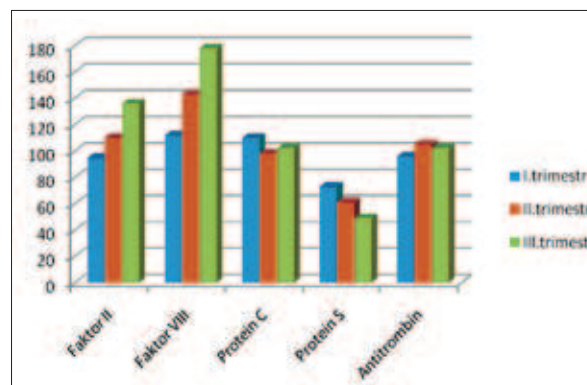
Graf 1 Lag time u fyziologické gravidity



Graf 2 ETP u fyziologické gravidity



Graf 3 Peak u fyziologické gravidity



Graf 4 Koagulační parametry v jednotlivých trimestrech

vaného trombinu v průběhu těhotenství roste. Signifikantní nárůst jsme pozorovali v rozdílech mezi I. a III. trimestrem. Podobně **peak**, neboli maximální hodnota koncentrace trombinu, vytváří signifikantní rozdíl mezi I. a III. trimestrem

ETP a peak tedy v průběhu těhotenství signifikantně narůstají, lag time se nemění.

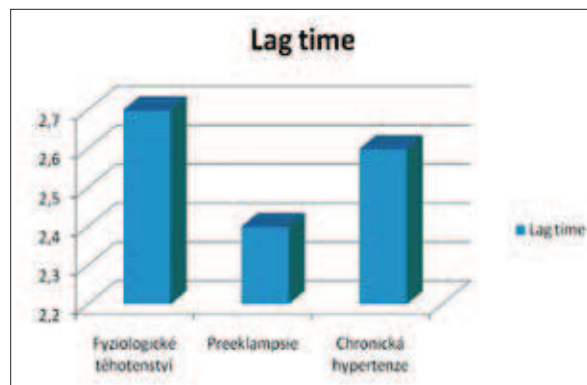
Hodnoty ostatních koagulačních parametrů jsou uvedeny v tabulce 2 a grafu 4. Pozorovali jsme signifikantní nárůst faktoru II a VIII a dále pokles volného proteinu S. U proteinu C došlo rovněž k poklesu, rozdíl však nebyl signifikantní, podobné výsledky jsme zaznamenali u antitrombinu.

LABORATORNÍ HODNOTY U RIZIKOVÝCH SKUPIN

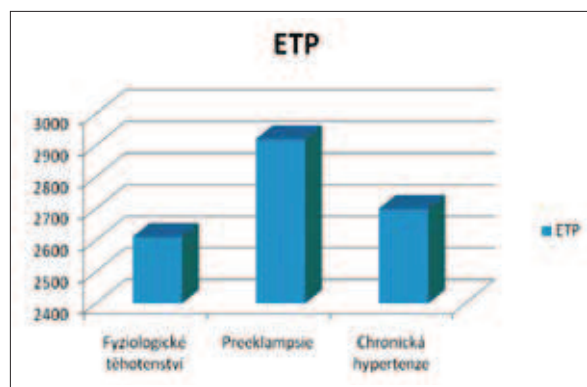
Laboratorní hodnoty u rizikových skupin pre eklampsie a chronická hypertenze ukazují tabulky 3–5 a grafy 5–8.

Tab. 3 TGT u pre eklampsie a chronické hypertenze, srovnání ve III. trimestru

| | Fyziologické těhotenství | Preeklampsie | Chronická hypertenze |
|----------|--------------------------|--------------|----------------------|
| ETP | 2611 | 2920 | 2700 |
| Lag time | 2,7 | 2,4 | 2,6 |
| Peak | 578 | 668 | 590 |



Graf 5 Lag time u pre eklampsie a chronické hypertenze, srovnání ve III. trimestru



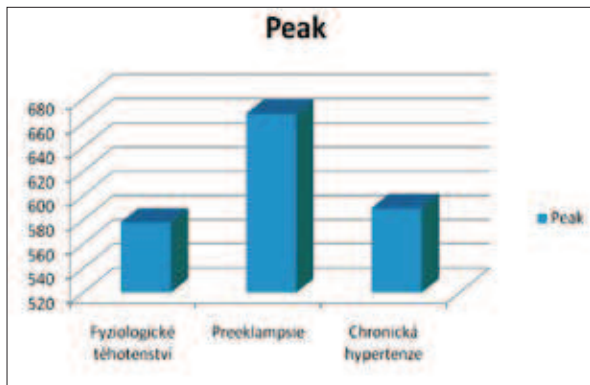
Graf 6 ETP u pre eklampsie a chronické hypertenze, srovnání ve III. trimestru

Tab. 4 Ostatní koagulační parametry u pre eklampsie a chronické hypertenze, srovnání ve III. trimestru

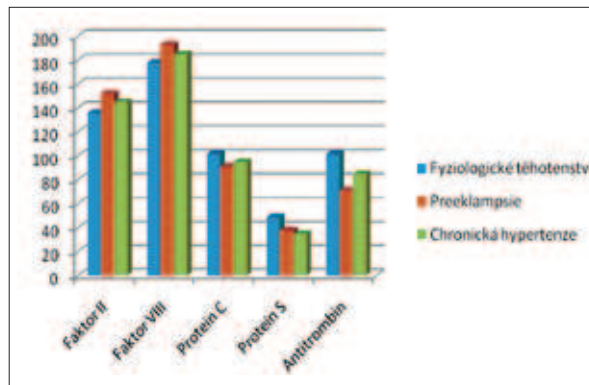
| | Faktor II | Faktor VIII | Protein C | Protein S | Antitrombin |
|--------------------------|-----------|-------------|-----------|-----------|-------------|
| Fyziologické těhotenství | 136 | 178 | 102 | 49 | 102 |
| Preeklampsie | 152 | 193 | 91 | 38 | 71 |
| Chronická hypertenze | 145 | 185 | 95 | 35 | 85 |

Tab. 5 Porovnání parametrů TGT u fyziologických gravidit a těhotenství, u nichž se ve třetím trimestru vyvinula pre eklampsie (n = 18)

| I. trimestr | | | |
|--------------|-------------------------------|---------------------|----------|
| | Fyziologická gravidita–medián | Preeklampsie–medián | p < 0,01 |
| ETP | 2010 | 2015 | NS |
| Lag time | 2,9 | 2,8 | NS |
| Peak | 451 | 462 | NS |
| II. trimestr | | | |
| | Fyziologická gravidita–medián | Preeklampsie–medián | p < 0,01 |
| ETP | 2250 | 2180 | NS |
| Lag time | 2,8 | 2,8 | NS |
| Peak | 522 | 510 | NS |



Graf 7 Peak u preeklampsie a chronické hypertenze, srovnání ve III. trimestru



Graf 8 Ostatní koagulační parametry u preeklampsie a chronické hypertenze, srovnání ve III. trimestru

Ze tří hodnocených parametrů lag time, ETP a peak jsme zaznamenali signifikantní rozdíly při porovnání fyziologických těhotenství a těhotenství s preeklampsií (tab. 3 a grafy 5-7) při statistické hladině $p < 0,01$, u těhotenství s chronickou hypertenzí však tyto rozdíly významné nebyly. Zajímavé porovnání 18 těhotných, u nichž se ve III. trimestru vyvinula preeklampsie, s ostatními těhotnými s fyziologickou graviditou neprokázalo statisticky významné rozdíly v I. a II. trimestru (tab. 5). Výsledky svědčí pro aktivaci koagulace až v pozdních fázích těhotenství. Výsledky jsou však ovlivněny výraznou klinickou variabilitou onemocnění. U těžkých, resp. časných preeklampsií tato aktivace i signifikantní rozdíly nastupují podstatně dříve. Výsledky tedy svědčí pro aktivaci koagulace až v pozdních fázích těhotenství. Tyto změny v koagulačním systému jsou signálními procesy pro ischemické procesy porušení endotelu, jež následně aktivují další patofyziologické procesy.

Příčina aktivace koagulace je komplexní. Z ostatních parametrů jsme při srovnání fyziologických těhotenství a preeklampsií ve III. trimestru zaznamenali významný vzestup faktorů II a VIII, pokles volného proteinu S i antitrombinu ($p < 0,01$). U chronické hypertenze došlo k podobným změnám, výsledky však kromě proteinu S nebyly statisticky významné.

ZÁVĚR

Preeklampsie představuje multisystémové onemocnění neznámé příčiny, které se objevuje ve druhé polovině těhotenství a je charakterizováno abnormální cévní odpovědí na patologickou invazi trofoblastů. Tato interakce s deciduálními buňkami, které exprimují tkáňový faktor (TF), vede k rychlé aktivaci zevní koagulační cesty [9, 14]. TF je také exprimován na placentárních tro-

foblastech, kde je však za fyziologických podmínek inhibován proteinem C aktivovaným vazbou na ePCR [7]. Zvýšený cévní odpor a dysfunkce endotelu jsou hlavním patofyziologickým důsledkem této abnormální placentace. Komplikace postihuje zhruba 2-7 % těhotných a je jednou z hlavních příčin mateřských úmrtí na celém světě. Ve srovnání s fyziologickým těhotenstvím dochází u pacientek s preeklampsií k další aktivaci hemostatického systému, a to včetně zvýšené generace trombinu. V naší studii jsme porovnávali výsledky trombin generálního testu u skupiny těhotných s původně fyziologickým těhotenstvím, u nichž se vyvinula preeklampsie a také výsledky těhotných preeklampsiček zařazených až ve třetím trimestru. Rovněž jsme porovnávali výsledky testu u skupiny těhotných s chronickou formou hypertenze bez přítomnosti proteinurie. Při porovnání obou skupin jsme zachytili statisticky významně vyšší počet prvoroďiček ve skupině preeklampsie a také vyšší průměrný věk rodiček u této komplikace. Ve shodě s literaturou jsme potvrdili signifikantně vyšší aktivaci generace trombinu u těhotných s preeklampsií [10]. Změny u preeklampsie jsou tedy charakterizovány zvýšenou generací trombinu v plazmě, avšak na rozdíl od fyziologického těhotenství dochází také k aktivaci trombocytů a formaci mikropartikulí [10]. Tento fakt může vysvětlit částečný klinický úspěch podávání kyseliny acetylosalicylové u preeklampsie. Lze tedy shrnout, že ve třetím trimestru v době manifestního onemocnění mají preeklampsičky signifikantně vyšší ETP v porovnání s fyziologickým těhotenstvím a normotenzí. Těhotné s chronickou hypertenzí rovněž vykazují mírný nárůst aktivace trombinu. Tyto výsledky však nejsou statisticky signifikantní. Vyšetření koagulace v prvním a druhém trimestru u žen, u nichž se později vyvinula preeklampsie, nevykázalo statisticky významné rozdíly a nelze jej

tedy využít v tomto případě jako prediktivní, ale jako pouze diagnostický test.

Práce byla podpořena grantem NT 14394-3/2013.

LITERATURA

1. Bertina, RM., Koeleman, BPC, Koester, T., et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 1994, 369, p. 64-67.
2. Dahlbäck, B. Physiological anticoagulation. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J Clin Invest*, 1994, 94, p. 923-927.
3. Duchemin, J. Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Haemost*, 2008, 99, p.767-773.
4. Hemker, HC., Beguin, S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost*, 1995, 74, p. 134-138.
5. Hemker, HC., Giesen, P., Al Dieri, R., et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003, 33, p. 4-15.
6. Chantarangkul, V., Clerici, M., Bressi, C., et al. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica*, 2003, 88, p. 547-554.
7. Isermann, B., Sood, R., Pawlinski, R., et al. The thrombomodulin-protein C system is essential for the maintenance of pregnancy. *Nat Med.*, 2003, 9(3), p. 331-337.
8. Lewis, SJ., Stephens, E., Florou, G., Macartney, NJ., et al. Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion. *Brit J Haematol*, 2007, 138, p. 775-782.
9. Lockwood, CJ., Huang, SJ., Krikun, G., et al. Decidual-hemostasis, inflammation, and angiogenesis in preeclampsia. *Semin Thromb Hemost*. 2011, 37(2), p.158-164.
10. Macey, MG., Bevan, S., Alam, L., et al. Platelet activation and endogenous thrombin potential in preeclampsia. *Thrombosis Res*, 2010, 125, p.76-81.
11. Macfarlane, R., Biggs, R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol*, 1953, 6, p. 3-8.
12. Pitney, WR., Dacie, JV. A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma; application in the investigation of haemophilia. *J Clin Pathol*, 1953, 6, p. 9-14.
13. Poort, SR., Rosendaal, FR., Reitsma, PH., Bertina, RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*, 1996, 88, p. 3698-3703.
14. Šimetka, O., Brychtová, P., Procházková, J., Procházka, M. Laboratorní změny aktivace endotelu u syndromu HELLP. *Gynekolog*, 2008, 2, s. 48-53.
15. vanVeen, JJ., Gatt, A., Cooper, PC., et al. Between-batch variation of calibrator activity can significantly influence fluorogenic measurement of thrombin generation. *J Thromb Haemost*, 2006, 4, p. 2514-2516.
18. van Veenn JJ., Gatt A., Cooper, PC., et al. Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombin generation measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between FVIII:C and thrombogram parameters. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2008, 19, p. 183-189.

MUDr. Veronika Lattová

Porodnicko-gynekologická klinika

LF UP a FN

I. P. Pavlova 6

775 20 Olomouc

e-mail: vlattova@post.cz