

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



TROMBOFILIE A TROMBOTICKÉ KOMPLIKACE U NEMOCNÝCH SE ZÁVAŽNOU SEPSÍ

MUDr. Zuzana Zenáhlíková

Praha 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Trombotické centrum a CHL ÚKDLB VFN

Autor: MUDr. Zuzana Zenáhlíková

Školitel: prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt	1
Abstract.....	2
1. Úvod.....	3
2. Hypotézy a cíle práce.....	4
3. Materiál a metodika	5
4. Výsledky	6
5. Diskuse.....	11
6. Závěr	12
7. Seznam použitých zkratk	14
8. Použitá literatura	15
Seznam publikací	18

Abstrakt

Úvod: Trombotické příhody patří mezi nejzávažnější komplikace v průběhu sepse. K profylaxi těchto komplikací je v současné době u pacientů doporučeno podávání nízkomolekulárních heparinů (LMWH). Tato profylaxe však často selhává.

Cíle studie: Jedním z cílů naší studie bylo sledovat změny hemostázy ve vztahu k zánětlivé reakci v průběhu patnácti dní závažné sepse. Dalším úkolem bylo zjistit, zda u těchto pacientů dochází ke správné profylaktické inhibici faktoru Xa (F Xa) v rozmezí 0,2–0,4 IU/ml, pokud je u nich prováděna doporučená profylaxe LMWH. Zároveň jsme zaznamenávali i dynamiku změn inhibice F Xa v průběhu celého sledovaného období. Také jsme se pokusili identifikovat faktory, které mohou ovlivnit antitrombotickou účinnost enoxaparínu.

Soubor pacientů a metody: Do studie bylo zařazeno 35 pacientů jednotky intenzivní péče (JIP) splňujících kritéria závažné sepse. Pouze 16 z nich bylo možno sledovat po celou dobu patnácti dní. Pacienti byli léčeni dle současných doporučení, včetně profylaxe LMWH, k této studii byl použit enoxaparín (40 mg/den). Sledování a odběry žilní krve pro laboratorní vyšetření proběhly 1., 2., 3., 6., 9., 12. a 15. den hospitalizace na JIP. Z odebraných vzorků byla prováděna laboratorní vyšetření markerů koagulace a zánětlivé reakce.

Výsledky: Maximální zánětlivá a prokoagulační odpověď byla nalezena prvních 3 dny sledování, dále již dochází poklesu laboratorních markerů, jsou však stále významně vyšší než normální laboratorní hodnoty. Subkutánní podávání enoxaparínu vedlo k dosažení žádaného profylaktického rozmezí ve 20 % provedených vyšetření. Účinek enoxaparínu pozitivně koreloval především s hodnotami aktivity inhibitorů koagulace proteinu C (PC) a antitrombinu (AT).

Závěr: Těžká sepsa je spojena s extrémním, zánětem indukovaným protrombotickým stavem. V současné době doporučované schéma profylaxe TEN (tromboembolické nemoci) však u některých pacientů nevede k náležité inhibici F Xa. Bylo by vhodné u kriticky nemocných pacientů se sepsí monitorovat prováděnou profylaxi s LMWH a dávkování upravit dle výsledků vyšetření inhibice F Xa.

Abstract

Introduction: Thrombotic events are among the most serious complications of sepsis. Currently, the administration of low molecular weight heparins (LMWH) is recommended in patients with severe sepsis for prophylaxis of these complications. However, this prophylaxis often fails.

Objectives of the study: One of the objectives of our study was to examine changes in haemostasis in relation to the inflammatory response during 15 days of severe sepsis. The next objective was to determine whether a prophylactic inhibition of F Xa in the range from 0.2 to 0.4 IU/mL is achieved in these patients, if they receive the recommended prophylaxis with LMWH. We also recorded the dynamics of changes in the F Xa inhibition during the entire study period. Moreover, we tried to identify the factors that may affect the antithrombotic efficacy of enoxaparin.

Patient population and methods: A total of 35 ICU patients meeting the criteria of severe sepsis were enrolled in the study. Only 16 of these patients could be followed throughout the entire 15-day period. Patients were treated according to the current guidelines, including LMWH prophylaxis (enoxaparin 40 mg sc daily). Monitoring and blood sampling was performed on days 1, 2, 3, 6, 9, 12 and 15 of hospitalization at the ICU. The samples collected were used for laboratory tests of blood coagulation markers and inflammatory reactions.

Results: Peak inflammatory and pro-coagulation response was recorded during the first 3 days of monitoring, thereafter the values of the laboratory markers began decreasing, but they are still significantly higher than normal laboratory values. Subcutaneous administration of enoxaparin led to the achievement of the desired prophylactic range in 20 % of the tests performed. The effect of enoxaparin positively correlated in particular with the level of activity of blood coagulation inhibitors, protein C (PC), and antithrombin (AT).

Conclusion: Severe sepsis is associated with an extreme, prothrombotic condition induced by inflammation. However, the currently recommended prophylaxis of TED fails to achieve adequate inhibition of F Xa in some patients. In critically ill patients with sepsis, it would be beneficial to monitor the prophylaxis with LMWH and adjust the dosage according to the results of the F Xa inhibition tests.

1. Úvod

Sepse, a zejména její těžké formy, jsou významným celospolečenským problémem. *Surviving Sepsis Campaign* (1) odhadla celosvětový počet případů sepse na 18 milionů ročně. Celková úmrtnost při sepsi je odhadována na 28,6 %, tedy 215 000 úmrtí za rok. Náklady na léčbu sepse jsou obvykle obrovské. Jedním z mnoha důvodů, proč je terapie sepse přes vysoké náklady na léčbu a ošetřování nemocných na JIP stále málo úspěšná, je fakt, že dosud nejsou známy všechny příčiny jejího vzniku a mechanismus selhání homeostatických systémů v lidském organismu, ke kterým při sepsi dochází.

Za sepsi je dnes obecně považován patologický stav způsobený nepřiměřenou a neregulovanou reakcí organismu na infekci. Hlavní roli v patogenezi sepse nehraje samotné patologické agens, ale přemrštěná imunitní odezva organismu na něj (2). I přesto, že aktivace imunitního systému je při mikrobiální invazi obecně ochranná, v přítomnosti generalizované odpovědi se výhody imunitního systému stávají neprospěšnými a vedou k tkáňovému poškození (3). Z reakcí imunitního systému a změn hemostázy jsou zatím známé informace převážně jen o těch změnách, ke kterým dochází v tzv. „časné“ fázi odpovědi organismu na sepsi. Avšak o změnách, ke kterým dochází v pozdějším období a které mohou končit zhroutilím životně důležitých systémů, včetně multiorgánové dysfunkce, je zatím známo poměrně málo.

Tromboembolické komplikace u pacientů se sepsi: Ve studiích (4-7) je popisován výskyt objektivně potvrzené TEN mezi 9,6-33 % pacientů JIP (8). V roce 2008 vypracovala skupina expertů doporučení pro vedení podpůrné terapie u pacientů se sepsi - „Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock“ (9). Guidelines obsahují i doporučení týkající se profylaxe žilní trombózy. U pacientů se závažnou sepsi má být profylaxe hluboké žilní trombózy (HŽT) zajištěna nízkomolekulárními hepariny (LMWH) nebo nefrakcionovaným heparinem (UFH) subkutánně (s.c.). Také guidelines 8. ACCP konference o antitrombotické a trombolytické terapii z roku 2008 (10) uvádějí, že u většiny pacientů JIP je vhodná profylaxe TEN. Správné zajištění profylaxe žilního tromboembolismu u pacientů se sepsi je velmi často obtížné. Výskyt TEN je i při použití doporučené profylaxe 15,5 %

(4-7, 11, 12). Sepse a septický šok jsou doprovázeny celou řadou změn v organismu, které mohou ovlivnit účinnost subkutánně podávaných nízkomolekulárních heparinů u kriticky nemocných pacientů. Absorpci léčiva po subkutánní aplikaci může snižovat například podávání vazopresorů nebo podkožní edém s poruchou perfúze periferních tkání, kam je aplikován LMWH (13, 14). Biologickou dostupost nefrakcionovaného heparinu může částečně ovlivňovat též jeho vazba na plazmatické proteiny. To již bylo prokázáno u proteinů akutní fáze orosomukoidu a alfa-1-antitrypsinu (15). Lze proto předpokládat, že k podobnému jevu může docházet částečně i u LMWH. Efekt LMWH je zprostředkovan přírodním inhibítorem koagulace antitrombinem (16). U pacientů s nízkou aktivitou AT může být díky tomu inhibice aktivovaného faktoru X (F Xa) nízkomolekulárním heparinem nedostatečná. Protože LMWH jsou převážně eliminovány ledvinami, může také renální selhání, které sepsi často doprovází, vést ke kumulaci farmaka v organismu (17, 18) a ke zvýšenému antitrombotickému efektu spojeného s rizikem krvácení.

2. Hypotézy a cíle práce

Dynamika změn hemostázy ve vztahu k zánětlivé reakci organismu v průběhu závažné sepse: Jedním z cílů studie bylo sledovat, jak se v průběhu tzv. „časné“ i „pozdní“ fáze závažné sepse mění vybrané koagulační markery a parametry zánětu

Inhibice faktoru Xa při doporučované profylaxi LMWH: Zaměřili jsme naši pozornost i měření účinnosti doporučované antitrombotické profylaxe pomocí vyšetření míry inhibice faktoru Xa. Zajímalo nás, zda dosáhne inhibice F Xa arbitrárně stanoveného rozmezí 0,2 – 0,4 IU/ml (19, 20).

Vliv vybraných parametrů na efekt subkutánně podávaného nízkomolekulárního heparinu: Sledovali jsme vzájemnou souvislost mezi účinností prováděné antitrombotické profylaxe (měřené pomocí míry inhibice F Xa) a vyšetřovanými parametry hemostázy a zánětlivé reakce. Především jsme se zaměřili na možný vliv vazby LMWH na proteiny akutní fáze (orosomukoid, alfa-1-antitrypsin), nedostatečnou aktivitu antitrombinu, hodnotu BMI (body mass index), hodnoty arteriálního tlaku krve a funkcí ledvin měřené pomocí vypočtené clearance kreatininu.

Vzájemný vztah závažnosti klinického stavu pacienta a vybraných parametrů hemostázy a zánětlivé reakce: Zajímali jsme se, do jaké míry koreluje klinický stav pacienta hodnocený skórovacími systémy (APACHE III, SAPS II a SOFA) s námi měřenými parametry hemostázy, zánětlivé reakce (proteiny akutní fáze a koncentrace interleukinů) a známek aktivace endotelu.

3. Materiál a metodika

Do studie byli zařazeni všichni pacienti přijatí na JIP I. chirurgické kliniky VFN splňující níže uvedená vstupní kritéria (kritéria diagnózy sepse (21), indikace k profylaxi TEN, věk nad 18 let). Vyloučeni byli pacienti s kontraindikací k léčbě enoxaparinem a pacienti s antikoagulační terapií v době vstupu do studie. Nemocní byli léčeni podle současných doporučení (22) a k profylaxi HŽT byl u všech pacientů použit enoxaparin (Clexane inj. sol. 0,4 ml ®, Aventis, France) v jedné s.c. dávce 40 mg/24 hod..

Laboratorní metody: Odběry krve k vyšetření proběhly 1., 2., 3., 6., 9., 12. a 15. den hospitalizace na JIP, vždy 4 hodiny (\pm 15 minut) po aplikaci enoxaparínu. Z odebraných vzorků krve byly provedeny následující vyšetření: krevní obraz, stanovení INR (international standartized ratio), aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas), fibrinogen, D-dimer, F 1+2 fragmenty, aktivita proteinu C (PC) a antitrombinu (AT), inhibice F Xa, CRP (C reaktivní protein, orosomukoid, alfa-1-gykoprotein, prealbumin, transferin, interleukin 6 (IL-6), sP-selektin, sE-selektin, sICAM (intercelular adhesive molecule 1), kreatinin.

Statistické metody: Ke statistické analýze dat a pro grafické znázornění výsledků studie byl použit program StatSoft, Inc. STATISTICA (2011) (data analysis software system), version 10 (www.statsoft.com). Byly stanoveny údaje deskriptivní statistiky. K porovnání rozdílů v čase pro normální rozložení byl použit ANOVA test s Holm-Sidak post-hoc test a pro data, jejichž rozložení normální není, Friedman ANOVA s Tukey post-hoc test. Ke zjištění vztahů mezi inhibicí faktoru Xa a vybranými proměnnými byl proveden výpočet korelačního koeficientu za použití testu vícečetné regrese (multiple regression test), kde je pacient vybrán jako jeden z faktorů. Tato metoda je doporučována (23) (24) k analýze dat, kde je prováděno opakované měření v

čase u jednoho subjektu. Při využití této metody získáváme takzvanou korelaci uvnitř subjektu. Hladina statistické významnosti (p) byla pro každý test stanovena na $\leq 0,05$.

4. Výsledky

Soubor pacientů: Ve studii bylo v průběhu r. 2007–2009 sledováno celkem 35 pacientů jednotky intenzivní péče chirurgické kliniky splňující kritéria závažné sepse. Pouze u 16 z nich (8 mužů, 8 žen; věk 35–83 let) bylo možné sledovat po celou stanovenou dobu 15 dní. Žádný pacient nespĺňoval kritéria zjevné diseminované intravaskulární koagulace podle ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) DIC (diseminovaná intravaskulární koagulace) skóre (25) v době zařazení do studie. U žádného pacienta nebyla zaznamenána heparinem indukovaná trombocytopenie ani alergická reakce na podávaný enoxaparin. U dvou pacientů byl průběh sepse komplikován krvácením, v obou případech se jednalo o chirurgický zdroj krvácení (krvácení z operační rány). Toto krvácení nevyžadovalo ukončení terapie enoxaparinem. U jednoho pacienta byla 6. den sledování prokázána CT vyšetřením ileofemorální hluboká žilní trombóza vlevo.

Dynamika změn hemostázy ve vztahu k zánětlivé reakci organismu v průběhu závažné sepse: Tabulka č. 1 a 2 shrnuje průměrné hodnoty (s uvedením směrodatné odchylky a mediánu) parametrů zánětu a IL-6 v jednotlivých dnech sledování. Výsledky statistického zhodnocení vývoje hodnot parametrů hemostázy a koncentrace cytoadhezivních molekul jsou uvedeny v tabulce č. 3 a 4.

Tabulka č. 1: Změny koncentrace proteinů akutní fáze u pacientů se závažnou sepsí v průběhu 15ti dní

		1. den	2. den	3. den	6. den	9. den	12. den	15. den	Norm. lab. Hodnoty
CRP (mg/dl)	průměr	19,87	20,19	17,82	15,90	16,83	13,44	11,50	0,20
	SD	10,13	12,10	8,84	6,76	10,10	7,67	6,59	0,18
	medián	18,50	17,55	17,40	16,20	13,60	11,00	11,35	0,20
A1A (g/l)	průměr	2,73	2,79	3,90	2,78	2,70	2,54	2,55	1,32
	SD	0,54	0,68	0,68	0,67	0,82	0,53	0,64	0,20
	medián	2,61	2,65	2,65	2,75	2,64	2,59	2,52	1,30
TRF (g/l)	průměr	1,23	1,20	1,20	1,22	1,21	1,29	1,37	2,49
	SD	0,22	0,29	0,26	0,41	0,35	0,39	0,42	0,38
	medián	1,24	1,17	1,18	1,70	1,21	1,25	1,27	2,48
Oroso (g/l)	průměr	1,87	1,89	1,97	1,96	2,10	2,40	1,95	0,71
	SD	0,41	0,49	0,40	0,39	0,49	0,48	0,60	0,17
	medián	1,79	1,84	2,40	1,98	2,20	1,93	1,96	0,70
Prea (g/l)	průměr	0,08	0,08	0,08	0,10	0,10	0,12	0,14	0,27
	SD	0,02	0,02	0,03	0,05	0,06	0,06	0,07	0,05
	medián	0,08	0,00	0,08	0,08	0,09	0,13	0,12	0,30

Tabulka č. 2: Změny koncentrace IL-6 u pacientů se závažnou sepsí v průběhu 15ti dní

		1. den	2. den	3. den	6. den	9. den	12. den	15. den	Norm. lab. hodnoty
IL-6 (pg/ml)	průměr	585,56	328,58	219,93	204,87	156,82	179,36	163,07	98,50
	SD	647,71	319,37	193,47	195,06	159,11	198,28	191,11	75,40
	medián	397,63	201,38	198,48	138,52	95,00	114,91	105,14	88,70

a – statisticky významný rozdíl versus normální laboratorní hodnoty;

b – statisticky významný rozdíl versus hodnoty 1. den

Tabulka č. 3: Změny parametrů koagulace u pacientů se závažnou sepsí v průběhu 15ti dní

		1. den	2. den	3. den	6. den	9. den	12. den	15. den	Norm. lab. hodnoty
D-dimer (µg/l)	průměr	1978 a	2082 a	1880 a	2421 a	1719 a	1765 a	1444 a,b	186
	SD	1543	1653	897	1613	1064	1396	962	70
	medián	1423	1385	1445	2053	1445	1274	1040	187
Fbg (g/l)	průměr	7,30 a	7,23 a	7,41 a	6,84 a	7,35 a	7,38 a	6,84 a	3,13
	SD	1,29	1,40	1,16	1,65	1,10	1,70	1,25	0,56
	medián	7,15	7,10	7,95	6,80	7,45	7,65	6,85	3,10
F 1+2 (pmol/l)	průměr	0,62 a	0,64 a	0,54 a	0,51 a	0,43 a	0,40 a,b	0,43 a	0,20
	SD	0,37	0,41	0,35	0,38	0,33	0,36	0,31	0,10
	medián	0,57	0,65	0,46	0,39	0,33	0,27	0,40	0,20
PC (%)	průměr	62,40 a	65,25 a	72,31 a	77,67 a	86,27 a,b	90,00 b	94,44 b	104,75
	SD	22,92	25,90	29,78	27,23	32,08	33,10	31,88	19,10
	medián	67,00	65,50	78,00	79,00	85,00	95,50	101,50	104,6
AT (%)	průměr	61,06 a	62,19 a	63,13 a	64,31 a	69,81 a	71,13 a	70,19 a	100,50
	SD	14,94	11,65	12,62	20,93	20,91	17,76	19,74	11,90

Tabulka č. 4: Změny koncentrace cytoadhezivních molekul u pacientů se závažnou sepsí v průběhu 15ti dní

		1. den	2. den	3. den	6. den	9. den	12. den	15. den	Norm. lab. hodnoty
sE-sel (ng/ml)	průměr	81,51	72,80	70,20	57,79	56,22	54,26	63,16	
	SD	101,15	78,76	64,93	27,60	27,36	22,90	48,83	
	medián	61,90	53,20	59,33	52,80	55,39	58,59	59,54	32,6
sP-sel (ng/ml)	průměr	86,20	81,94	94,42	111,72	116,62	135,43	141,31 b	134,5
	SD	36,68	39,93	32,65	30,80	39,03	47,44	88,46	79,0
	medián	77,06	65,28	85,20	106,96	108,77	121,80	107,78	
sICAM (ng/ml)	průměr	698,24	704,27	731,68	803,09	883,16	912,59	881,38	213,5
	SD	311,29	261,32	262,82	322,67	327,57	324,36	315,46	82,6
	medián	630,30	691,01	755,86	701,56	848,57	911,49	823,76	

a – statisticky významný rozdíl versus normální laboratorní hodnoty;

b – statisticky významný rozdíl versus hodnoty 1. den

Inhibice faktoru Xa při doporučené profylaxi LMWH: Průměrná inhibice F Xa byla 0,169 IU/ml ($\pm 0,173$). Profylaktického rozmezí 0,2-0,4 IU/ml bylo dosaženo jen v 22 případech (20 % z celkového počtu vyšetření), 77x (71 %) byla inhibice F Xa snižena pod profylaktické rozmezí, 10x (9 %) byla hodnota inhibice F Xa naopak zvýšena $> 0,4$ IU/ml. Dynamika změn hodnot inhibice F Xa je shrnuta v tab. 5.

Tabulka č. 5: Změny inhibice F Xa v průběhu 15 dní u pacientů se závažnou sepsí

	<i>1. den</i>	<i>2. den</i>	<i>3. den</i>	<i>6. den</i>	<i>9. den</i>	<i>12. den</i>	<i>15. den</i>
průměr	0,09	0,10	0,15	0,18	0,22	0,21	0,24
SD	0,10	0,09	0,11	0,16	0,24	0,22	0,20
median	0,04	0,04	0,13	0,14	0,16	0,13	0,18

Vliv vybraných parametrů na efekt subkutánně podávaného nízkomolekulárního heparinu: Výše inhibice F Xa pozitivně koreluje s vyšší aktivitou antitrombinu ($r = 0,42$; $p < 0,001$) a proteinu C ($r = 0,45$; $p < 0,001$). Pozitivní korelace byla rovněž nalezena mezi vyšší inhibicí F Xa a koncentrací prealbuminu ($r = 0,46$; $p < 0,001$). Negativní korelace byla též nalezena mezi vyšší inhibicí F Xa a koncentrací fragmentů protrombinu F1+2 ($r = -0,27$; $p = 0,015$). Statisticky významná korelace mezi vyšší inhibicí F Xa a koncentrací alfa-1-antitrypsinu nebyla nalezena. Tato korelace byla zjištěna pouze ve skupině pacientů s koncentrací alfa-1-antitrypsinu $\geq 2,2$ g/l ($r = -0,33$; $p = 0,01$). Mezi inhibicí F Xa a dalšími sledovanými parametry (CRP, orosomukoid, IL-6, fibrinogen, arteriální tlak, hmotnost a BMI) již k statisticky významné korelaci nedocházelo. Pearsonův korelační test neprokázal statisticky významnou korelaci mezi následujícími proměnnými: clearance kreatininu první den versus inhibice F Xa v 2., 3., 6., 9., 12. a 15. den. Nebyly nalezeny rozdíly ve výši dosažené inhibice F Xa mezi skupinou pacientů s katecholaminovou podporou noradrenalinem ($r = 0,19 \pm \text{SD } 0,18$) a skupinou pacientů bez této léčby ($r = 0,16 \pm \text{SD } 0,17$).

Vzájemný vztah závažnosti klinického stavu pacienta a parametrů hemostázy a zánětlivé reakce: Výsledky statistického zhodnocení vzájemného vztahu mezi klinickými skórovacími systémy a parametry hemostázy (resp. zánětlivé reakce a aktivace endotelu) jsou uvedeny v tab. č. 6 (resp. č.7).

Tabulka č. 6: Vztah klinických skórovacích systémů a parametrů hemostázy

	<i>SOFA</i>	<i>SAPS II</i>	<i>APACHE II</i>
aPTT	0,2356	0,3099	0,4311
	p = 0,022	p = 0,002	p = 0,000
INR	0,1823	0,241	0,3346
	p = 0,079	p = 0,019	p = 0,001
inhibice FXa	0,0654	-0,0382	-0,0424
	p = 0,531	p = 0,714	p = 0,685
AT	-0,3535	-0,2552	-0,4929
	p = 0,000	p = 0,013	p = 0,000
D-dimer	0,0901	-0,1228	-0,0762
	p = 0,388	p = 0,238	p = 0,465
Fbg	0,0098	-0,0408	0,0818
	p = 0,925	p = 0,696	p = 0,433
PC	-0,2697	-0,4209	-0,4922
	p = 0,009	p = 0,000	p = 0,000
F 1+2	-0,0397	-0,469	-0,4573
	p = 0,704	p = 0,000	p = 0,000

Tabulka č. 7: Vztah klinických skórovacích systémů a parametrů zánětu a aktivace endotelu

	<i>SOFA</i>	<i>SAPS II</i>	<i>APACHE II</i>
CRP	0,3156	0,1055	0,3113
	p = 0,001	p = 0,268	p = 0,001
Transferin	-0,5427	-0,3847	-0,5538
	p = 0,000	p = 0,000	p = 0,000
Prealbumin	-0,2994	-0,2197	-0,3316
	p = 0,001	p = 0,020	p = 0,000
Alfa-1-antitrypsin	0,0691	-0,1194	-0,0268
	p = 0,469	p = 0,210	p = 0,779
Oroso	-0,0449	-0,1782	-0,0732
	p = 0,639	p = 0,060	p = 0,443
IL-6	0,2121	0,3858	0,3946
	p = 0,030	p = 0,000	p = 0,000
sP-selektin	0,0596	0,0524	-0,0268
	p = 0,546	p = 0,595	p = 0,786
sE-selektin	0,3459	0,2316	0,0695
	p = 0,000	p = 0,017	p = 0,481
sICAM-1	0,289	0,2531	0,1823
	p = 0,003	p = 0,009	p = 0,063

korelačního koeficient s uvedením hodnoty statistické významnosti (p);

5. Diskuse

V uvedené studii byla sledována dynamika změn markerů zánětlivé, koagulační a fibrinolytické odpovědi u pacientů se závažnou sepsí v průběhu patnácti dnů od přijetí na JIP. Zatím byly známy převážně jen změny, ke kterým dochází v tzv. „časné“ fázi odpovědi organismu na sepsi, tj. v prvních 3 dnech (26) nebo maximálně po dobu 7 dnů (27). Podobný průběh změn zánětlivé reakce a koagulace jako ve výše uvedených studiích byl zaznamenán v 1. týdnu i u našich pacientů. Maximální zánětlivá (zvýšená koncentrace IL-6, alfa-1-antitrypsinu, CRP) a prokoagulační odpověď (zvýšená koncentrace F1+2 fragmentů a D-dimeru) byla nalezena v prvních 3 dnech, tedy v počáteční fázi sepse. Dále již koncentrace většiny pozitivních proteinů akutní fáze klesá, se signifikantním rozdílem 12. a 15. den proti počátečním hodnotám. Přesto i 15. den byly koncentrace těchto proměnných vyšší, než byla norma laboratoře. Zatímco CRP reaguje na probíhající zánět velmi rychle, extrémně vysoké hodnoty jsou již prvý den hospitalizace pacienta na JIP a poté rychle klesají až do 15. dne, orosomukoid odpovídá na zánětlivý proces velmi pozvolným nárůstem (změna však ani nedosahuje statisticky významných hodnot) a maxima dosáhne teprve 9. den. Spolu s tím jsme na druhé straně zaznamenali i opačný průběh změny koncentrace negativních proteinů akutní fáze transferinu a prealbuminu, což svědčí o počátečním katabolismu (28, 29), který se pozvolna vyrovnával ke konci sledovaného období. Pozorovaná počáteční nízká aktivita přirozených inhibitorů koagulace (AT and PC) je typickým nálezem pro sepsi a byla pozorovaná i ve studii „PROWESS“ (27).

Co se týká profylaxe HŽT, je u pacientů se sepsí doporučováno subkutánní podávání nefrakcionovaných heparinů nebo lépe nízkomolekulárních heparinů (9). LMWH díky svým farmakokinetickým a farmakodynamickým vlastnostem mají lépe předvídatelný efekt než UFH, a proto u nich rutinní monitorace jejich antikoagulačního účinku není všeobecně doporučována (16). Výsledky klinických studií se však prokázaly, že účinná profylaxe HŽT je možné docílit jen velmi obtížně (14, 18, 28, 30-33). V naší studii s nemocnými se závažnou sepsí vedla doporučená profylaktická dávka enoxaparinu 40mg k dosažení žádaného profylaktického rozmezí (0,2–0,4 IU/ml anti F Xa) také jen ve 20 % provedených vyšetření.

Kolisání inhibice F Xa u pacientů se sepsí je dle našich výsledků možné přičíst především nižší aktivitě AT. Tuto závislost potvrzuje nalezená pozitivní korelace mezi aktivitou AT a inhibicí F Xa. Biologickou dostupnost heparinu může částečně ovlivňovat též jeho vazba na plazmatické proteiny (15). Takto tomu může být zejména u pacientů se sepsí, kteří při zánětlivé reakci mají hladiny těchto proteinů akutní fáze zvýšeny. V naší studii byla nalezena negativní korelace mezi výší inhibice F Xa a koncentrací alfa-1-antitrypsinu ($r = -0,33$; $p = 0,01$) ve skupině pacientů s hodnotami alfa-1-antitrypsinu $\geq 2,2$ g/l. Vliv dalšího proteinu akutní fáze orosomukoidu však v tomto směru použitými testy prokázán nebyl. Diskutovaným faktorem ovlivňujícím antikoagulační účinek LMWH je také podávání vazopresorů. Tato hypotéza však v naší studii potvrzena nebyla. Taktéž jsme se pokusili ověřit hypotézu, že snížená clearance kreatininu může způsobit bioakumulaci LMWH, a tak vést ke zvýšení inhibice F Xa ve vzorcích pacientů s renálním selháním. Nicméně jsme takovou korelaci mezi iniciální hladinou kreatininu a pozdějšími hodnotami inhibice F Xa nenašli.

Klinické skórovací systémy APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation skóre), SAPS II (Simplified Acute Physiology Score) i skórovací systém pro hodnocení míry orgánového selhávání SOFA (Sequential Organ Failure Assessment score) velmi úzce koreloval s řadou sledovaných zánětlivých i koagulačních parametrů. Nález pozitivní korelace mezi klinickým stavem pacienta a koagulačními testy INR, aPTT svědčí spíše o sklonu ke krvácení u pacientů s těžším průběhem. Avšak negativní korelace mezi SAPS II, APACHE II skóre a inhibitory koagulace poukazují zároveň na insuficientní inhibici koagulace u pacientů v těžkém klinickém stavu.

6. Závěr

Tato studie byla zaměřena na sledování změn parametrů zánětlivé reakce akutní fáze spolu se známkami zánětlivé dysfunkce endotelu a markerů hemostázy u pacientů se závažnou sepsí. Současně byla vyhodnocena dosahovaná výše inhibice F Xa při doporučené antitrombotické profylaxi nízkomolekulárním heparinem.

Prvým cílem této práce bylo zaznamenat dynamiku změn hemostázy ve vztahu k zánětlivé reakci organismu v průběhu závažné sepse. A to nejen v její počáteční fázi, ale zejména i v dalším průběhu, tedy v tzv. pozdní fázi. Náš výzkum byl ojedinělý právě

délkou doby sledování pacientů - 15 dnů, všechny dříve publikované podobně zaměřené studie měly dobu sledování kratší. V souladu s publikovanými daty jiných autorů jsme v počáteční fázi zaznamenali extrémní prozánětlivou a protrombotickou odpověď. Tyto změny byly naopak doprovázeny poklesem negativních proteinů akutní fáze a deplecí přirozených inhibitorů koagulace - antitrombinu a proteinu C. V dalším průběhu sepse se hodnoty většiny parametrů postupně přibližovaly k normě laboratoře, avšak i 15. den nebyly ještě zcela normalizovány.

Taktéž jsme se zaměřili na laboratorní sledování účinnosti podávané profylaxe tromboembolické nemoci u nemocných se sepsí. Dle námi zjištěných výsledků však profylaxe běžně doporučovanými dávkami enoxaparinu 40 mg s.c. 1x denně nevedla u pacientů se závažnou sepsí v 80 % případech k dosažení požadované výše profylaktické inhibice F Xa (tj. dosažení inhibice v rozmezí 0,2–0,4 anti F Xa IU/ml), zejména v časně fázi sepse. To by mohlo být jedním z důvodů, proč doporučované podávání LMWH v profylaktických dávkách nemusí vést u nemocných se sepsí k úspěšnému snížení výskytu tromboembolických epizod. Podle SPC (souhrn údajů o léku) se u nízkomolekulárních heparinů nemusí jejich účinnost laboratorně monitorovat (na rozdíl od nefrakcionovaného heparinu i.v. nebo warfarinu) . To je také považováno za jednu z hlavních výhod nízkomolekulárních heparinů proti jiným antitrombotikům. Naše výsledky by však v tomto případě u pacientů se sepsí svědčily spíše pro průběžnou laboratorní monitoraci efektu podávaných LMWH a eventuální adjustaci jejich dávkování tak, aby bylo dosaženo cílové profylaktické inhibice faktoru Xa.

Dosažené výsledky rovněž naznačují, že nedostatečný účinek profylaktických dávek enoxaparinu souvisí i s variabilní dostupností přirozeného inhibitoru koagulace antitrombinu. Pro tuto hypotézu by svědčil nálezný pozitivní korelace mezi hladinou antitrombinu a výší inhibice faktoru Xa. To pak v léčebném režimu nemocných se sepsí otevírá otázku vhodnosti monitorace koncentrace antitrombinu a jeho případné substituce, pokud se zjistí jeho deficit.

7. Seznam použitých zkratk

A1AT	alfa 1 antitrypsin
APACHE II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation score
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
AT	antitrombin
BMI	body mass index
CRP	C reaktivní protein
F Xa	aktivovaný faktor X
HŽT	hluboká žilní trombóza
IL-6	interleukin
IU	mezinárodní jednotka
INR	international normalised ratio
JIP	jednotka intenzivní péče
LMWH	nízkomolekulární heparin
ORM	orosomukoid
p	hladina statistické významnosti
PC	protein C
PREA	prealbumin
SAPS II	New Simplified Acute Physiology Score
s.c.	subkutánní
SD	směrodatná odchylka
sICAM-1	intercelular adhesive molecule 1
SAPS II	Simplified Acute Physiology Score
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment score
TEN	tromboembolická nemoc
TF	tkáňový faktor
TRF	transferin
UFH	nefrakcionovaný heparin
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice
WBC	leukocyty

8. Použitá literatura

1. SLADE, E., et al. The Surviving Sepsis Campaign: raising awareness to reduce mortality. *Crit Care*. 2003, **7** (1), 1-2. ISSN 1364-8535.
2. EVANS, T. J. The role of macrophages in septic shock. *Immunobiology*. 1996, **195** (4-5), 655-659. ISSN 0171-2985
3. WARREN, H. S. Strategies for the treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 1997, **336** (13), 952-953. ISSN 0028-4793
4. BELCH, J. J., et al. Prevention of deep vein thrombosis in medical patients by low-dose heparin. *Scott Med J*. 1981, **26** (2), 115-117. ISSN 0036-9330
5. SAMAMA, M. M., et al. A comparison of enoxaparin with placebo for the prevention of venous thromboembolism in acutely ill medical patients. Prophylaxis in Medical Patients with Enoxaparin Study Group. *N Engl J Med*. 1999, **341** (11), 793-800. ISSN 0028-4793.
6. GARDLUND, B. Randomised, controlled trial of low-dose heparin for prevention of fatal pulmonary embolism in patients with infectious diseases. The Heparin Prophylaxis Study Group. *Lancet*. 1996, **347** (9012), 1357-1361. ISSN 0140-6736.
7. PINGLETON, S. K., et al. Prevention of pulmonary emboli in a respiratory intensive care unit: efficacy of low-dose heparin. *Chest*. 1981, **79** (6), 647-650. ISSN 0012-3692
8. HOLUB, M. Thromboembolic complications of sepsis: what is the incidence and pathophysiological mechanisms involved? *Thrombosis and haemostasis*. 2008, **99** (5), 801-802. ISSN 0340-6245
9. DELLINGER, R. P., et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*. 2008, **36** (1), 296-327. ISSN 1530-0293
10. GEERTS, W. H., et al. Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008, **133** (6 Suppl), 381S-453S. ISSN 0012-3692
11. CADE, J. F. High risk of the critically ill for venous thromboembolism. *Crit Care Med*. 1982, **10** (7), 448-450. ISSN 0090-3493

12. HIRSCH, D. R., et al. Prevalence of deep venous thrombosis among patients in medical intensive care. *JAMA*. 1995, **274** (4), 335-337. ISSN 0098-7484
13. CROWTHER, M. a W. LIM. Measuring the anticoagulant effect of low molecular weight heparins in the critically ill. *Crit Care*. 2006, **10** (4), 150. ISSN 1466-609X.
14. DORFFLER-MELLY, J., et al. Bioavailability of subcutaneous low-molecular-weight heparin to patients on vasopressors. *Lancet*. 2002, **359** (9309), 849-850. ISSN 0140-6736.
15. YOUNG, E., et al. Heparin binding to plasma proteins, an important mechanism for heparin resistance. *Thromb Haemost*. 1992, **67** (6), 639-643. ISSN 0340-6245
16. HIRSH, J. a R. RASCHKE. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004, **126** (3 Suppl), 188S-203S. ISSN 0012-3692
17. FRYDMAN, A. Low-molecular-weight heparins: an overview of their pharmacodynamics, pharmacokinetics and metabolism in humans. *Haemostasis*. 1996, **26** (Suppl 2), 24-38. ISSN 0301-0147
18. NAGGE, J., et al. Is impaired renal function a contraindication to the use of low-molecular-weight heparin? *Arch Intern Med*. 2002, **162** (22), 2605-2609. ISSN 0003-9926
19. RABBAT, C. G., et al. Dalteparin thromboprophylaxis for critically ill medical-surgical patients with renal insufficiency. *J Crit Care*. 2005, **20** (4), 357-363. ISSN 0883-9441
20. DUHL, A. J., et al. Antithrombotic therapy and pregnancy: consensus report and recommendations for prevention and treatment of venous thromboembolism and adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2007, **197** (5), 457 e451-421. ISSN 1097-6868
21. LEVY, M. M., et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003, **31** (4), 1250-1256. ISSN 0090-3493.
22. DELLINGER, R. P., et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004, **32** (3), 858-873. ISSN 0090-3493
23. BLAND, J. M. a D. G. ALTMAN. Correlation, regression, and repeated data. *Bmj*. 1994, **308** (6933), 896. ISSN 0959-8138

24. BLAND, J. M. a D. G. ALTMAN. Calculating correlation coefficients with repeated observations: Part 1 - Correlation within subjects. *BMJ*. 1995, **310** (6977), 446. ISSN 0959-8138
25. TAYLOR, F. B., JR., et al. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*. 2001, **86** (5), 1327-1330. ISSN 0340-6245
26. XIAO, H., et al. Mechanisms of mortality in early and late sepsis. *Infect Immun*. 2006, **74** (9), 5227-5235. ISSN 0019-9567.
27. KINASEWITZ, G. T., et al. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism [ISRCTN74215569]. *Crit Care*. 2004, **8** (2), R82-90. ISSN 1466-609X
28. BIOLO, G., et al. Metabolic response to injury and sepsis: changes in protein metabolism. *Nutrition*. 1997, **13** (9 Suppl), 52S-57S. ISSN 0899-9007
29. BRIZA, J., et al. Reakce akutní fáze u těžkých úrazů. *Sb Lek*. 2002, **103** (2), 193-202. ISSN 0036-5327
30. JOCHBERGER, S., et al. Antifactor Xa activity in critically ill patients receiving antithrombotic prophylaxis with standard dosages of certoparin: a prospective, clinical study. *Crit Care*. 2005, **9** (5), R541-548. ISSN 1466-609X
31. PRIGLINGER, U., et al. Prophylactic anticoagulation with enoxaparin: Is the subcutaneous route appropriate in the critically ill? *Crit Care Med*. 2003, **31** (5), 1405-1409. ISSN 0090-3493
32. ROMMERS, M. K., et al. Anti-Xa activity after subcutaneous administration of dalteparin in ICU patients with and without subcutaneous oedema: a pilot study. *Crit Care*. 2006, **10** (3), R93. ISSN 1466-609X.
33. RUTHERFORD, E. J., et al. Optimal dose of enoxaparin in critically ill trauma and surgical patients. *J Trauma*. 2005, **58** (6), 1167-1170. ISSN 0022-5282.

Seznam publikací

1. publikace, které jsou podkladem disertace

a) s impact factorem

ZENÁHLÍKOVÁ, Z., J. KVASNIČKA, Z. KUDRNOVÁ, M. SUDROVÁ, R. BRZEŽKOVÁ, J. MAZOCH, I. MALÍKOVÁ, J. VÝBORNÝ, D. ERHART a L. PECEN. F Xa Inhibition and Coagulation Changes During DVT Prophylaxis by Enoxaparin over the Course of a 15-Day Follow-Up in Septic Patients. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis*. 2010. **16** (5), 584-90. **IF: 1,351**

KUDRNOVÁ, Z., J. KVASNIČKA, K. KUDRNA, J. MAZOCH, I. MALIKOVA, Z. ZENÁHLÍKOVÁ, M. SUDROVÁ a R. BRZEŽKOVÁ. Favorable coagulation profile with fondaparinux after hip surgery in elderly patients. *Int J Hematol* 2009, 90 (4), 476-482. ISSN 1865-3774. **IF: 1,168**

b) bez IF

ZENÁHLÍKOVÁ, Z., et al. Trombotické komplikace při sepsi a jejich farmakologická profylaxe. *Cas Lek Cesk*. 2007, **146** (7), 597-602. ISSN 0008-7335.

2. Publikace bez vztahu k tématu disertace

a) s impact factorem

SUDROVÁ, M., J. KVASNIČKA, Z. KUDRNOVÁ, Z. ZENÁHLÍKOVÁ, J. MAZOCH a R. BRZEZKOVA. Influence of long-term thromboprophylaxis with low-molecular-weight heparin (enoxaparin) on changes of bone metabolism markers in pregnant women. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2010 **17** (5), 508-513. ISSN 1938-2723. **IF: 1,351**.

KVASNIČKA, J., J. HORÁK, Z. ZENÁHLÍKOVÁ, T. KVASNIČKA, S. ŠIMEK, T. KOVARNIK, I. MALÍKOVÁ, A. LINHART a M. ASCHERMANN. Reduced thrombin generation and soluble P-selectin after intravenous enoxaparin during PCI. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2011. **25** (3), 243-250. ISSN 1573-7241 **IF 3,098**

b) bez IF

KVASNIČKA J., J. HÁJKOVÁ, P. BOBČÍKOVÁ, D. DUŠKOVÁ, Š. POLETÍNOVÁ,
V. KIEFEROVÁ, **Z. ZENÁHLÍKOVÁ** A L. PECEN: Polymorfismy genů destiček
spojované s aterotrombogenezí a jejich výskyt ve zdravé české populaci středního věku.
Cor et vasa; 2009; 51 (3) Cor 187–193.