Utjecaj izvantjelesne cirkulacijske potpore na viskoelastična svojstva krvnoga ugruška i funkcije trombocita

Svetina, Lucija

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:803507

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lucija Svetina

Utjecaj izvantjelesne cirkulacijske potpore na viskoelastična svojstva krvnoga ugruška i funkcije trombocita

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lucija Svetina

Utjecaj izvantjelesne cirkulacijske potpore na viskoelastična svojstva krvnoga ugruška i funkcije trombocita

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

Disertacija je izrađena u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Klinika za kardijalnu kirurgiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Bojan Biočina

SADRŽAJ

Popis oznaka i kratica

1. Uvod 1

1.1. Opći i epidemiološki podaci srčanog zatajenja 1

1.2. Sastavni dijelovi ECMO/ECLS sustava, modaliteti liječenja 2

1.3. Krvarenje bolesnika na ECMO/ECLS potpori 4

1.4. Dosadašnje vođenje antikoagulacije i primjena testova *uz bolesničku postelju* u kliničkoj praksi 7

1.4.1. ACT 9

1.4.2. APTV 10

1.5. Optimalna nadoknada krvnih pripravaka 10

2. Hipoteza 12

3. Ciljevi istraživanja 13

4. Ispitanici i metode 14

4.1. Selekcija bolesnika i modalitet liječenja 14

4.2. Antikoagulacijski protokol 20

4.3. Uzorkovanje krvi za impendacijsku agregometriju i rotacijsku tromboelastometriju 22

4.4. Impedancijska agregometrija trombocita 23

4.5. Rotacijska tromboelastometrija 25

4.6. Statističke metode 34

5. Rezultati 36

6. Rasprava 69

6.1. Rezultati provedenog istraživanja 69

6.2. Pregled literature 79

6.3. Ograničenja istraživanja 82

7. Zaključci 83

8. Sažetak 85

9. Summary 86

10. Popis literature 87

11. Životopis 99

Popis oznaka i kratica

ECMO - engl. *Extracorporeal membrane oxygenation*; stroj za izvantjelesnu membransku oksigenaciju

ECLS - engl. *Extracorporeal Life Support*; stroj za izvantjelesno održavanje života

ELSO - engl. *Extracorporeal Life Support Organization*; Organizacija za izvantjelesno održavanje života

V-V - vensko-venski

V-A - vensko-arterijski

vWF - von Willebrand faktor

ACT - engl. *Activated Coagulation Time*; aktivirano vrijeme zgrušavanja

APTV - aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

INR - engl. *International Normalized Ratio*; Internacionalni normalizirani omjer

Trc - trombociti

POC - engl. *Point-of-Care Testing*; testovi uz bolesničku postelju

ROTEM® - Rotacijska tromboelastometrija

TEM - tromboelastometrija

JIL - jedinica intenzivnog liječenja

BIS - bolnički informacijski sustav

L - leukociti

CRP – C reaktivni protein

AT III - antitrombin 3

MEA – engl. *Multiplate Aggregometry*; Multiplate agregometrija

AUC - engl. *Area Under Curve*; površina ispod krivulje

ASPI test - trombocitna agregacija stimulirana arahidonskom kiselinom

ADP test - trombocitna agregacija stimulirana adenozin-difosfatom

CT - engl. *Clotting Time*; vrijeme zgrušavanja

MCF - engl. *Maximum Clot Firmness*; mjera najveće čvrstoće ugruška

CFT - engl. *Clot Formation Time*; vrijeme formacije ugruška

α^{o} - engl. *alpha angle*; alfa kut

LI - engl. *Lysis Index at 30 min*; indeks lize

1. Uvod

1.1. Opći i epidemiološki podaci srčanog zatajenja

Srčano zatajenje je postalo vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u razvijenim zemljama svijeta s prevalencijom od 2,5% (1, 2). Usavršavanjem konzervativnih i kirurških mjera liječenja populacija bolesnika sa kongestivnim srčanim zatajenjem je znatno uvećana, čineći skupinu od 17 milijuna ljudi u Europi i Sjedinjenim Američkim Državama, svake godine uvećanu za novih 500,000 bolesnika (3). Procjenjuje se da petogodišnji mortalitet ovih bolesnika iznosi 80%. U skupini bolesnika ovisnih o inotropnoj potpori preživljenje je ispod 30% unutar godine dana (4). Kod ovakvih kroničnih bolesnika preostaje primjeniti terapiju koja nadilazi konzervativan pristup. Takva terapija je potrebna i bolesnicima sa akutnim kardiorespiratornim zatajenjem, sa komplikacijama nakon operacije ili nakon transplantacije srca (odbacivanje organa).

U tim slučajevima, bolesnicima u završnom stadiju zatajenja srca ili u reanimacijskom postupku (kao oblik premoštenja do oporavka organa ili do definitivnog zbrinjavanja: operacija; transplantacija; unaprijeđenje na dugotrajniji oblik potpore) je izvantjelesna cirkulacijska potpora (engl. *Extracorporeal membrane oxygenation/Extracorporeal life support*; ECMO/ECLS) uvelike promijenila način liječenja i posljedično preživljenje. ECMO/ECLS je tehnika kratkotrajne mehaničke respiracijske/cirkulacijske potpore koja osigurava podršku radu srca i pluća kod bolesnika kojima je funkcija navedenih organa oštećena do vitalne ugroženosti. Inačica naziva ECMO odnosi se na podršku respiraciji, odnosno izmjeni plinova, dok je inačica ECLS rezervirana za potporu cirkulaciji i respiraciji (5).

ECMO terapija svoj razvoj započinje 1971. godine, a isprva je upotrebljavana isključivo u slučajevima kada su svi ostali modaliteti liječenja iscrpljeni. Iz navedenog je jasno da je

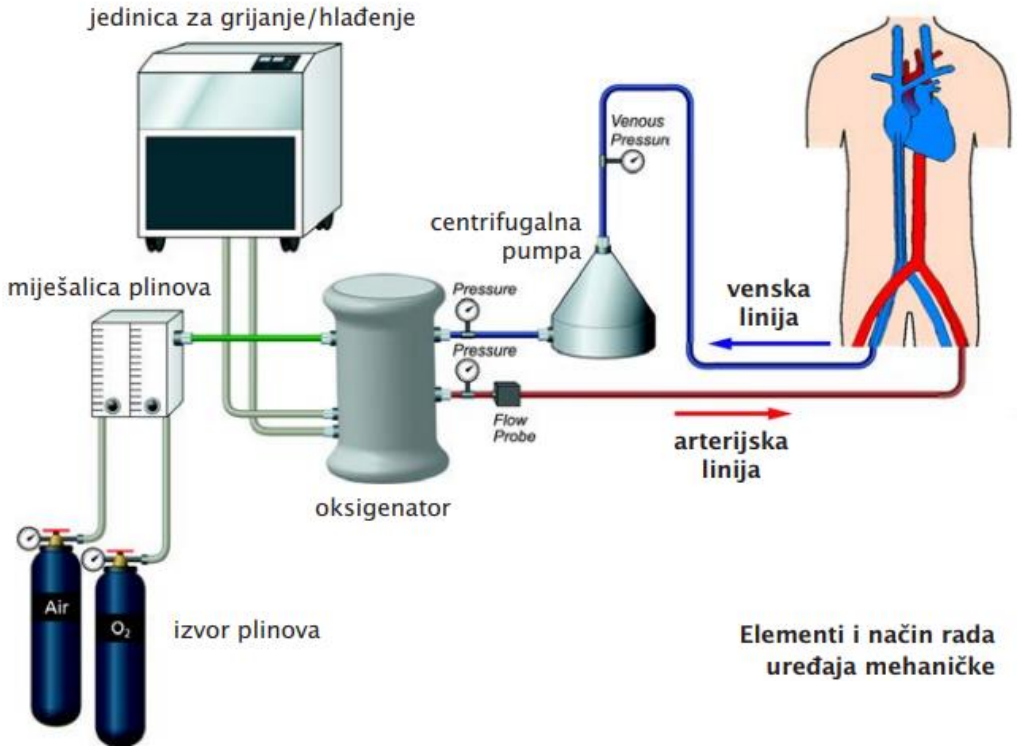
produljenje preživljenja za više od jednog dana u već moribundnog bolesnika predstavljalo uspjeh (5). Danas je liječenje daleko odmaklo od tih skromnih početaka, kako kronološki tako i tehnološki, napretkom u izvedbi i materijalu, vođenju potpore i prije svega duljini preživljenja bolesnika.

U Organizaciji za izvantjelesno održavanje života (engl. *Extracorporeal Life Support Organization*; ELSO) registru nalazi se preko 14 000 bolesnika liječenih ECMO/ECLS terapijom. Prema izvješću iz 2015. godine, indikacije za ECMO/ECLS potporu su bile respiratorno zatajenje u 49%, srčano zatajenje u 39% i uporaba ECMO/ECLS u sklopu reanimacije u 12% bolesnika. Preživljenje unutar 30 dana od trenutka uspostavljanja ECMO/ECLS potpore je iznosilo 35-40% (6-9).

1.2. Sastavni dijelovi ECMO/ECLS sustava, modaliteti liječenja

Osnovne dijelove ECMO/ECLS sustava čine pumpa koja omogućuje protok krvi, oksigenator i pripadajuće kanile (Slika 1). Deoksigenirana venska krv se iz organizma odvodi preko „pristupne“ (engl. inflow) kanile postavljene u venski dio cirkulacije pomoću negativnog tlaka koji proizvodi pumpa. Pumpa potom potiskuje krv prema oksigenatoru koji u potpunosti preuzima funkciju pluća. Ukoliko je potrebno korigirati tjelesnu temperaturu bolesnika koristi se jedinica za grijanje/hlađenje. Krv se zatim putem „povratne“ (engl. outflow) kanile vraća u arterijski ili venski dio cirkulacije. Upravo na temelju „povratnoga“ vaskularnog pristupa razlikujemo dva modaliteta ECMO odnosno ECLS potpore, vensko-venski (V-V) i vensko-arterijski (V-A). Koji će se modalitet primijeniti u pojedinog bolesnika, ovisi o potrebi cirkulacijske potpore bolesnika.

U ovom radu usredotočit ćemo se samo na akutne cirkulacijske poremećaje i modalitete liječenja putem V-A ECMO potpore. Ovisno o poremećaju koji je doveo do akutnog urušaja, uspostavljanje ECMO/ECLS potpore moguće je ostvariti putem nekoliko vaskularnih pristupa. Kolokvijalan naziv "centralni ECMO/ECLS" odnosi se na postavljanje kanila direktno u srce i velike krvne žile, nakon kirurškog otvaranja prsnog koša, najčešće nakon operacije na srcu. Naziv "periferni ECMO/ECLS" odnosi se na postavljanje drenažnih kanila putem perifernih krvnih žila, najčešće perkutano i to kao primarna potpora (10).



Slika 1. Dijelovi ECMO/ECLS sustava kanilacije (preuzeto sa http://www.kardio.hr/wp-content/uploads/2012/02/63-64.pdf).

1.3. Krvarenje bolesnika na ECMO/ECLS potpori

Rastući broj dokaza podupire tvrdnju da nekirurško krvarenje pripada među najčešće komplikacije nakon započinjanja ECMO/ECLS terapije (11-16). Prevalencija krvarenja izrazito varira prema dostupnoj literaturi i o korištenoj definiciji krvarenja, i u rasponu je od 5 do čak 81%. Najčešće opisano krvarenje je kirurško krvarenje i krvarenje s mjesta postavljanja kanila (6-32% slučajeva). Najteži i najsmrtonosniji oblik krvarenja je intrakranijsko krvarenje (3-19% slučajeva) (17, 18). Ovakav nesklad u podacima posljedica je različitih definicija koje se koriste u opisu krvarenja (11, 13, 16). Krvarenje je i najčešći razlog prijevremenog prekidanja ECMO/ECLS terapije. Ovako veliko odstupanje u brojkama koje opisuju negativne ishode proizlazi iz činjenice da su dostupni alati za proučavanje koagulacijskih abnormalnosti nedorasli napretku mehaničke cirkulacijske potpore. Neovisno o korištenom sustavu potpore (vrsta oksigenatora, pumpe i građe cijevi sustava) stopa navedenih komplikacija je približno jednaka, jer svi sustavi potiču sistemski upalni odgovor, mijenjaju funkciju trombocita i zadiru u sustav zgrušavanja (8).

Patofiziološki mehanizmi hemostatskih poremećaja bolesnika na ECMO/ECLS potpori su brojni (Tablica 1).

Na prvom mjestu se nalaze problemi sa hemokompatibilnosti, potom interakcija stijenki sustava i elemenata krvi, gubitak polimera von Willebrand faktora (vWF), poremećaj funkcije trombocita, primjena antiagregacijske i antikoagulacijske terapije (16, 19). Kontinuiran protok krvi kroz takav sustav je povezan sa jakim nefiziološkim tangencijalnim sprezanjem komponenata krvi koji zauzvrat dovodi do nastanka hemostatskih poremećaja (16).

Tablica 1. Djelovanje ECMO/ECLS sustava na proces koagulacije (preuzeto iz Bolliger D, Zenklusen U, Tanaka KA. Point-of-care coagulation management algorithms during ECMO support: are we there yet? Minerva Anestesiol. 2016;82(9):1000-9.).

Mehanizam	**Djelovanje ECMO/ECLS sustava**
Kontaknta aktivacija i SIRS	++
Potrošna koagulopatija	++
Dilucijska koagulopatija	+
Koncentracija fibrinogena	+++ (reaktant akutne faze upale)
Fibrinoliza	+/++
Proizvodnja trombina	++
Broj trombocita	↓
Funkcija trombocita	Upalnim odgovorom aktivirani trombociti

Prisustvo izvantjelesnog optoka u kontinuiranom kontaktu s cirkulirajućim protrombogenim čimbenicima neprekidno potiče i aktivaciju koagulacije (20, 21). Sistemska antikoagulacija je potrebna kako bi se inhibirala aktivacija trombina koji egzacerbira daljnju alteraciju hemostaze. Učinkovitost antikoagulacije se smanjuje tijekom liječenja ECMO/ECLS-om te ima medijan od 6 dana bez tromboembolijskih komplikacija (22).

Jasno je da je glavnina tehnološkog napretka usmjerena na smanjenje ovih komplikacija povećanjem hemokompatibilnosti. Primjenjene modifikacije u svrhu unaprijeđenja su opsežne, ali

u konačnici cilj im je smanjiti područja staze krvi, turbulentnog i retrogradnog protoka krvi u pojedinim komponentama sustava.

Svaki bolesnik predstavlja individuu koja u skladu sa svojom osnovnom bolesti i njenim patofiziološkim mehanizmom nastanka kao i prileţećim komorbiditetima ima drugačije potrebe za održavanjem homeostaze. Ne postoji jedinstven protokol primjenjiv na sveobuhvatnu populaciju bolesnika liječenih ECMO/ECLS potporom. Uz činjenicu da svaka bolest ima svoju genezu nastanka i poremećaja koagulacije valja imati na umu da ista bolest prolazi različite faze razvoja. U navedenoj situaciji to se odnosi na povremene i privremene promjene koagulacijskog statusa bolesnika. Primjer jednog patofiziološkog procesa je bolesnik sa kardiorespiratornim zatajenjem neposredno nakon kardiokirurškog zahvata. Inicijalno nakon operacije bolesnici pokazuju sve aspekte poremećaja koagulacije. Međutim, to je samo privremen stadij koji ubrzo prelazi u hiperkoagulabilno stanje u odmakloj fazi liječenja. Potreba za stalnim nadziranjem i upravljanjem homeostazom uspješno balansirajući na granici krvarenja i tromboembolije ukazuje na jasnu potrebu individualizacije vođenja hemostatske terapije bolesnika.

Klinički problem je kompliciran nedostatkom valjanog mjernog instrumenta pojedinih komponenata koagulacijske kaskade. Značajno odstupanje u praksi zabilježeno je u istraživanju koje je provedeno u 187 ELSO centara koji koriste ECMO/ECLS potporu (23). Nefrakcionirani heparin se koristio u 100% protokola liječenja ECMO/ECLS potporom. Parenteralni pripravci direktnog inhibitora trombina su korišteni u 8% centara. Stupanj antikoagulacije je u 97% centara mjeren koristeći aktivirano vrijeme zgrušavanja (engl. *Activated Coagulation Time*; ACT). Terapijska širina nije bila uniformna za sve centre te je varirala između minimalne vrijednosti od 183 (raspon 140-220) i maksimalne vrijednosti od 210 (raspon 170-240) sekundi. Aktivirano tromboplastinsko vrijeme (APTV) i koncentracija čimbenika anti-Xa su mjereni u 96% i u 65%

centara, no imali su i različiti raspon ciljnih vrijednosti. Nalazi testova tromboelastometrije su korišteni u 43% centara (23).

Sve to upućuje na činjenicu da ne postoji jedinstveni antikoagulacijski protokol za liječenje i nadzor bolesnika na ECMO/ECLS potpori.

1.4. Dosadašnje vođenje antikoagulacije i primjena testova *uz bolesničku postelju* u kliničkoj praksi

Procjena koagulacijskog statusa kod kritičnih bolesnika je složen proces. Kada se takvim bolesnicima u listu intervencija pribroji i otežavajući čimbenik poput izvantjelesnog krvotoka i antikoagulacijska terapija stupanj složenosti procjene raste. Ispravno bi bilo mjeriti globalnu funkciju sustava zgrušavanja in vivo i prema toj procjeni prilagoditi antikoagulacijsku terapiju. Značajno ograničenje svih testova koji proučavaju stupanj antikoagulacije je nedostatak standardiziranosti. Vrijednosti istih testova iz istog uzorka krvi u jednom laboratoriju mogu se razlikovati od istih testova izvedenih iz istog uzorka u drugom laboratoriju. Korištenje samo jednog testa za praćenje antikoagulacije nije više prihvatljiva praksa. Međutim, upotreba višestrukih testova nekoliko puta dnevno za procjenu antikoagulacije nije opravdana, a može biti i zbunjujuća za članove ECMO/ECLS tima.

Većina tromboembolijskih i hemoragijskih zbivanja te krajnji ishod liječenja ne koreliraju sa standardnim testovima i čimbenicima koagulacije (poput ACT; APTV; Internacionalni normalizirani omjer - engl. *International Normalized Ratio:* INR; fibrinogen) i brojem trombocita (Trc) u bolesnika na ECMO/ECLS potpori. Naprotiv, većina je takvih komplikacija prisutna u slučajevima kada su rezultati standardnih laboratorijskih testova unutar refrentnih vrijednosti (24).

Posljedica je to činjenice da navedeni testovi ne mogu otkriti hiper- ili hipofibrinolizu, hiper- ili hipokoagulabilnost, poremećaj agregacije trombocita, a produljeno vrijeme njihove izrade umanjuje njihovu pouzdanost (25, 26).

Unatrag nekoliko godina uvelike se radi na stvaranju novih uređaja koji pružaju detaljniju analizu pojedinih koraka koagulacijske kaskade.

Viskoelastični testovi iz uzorka pune krvi i testovi funkcije trombocita detaljno odražavaju hemostatski status bolesnika i stoga bi mogli biti od koristi u praćenju učinkovitosti antikoagulacijske terapije bolesnika na mehaničkoj potpori cirkulaciji (27). Prednost testova *uz bolesničku postelju* (engl. *Point-Of-Care testing*; POC) u odnosu na standardne laboratorijske testove temelji se na jedinstvenoj činjenici koja je jedna od temeljnih karakteristika ovih uređaja – rezultati se dobivaju iz uzorka pune krvi unutar desetak minuta od započinjanja izrade testa. Upravo ih to čini idealnim komponentama algoritma za ciljno usmjerenje hemostatke terapije osnovane na racionalnoj potrošnji krvnih pripravaka (28, 29). Poznatiji među tim POC testovima su rotacijska tromboelastometrija (ROTEM® delta, Pentapharm GmbH, Münich, Njemačka) i testovi impendacijske agregometrije trombocita (Multiplate® analyser, Cobas, Roche Diagnostic Limited, Švicarska). ROTEM® nastavlja razvoj tromboelastometrije (TEM) i omogućava podrobniju analizu viskoelastičkih svojstava pune krvi (30-34). ROTEM® koristi nekoliko aktivatora i inhibitora koagulacijske kaskade, i ovisno o korištenim reagensima na tržištu je dostupno pet testova koji samostalno ili u međusobnim kombinacijama pružaju visoko vrijedne rezultate. Multiplate® mehanizmom impendacijske agregometrije procjenjuje funkciju trombocita (35).

U pojedinim se medicinskim granama poput traumatologije, transplantacije jetre ili kardijalne kirurgije ovi uređaji rutinski koriste za upravljanje rizikom krvarenja i transfuzijsko liječenje.

Upravo je činjenica da rezultati pojedinih testova dobro koleriraju sa standardiziranim laboratorijskim testovima omogućila njihovu implementaciju u algoritam liječenja (36-40).

Razlika u primjeni ovih testova između navedenih grana kirurgije i u vođenju ECMO/ECLS potpore je činjenica da u posljednjem slučaju ne želimo postići normalizaciju koagulacijskih parametara. Naime, ispravkom i normaliziranjem pojedinim stupnjeva hemostaze povećava se prilika za stvaranje krvnih ugrušaka u komponentama ECMO/ECLS sustava. Stoga je ipak potreban određen stupanj antikoagulacije. Praćenje hemostaze je preporučeno tijekom mehaničke potpore cirkulaciji da bi se smanjio rizik hemoragijskih i tromboembolijskih komplikacija. Važno je da se ovi testovi ponavljaju opetovano tijekom terapije jer se stvaranje trombina, čvrstoća ugruška i odgovor trombocita mogu značajno promijeniti tijekom vremena sa velikom inter- i intraindividualnom varijabilnosti.

U nastavku je pregled testova koji su za vrijeme istraživanja korišteni u rutinskoj praksi.

1.4.1. ACT

ACT je parametar prvi put opisan 1966. godine i još uvijek predstavlja jedne od temeljih testova procjene djelovanja nefrakcioniranog heparina. ACT spada u skupinu POC testova. U našoj se ustanovi za te potrebe koristi Medtronic ACT Plus™ (Medtronic Perfusion Systems, Minneapolis, MN), mikroprocesorom kontroliran koagulacijski instrument rutinski korišten tijekom trajanja izvantjelesnog krvotoka kardiokirurške operacije. Dobivena vrijednost je evaluacija funkcije unutarnjeg i zajedničkog puta zgrušavanja (41-43). Unatoč tome pomoću ACT-a nije moguće u potpunosti procijeniti sposobnost antikoagulacije jer je test osjetljiv na različite čimbenike prisutne u bolesnika sa kardijalnom patologijom, poput pridruženih koagulopatija, dobi bolesnika, terapije

antikoagulansima ili antiagregansima, poremećaja funkcija trombocita i/ili fibrinogena, hipotermije, hemodilucije i koncentracije antritrombin 3 (AT III) (44).

Test se izvodi iz 0.4 ml uzorka svježe pune krvi koja se postavlja u odgovarajuću epruvetu u kojoj započinje proces zgrušavanja kaolinskim aktivatorom. Nakon inkubacije u trajanju 300 sekundi u prethodno zagrijanoj testnoj epruveti započinje mjerenje koje može biti u rasponu od 6-999 sekundi. Normalna vrijednost je 90-150 sekundi.

1.4.2. APTV

APTV predstavlja mjeru unutarnjeg puta zgrušavanja. Danas se redovito koristi kao dio standardiziranog obrasca praćenja djelovanja nefrakcioniranog heparina, međutim ne i u kardiokirurškim salama jer je vremenski period od uzorkovanja krvi do izrade testa predugačak (60-90 minuta). Također, manjak mu je nemogućnost prepoznavanja fibrinolize i poremećaja stvaranja ugruška. Izražava se u sekundama, normalna vrijednost je 30-40 sekundi. Uzrok preniskih vrijednosti uz prenisku koncentraciju nefrakcioniranog heparina može biti i niska razina AT III, trombocitoza, ubrzano izlučivanje diurezom ili transfuzija krvi.

1.5. Optimalna nadoknada krvnih pripravaka

Trenutno ne postoji strukturirani protkol nadoknade krvnih pripravaka temeljen na dokazima i zato većina ustanova koristi vlastite smjernice oblikovane prema kliničkom iskustvu.

Točna donja granica vrijednosti hematokrita za koju je potrebno primjeniti nadoknadu koncentrata eritrocita se razlikuje među ustanovama. Većina ustanova se slaže da je potrebno primjeniti transfuzijsko liječenje kako bi se održala donja vrijednost hematokrita iznad 35-40%.

Svježe smrznuta plazma se primjenjuje u slučajevima značajnijeg krvarenja ili ukoliko je vrijednost spontanog INR veća od 1.5-2.0. Na vrijednost INR ne utječe koncentracija heparina i stoga je dobra mjera procjene vanjskog puta zgrušavanja. Primjenjuje se u dozi 10 ml/kg. Svježe smrznuta plazma se koristi i ukoliko postoji heparinska rezistencija radi povećanja koncentracije AT III, iako je nadoknada koncentrata AT III bolji izbor.

Fibrinogen se primjenjuje u obliku koncentrata od 10-20 ml/kg ili 1 jedinica/20 kg tjelesne mase ukoliko je plazmatska koncentracija manja od 100 mg/dl ili kada je INR veći od 2.

Nadoknada trombocitima se primjenjuje ako je broj trombocita je manji od 50 x 10^9/L (ukoliko bolesnik ne krvari), odnosno ukoliko postoji epizoda krvarenja uz broj trombocita manji od 100 x 10^9/L.

U slučajevima pretjeranog krvarenja koje se nije uspjelo kontrolirati nadoknadom trombocita i ispravkom nedostataka drugih čimbenika zgrušavanja, može se primjeniti rekombinantni humani faktor zgrušavanja krvi VIII. On potiče stvaranje trombina i primjenjen u dozi 40-90 μg/kg može značajno smanjiti težinu krvarenja i daljnju potrebu za nadoknadom koncenrata eritrocita. Postoji opravdan strah prilikom njegove primjene tijekom ECMO/ECLS terapije zbog mogućnosti nastanka fatalne tromboze i zato se ponekad primjenjuje niža doza; 25-50 μg/kg, koja se nikad ne ponavlja unutar 24 h.

2. Hipoteza

Kod bolesnika liječenih izvantjelesnom cirkulacijskom potporom uporabom specifičnih testova koji kvantificiraju agregaciju trombocita i viskoelastična svojstva krvnoga ugruška moguće je predvidjeti hemoragijska neželjena zbivanja.

3. Ciljevi istraživanja

OPĆI CILJ: Cilj predloženog istraživanja je ispitati mogu li se predvidjeti hemoragijska zbivanja uporabom specifičnih testova koji proučavaju agregaciju trombocita i viskoelastična svojstva krvnoga ugruška.

SPECIFIČNI CILJEVI: Odrediti vrijednost testova rotacijske tromboelastometrije i testova agregacije trombocita u bolesnika na izvantjelesnoj potpori cirkulaciji. Usporediti vrijednosti navedenih metoda procjene koagulacijskog i agregacijskog statusa bolesnika s učestalošću hemoragijskih komplikacija.

Terapijsko djelovanje na osnovi parametara testova rotacijske tromboelastometrije i agregacije trombocita.

4. Ispitanici i metode

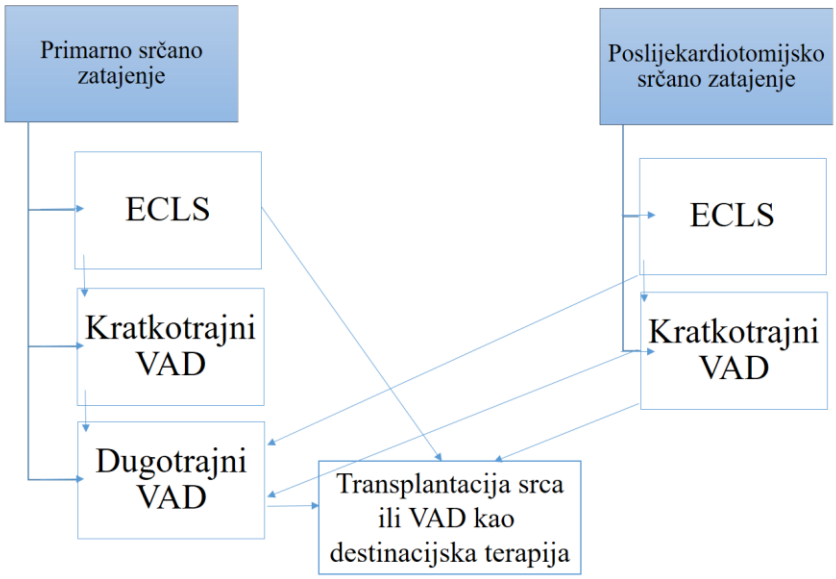
4.1. Selekcija bolesnika i modalitet liječenja

Nakon odobrenja etičkog povjerenstva Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u ovo je prospektivno istraživanje uključeno 28 odraslih bolesnika (muškarci, n = 21 (75%); žene, n = 7 (25%)) koji su liječeni V-A modalitetom ECMO/ECLS potpore. Istraživanje je uključilo odrasle bolesnike liječene na KBC Zagreb (Klinika za kardijalnu kirurgiju, Klinika za anesteziologiju i reanimatologiju) u periodu od 2014. do 2016. godine za koje je multidisciplinaran konzilij kardijalnih kirurga, anesteziologa i kardiologa donio odluku o nužnosti započinjanja modaliteta dugotrajnijeg (više od 6 sati) izvantjelesnog održavanja života. Razlozi za uspostavu potpore su bile održavanje hemodinamske stabilnosti sa omogućavanjem oporavka miokarda u sklopu produžene perfuzije organa nakon operacije na otvorenom srcu (poslijekardiotomijski ECMO/ECLS) ili početni razvoj kardiogenog šoka različite etiologije (u bolesnika bez recentne operacije na otvorenom srcu: primarni ECMO/ECLS) (Slika 2). Svi su uzorci prikupljeni u skladu s etičkim i bioetičkim principima. Privatnost podataka ispitanika/bolesnika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka u potpunosti je osigurana. Cjelokupni istraživački proces obavljen je u skladu sa svim primjenjivim smjernicama, uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN121/03) i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04). Prospektivno su bilježeni demografski, konvencionalni laboratorijski podaci i podaci o ishodima liječenja.

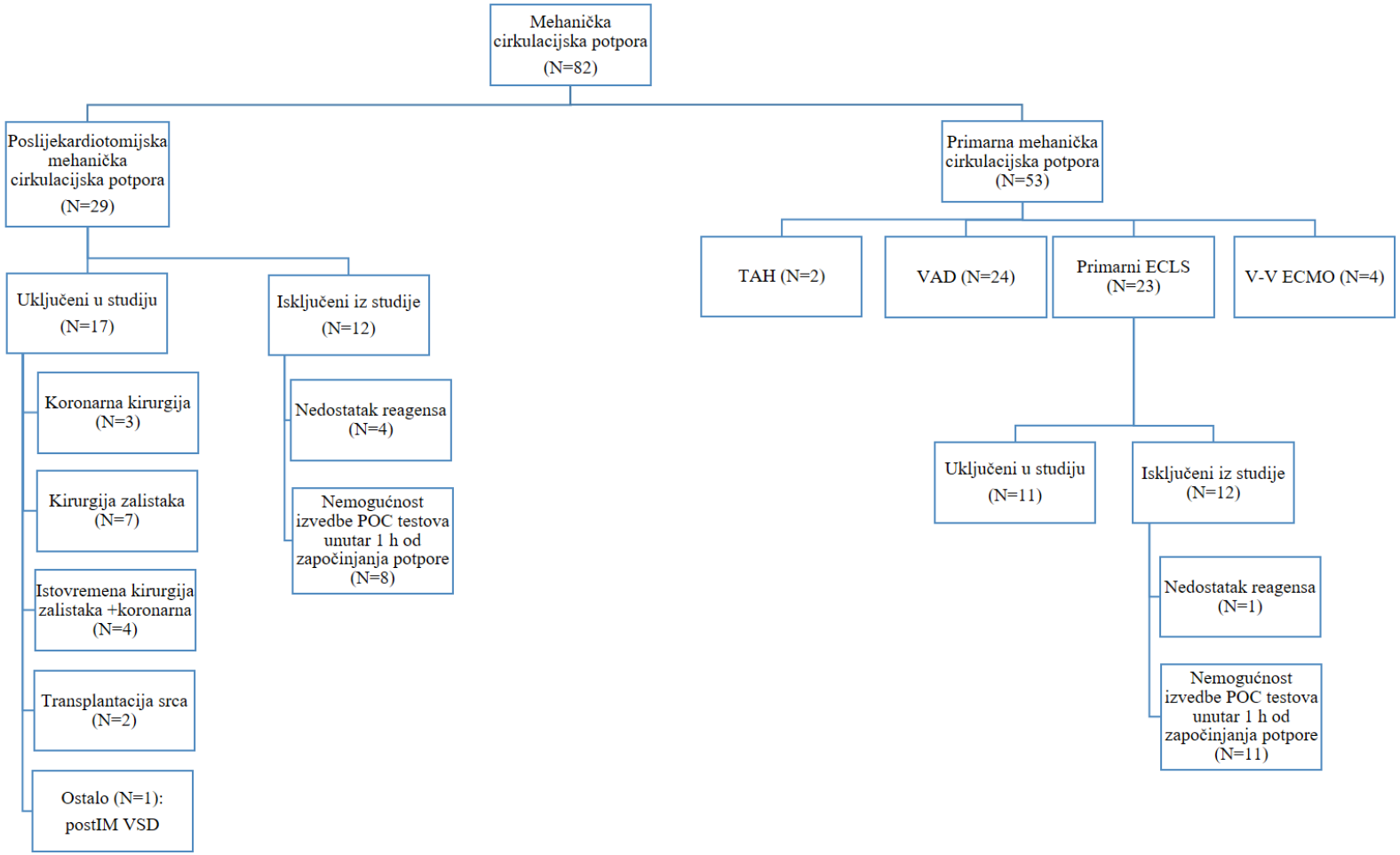
Dijagram tijeka liječenja odraslih bolesnika sa mehaničkom cirkulacijskom potporom na Klinici za kardijalnu kirurgiju u razdoblju 2014.-2016. godine prikazan je na slici 3. Od 82 odrasla

bolesnika liječenih mehaničkom cirkulacijskom potporom 29 bolesnika je liječeno poslijekardiotomijskom, te 53 bolesnika sa primarnom potporom. U skupini bolesnika sa primarnom mehaničkom cirkulacijskom potporom 23 bolesnika su liječena ECMO/ECLS potporom. Ostali bolesnici iz navedene skupine su liječeni dugotrajnijim oblicima potpore ili ECMO-om u indikaciji respiratornog zatajenja te nisu predmet ovog istraživanja.

Kriteriji za isključenje bolesnika (iz skupine ECMO/ECLS) iz istraživanja bili su dob ispod 18 godina, otprije poznati poremećaji zgrušavanja, nedostatak reagensa za pojedini POC test, ili nemogućnost izvedbe POC testova unutar sat vremena od započinjanja ECMO/ECLS potpore.



Slika 2. Izbor i redoslijed unaprijeđenja mehaničke cirkulacijske potpore u bolesnika sa dva različita uzroka srčanog zatajenja.



Slika 3. Dijagram tijeka liječenja odraslih bolesnika sa mehaničkom cirkulacijskom potporom na Klinici za kardijalnu kirurgiju 2014.-2016. godine. VAD: Ventricular Assist Device; TAH: Total Artificial Heart; PostIM VSD: Postinfarktni ventrikulski septalni defekt.

Prikupljeni demografski podaci su se odnosili na dob, spol, indikacije za ECMO/ECLS potporu, komorbiditete, težinu osnovne bolesti (procijenjene na osnovi prisutnosti: inotropne potpore, postojeće ventilacije bolesnika prije donošenja odluke o potpori, malignog poremećaja srčanog ritma, vanjske masaže srca u sklopu reanimacijskog postupka, akutnog bubrežnog zatajenja), vrijednosti prijeimplantacijskih laktata, biokemijskih nalaza, hemodinamskih parametara, funkcije lijevog ventrikula i znakova hipoperfuzije perifernih organa. Prikupljeni su i podaci o antiagregacijskoj i antikoagulacijskoj terapiji prije započinjanja potpore i vrsta prethodne operacije (za poslijekardiotomijsku potporu). Bilježeni ishodi su uključivali trajanje ECMO/ECLS potpore, trajanje boravka u jedinici intenzivnog liječenja (JIL), trajanje ventilacije bolesnika, potreba za nadomjesnom bubrežnom funkcijom, ukupno trajanje boravka u bolnici i ishod liječenja. Zabilježen je datum postavljanja ECMO/ECLS potpore i odvajanja (ili drugog ishoda) nakon završetka terapije.

Primarna mjera ishoda bila je značajno krvarenje, definirano prema ELSO kriterijima. Značajno krvarenje se opisuje kao ono praćeno padom koncentracije hemoglobina od najmanje 20 g/L u periodu od 24 h, odnosno krvarenje više od 20 ml/kg u periodu od 24 h ili potreba za jednokratnom ili višekratnom nadoknadom 10 ml/kg koncentrata eritrocita u 24 h. U istu kategoriju spada i retroperitonealno, plućno ili intrakranijsko krvarenje odnosno svako krvarenje za koje je potrebno učiniti kiruršku intervenciju. Ukoliko je bolesnik nekoliko uzastopnih dana imao isti primarni izvor krvarenja, oni su promatrani kao ista epizoda krvarenja. Ukoliko je bolesnik imao više od jedne epizode krvarenja isti dan, to je također zabilježeno. Važno je razlikovati intenzitet krvarenja jer je krvarenje i nadoknada krvnih pripravaka povezana sa većom smrtnošću u ECMO/ECLS bolesnika (45).

Sekundarna je mjera ishoda uključivala dnevno bilježenje potrošnje dostupnih derivata krvnih pripravaka (svježe smrznuta plazma, pročišćeni koncentrat fibrinogena, koncentrat trombocita), iznos drenaže na torakalne drenove (ukoliko je bolesniku dreniran toraks), bilježenje drugih epizoda krvarenja koja ne zadovoljavaju kriterij značajnog krvarenja (krvarenje sa mjesta kanilacije, iz prsnog koša ukoliko je kirurški otvarano, gastrointestinalno krvarenje i/ili epistaksa) i mortalitet.

Bilježeni konvencionalni laboratorijski testovi su svakodnevno uzorkovani, u sklopu rutinske kliničke prakse, u 6 h ujutro. Ti su testovi uključivali biljege upale: leukocite (L) i C-reaktivni protein (CRP); obilježja crvene krvne slike: broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, vrijednost hematokrita; broj trombocita; i koagulacijske markere: APTV, INR, fibrinogen, D-dimeri, slobodni hemoglobin u plazmi. U isto vrijeme je uzorkovana krv za ACT, koji je bio predmet istraživanja. Uz sve navedeno bilježen je početak, kraj i intenzitet antiagregacijske i antikoagulacijske terapije.

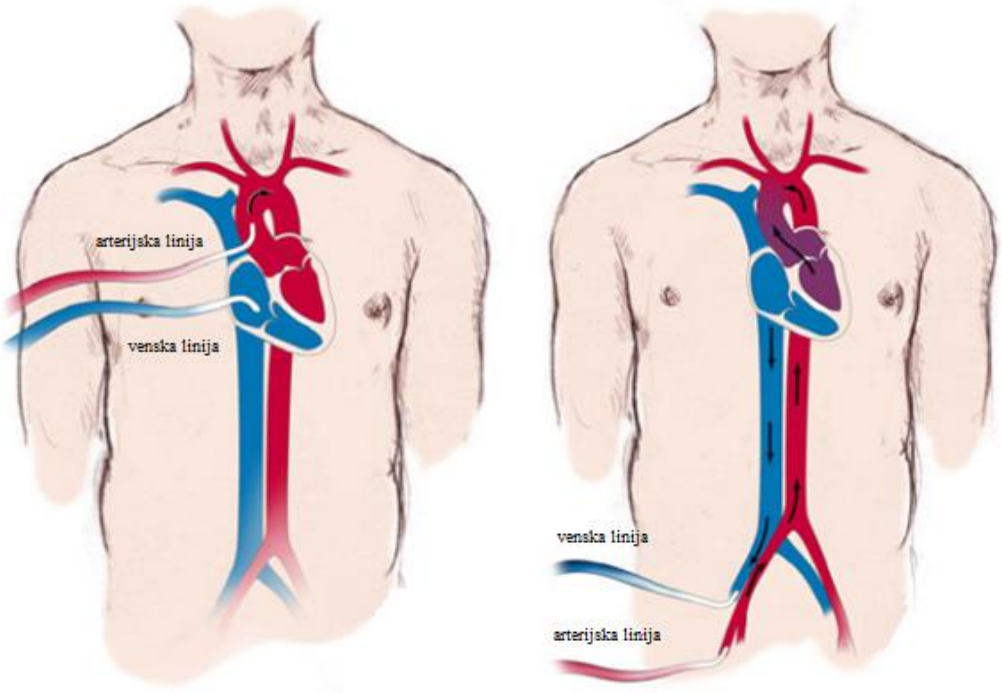
Svi ECMO/ECLS sustavi su se sastojali od Maquet Rotaflow centrifugalne pumpe (Maquet Cardiopulmonary GmbH, Rastatt, Njemačka) i nisko rezistentnog Quadrox D oksigenatora (Maquet Cardiopulmonary GmbH, Rastatt, Njemačka). Krv je proticala kroz biokompatibilni sustav cijevi i kanila. Čitava zapremnina cijevi je prije implantacije ispunjena otopinom kristaloida.

V-A ECMO/ECLS potpora je uspostavljena putem centralne ili periferne kanilacije (Slika 4). Centralna potpora podrazumijeva kirurško otvaranje prsnog koša i direktno postavljanje drenažnih kanila u desni atrij i aortu. Kanile se u ovom scenariju provlače subksifoidno kroz kožu. Zbog već otvorenog prsnog koša nakon operacije na srcu na centralni se oblik kanilacije odlučujemo u poslijekardiotomijskim slučajevima. Periferna kanilacija podrazumijeva kanilaciju perifernih

krvnih žila (u naših bolesnika lijeva femoralna arterija i desna femoralna vena). Kanilacija arterije se obavlja nakon kirurške eksploracije uz njeno zaomčavanje, postavljanje fiksacijskog i hemostatskog obodnog šava. Vena je uvijek kanilirana perkutano tehnikom po Seldingeru. Na ovakav način potpore se odlučujemo u slučaju kardiogenog šoka bolesnika bez recentne kardiokirurške operacije. Također, nastavno na indikaciju postupak postavljanja kanila izvođen je elektivnim ili hitnim načinom rada.

Veličina kanila je određena prema BSA (*Body Surface Area*). Za perifernu femoralnu kanilaciju koristile su se kanile promjera 21-27 Fr (vena) i 15-21 Fr (arterija). Za centralnu kanilaciju promjer kanila za uzlaznu aortu je iznosio 20-22 Fr i donju šuplju venu 28-34 Fr. Protok na ECMO/ECLS sustavu prilagođavao se prema potrebi količine hemodinamske potpore bolesnika. Početni protok na pumpi je iznosio 20 ml/kg/min uz postepeno povećanje protoka za 10 ml/kg/min svakih 5-10 minuta potpore kako bi se spriječio "stunning" miokarda. Ciljna vrijednost protoka pumpe je iznosila 60-150 ml/kg/min, što odgovara protoku od 2.4 L/min/m^2. Bolesnici su čitavo vrijeme trajanja potpore bili u normotermiji.

Neurološki status bolesnika se redovito provjeravao. Ukoliko je bolesnik bio sediran provjera se izvršavala u periodima prekida sedacije. Ukoliko je neurološka slika bila klinički nejasna, prema indikaciji učinila bi se kompjuterizirana tomografija. Proučavano trajanje ECMO/ECLS tretmana kao i izvedba i praćenje svih testova tijekom istraživanja je iznosilo 5 dana.



Centralna kanilacija Periferna kanilacija

Slika 4. Primjer periferne i centralne kanilacije (preuzeto sa http://www.kardio.hr/wp-content/uploads/2012/02/63-64.pdf).

4.2. Antikoagulacijski protokol

Od trenutka nastanka ECMO/ECLS terapije pa sve do danas, nefrakcionirani heparin predstavlja najprikladniji i najčešće korišteni antikoagulans zbog dvije bitne karakteristike: kratki poluživot i mogućnost brze neutralizacije protamin sulfatom. Iako je nužan i neizbježan, on je i sastavni dio *circulus vitiosus* krvarenja (46).

Vremensko trajanje uspješnosti ECMO/ECLS potpore je ograničeno, ne samo štetnim učinkom rezultata sistemskog upalnog odgovora na ciljne organe, nego i djelotvornošću heparinske terapije.

S vremenom izloženosti potpori se smanjuje učinkovitost heparina i povećava rizik za tromboemboliju. Taj fenomen se javlja kao posljedica potrošnje AT III za vrijeme trajanja kontinuirane heparinske terapije.

Svaki dio procesa zgrušavanja je podložan promjeni tijekom izloženosti ECMO/ECLS sustavu. Idealan uređaj za upravljanje doziranja heparina nije do sada razvijen (47).

Naš antikoagulacijski protokol se oslanjao na primjenu nefrakcioniranog heparina. Antikoagulacijski učinak nefrakcioniranog heparina je posredovan interakcijom sa dva endogena antikoagulansa: AT III i inhibitora puta tkivnog čimbenika. Nefrakcionirani heparin je složeni glikozaminoglikan koji se veže na AT III putem pentasahardine sekvence koja je prisutna samo u trećini molekula nefrakcioniranog heparina. Kompleks nefrakcioniranog heparina i AT III ima mnogo brži inhibicijski učinak na čimbenike zgušavanja u usporedbi s samostalnim AT III.

Kod svih je bolesnika sa primarnom ECMO/ECLS potporom primjenjena bolus doza nefrakcioniranog heparina 50–100 IU/kg prije postupka kanilacije. Doza heparina je prilagođena bolesnikovom koagulacijskom stausu prisutnom prije započinjanja kanilacijskog postupka. Prva provjera ACT je učinjena 1 h nakon početka potpore. Nakon što je vrijednost ACT pala ispod 300 s započeta je kontinuirana primjena heparina 10-20 IU/kg/h. Kod poslijekardiotomijskih ECMO/ECLS bolesnika prije postupka kanilacije primjenjena je bolus doza nefrakcioniranog heparina isključivo ukoliko je nefrakcionirani heparin (korišten prilikom primjene sustava za izvantjelesni krvotok za vrijeme operacijskog zahvata) već neutraliziran protamin sulfatom nakon postupka dekanilacije (odstranjivanje kanila sustava za izvantjelesni krvotok). Terapija kontinuiranom primjenom nefrakcioniranog heparina se započinje 24 h nakon uspostave potpore. Uvjet koji je pritom bilo nužno zadovoljiti je smanjenje drenaže na torakalne drenove ispod 4 ml/kg/h (ukoliko su prethodno postavljeni drenovi). Brzina terapije nefrakcioniranim heparinom

se potom prilagođavala sukladno vrijednostima APTV i ACT. Ciljni APTV je bio 1.5 do 2.0 normalne vrijednosti. Pretraga se izvodila svaka 4 sata. Ciljni ACT je iznosio 160-200 s. Prva pretraga se izvodila svaka 4 sata, druga svakih 8 sati, u slučaju većeg odstupanja od očekivanih vrijednosti i češće. Očekivane vrijednosti standardnih laboratorijskih testova su: vrijednost hematokrita iznad 30, koncentracija hemoglobina 110-130 g/L, broj trombocita iznad 50×10^9/L (bez znakova krvarenja, primarni ECMO/ECLS), broj trombocita iznad 80×10^9/L (kod krvarenja ili planiranih zahvata, primarni ECMO/ELCS), broj trombocita iznad 100×10^9/L (poslijekardiotomijski ECMO/ECLS). Očekivana koncentracija fibrinogena je bila iznad 2 g/L, vrijednost INR 0.8-1.1, koncentracija antritrombina AT III iznad 60%. Sve pretrage su učinjene dva puta dnevno, osim AT III koji se provjeravao jednom dnevno.

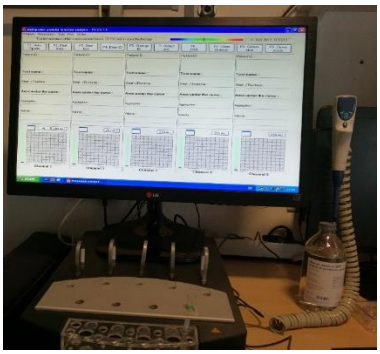
4.3. Uzorkovanje krvi za impendacijsku agregometriju trombocita i rotacijsku tromboelastometriju

Uzorkovanje krvi i izvođenje testova tromboelastometrije i impedancijske agregometrije trombocita učinjeno je u pet vremenskih točaka odnosno pet dana terapije ECMO/ECLS potporom. Uzorak krvi za svaki test zasebno se pribavljao putem centralnog venskog katetera. Uzorak krvi za rotacijsku tromboleastometriju se pohranjivao u natrij-citrat epruvetu volumena 4.5 ml (0.109Molar/3.2% koncentrat citrata – BD Vacutainer®). Uzorak krvi za impendacijsku agregometriju trombocita se pohranjivao u heparinizirani epruvetu volumena 4 ml (Lithium Heparin 68. I.U. – BD Vacutainer ®). U istom vremenskom periodu uzorkovana je i krv za rutinske laboratorijske testove koji se svakodnevno izvode u središnjem bolničkom laboratoriju kao i za mjerenje ACT koje se izvodi *uz krevet bolesnika*. Sva testiranja rotacijske tromboelastometrije i impedancijske agregometrije trombocita izvedena su od strane iste osobe medicinske struke

educirane za izvedbu ovih testova, koji nije bio aktivno uključena u proces liječenja bolesnika. Ista osoba je sve testove izvodila tijekom cijelog procesa istraživanja. Epruvete sa uzorkom krvi za impendacijsku agregometriju trombocita su, prema preporuci proizvođača, prije izvođenja testa skladištene 30 minuta u specijaliziranom grijaču namještenom na visinu tjelesne temperature. Potom je izveden test agregometrije. Test rotacijske tromboelastometrije se učinio odmah nakon uzorkovanja uzorka pune krvi.

4.4. Impendacijska agregometrija trombocita

Multiplate® (Multiplate® analyser, Cobas, Roche Diagnostic Limited, Švicarska) je naziv korištenog uređaja za impendacijsku agregometriju trombocita (Slika 5). Naziv Multiplate je skraćenica porijekla iz engleskog jezika. Odnosi se na opis funkcije uređaja, *multiple platelet function analyzer*. Uređaj za impendacijsku agregometriju trombocita omogućuje kvantifikaciju funkcije (aktivnost) trombocita iz uzoraka pune krvi. Zbog malih dimenzija uređaja i jednostavnosti izvedbe testova moguće je učiniti brzu analizu uzorka krvi u neposrednoj blizini bolesnika. Zbog egzaktnog i pravovremenog riješenja Multiplate® pruža pouzdan uvid u dinamičan poremećaj hemostaze tijekom izloženosti bolesnika izvantjelesnom krvotoku.

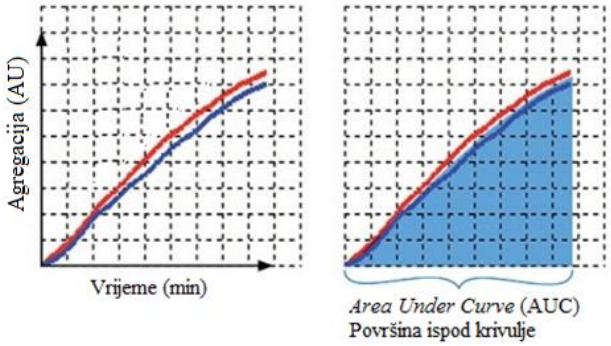


Slika 5. Uređaj impedancijske agregometrije trombocita Multiplate®.

Uređaj posjeduje pet kanala za zasebna testiranja uzoraka krvi. Stoga je moguće u istom vremenskom periodu testirati do pet uzoraka. Svaki kanal je spojen sa jednokratnom testnom čašicom (engl. *test cell*) sa dva para elektroda (duljina elektrode koja je u kontaktu s krvi je 3 mm, širina elektrode je 0.3 mm). Elektrode se uranjaju u mješavinu antikoagulirane krvi (300 μL) i fiziološke otopine tjelesne temperature (300 μL). Nakon trominutne inkubacije dodaje se 20 μL otopine reagensa, odnosno stimulatora agregacije. Polazna pretpostavka je da su trombociti netrombogeni u stanju mirovanja. U čašici se nalazi i magnet koji levitira u magnetskom polju predviđenom brzinom od 800 rotacija/minuta. Svrha magneta je ubrzanje trombocita koji se agregiraju na elektorde uz pomoć reagensa. Agregacija trombocita na pojedinu elektrodu istog para elektroda uzrokuje povećanje impendancije između obje elektrode. Porast impendancije između elektroda se kontinuirano prati kroz 6 minuta i prikazuje kao površina ispod krivulje (Slika 6). Veća impendancija odgovara većoj površini ispod krivulje. Ta površina ispod krivulje engleski se označava kao *Area Under Curve* (AUC). U svakom kanalu postoje dva para elektroda koja međusobno čine kontrolu. Radi navedenog rezultat se prikazuje u obliku dvije krivulje, a konačna vrijednost je presjek njihovih vrijednosti. Ukoliko je odstupanje između AUC dvije krivulje istog testa veće od 20% test se smatra neispravnim i isti je potrebno ponoviti.

Postoji nekoliko vrsta reagensa, odnosno agonista agregacije trombocita. Svaki reagens se prethodno priprema i pohranjuje prema preporuci proizvođača. U primjenjenom istraživanju smo koristili dva reagensa odnosno testa. ASPI test mjeri trombocitnu agregaciju stimuliranu arahidonskom kiselinom koncentracije 0.5 mM. ADP test je mjeri trombocitnu agregaciju stimuliranu adenozin-difosfatom koncentracije 6.4 μM.

Epruvete sa uzorkom krvi za impendacijsku agregometriju trombocita se, prema preporuci proizvođača, prije izvođenja testa skladište 30 minuta u specijaliziranom grijaču namještenom na visinu tjelesne temperature. Potom se izvodi test agregometrije.



Slika 6. Grafički prikaz funkcije trombocita pomoću Multiplate® testa, prikazano kao AUC.

4.5. Rotacijska tromboelastometrija

Koncept tromboelastometrije je mnogo stariji od koncepta impendacijske agregometrije trombocita sa korijenima u tromboelastografiji razvijenoj 1948. godine. Zasniva se na mjerenju viskoelastičnih svojstava krvnoga ugruška. Krivulja koja opisuje ta svojstva prolazi sve faze koje su jasno prikazane neprekidnom linijom sa polaznom točkom u trenutku početka oblikovanja ugruška i posljednjom točkom koja označava degradaciju ugruška.

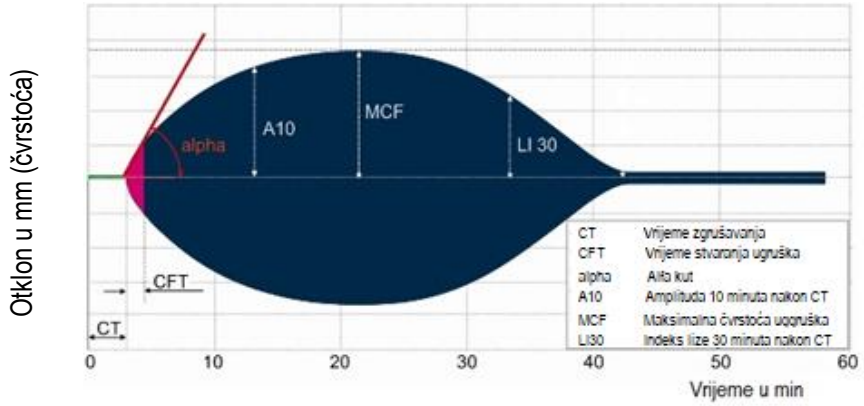
Korišteni uređaj za rotacijsku tromboelastometriju je bio ROTEM® delta (ROTEM delta, Pentapharm GmbH, Münich, Njemačka). Danas je dostupan i napredniji, u potpunosti automatiziran ROTEM® sigma (Slika 7).



Slika 7. Uređaj za rotacijsku tromboelastometriju ROTEM® delta i ROTEM® sigma.

Uređaj se sastoji od četiri kanala što omogućuje izvođenje četiri usporedna testa i znatno ubrzava proces procjene kvalitete ugruška orijentirajući se na sastojke krvi pojedinačno. Svaki kanal je pripojen na vlastitu jednokratnu čašicu u koju je uronjen jednokratan klip. Taj klip je pričvršćen na trajno oscilirajuću vertikalnu osovinu koja je položena pomoću posebnih ležajeva kako bi se okretala 4.75º u oba smjera po vertikalnoj osi. Test rotacijske tromboelastometrije se izvodi odmah nakon uzorkovanja uzorka pune krvi. U čašicu se stavlja uzorak citratom antikoagulirane pune krvi tjelesne temperature i željeni reagens. Oscilacija klipa se bilježi pomoću optičkog sistema koji čini izvor svjetla i ogledalo na vrhu vertikalne osi. Ukoliko ne postoji stvaranje ugruška, kretanje klipa je idealno. Međutim s vremenom se formira ugrušak i lijepi na stijenke klipa i čašice. Viskoelastična svojstva krvnoga ugruška ometaju oscilacije klipa odnosno osovine. Smanjenje amplitude oscilacije vertikalne osi odgovara procesu formacije krvnoga ugruška.

Broj parametara i testova u rotacijskoj trombolestometriji je veći nego u impendacijskoj agregometriji (Slika 8).



Slika 8. Slikovni prikaz najvažnijih parametara i skraćenica rotacijske tromboelastometrije.

Pojašnjenje skraćenica rotacijske tromboleastometrije:

CT (engl. *Clotting Time*; vrijeme zgrušavanja): vrijeme proteklo nakon dodavanja reagensa u uzorak krvi u kojem krivulja doseže amplitudu od 2 mm, izražava se u sekundama. Vrijednost CT omogućava podrobniju analizu čimbenika potrebnih za stvaranje trombina. Ovisno o korištenom reagensu možemo detaljnije proučavati unutarnji i vanjski put zgrušavanja. Na vrijednost CT utječe antikoagulantna terapija i koncentracija AT III. Iz navedenog proizlazi da skraćena vrijednost CT može ukazivati na hiperkoagulabilno stanje, dok produžen CT može biti posljedica antikoagulantne terapije ili nedostatka čimbenika zgrušavanja. U zaključku, CT je primarno pod utjecajem aktivnosti čimbenika zgrušavanja, antikoagulantnih lijekova (poput heparina), fibrinogena i trombocita. Stoga je ciljna terapija korekcije produženog CT usmjerena nadoknadi navedenih čimbenika (svježe smrznuta plaza ili koncentrati čimbenika koagulacije).

MCF (engl. *Maximum Clot Firmness*; mjera najveće čvrstoće ugruška): vrijednost MCF je jedan od najvažnijih čimbenika u tromboelastometriji. Odnosi se na najveći otklon od apscise u pojedinom trenutku stvaranja ugruška (dakle bez obzira na vremenski trenutak postizanja vrijednosti), izražen u milimetrima. Na MCF utječe broj i funkcija trombocita, količina i kvaliteta fibrinogena (sposobnost njegove polimerizacije), koncentracija čimbenika XIII i status fibrinolize.

CFT (engl. *Clot Formation Time*; vrijeme stvaranja ugruška): ukazuje na kinetiku trombocitne i fibrinogenske polimerizacije. Izražava se u sekundama. Produljeni CFT i normalan MCF ukazuju na poremećaj polimerizacije ugruška. Smanjeni MCF i normalni CFT ukazuju na nedostatak zgrušavajućih supstanci poput fibrinogena i/ili trombocita.

α^{o} (engl. *alpha angle*; alfa kut): kut odmaka od nulte apscise i tangente koja prolazi od polazne točke prema točki amplitude 2 mm od aspcise. Ukazuje na kinetiku fibrinogenske i trombocitne polimerizacije (kinetika stvaranja ugruška) i pod utjecajem je djelovanja antikoagulantnih lijekova.

A (x): A parametar odnosi se na visinu amplitude (maksimalnu vrijednost čvrstoće ugruška) u izabranom vremenskom odmaku odnosno točki. A parametar se označava kao A5, A10 i A30 odnosno odgovara MCF vrijednosti nakon 5, 10 ili 30 minuta.

LI 30 (engl. *lysis index at 30 min*; indeks lize nakon 30 min): vrijedost LI označava stupanj fibrinolize ugruška nakon 30 minuta od početka stvaranja ugruška. Odnosi se na stupanj smanjenja čvrstoće ugruška.

Sve navedeno je pregledno opisano u Tablici 2.

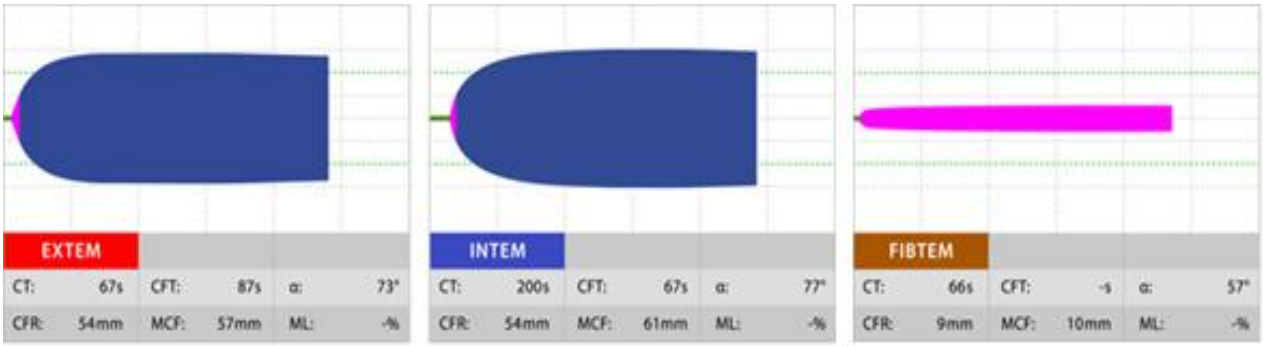
Tablica 2. Pojašnjenje skraćenica rotacijske tromboleastometrije.

Vrijeme zgrušavanja	CT	Aktivnost faktora koagulacije Antikoagulacijski lijekovi (npr. heparin) Trombociti Fibrinogen
Vrijeme formacije ugruška	CFT	Kinetika trombocitne i fibrinogenske polimerizacije (antikoagulacijski lijekovi)
Alfa kut	A	Kinetika trombocitne i fibrinogenske polimerizacije (antikoagulacijski lijekovi)
Maksimalna čvrstoća	MCF	Mehanička čvrstoća ugruška (trombociti, fibrinogen, faktor XIII)
A (amplituda čvrstoće ugruška nakon vremena T)	Ax	Čvrstoća ugruška nakon vremena T. Koristan i brz indikator razvoja čvrstoće ugruška, primarno pod utjecajem trombocita, fibrinogena i F XIII.
Index Lize (30 minuta nakon CT)	LI 30	Fibrinolitička aktivnost Hiperfibrinoliza (nedostatak inhibitora fibrinolize ili pretjerana fibrinoliza)

Pojašnjenje testova rotacijske tromboleastometrije:

ROTEM® procjenjuje sposobnost bolesnikovog mehanizma zgrušavanja da na mjestu ozljede stvori ugrušak. Razvidno tome, postoje različiti reagensi (agonisti) pomoću kojih se mogu izvoditi preporučeni testovi. Za lakše razumijevanje postojećih testova potrebno je poznavati proces zgrušavanja krvi. Zgrušavanje krvi je veoma složen mehanizam koji se može aktivirati ozljedom stijenke krvne žile, ozljedom sastavnih dijelova krvi ili dodirom krvi sa oštećenim endotelnim stanicama, kolagenom ili tkivnim elementima izvan krvnih žila. Konačan rezultat je stvaranje aktivatora protrombina za pretvorbu protrombina u trombin, nakon čega trombin proteolitički mijenja fibrinogen. Iz fibrinogena nastaje fibrinski monomer koji se polimerizira sa drugim molekulama fibrinskog monomera. Konačan rezultat je stvaranje fibrinskih niti koje čine osnovu odnosno mrežu krvnoga ugruška. Upravo je aktivator protrombina ciljni rezultat djelovanja dva puta zgrušavanja, vanjskog i unutarnjeg, koji se sastoje od različitih plazmatskih bjelančevina, čimbenika zgrušavanja.

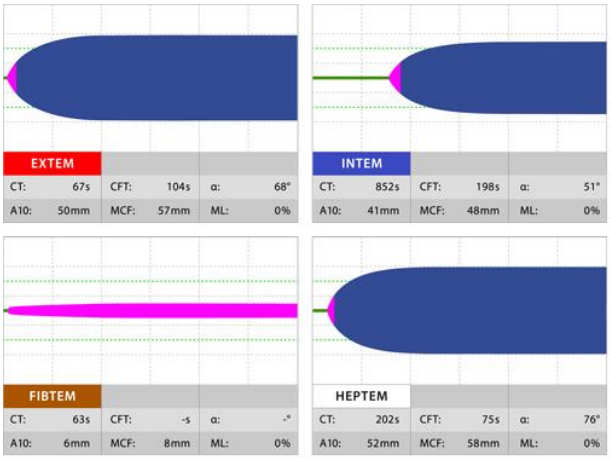
Korišteni testovi ROTEM® (Slika 9):



Slika 9. Prikaz krivulja normalnog nalaza 3 osnovna testa ROTEM®.

INTEM test – test kao reagens koristi agonist unutarnjeg puta zgrušavanja. Njegovom analizom proučavamo sveukupni prikaz koagulacije. INTEM test je stoga osjetljiv na nedostatak čimbenika zgrušavanja, antikoagulantnog djelovanja heparina, funkciju i broj trombocita te funkciju fibrinogena. Ukoliko postoj blagi stupanj nedostatka čimbenika zgrušavanja, disfunkcija trombocita ili prisutnost djelovanja acetilsalicilne kiseline kao antiagregacijskog čimbenika, osjetljivost mu je smanjena (Tablica 3).

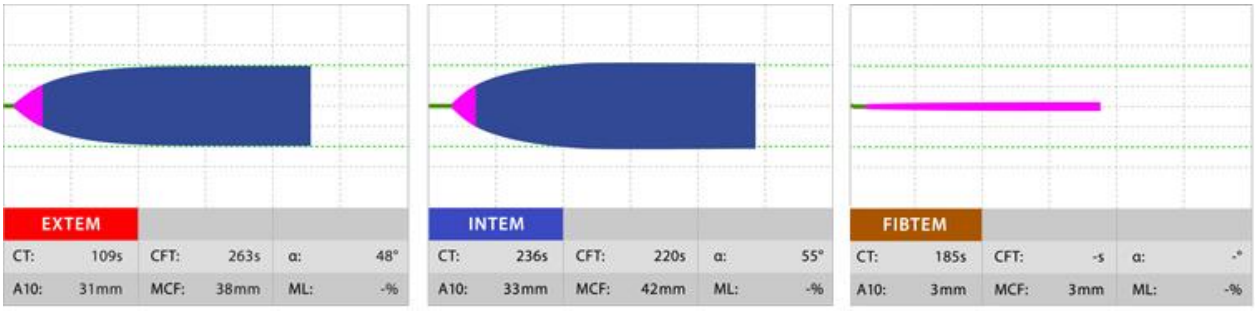
HEPTEM test – test također kao reagens koristi agonist unutarnjeg puta zgrušavanja, ali za razliku od INTEM testa sadrži i enzim heparinazu. Cilj ovog enzima je neutralizacija djelovanja heparina uzorka proučavane krvi. Primjenjuje se u bolesnika izloženih djelovanju visokih doza heparina, poput kardiokirurških bolesnika na nekom od oblika izvantjelesne cirkulacije. Usporedbom INTEM i HEPTEM testa omogućuje se razlikovanje poremećaja zgrušavanja zbog prisutnosti heparina ili nedostaka čimbenika zgrušavanja (Slika 10). Protamin je agonist heparina korišten u svakodnevnoj praksi kardijalne kirurgije, stoga usporedbom ova dva testa možemo primjeniti pravovaljanu dozu protamina kako bi se postigao željeni stupanj zgrušavanja (Tablica 3).



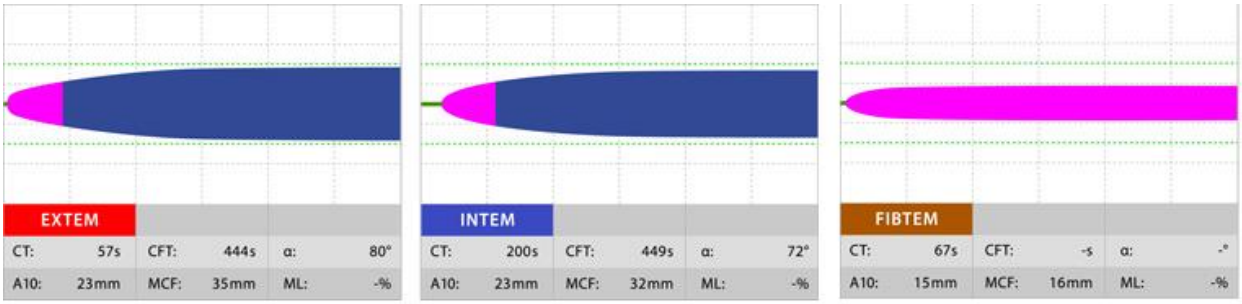
Slika 10. Prikaz usporedbe testova u identifikaciji djelovanja heparina.

EXTEM test – test kao reagens koristi agonist vanjskog puta zgrušavanja. Osjetljiv je na nedostatak čimbenika vanjskog puta zgrušavanja, te kao i INTEM na funkciju i broj trombocita, funkciju odnosno polimerizaciju fibrina, nedostatak čimbenika XIII i povećan stupanj fibrinolize. Ima nisku osjetljivost prema djelovanju heparina, i nema osjetljivost prema djelovanju acetilsalicilne kiseline i kumadinskih antikoagulansa (pri visokim vrijednostima INR vrijednost EXTEM testa može biti potpuno normalna) (Tablica 3).

FIBTEM test - test se često analizira usporedno sa EXTEM testom, jer su oba testa u osnovi jednaka. Međutim, osnovnu razliku FIBTEM testa u odnosu na EXTEM test je dodatak (uz agonist vanjskog puta zgrušavanja) citohalazina D. Citohalazin D je inhibitor normalne građe citoskeleta trombocita, čime se inhibira njihova funkcija. Uspoređujući ova dva testa proučava se uloga trombocita i fibrinogena u procesu stvaranja krvnoga ugruška (odnosno dobivena krivulja FIBTEM testa je EXTEM krivulja bez funkcije trombocita) (Slika 11, Slika 12, Tablica 3).



Slika 11. ROTEM® nalaz koji upućuje na poremećaj polimerizacije fibrinogena.



Slika 12. ROTEM® nalaz u kvantifikaciji smanjenog doprinosa trombocita u stvaranju krvnoga ugruška.

Tablica 3. Pojašnjenje testova rotacijske tromboleastometrije.

Korišteni reagens	Interpretacija testa
in-tem®	Brza procjena oblikovanja ugruška, polimerizacije fibrina i fibrinolize putem unutarnjeg puta zgrušavanja
r ex-tem®	Brza procjena oblikovanja ugruška, polimerizacije fibrina i fibrinolize putem vanjskog puta zgrušavanja
fib-tem®	ROTEM® analiza bez doprinosa trombocita; kvalitativna procjena statusa fibrinogena
hep-tem®	Namijenjen za detekciju djelovanja heparina (koristi se u usporedbi sa INTEM)

4.6. Statističke metode

Za statističku obradu podataka početna točka istraživanja je bio trenutak uzimanja uzorka pune krvi bolesnika neposredno nakon početka liječenja izvantjelesnom cirkulacijskom potporom. Završna točka praćenja je bio kraj petog dana ECMO/ECLS potpore ili završetak liječenja izvantjelesnom cirkulacijskom potporom koja se definira kao odvajanje od ECMO/ECLS potpore, definitivno kirurško zbrinjavanje ili kao smrt bolesnika. Cilj analize podataka je bio ispitati je li moguće uporabom specifičnih testova funkcije trombocita i viskoelastičnih svojstava krvnoga ugruška tijekom liječenja izvantjelesnom potporom cirkulaciji predvidjeti hemoragijska neželjena zbivanja. Analiza normalnosti raspodjele podataka je provjerena testom Smirnov-Kolmogorov te su se shodno dobivenim rezultatima koristili parametrijski, odnosno neparametrijski testovi te odgovarajući prikaz kontinuiranih vrijednosti (aritmetičke sredine i standardne devijacije, odnosno medijan). Određeni su binarni ishodi (krvarenje, preživljenje), a kontinuirane vrijednosti ostalih varijabli su testirane u odnosu na ishode. Kako bi se smanjio potencijalno negativni utjecaj malog broja ispitanika na testiranje većeg broja varijabli, vrijeme praćenja je cenzorirano i učinjena je binarna logistička regresija i Coxova multivarijatna regresija modelom proporcionalnih hazarda (backward stepwise - conditional LR s vremenom do događaja kao vremenom praćenja). Potom je za svaki test koji je pokazao statistički značajnu povezanost s ishodom učinjena ROC (od engl. Receiver Operating Characteristic) analiza i određena je granična vrijednost testa pomoću Youden J čimbenika kako bi se kontinuirane varijable vrijednosti testova pretvorile u kategoričke, kao 0 = ispod granične vrijednosti i 1 = iznad granične vrijednosti. Koristeći tako posložene kategoričke varijable, rezultati su prikazani krivuljom omjera hazarda, koristeći Mantel-Cox log rank test. Ostale zabilježene varijable su s rezultatima testova uspoređene uz pomoć Spearmanovog rho koeficijenta korelacije i Mann-Whitney U testa za nezavisne uzorke. Svi statistički testovi bili su

dvosmjerni. Vrijednosti *p* manje od i jednake 0.05 određene su statistički značajnima. Statistička obrada podataka je učinjena uz pomoć programa MedCalc (Verzija 11.2.1 © 1993-2010. MedCalc Software bvba Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium), te programa SPSS (Verzija 22.0. Izdana 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY: IBM Corp.).

5. Rezultati

U istraživanje je uključeno 28 bolesnika (muškarci, n = 21 (75%); žene, n = 7 (25%)) koji su liječeni venoarterijskim (V-A) modalitetom ECMO/ECLS potpore. Demografski podaci izneseni su u tablici 4.

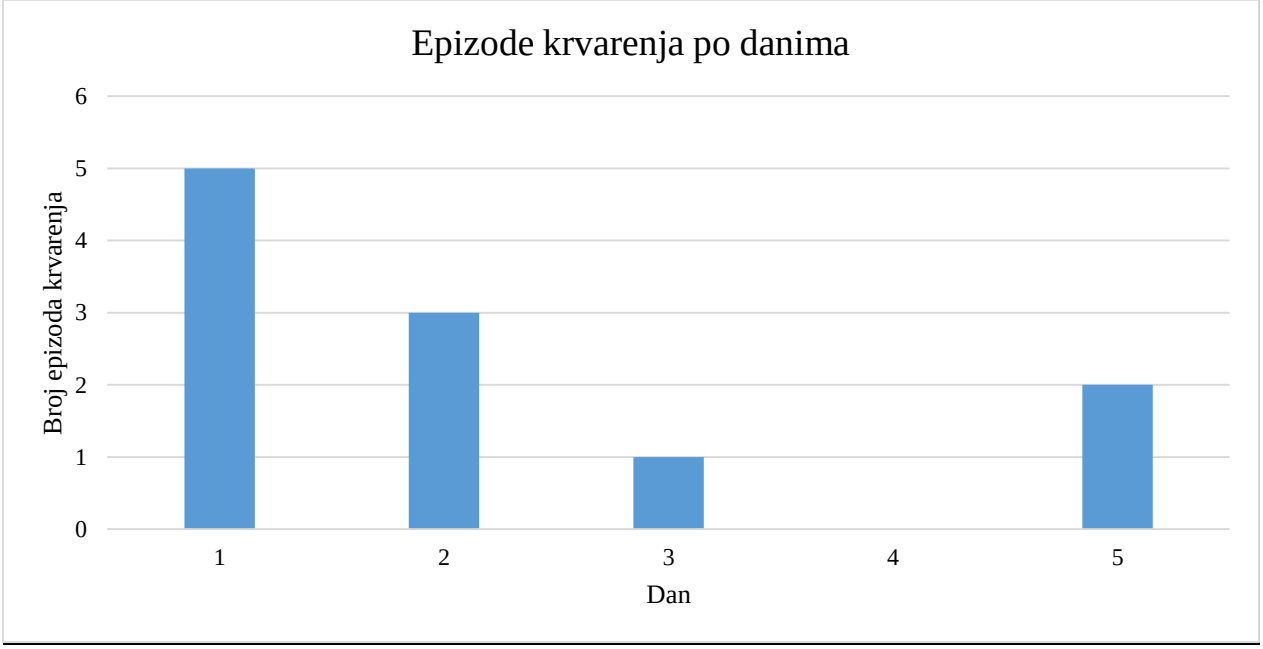
Ovisno o podležećoj patologiji kanile ECMO/ECLS sustava su postavljane perkutano perifernim (46 %) odnosno kirurški centralnim pristupom (54 %). Pacijenti liječeni ECMO/ECLS-om su praćeni prvih 5 dana od uspostavljanja potpore, a prosječno trajanje potpore je bilo 6,8 dana.

Značajno krvarenje kao mjera ishoda je zabilježeno u 8/28 bolesnika (28 %). Broj krvarećih epizoda po bolesniku je iznosio 1,38. Tri bolesnika su imala 2 epizode krvarenja, a pet bolesnika jednu epizodu krvarenja. Nema statistički značajne povezanosti između vaskularnih pristupa i pojavnosti teškog krvarenja (Mann-Whitney U test, $p = 0.25$). Najviše je krvarećih epizoda bilo prvi i drugi dan (Slika 13).

Tablica 4. Demografski podaci.

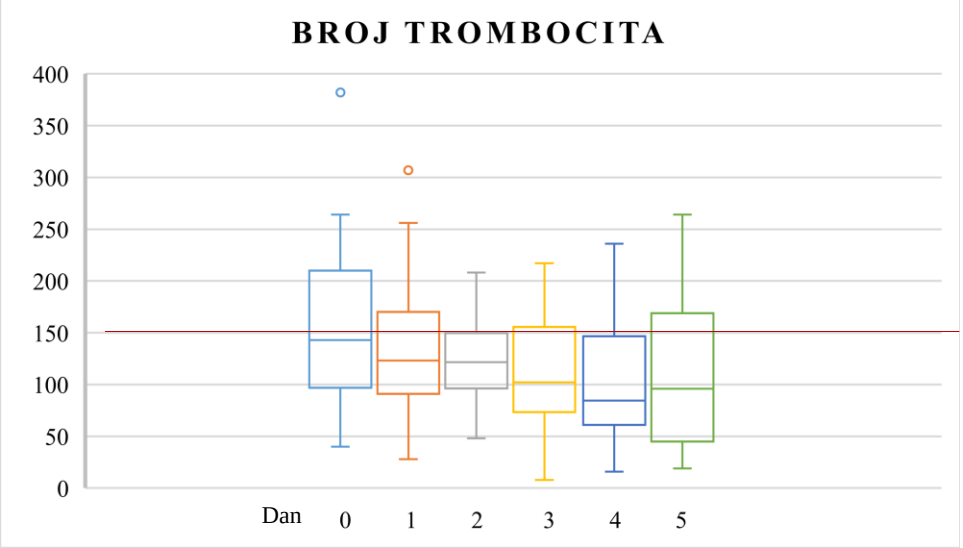
Vrijednosti su testirane pomoću Mann Whitney U testa.	Ukupno	Bolesnici sa značajnim krvarenjem	Bolesnici bez značajnog krvarenja	*p*
Broj bolesnika	28	8	20	0,24
Prosjek godina	56	52,9	56,05	0,46
Muškarci (%)	75	75	75	1,00

Prosječno trajanje potpore u danima	6,8	7	6,7	0,25
Ejekcijska frakcija lijevog ventrikula (%)	24,1	26	27,5	0,46
Laktati prije započinjanja potpore (mmol/L)	3,85	9,36	3,15	0,001
Poslijekardiotomijski ECMO/ECLS (%)	60	75	25	0,37
Medijastinum ostavljen otvoren nakon zahvata (%)	53	75	25	0,07
Periferna kanilacija (%)	46	38	62	0,28
30-dnevni mortalitet (%)	40	50	50	0,71
Prosječno trajanje ventilacije u danima	7,5	10,5	6,2	0,15

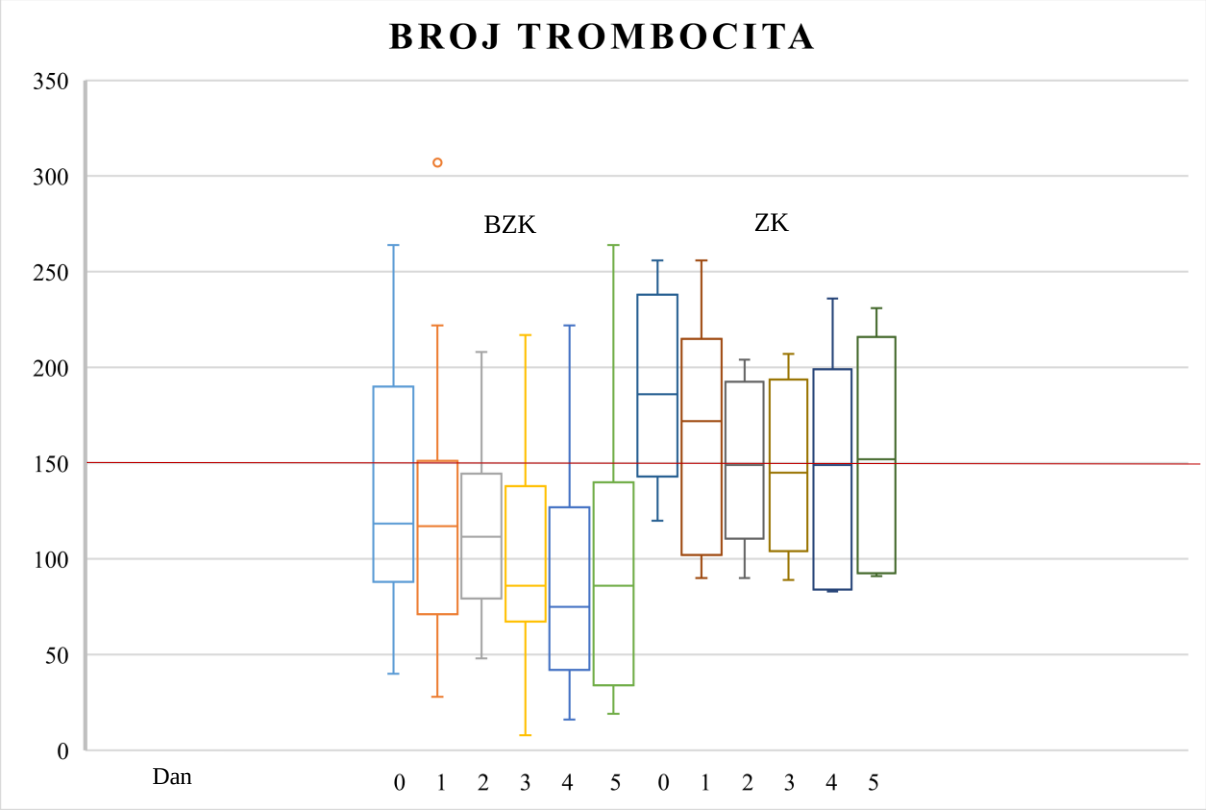


Slika 13. Raspodjela epizoda krvarenja po danima (ukupni broj epizoda krvarenja = 11).

Od trenutka započinjanja ECMO/ECLS potpore bilježi se umjeren pad broja trombocita do vrijednosti ispod referentnih vrijednosti (≤ 150 x 10^9/L) (Slika 14, 15).

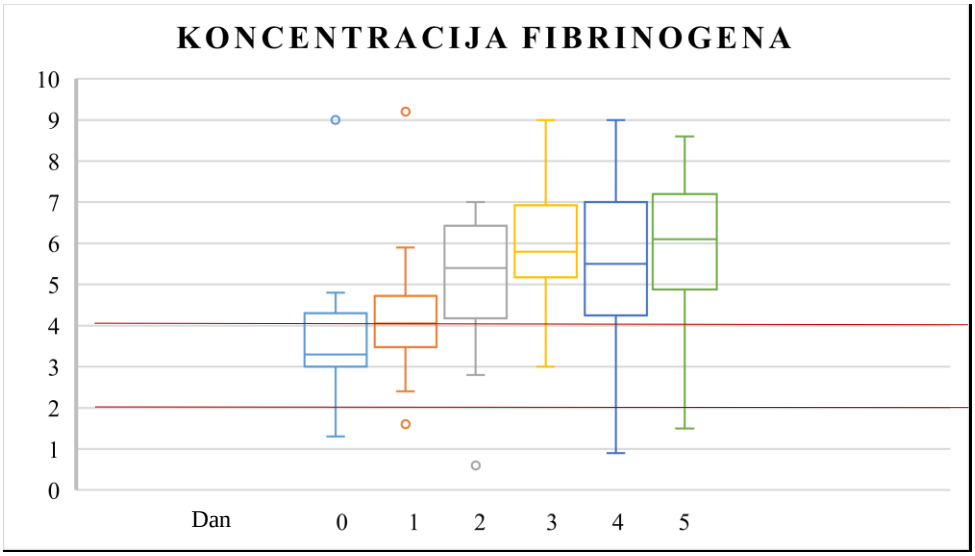


Slika 14. Dnevno kretanje broja trombocita (donja granica referentne vrijednosti je označena crvenom linijom - 150-400 x10^9/L) u svih bolesnika. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.

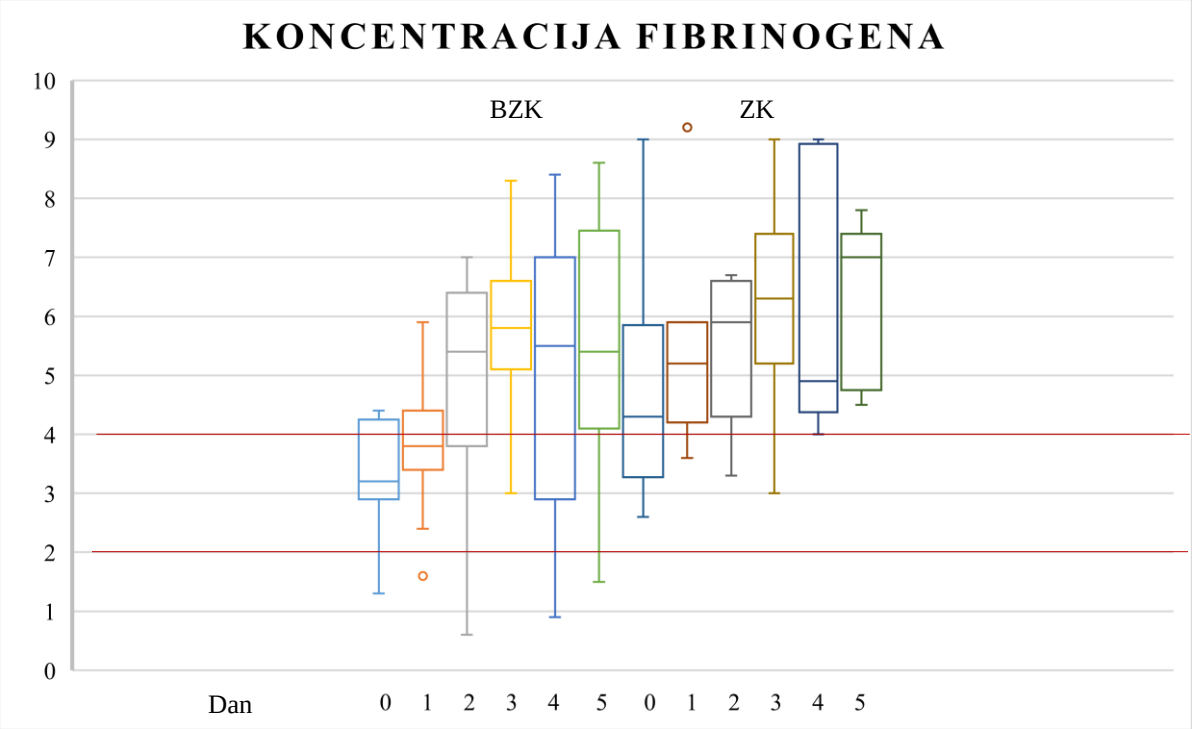


Slika 15. Usporedba dnevnog kretanja broja trombocita (donja granica referentne vrijednosti je označena crvenom linijom - 150-400 $x10^9$/L) u obje skupine bolesnika. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani. BZK = bolesnici bez značajnog krvarenja; ZK = bolesnici sa značajnim krvarenjem.

Koncentracija fibrinogena kontinuirano raste iznad referentnih vrijednosti (≥ 4 g/l) (Slika 16, 17).

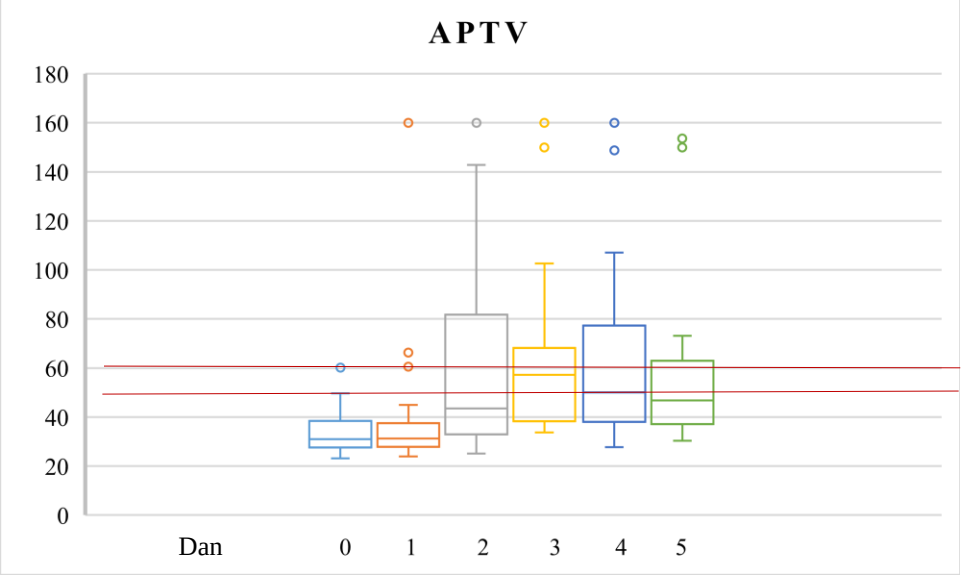


Slika 16. Dnevno kretanje koncentracije fibrinogena (referentna vrijednost je označena crvenom linijom - 2-4 g/L) u svih bolesnika. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.

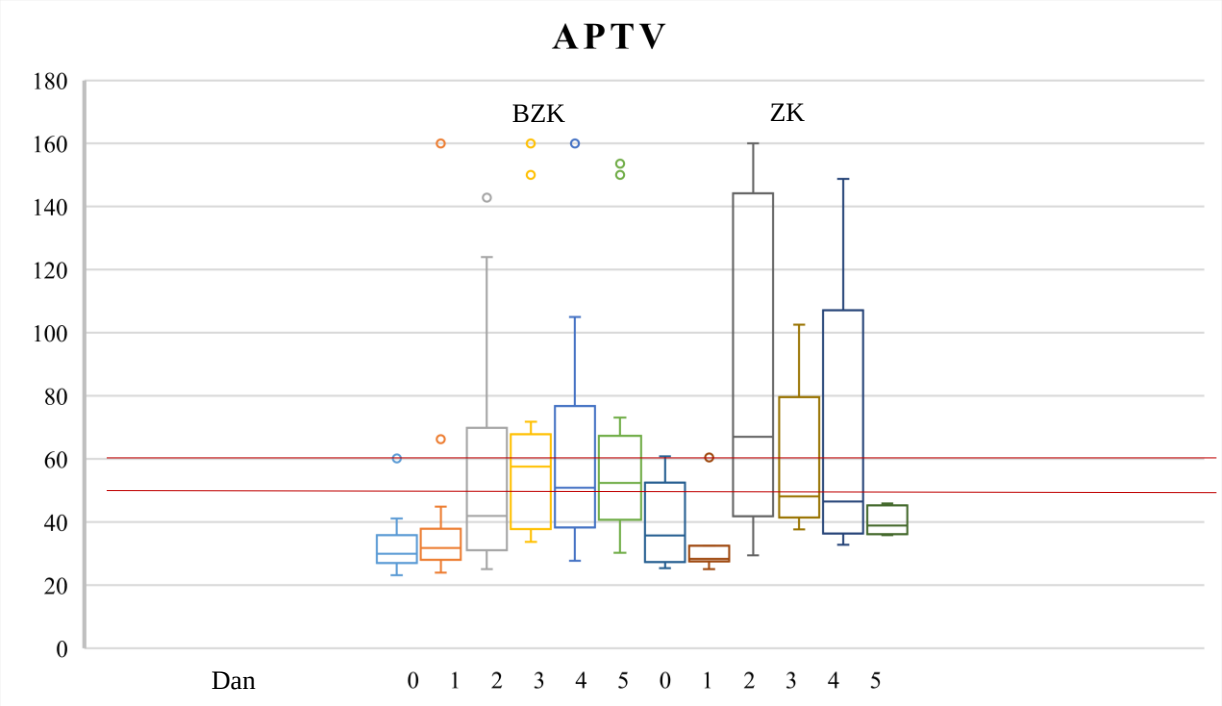


Slika 17. Usporedba dnevnog kretanja koncentracije fibrinogena (referentna vrijednost je označena crvenom linijom - 2-4 g/L) u obje skupine bolesnika. BZK = bolesnici bez značajnog krvarenja; ZK = bolesnici sa značajnim krvarenjem. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.

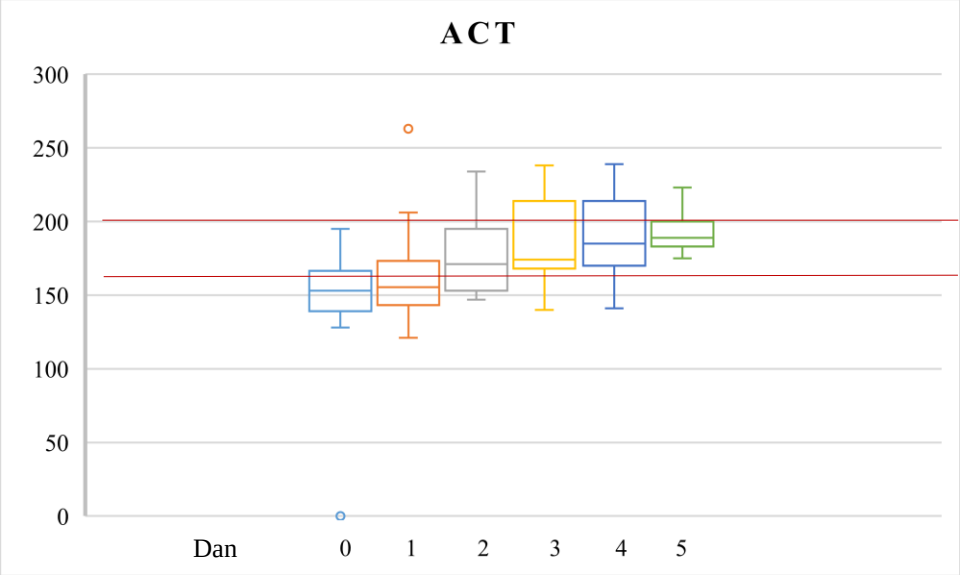
Vrijednosti APTV i ACT testova pokazuju mala odstupanja od referentnog raspona vrijednosti (Slika 18, 19, 20, 21).



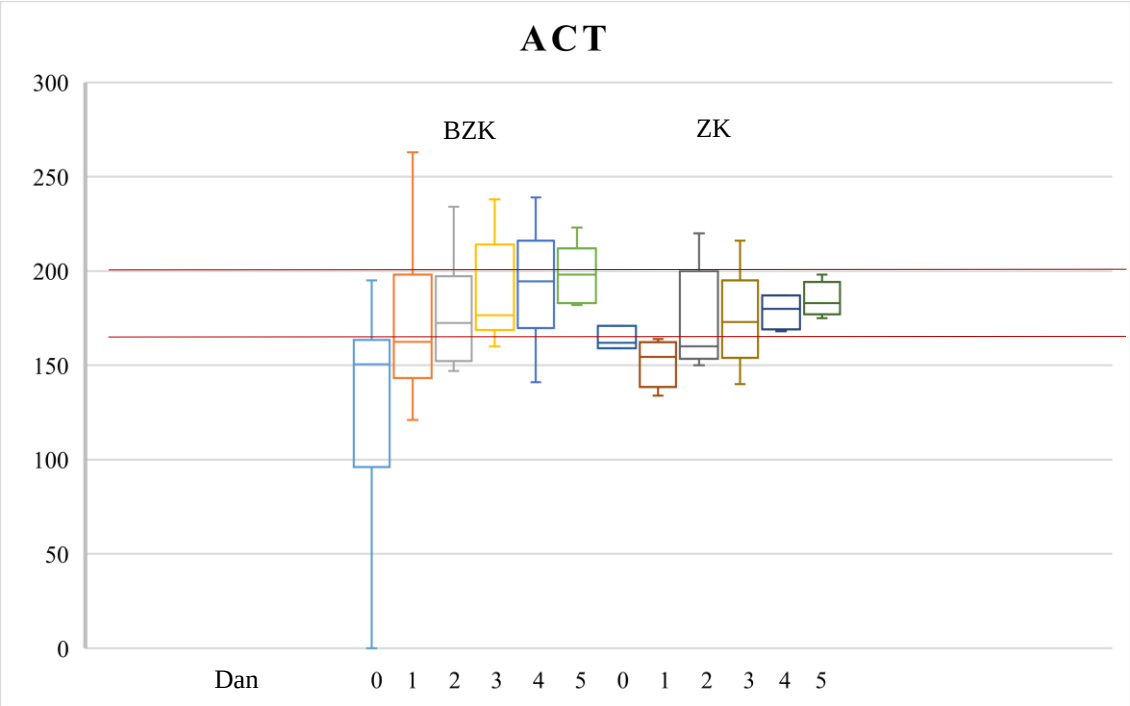
Slika 18. Dnevno kretanje APTV vrijednosti (referentna vrijednost je označena crvenom linijom - terapijska širina je 50-60 sekundi) u svih bolesnika. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.



Slika 19. Usporedba dnevnog kretanja APTV vrijednosti (referentna vrijednost je označena crvenom linijom - terapijska širina je 50-60 sekundi) u obje skupine bolesnika. BZK = bolesnici bez značajnog krvarenja; ZK = bolesnici sa značajnim krvarenjem. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.

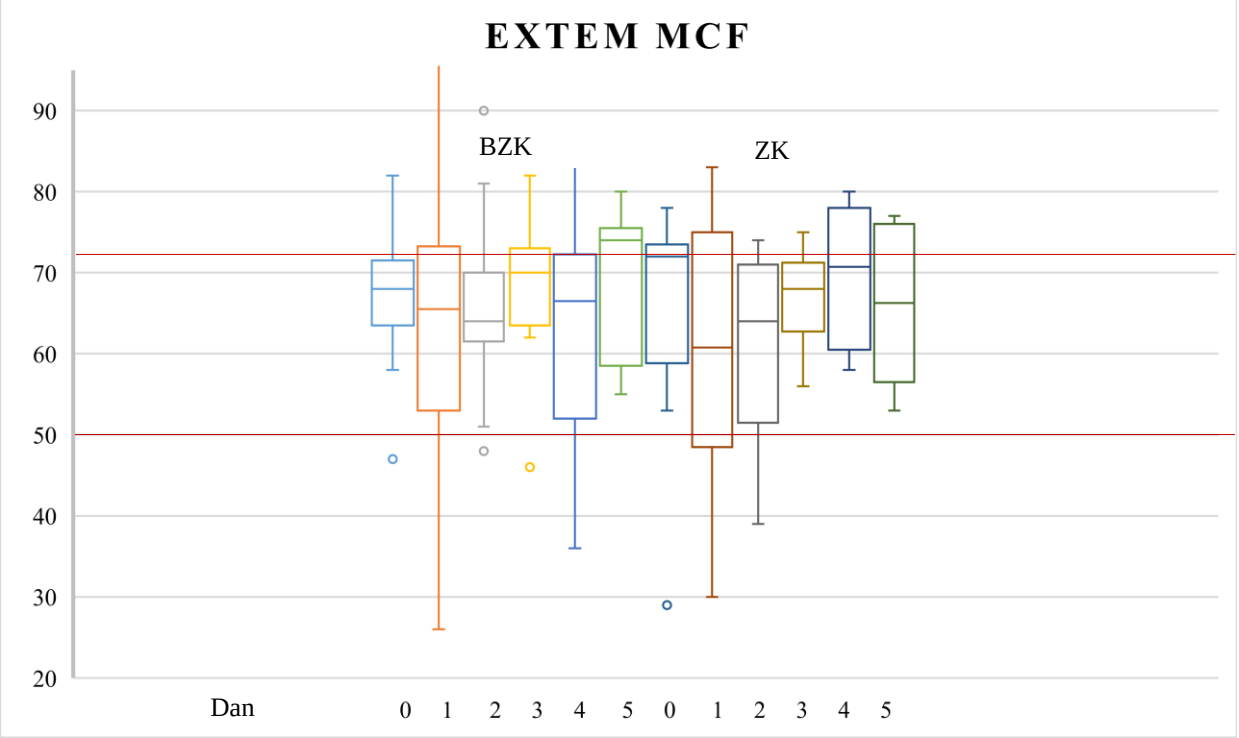


Slika 20. Dnevno kretanje ACT vrijednosti (referentna vrijednost je označena crvenom linijom - terapijska širina je 160-200 sekundi) u svih bolesnika. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.

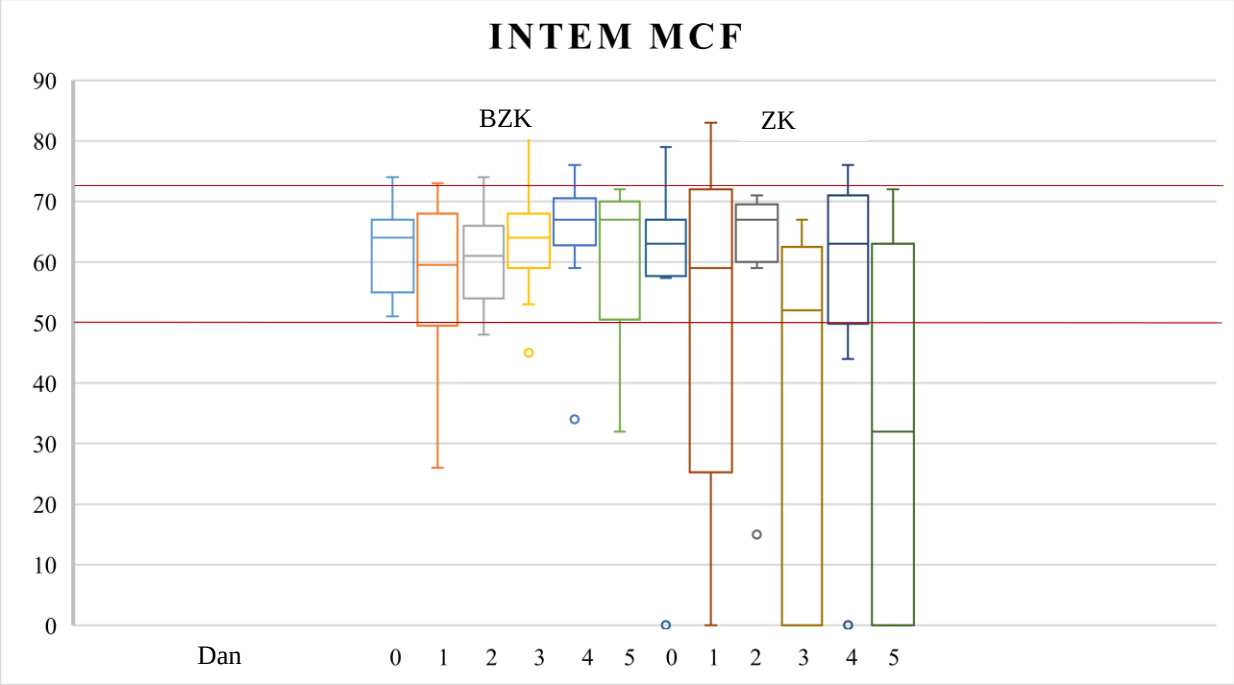


Slika 21. Usporedba dnevnog kretanja ACT vrijednosti (referentna vrijednost je označena crvenom linijom - terapijski raspon je 160-200 sekundi) u obje skupine bolesnika. BZK = bolesnici bez značajnog krvarenja; ZK = bolesnici sa značajnim krvarenjem. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.

Čvrstoća ugruška je bila očuvana tijekom cijelog trajanja ECMO/ECLS terapije uz napomenu kako su vrijednosti FIBTEM MCF testa bile blago povišene u većine bolesnika (Slike 22, 23, 33).

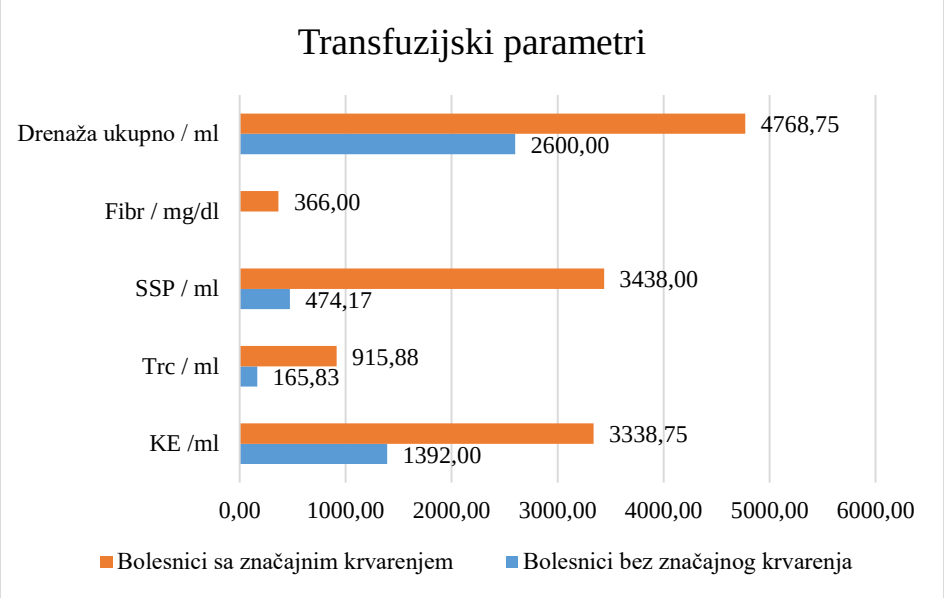


Slika 22. Usporedba dnevnog kretanja EXTEM MCF vrijednosti (referentna vrijednost je označena crvenom linijom - 50-72 mm) u obje skupine bolesnika. BZK = bolesnici bez značajnog krvarenja; ZK = bolesnici sa značajnim krvarenjem. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.



Slika 23. Usporedba dnevnog kretanja INTEM MCF vrijednosti (referentna vrijednost je označena crvenom linijom - 50-72 mm) u obje skupine bolesnika. BZK = bolesnici bez značajnog krvarenja; ZK = bolesnici sa značajnim krvarenjem. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.

Ukupna drenaža, potrošnja koncentrata eritrocita i ostalih krvnih pripravaka je bila veća u skupni bolesnika sa značajnim krvarenjem (Slika 24).



Slika 24. Ukupna potrošnja krvnih pripravaka i ukupan iznos drenaže u obje skupine bolesnika. Fibr = fibrinogen; SSP = svježe smrznuta plazma; Trc = koncentrat trombocita; KE = koncentrat eritrocita.

Povezanost broja trombocita s vrijednostima ASPI i ADP Multiplate testa je pokazana u tablici 5.

Tablica 5. Usporedba vrijednosti broja trombocita i vrijednosti ASPI i ADP testa (Spearmanov rho koeficijent korelacije).

Parametar	Postimplantacijski dan	Bolesnici sa značajnim krvarenjem	Bolesnici bez značajnog krvarenja	*p*
ASPI	0	57,1	47,6	0,482
ADP		58,8	49,6	0,365
Trombociti		189,4	154,6	0,092
ASPI	1	43,0	36,1	0,312
ADP		68,0	40,0	0,076
Trombociti		165,8	120,6	0,990
ASPI	2	55,0	38,0	0,196
ADP		69,4	42,8	0,003
Trombociti		150,8	115,6	0,079
ASPI	3	70,4	36,3	0,062
ADP		67,0	42,5	0,062
Trombociti		147,1	98,1	0,025
ASPI	4	53,4	44,0	0,470
ADP		74,7	44,8	0,142
Trombociti		150,7	84,2	0,013
ASPI	5	62,0	36,1	0,109
ADP		89,3	41,6	0,164
Trombociti		155,0	94,3	0,074

Nezavisne varijable ROTEM® testova u obje skupine bolesnika su testirane Mann-Whitney U testom (Tablica 6).

Tablica 6. Pregled izvođenih ROTEM testova u obje skupine bolesnika (nezavisne varijable su testirane Mann-Whitney U testom). PID = poslijeimplantacijski dan potpore.

Test	Parametar	PID	Bolesnici sa značajnim krvarenjem	Bolesnici bez značajnog krvarenja	*p*	Test	Parametar	PID	Bolesnici sa značajnim krvarenjem	Bolesnici bez značajnog krvarenja	*p*
INTEM	CT	0	254,3	159	0,199	HEPTEM	CT	0	231,4	203,9	0,33
	CFT		119,6	110,9	0,945		CFT		128,1	112,9	0,11
	α°		66,4	71,3	0,891		α°		65,3	69	0,188
	A10		50,4	53,1	0,63		A10		50	51,2	0,082
	A20		56,3	59,8	0,49		A20		50	54,5	0,095
	A30		57	59,8	0,25		A30		59,3	60,3	0,151
	MCF		57,4	62,3	0,49		MCF		59,3	63,5	0,238
INTEM	CT	1	178,2	173,6	0,001	HEPTEM	CT	1	205,6	183,3	0,866
	CFT		91,4	88,6	0,033		CFT		120,3	112,7	0,053
	α°		69,4	71,5	0,049		α°		62,7	66,2	0,081
	A10		45,9	49,8	0,098		A10		47,6	48,3	0,98
	A20		49,5	55,8	0,095		A20		52,2	53,1	0,119
	A30		48,7	56,7	0,104		A30		52,6	53,5	0,026
	MCF		50,5	58,1	0,178		MCF		52,5	55,1	0,098
INTEM	CT	2	218,5	289,5	0,823	HEPTEM	CT	2	183,9	178,5	0,007
	CFT		118,3	108,4	0,389		CFT		130,6	108,1	0,095
	α°		67,3	69,4	0,025		α°		64,1	70,1	0,132
	A10		58,8	51,9	0,119		A10		47	52,5	0,217

	A20		59,6	58,9	0,147		A20		51,9	56,9	0,099
	A30		57,5	59,4	0,103		A30		55,1	57,7	0,154
	MCF		67,3	60,9	0,283		MCF		58,1	60,3	0,307
INTEM	CT	3	324,8	262,2	0,182	HEPTEM	CT	3	227,8	192,5	0,446
	CFT		113,8	92,8	0,94		CFT		102,8	101,6	0,762
	α°		60	72,9	0,88		α°		61	68,9	0,762
	A10		41,1	55,5	0,762		A10		51,6	52,4	1
	A20		49,3	61,8	0,595		A20		57,4	58,6	0,008
	A30		59,5	62,6	0,645		A30		58,8	61,7	0,878
	MCF		37,9	63,4	0,446		MCF		58,2	61,4	0,446
INTEM	CT	4	355,6	226,3	0,099	HEPTEM	CT	4	190,6	183,5	0,592
	CFT		131,1	113,3	0,962		CFT		110,1	91,8	0,432
	α°		62,8	71,7	0,962		α°		65	65,5	0,536
	A10		48,3	55,6	0,887		A10		49,6	50,8	0,261
	A20		53,9	61,6	0,962		A20		54,4	54,2	0,299
	A30		53,4	61,6	1		A30		54,4	55,1	0,428
	MCF		55,6	64,3	0,601		MCF		56,5	59,4	0,299
INTEM	CT	5	303,5	280,8	0,604	HEPTEM	CT	5	265,8	153,5	0,106
	CFT		113,4	102,8	0,33		CFT		145,2	125	0,148
	α°		63,2	70	0,604		α°		57	68,2	0,503
	A10		46,4	51,3	0,503		A10		51,7	49,1	0,604
	A20		42,2	58	0,825		A20		46,5	56	0,26
	A30		48,7	59,8	0,864		A30		46	57,6	0,727
	MCF		32	60,9	1		MCF		46,4	58,4	0,94
EXTEM	CT	0	104,6	87,4	0,238	FIBTEM	CT	0	97,4	90,2	0,591
	CFT		121,9	97,9	0,214		CFT		520,2	462	0,53
	α°		71,4	72,9	0,452		α°		70,5	70,6	0,645
	A10		62,3	56,3	0,034		A10		18,3	18,7	0,19

	A20		60,7	61,9	0,04		A20		18	18,4	0,265
	A30		64	63,9	0,01		A30		18,1	20,6	0,196
	MCF		64,6	66,1	0,027		MCF		26,6	27,4	0,19
EXTEM	CT	1	72,8	66,6	0,018	FIBTEM	CT	1	110,3	100,5	0,033
	CFT		195,1	116,3	0,059		CFT		514,3	374,8	0,019
	α°		55,8	67,4	0,098		α°		63,3	70,3	0,282
	A10		47,6	50,6	0,059		A10		20,6	20,4	0,008
	A20		51	57,8	0,095		A20		22	19,2	0,178
	A30		59,7	61,3	0,048		A30		20,4	22,2	0,052
	MCF		51,6	59,2	0,098		MCF		20,4	19,7	0,231
EXTEM	CT	2	76,9	67,9	0,079	FIBTEM	CT	2	102,3	86,5	0,333
	CFT		102,6	98,6	0,307		CFT		536	465,8	0,154
	α°		74,9	72,5	0,775		α°		71,9	73,6	0,429
	A10		59,9	58,3	0,163		A10		23,5	24,1	0,621
	A20		68,9	63,2	0,132		A20		25	26,1	0,621
	A30		62,8	64,3	0,047		A30		30,1	32,6	0,413
	MCF		64,9	68,7	0,047		MCF		22,8	27	0,389
EXTEM	CT	3	86,4	73,4	0,762	FIBTEM	CT	3	84,8	78,1	0,704
	CFT		106,8	88,5	0,704		CFT		571,4	349,8	0,168
	α°		64	75,4	0,595		α°		61	73,9	0,595
	A10		51	59,6	1		A10		23,4	25,5	0,543
	A20		55,3	66	1		A20		25,2	27,2	0,649
	A30		68,8	69,4	0,878		A30		27,8	27,9	0,959
	MCF		55,8	68,5	0,704		MCF		34	32,3	0,446
EXTEM	CT	4	90,5	83	0,017	FIBTEM	CT	4	74,4	69,9	0,384
	CFT		167,4	114,3	0,536		CFT		787,4	352,8	1
	α°		64,3	68,2	0,711		α°		67,3	74,1	0,669
	A10		55,3	55,2	0,196		A10		25,5	25,6	0,384

	A20		59,8	59,3	0,227		A20		27,3	27,2	0,34
	A30		60,4	63,8	0,263		A30		25,5	25,1	0,263
	MCF		60,8	62,8	0,384		MCF		28,4	31,7	0,34
EXTEM	CT	5	91	73,9	0,05	FIBTEM	CT	5	71,1	67,8	0,034
	CFT		129,6	123,6	0,604		CFT		378	196,9	0,63
	α°		49,3	73,8	0,825		α°		58,2	74,6	0,825
	A10		48,6	57,4	0,604		A10		27	28,3	0,71
	A20		52,6	64,9	0,604		A20		28,3	30,4	0,71
	A30		52,8	63,9	0,482		A30		25,5	30,9	0,864
	MCF		53	68,6	0,825		MCF		25,4	31,2	0,71

Konvencionalni rutinski upotrebljavani testovi funkcije koagulacije (APTV i ACT) i koncentracija fibrinogena su uspoređeni s rezultatima testova impedancijske agregometrije trombocita uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije Spearmanovim rho koeficijentom korelacije.

Kako bi se usporedile demografske, laboratorijske i operacijske varijable s pojavom krvarenja, te se odredio njihov odds ratio, učinjena je binarna logistička regresija s pojavom krvarenja kao binarnim ishodom (0 = nije bilo značajnog krvarenja, 1 = bilo je značajnog krvarenja).

Kako bi se procjenila povezanost testova impedancijske agregometrije uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije s krvarenjem, provedena je Coxova multivarijatna regresija koristeći pojavu krvarenja kao mjereni događaj, uz opciju backward conditional analize.

ROC analiza (engl. Reciever Operating Curve) je izvedena u slučajevima signifikantnih korelacija testova impedancijske agregometrije uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije s krvarenjem.

ROC analiza je učinjena koristeći prosječnu vrijednost petodnevnog mjerenja podataka s ciljem identifikacije vrijednosti parametara impedancijske agregometrije uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije koji određuju sklonost ekscesivnom krvarenju. Pomoću Youdenovog J indeksa je pokazano područje ispod krivulje (engl. Area Under Curve; AUC) s graničnom vrijednošću > 0,7 da bi se test smatrao statistički značajnim. Ukoliko jest, određena je granična vrijednost područja najveće osjetljivosti i specifičnosti za svaki analizirani test, zasebno.

Youden J indeks se izračunava kao osjetljivost + specifičnost – 1 i mjera je pouzdanosti dihotomnog dijagnostičkog testa. Potom su vrijednosti kontinuirane varijable pojedinog testa pretvorene u kategoričke; ukoliko je vrijednost testa u uzorku ispitanika bila manja od vrijednosti Youden J indeksa, pretvorena je u kategoričku varijablu s vrijednošću 0. Ako je bila veća ili jednaka vrijednosti Youden J indeksa, pretvorena je u kategoričku varijablu s vrijednošću 1. Povezanost vrijednosti testa, kao kategoričke varijable, s krvarenjem analizirana je Mantel-Cox log rank testom i prikazana funkcijom hazarda.

Spearmanov rho koeficijent korelacije nije pokazao statistički značajne povezanosti između konvencionalnih testova funkcije koagulacije (APTV i ACT) u odnosu na rezultate testova rotacijske tromboelastometrije, osim u testu INTEM CT (Tablica 7). Također nije pokazana statistički značajna povezanost između testova impedancijske agregometrije trombocita i broja trombocita (Tablica 8). S druge strane, pokazana je jaka korelacija gotovo svih testova rotacijske tromboelastometrije i koncentracije fibrinogena (Tablica 9).

Tablica 7. Prikaz testiranja povezanosti testova APTV i ACT međusobno i u odnosu na testove ROTEM®.

Spearmanov koeficijent korelacije rho		ACTtotal	APTVtotal
ACT	Koeficijent koelacije		.483
	p		.036
APTV	Koeficijent koelacije	.483	
	p	.036	

INTEM CT	Koeficijent koelacije	.429	.554
	p	.067	.002
INTEM alpha	Koeficijent koelacije	-.229	-.072
	p	.345	.717
INTEM A10	Koeficijent koelacije	-.141	.005
	p	.564	.980
INTEM A20	Koeficijent koelacije	-.184	.013
	p	.451	.946
INTEM A30	Koeficijent koelacije	-.124	-.058
	p	.661	.787
INTEM CFT	Koeficijent koelacije	.054	-.044
	p	.825	.825
INTEM MCF	Koeficijent koelacije	-.126	.065
	p	.607	.742
HEPTEM CT	Koeficijent koelacije	.117	.027
	p	.634	.890
HEPTEM CFT	Koeficijent koelacije	.032	-.053
	p	.895	.788
HEPTEM	Koeficijent koelacije	.011	.125

alpha	*p*	.963	.525
HEPTEM A10	Koeficijent koelacije	-.072	.053
	p	.768	.787
HEPTEM A20	Koeficijent koelacije	-.048	.057
	p	.845	.773
HEPTEM A30	Koeficijent koelacije	.004	.079
	p	.987	.714
HEPTEM MCF	Koeficijent koelacije	.051	.107
	p	.834	.589

Tablica 8. Usporedba vrijednosti broja trombocita i vrijednosti ADP i ASPI testa impedancijske agregometrije trombocita.

Spearmanov rho koeficijent korelacije		ASPI	ADP
Broj trombocita	Koeficijent korelacije	.085	.118
	p	.674	.557

Tablica 9. Prikaz testiranja povezanosti koncentracije fibrinogena u odnosu na testove ROTEM®.

Spearmanov koeficijent korelacije rho	Fibrinogen

FIBTEM CT	Koeficijent koelacije	-.067
	p	.734
FIBTEM CFT	Koeficijent koelacije	-.568**
	p	.002
FIBTEM alpha	Koeficijent koelacije	.531**
	p	.004
FIBTEM A10	Koeficijent koelacije	.598**
	p	.001
FIBTEM A20	Koeficijent koelacije	.611**
	p	.001
FIBTEM A30	Koeficijent koelacije	.608**
	p	.002
FIBTEM MCF	Koeficijent koelacije	.434*
	p	.021

Binarna logistička regresija je identificirala ostavljanje medijastinuma nakon operacije otvorenim (p = 0,046, odds ratio 4,000), transfuziju koncentrata eritrocita (p = 0,001, odds ratio 11,631),

transfuziju koncentrata trombocita (p = 0,020, odds ratio 5,449), razinu prijeimplantacijskih laktata (p = 0,028, odds ratio 1,57) i transfuziju svježe smrznute plazme (p = 0,002, odds ratio 9,210) kao pozitivne prediktore značajnog krvarenja (Tablica 10).

Tablica 10. Prediktori značajnog krvarenja identificirani binarnom logističkom regresijom.

Demografske, laboratorijske i operacijske varijable	**Omjer rizika**	***p***
Dob	.403	.526
Ejekcijska frakcija	1.156	.282
Medijastinum ostavljen otvoren nakon operacije	4.000	0.046
Spol	.067	.795
Dani ventilacije	1.654	.198
Prijeimplantacijski laktati	1.57	0.028
Transfuzija koncentrata eritrocita	11.631	0.001
Transfuzija koncentrata trombocita	5.449	0.020
Transfuzija svježe smrznute plazme	9.210	0.002
Ukupna drenaža	1.929	0.165

Testovi koji su Coxovom regresijom značajno povezani s povećanim rizikom značajnog krvarenja tijekom prvih pet dana postimplantacijskog perioda su INTEM CT test (p = 0,002), EXTEM CT test (p = 0,018) i FIBTEM MCF test (p = 0,028).

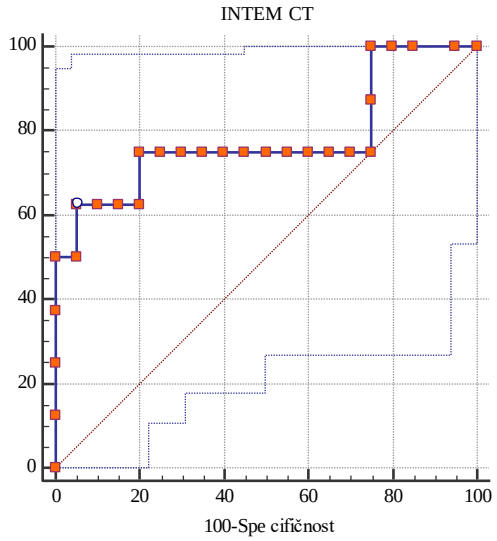
Uz njih su specifično za drugi postimplantacijski dan s krvarenjem povezani INTEM alpha test (p = 0,009), INTEM A10 (p = 0,032), INTEM A30 (p = 0,013), INTEM MCF (p = 0,009), FIBTEM CFT (p = 0,026) i HEPTEM CFT (p = 0,002).

INTEM MCF, INTEM A10 2. postimplantacijski dan, INTEM A30 2. postimplantacijski dan i INTEM MCF 2. postoperativni dan, FIBTEM CFT i HEPTEM CFT nisu pokazali statistički značajnu povezanost s krvarenjem nakon ROC analize, iako su imali AUC > 0,7 te su bili blizu granice statističke značajnosti.

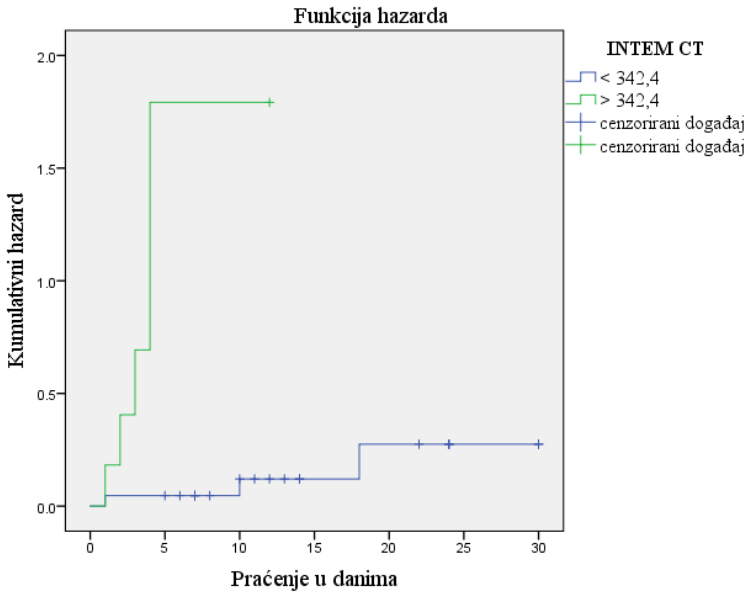
Vrijednosti ADP, ASPI, APTV i ACT testova nisu statistički značajno povezane s rizikom od značajnog krvarenja nakon analize Coxovom regresijom ($p > 0,05$).

INTEM CT

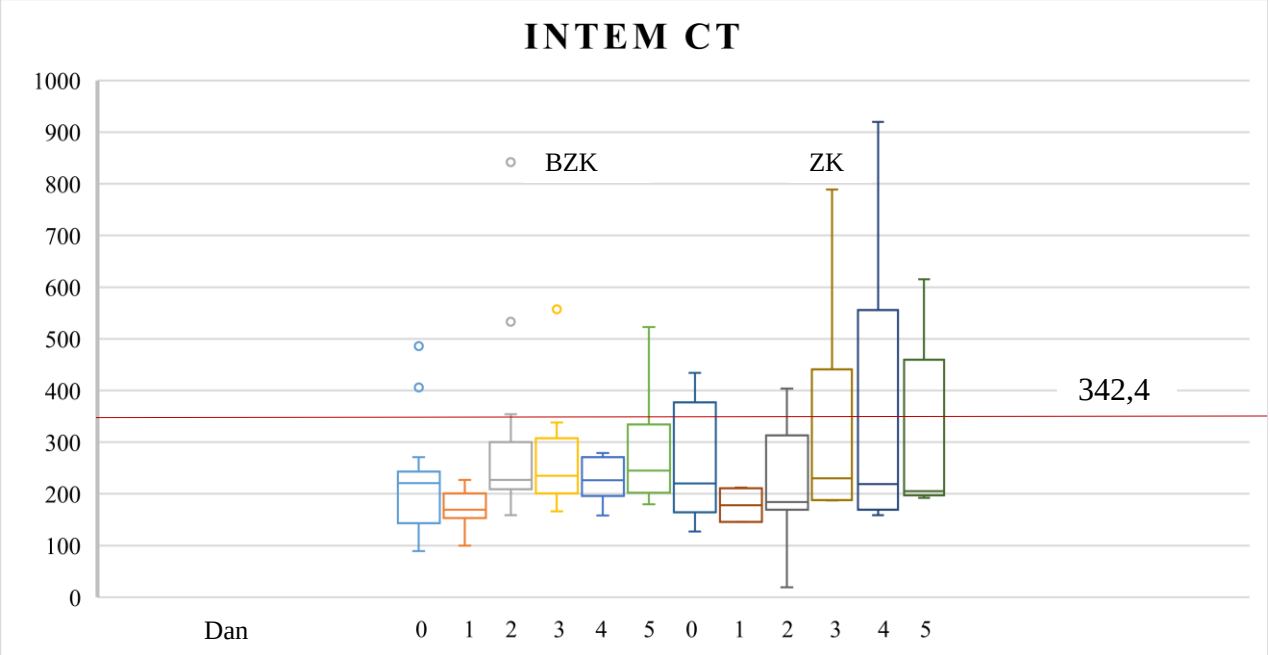
Vrijednosti INTEM CT testa su po danima najpouzdanije korelirale s rizikom krvarenja. Vrijednosti su Coxovom regresijom povezane s krvarenjem na dan implantacije ($p = 0,021$), drugi postimplantacijski dan ($p = 0.001$), treći postimplantacijski dan ($p = 0,023$) i četvrti postimplantacijski dan ($p = 0,027$). Potom je učinjena ROC analiza kojom je dobivena gornja granična vrijednost testa. Vrijednosti iznad gornje granične vrijednosti su označene kao 1, a one ispod gornje granične vrijednosti kao 0 (Slika 25). Potom je vrijednost testova korelirana s rizikom krvarenja kako bi se dobio omjer hazarda (Mantel-Cox log rank test) (Slika 26). Pozitivna prediktivna vrijednost je 82,94 % (CI 95 % 35,12-99,56 %), a negativna prediktivna vrijednost je 86,7 % (CI 95 % 65,6-97,23 %) (Tablica 11). Vrijednosti INTEM CT testa su u većine bolesnika bile unutar raspona referentnih vrijednosti, a 342,4 je identificirana kao gornja granična vrijednost za pojavu značajnog krvarenja. Pomoću dijagrama pravokutnika (”box and whisker plot”) opisano je dnevno kretanje vrijednosti (Slika 27).



Slika 25. ROC krivulja INTEM CT testa, AUC 0,781, *p* = 0,022, Youden J indeks 0,5750 (> 342,4, osjetljivost 62,5 %, CI 24,5-91,5 %, specifičnost 95 %, CI 75,1-99,9 %).



Slika 26. Mantel-Cox log rank test nakon konverzije u kategoričke varijable pokazuje statistički značajnu povezanost s krvarenjem pacijenata (*p* = 0,002, omjer hazarda 14,89).



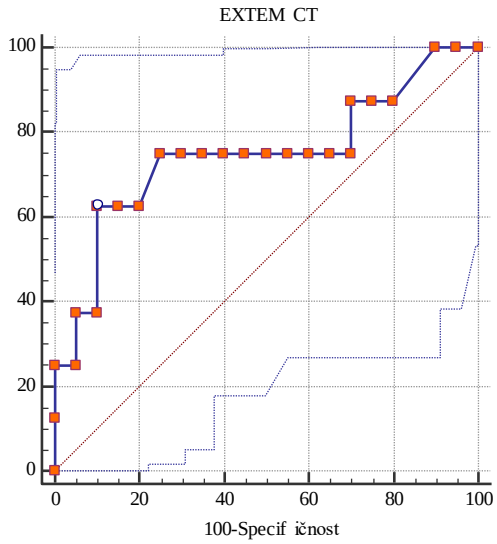
Slika 27. Usporedba dnevnog kretanja INTEM CT analize (referentna vrijednost je 100-240 s) u obje skupine bolesnika. Gornja granična vrijednost za pojavu značajnog krvarenja je označena crvenom linijom = 342,4. BZK = bolesnici bez značajnog krvarenja; ZK = bolesnici sa značajnim krvarenjem. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.

Tablica 11. Pozitivna i negativna prediktivna vrijednost testa.

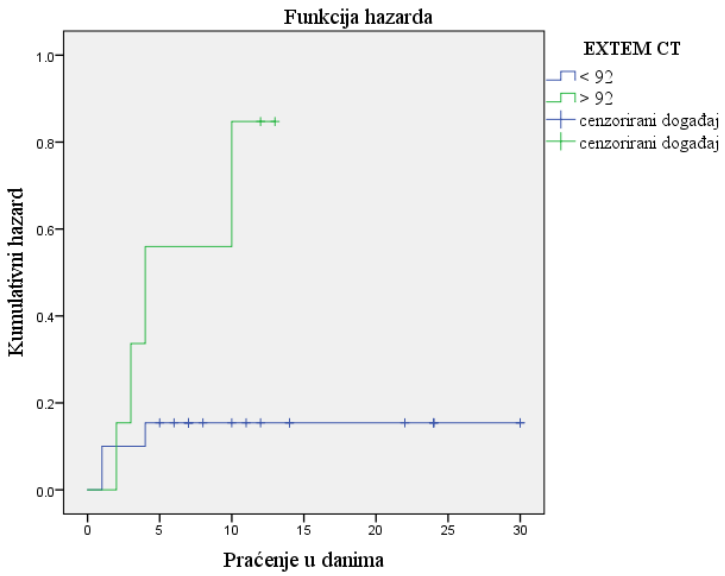
Pozitivna prediktivna vrijednost (%)	82,94
95 % CI	35,12 - 99,56
Negativna prediktivna vrijednost (%)	86,7
95 % CI	65,55 - 97,23

EXTEM CT

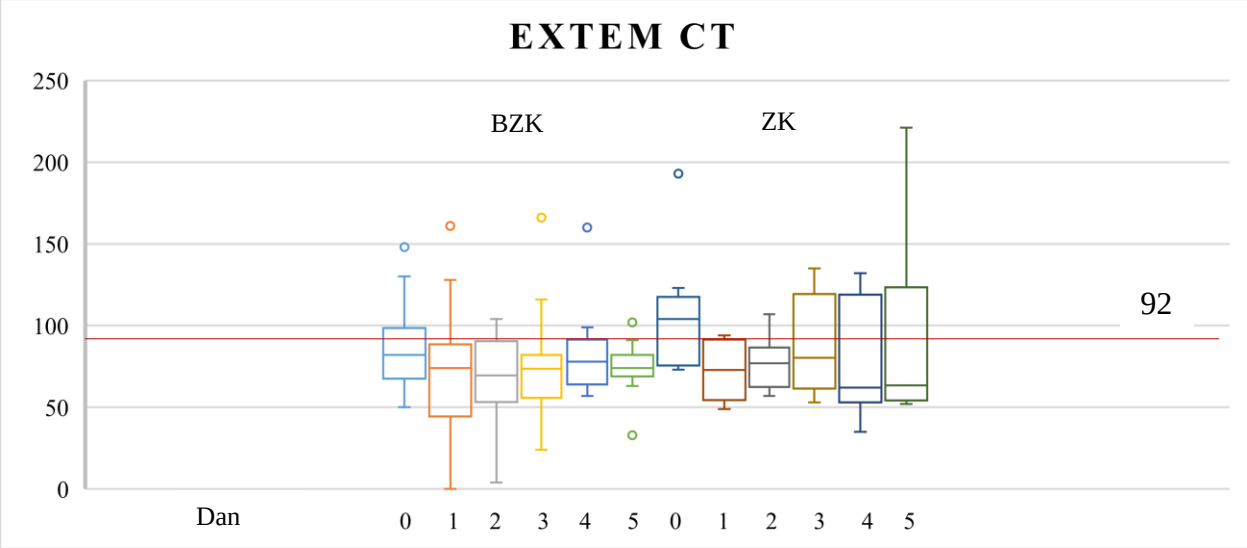
Vrijednosti EXTEM CT testa su dobro korelirale s rizikom krvarenja prva dva postimplantacijska dana. Vrijednosti su Coxovom regresijom povezane s krvarenjem prvi postimplantacijski dan (p = 0,049) te drugi postimplantacijski dan (p = 0,007). Potom je učinjena ROC analiza kojom je dobivena gornja granična vrijednost testa. Vrijednosti iznad gornje granične vrijednosti su označene kao 1, a one ispod gornje granične vrijednosti kao 0 (Slika 28). Potom je vrijednost testova korelirana s rizikom krvarenja kako bi se dobio omjer hazarda (Mantel-Cox log rank test) (Slika 29). Pozitivna prediktivna vrijednost je 70,9 % (CI 95 % 28,32-96,2 %), a negativna prediktivna vrijednost je 86,1 % (CI 95 % 64,13-97,09 %) (Tablica 12). Vrijednosti EXTEM CT testa su u većine bolesnika bile unutar raspona referentnih vrijednosti, a 92 je identificirana kao granična vrijednost za pojavu značajnog krvarenja. Pomoću dijagrama pravokutnika (”box and whisker plot”) opisano je dnevno kretanje vrijednosti (Slika 30).



Slika 28. ROC krivulja EXTEM CT testa, AUC 0,747, p = 0,0475, Youden J indeks 0,525 (> 92, osjetljivost 62,5 %, CI 24,5-91,5 %, specifičnost 90 %, CI 68,3-98,8 %).



Slika 29. Mantel-Cox log rank test nakon konverzije u kategoričke varijable pokazuje statistički značajnu povezanost s krvarenjem pacijenata (p = 0,018, hazard ratio 5,724).



Slika 30. Usporedba dnevnog kretanja EXTEM CT analize (referentna vrijednost je 38-79 s) u obje skupine bolesnika. Gornja granična vrijednost za pojavu značajnog krvarenja je označena crvenom linijom = 92. BZK = bolesnici bez značajnog krvarenja; ZK = bolesnici sa značajnim krvarenjem. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.

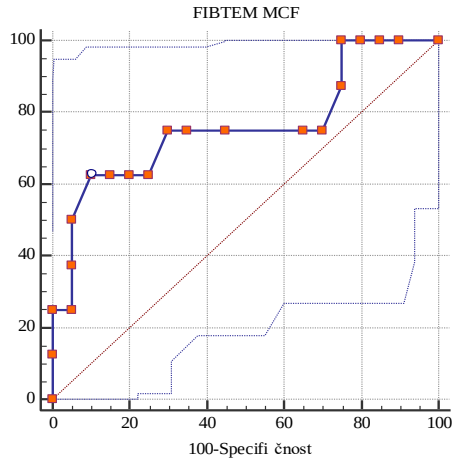
Tablica 12. Pozitivna i negativna prediktivna vrijednost testa

Pozitivna prediktivna vrijednost (%)	70,9
95 % CI	28,3 – 96,2
Negativna prediktivna vrijednost (%)	86,1
95 % CI	64,1 - 97,09

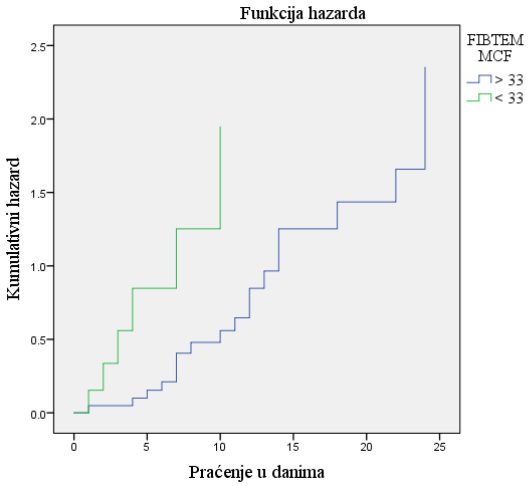
FIBTEM MCF

Vrijednosti FIBTEM MCF testa su snažno povezane s rizikom krvarenja svih pet dana postimplantacijskog praćenja. Vrijednosti su Coxovom regresijom povezane s krvarenjem (p = 0,031). Potom je učinjena ROC analiza kojom je dobivena granična vrijednost testa. Vrijednosti iznad gornje granične vrijednosti su označene kao 1, a one ispod gornje granične vrijednosti kao 0 (Slika 31). Potom je vrijednost testova korelirana s rizikom krvarenja kako bi se dobio omjer hazarda (Mantel-Cox log rank test) (Slika 32). Pozitivna prediktivna vrijednost je 59,32 % (CI 95 % 25,6-87,5 %), a negativna prediktivna vrijednost je 89,2 % (CI 95 % 65,7-98,7 %) (Tablica 13).

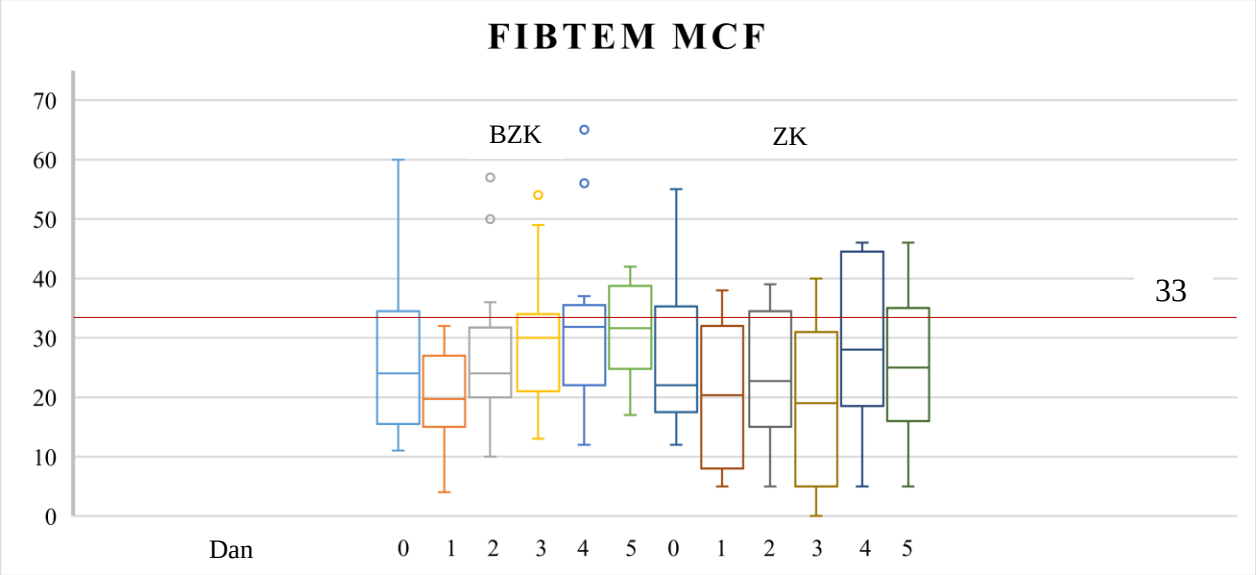
Vrijednosti FIBTEM MCF testa su u većine bolesnika bile uz gornju granicu raspona referentnih vrijednosti, ili pak povišene, a 33 je identificirana kao gornja granična vrijednost za pojavu značajnog krvarenja. Pomoću dijagrama pravokutnika (”box and whisker plot”) opisano je dnevno kretanje vrijednosti (Slika 33).



Slika 31. ROC krivulja FIBTEM MCF testa, AUC 0,759, *p* = 0,0307, Youden J indeks 0,525 (> 33, osjetljivost 62,5 %, CI 24,5-91,5 %, specifičnost 90 %, CI 68,3-98,8 %).



Slika 32. Mantel-Cox log rank test nakon konverzije u kategoričke varijable pokazuje statistički značajnu povezanost s krvarenjem pacijenata (*p* = 0,031, hazard ratio 3,048).



Slika 33. Usporedba dnevnog kretanja FIBTEM MCF analize (referentna vrijednost je 9-25 mm) u obje skupine bolesnika. Gornja granična vrijednost za pojavu značajnog krvarenja je označena crvenom linijom = 33. BZK = bolesnici bez značajnog krvarenja; ZK = bolesnici sa značajnim krvarenjem. Na apscisi su brojčano označeni poslijeimplantacijski dani.

Tablica 13. Pozitivna i negativna prediktivna vrijednost testa

Pozitivna prediktivna vrijednost (%)	70,85
95 % CI	28,3 – 96,0
Negativna prediktivna vrijednost (%)	86,1
95 % CI	64,1 – 97,0

Učinjena je usporedba omjera i razlike INTEM CT i HEPTEM CT testa s vrijednostima ACT testa. Nije pokazana statistički značajna povezanost (Tablica 14).

Tablica 14. Usporedba vrijednosti ACT testa s omjerom i razlikom INTEM CT i HEPTEM CT testova.

Spearmanov koeficijent korelacije rho		ACT	Omjer INTEM CT i HEPTEM CT	Razlika INTEM CT i HEPTEM CT
ACT	Koeficijent korelacije	1.000	.330	.339
	p		.167	.155
	N	19	19	19
Omjer INTEM CT i HEPTEM CT	Koeficijent korelacije	.330	1.000	.999
	p	.167		.000
	N	19	28	28
Razlika INTEM CT i HEPTEM CT	Koeficijent korelacije	.339	.999	1.000
	p	.155	.000	
	N	19	28	28

6. Rasprava

6.1. Rezultati provedenog istraživanja

Temeljni rezultati ovog istraživanja mogu se podijeliti u četiri skupine:

1. podaci dobiveni ovim istraživanjem pokazuju da je značajno krvarenje moguće predvidjeti određenim testovima ROTEM® analize;

2. nije dokazana statistički značajna povezanost između konvencionalnih testova funkcije koagulacije (APTV i ACT) međusobno i u odnosu na rezultate testova impedancijske agregometrije uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije;

3. pokazana je jaka korelacija gotovo svih testova impedancijske agregometrije uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije i koncentracije fibrinogena;

4. unatoč korelaciji gotovo svih testova impedancijske agregometrije uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije i koncentracije fibrinogena ona se nije pokazala kao nezavisni prediktor krvarenja.

Ispitivanu skupinu našeg istraživanja predstavlja kohorta kompleksnih bolesnika. Dio njih je već izložen kardiokirurškoj operaciji, opetovanim transfuzijama krvi i krvnih pripravaka, određenom stupnju zatajenja perifernih organa poput jetre i posljedičnom nedostatku dovoljne sinteze čimbenika zgrušavanja. Dio tih bolesnika je u neposrednom postoperativnom tijeku hipokoagulabilan zbog potrošnje čimbenika zgrušavanja tijekom i nakon operativnog zahvata radi izlaganja krvi stranim površinama cijevi sistema za izvantjelesni krvotok i rezidualnog djelovanja

sistemske primjene heparina kao i poremećaja funkcije trombocita. Na to sve dodatno utječe hemodilucija i hipotermija. Ovaj splet poremećaja zgrušavanja podrazumijeva i incidente kirurškog krvarenja. Sve to čini circulus vitiosus koji vodi ka sekundarnom poremećaju zgrušavanja.

Značajno krvarenje je prema ELSO kriterijima opisano kao krvarenje praćeno padom koncentracije hemoglobina od najmanje 20 g/L u periodu od 24 h, odnosno krvarenje više od 20 ml/kg u periodu od 24 h ili potreba za jednokratnom li višekratnom nadoknadom 10 ml/kg koncentrata eritrocita u 24 h. U istu kategoriju spada i retroperitonealno, plućno ili intrakranijsko krvarenje odnosno svako krvarenje za koje je učinjena kirurška intervencija. Ukoliko bolesnik nekoliko uzastopnih dana ima isti primarni izvor krvarenja, oni se promatraju kao ista epizoda krvarenja. Ukoliko bolesnik ima više od jedne epizode krvarenja isti dan, to se također bilježi. Važno je razlikovati intenzitet krvarenja jer je krvarenje i nadoknada krvnih pripravaka povezana sa većom smrtnošću u ECMO/ECLS bolesnika (45).

Uspoređivali smo samo značajno krvarenje jer je to događaj koji zahtjeva promptnu intervenciju. Intervencija moze obuhvaćati kiruršku intervenciju ili korekciju koagulacijskog statusa pripravcima koncentrata eritrocita. Svaka intervencija podrazumijeva značajnu promjenu koagulacijskog statusa i moze biti pokretačem novog patofiziološkog obrasca reagiranja ukoliko nije pravodobna i primjerenog opsega. I stoga je važno u složenim uvjetima korekcije koagulacijskog statusa ograničiti broj i vrstu intervencija samo na one koje u značajnoj mjeri utječu na ishod.

U ovom istraživanju najčešće opisano krvarenje je bilo kirurško krvarenje i krvarenje s mjesta postavljanja kanila. Nije bilo epizoda intrakranijskog krvarenja. U našoj skupini bolesnika značajno je krvarilo 8/28 (28%) bolesnika. Nije zabilježeno tromboembolijskih incidenata. Broj

krvarećih epizoda po bolesniku je iznosio 1,38. Tri bolesnika su imala 2 epizode krvarenja, a pet bolesnika jednu epizodu krvarenja. Nije nađeno statistički značajne povezanosti između vaskularnih pristupa i pojavnosti značajnog krvarenja. Najviše je krvarećih epizoda bilo prvi i drugi dan.

Broj pacijenata je usporediv s do sada objavljenim klinički relevantnim radovima koji su imali slične brojeve i frekvenciju uzorkovanja.

Ukupna drenaža, potrošnja koncentrata eritrocita i ostalih krvnih pripravaka je bila veća u skupni bolesnika sa značajnim krvarenjem.

U studiji na ECMO i VAD populaciji bolesnika koja je za cilj imala okarakterizirati poremećaje koagulacije koji povećavaju rizik od krvarenja, tromboze ili smrti nedugo nakon implantacije opisano je da hipokoagulacija potvrđena ROTEM® analizom uspješno predviđa značajno poslijeimplantacijsko krvarenje (48). Kao i u našem radu, tako i u navedenom radu rezultati Multiplate® testova nisu imali statistički značajnih poveznica sa krvarenjem, trombozom i preživljenjem (48). Analizirajući ECMO i VAD bolesnike zajedno, dokazano je da su niske vrijednosti MCF EXTEM i FIBTEM testa značajno povezane s značajnim krvarenjem.

Na osnovu MCF vrijednosti FIBTEM testa (u kombinaciji sa MCF EXTEM) moguće je diferencirati relativnu ulogu fibrinogena u procesu nastanka krvnoga ugruška. U našem istraživanju dokazana je jaka korelacija gotovo svih testova impedancijske agregometrije uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije i koncentracije fibrinogena. Tvornički zadan ciljni raspon vrijednosti MCF FIBTEM testa iznosi 9-25 mm. U navedenom istraživanju medijan vrijednosti u obje skupine bolesnika (bolesnika sa i bez zabilježene značajne epizode krvarenja) je bio niži nego u našem istraživanju. Iako u našem istraživanju postoji jaka korelacija gotovo svih

testova impedancijske agregometrije uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije i koncentracije fibrinogena, potonja se nije pokazala kao nezavisni prediktor krvarenja. Ovaj posljednji nalaz podudara se sa rezultatima nekoliko studija koje potvrđuju ovu povezanost u svim izvedenim testovima (EXTEM, INTEM, FIBTEM, HEPTEM) i sa svim parametrima osim CT (49, 50). Ova povezanost je posebno naglašena u parametrima A i MCF.

Tumačenje ovako značajne usklađenosti koncentracije fibrinogena i provedenih testova proizlazi iz njegove funkcije. Stvaranje fibrina je završni rezultat sekundarnog mehanizma hemostaze putem dva načina aktivacije; kontaktnom aktivacijom i pomoću tkivnog faktora. ROTEM® proučava oba puta zgrušavanja. Većina je čimbenika zgrušavanja prisutna u plazmi kao inaktivni proenzim serinskih proteaza. Čimbenik s najvećom koncentracijom u plazmi je fibrinogen, 2-4 g/L. Križno povezivanje fibrina nastaje nizom katalitičkih reakcija koje uključuju proenzime serinskih proteaza i njihove aktivirane glikoproteinske kofaktore. Glavna uloga trombina jest pretvorba fibrinogena u fibrin. Fibrinogen je također i reaktant upalne faze i stoga su njegove vrijednosti često iznad normalnih vrijednosti u kritičnih bolesnika, kao što je slučaj sa našom populacijom. Koncentracija fibrinogena kontinuirano raste iznad referentnih vrijednosti tijekom trajanja terapije. Predložena je i mogućnost da je smanjena stopa pojavnosti krvarenja posljedica uloge fibrinogena u GpIIb/IIIa navođenoj agregaciji trombocita (51, 52). S kliničkog stajališta, može se zaključiti da terapija koncentratom fibrinogena može nadići poremećaj funkcije trombocita u prevenciji krvarenja.

Prema rezultatima već objavljenih istraživanja, koncentrat fibrinogena povećava vrijednosti FIBTEM A10 i MCF u većini bolesnika. Nasuprot tome, zabilježeni porast vrijednosti FIBTEM A10 i MCF ne korelira s značajnim povišenjem vrijednosti INTEM i EXTEM A10 ili MCF. Čvrstoća ugruška ovisi o interakciji aktiviranih trombocita, oblikovanju fibrinske mreže i

aktiviranom čimbeniku XIII. Objašnjenje opisanog nalaza se može pronaći u hipotezi da manjak jednog od navedenih čimbenika biva nadoknađen suviškom drugog. Nakon značajnog krvarenja, i fibrinogen i broj trombocita se smanjuju, dovodeći do smanjenja amplitude koja odražava zgrušavanje odnosno čvrstoću ugruška. Kao što je navedeno, dodavanje koncentrata fibrinogena rezultira povećanjem FIBTEM A10 i MCF vrijednosti, dok se vrijednosti EXTEM i INTEM A10 i MCF ne mijenjaju. Nepromijenjena visina amplitude zgrušavanja EXTEM testa nakon dodavanja koncentrata fibrinogena može biti rezultat aktualnog gubitka krvi i potrošnje u trajućem mehanizmu kompenzacije hemostaze. Trombociti su predominantna komponenta amplitude EXTEM testa. Ako se amplituda zgrušavanja FIBTEM testa poveća nakon dodavanja koncentrata fibrinogena, dok vrijednost amplitude zgrušavanja EXTEM testa ostaje nepromijenjena, nalaz govori u prilog značajnom smanjenju broja i/ili funkcije trombocita. Nadalje, ovaj nalaz snažno sugerira kako dodavanje koncentrata fibrinogena može kompenzirati amplitudu zgrušavanja kod smanjenja broja trombocita (53).

Najčešći uzrok poremećaja zgrušavanja koji je prisutan tijekom izlaganja elemenata krvi ECMO/ECLS sustavu je svakako poremećaj funkcije trombocita kao što je vidljivo i iz naših rezultata (54, 55). Od trenutka započinjanja ECMO/ECLS potpore bilježi se umjeren pad broja trombocita do vrijednosti ispod referentnih vrijednosti.

Stupanj poremećaja funkcije trombocita proporcionalan je trajanju izloženosti izvantjelesnom krvotoku, što zahtjeva pouzdan indikator funkcije trombocita.

Nekoliko studija je dokazalo da je ADP test Multiplate® uređaja najosjetljiviji test u perioperativnoj procjeni stečenog poremećaja funkcije trombocita. Vrijednost ADP testa se smanjuje tijekom trajanja izloženosti ECMO/ECLS sustavu (56). Rezultati nekoliko istraživanja podupiru tu tvrdnju i opisuju smanjenje vrijednosti ADP testa u bolesnika 15 minuta nakon početka

izlaganja izvantjelesnom krvotoku, u usporedbi s bazalnim vrijednostima mjerenim preoperativno (57). Isto je pokazano i u našem istraživanju, no vrijednosti ADP testa nisu bili prediktori značajnog krvarenja.

ASPI test je drugi test Multiplate® uređaja koji je dio nekoliko smjernica za upravljanje hemostatskim liječenjem i koji se redovito koristi u svrhu prilagodbe antiagregacijske terapije nakon kardiokirurške operacije (58, 59). Osim što pruža uvid u procjenu odgovora trombocita na antiagregacijsku terapiju, omogućava i proučavanje odgovora trombocita na promjene sinteze COX1 tijekom hipotermije, acidoze i terapije koloidnim otopinama (60, 61). Istraživanja pokazuju da se vrijednost ASPI testa ne mijenja nakon uvođenja terapije izvantjelesnim krvotokom, što upućuje na činjenicu da je agregacija trombocita jače stimulirana arahidonskom kiselinom nego ADP-om. Može se zaključiti da je ASPI test manje osjetljiv za prikaz nespecifičnih promjena trombocita tijekom trajanja izvantjelesnog krvotoka (56).

Rezultati Multiplate® testova ovise i o broju trombocita, a vrijednosti testova agregacije se smanjuju paralelno s trombocitopenijom. Promjene vrijednosti agregacije mogu biti rezultat pravog poremećaja funkcije trombocita, ali i rezultat smanjenja njihovog broja. Terapijska odluka temeljena samo na rezultatu Multiplate® testa nije preporučiva (62). Kao što je već navedeno, rezultati Multiplate® testova nisu imali statistički značajnih poveznica sa krvarenjem, trombozom i preživljenjem. Multiplate® nije jedini test koji proučava funkciju trombocita, ali je jedini čiji su rezultati već opisani u objavljenim radovima na ECMO/ECLS populaciji.

Naši rezultati ukazuju na činjenicu da je predviđanje krvarenja prema rezultatima ROTEM® analize točnija u odnosu na predviđanje prema rutinski izvođenim testovima koji opisuju koagulacijski status bolesnika. Ispravno predviđanje pojave krvarenja izravno je povezano s uvođenjem ispravne terapije, odnosno nadoknade krvnih pripravaka. Osim što su rezultati ovih

testova odraz detaljne analize svih aspekata zgrušavanja, oni su dostupni i u kratkoj jedinici vremena. Rad objavljen na rezultatima 14,000 ROTEM® testova izvedenih u nekardijalnih bolesnika pokazao je da je rezultat dobiven nakon 10 minuta usporediv s rezultatima konačnog MCF-a što upućuje na činjenicu da se konačni rezultat može protumačiti već nakon 10 minuta od uzorkovanja krvi.

Obzirom da je koagulopatija multifaktorijalno stanje, multivarijatna analiza je izdvojila višestruke varijable tromboelastometrije koje zajedno čine predviđanje krvarenja preciznijim od bilo koje varijable ponaosob.

U našem istraživanju testovi predviđanja rizika značajnog značajnog krvarenja tijekom prvih pet dana postimplantacijskog perioda su INTEM CT test (p = 0,002), EXTEM CT test (p = 0,018) i FIBTEM MCF (p = 0,028).

Vrijednosti INTEM CT testa su najčešće statistički korelirale s rizikom od pojave značajnog krvarenja u prvih pet postimplantacijskih dana, a zbog visokog omjera hazarda (14,89), rezultati se mogu smatrati i klinički značajnima. Vrijednosti EXTEM CT testa su posebno dobro korelirale s rizikom krvarenja prva dva postoperativna dana (omjer hazarda 5,724). Vrijednosti FIBTEM MCF testa su snažno povezane s rizikom krvarenja svih pet dana postimplantacijskog praćenja (omjer hazarda 3,048). Viša vrijednost FIBTEM MCF je protektivan faktor u predviđanju krvarenja. Razlozi su već navedeni u prethodnom dijelu rasprave. Vrijednost CT INTEM i EXTEM testa primarno je pod utjecajem aktivnosti čimbenika zgrušavanja. INTEM CT testa omogućuje globalni prikaz koagulacije. Osjetljiv je na nedostatak čimbenika zgrušavanja (čimbenici unutarnjeg puta zgrušavanja) i antikoagulacijski učinak heparina. EXTEM CT testa odraz je vanjskog puta zgrušavanja. Slabo je osjetljiv na učinak heparina. Produženi CT oba testa

primarno je posljedica manjka čimbenika koagulacije. HEPTEM test može se koristiti kako bi se prikazala prisutnost heparina i njegovog učinka na hemostatska svojstva putem komparacije s INTEM parametrima. INTEM CT je bio na gornjoj granici normale u većini izvedenih testova što ukazuje na minimalni doprinos heparina u procesu zgrušavanja. Istraživanja na pedijatrijskoj populaciji kardiokirurških bolesnika jasno su upozorila na povezanost između produženog CT i povećanog postoperativnog krvarenja (63). Višestruki radovi iz naše ustanove su dokazali da su pojedini testovi ROTEM® analize značajan alat u razjašnjavanju etiologije ranog postoperativnog krvarenja (64, 65). Rano prepoznat rizik za prekomjerno postoperativno krvarenje omogućuje pravovremenu i ciljanu terapiju ukoliko se takvo krvarenje razvije. Prekomjerno krvarenje praćeno normalnim nalazima ROTEM® analize upućuje na kirurško krvarenje te govori protiv empirijskog ordiniranja prokoagulantnih krvnih pripravaka (64, 65).

Slični rezultati u odnosu na iznesno objavljeni su u radovima na populaciji bolesnika u procesu transplantacije jetre. Transplantacija jetre spada u skupinu kirurških postupaka sa velikim rizikom za krvarenje jer su bolesnici intrinzično hemostatski nedostatni uslijed postojećeg manjka dovoljne i pravilne sinteze čimbenika zgrušavanja. Rezultati dvaju istraživanja provedenih na opisanoj skupini bolesnika odgovaraju rezultatima našeg istraživanja. Produljena vrijednost EXTEM CT testa je neovisni prediktor nadoknade koncentrata eritrocita. Granične vrijednosti za nadoknadu krvnih pripravaka EXTEM CT testa u navedenim istraživanjima su se kretale 62-65 s (66, 67). U našem istraživanju vrijednosti EXTEM CT testa koje su dobro korelirale s rizikom krvarenja iznosile su ≥92 s. Naizgled velika razlika između rezultata naših radova može se pripisati činjenici da je ECMO/ECLS sustav višestruko destruktivniji u domeni koagulacije nego što je prileježći poremećaj sintetske funkcije jetre kao i dodatni poremećaj agregacije trombocita prouzročen sistemskim upalnim odgovorom.

Objavljene su i usporedbe rezultata ACT testa i INTEM ROTEM® testa. Oba testa prikazuju funkcionalnost unutarnjeg puta zgrušavanja. Rezultati naše studije su u skladu s ranije objavljenim podacima, te potvrđuju da nema povezanosti između ovih nalaza; tijekom trajanja potpore ACT rezultat se nalazi unutar ciljnog raspona za heparinsku terapiju, dok je INTEM CT testa unutar normalnih vrijednosti. Ta činjenica budi sumnju o pouzdanosti INTEM CT testa u vođenju antikoagulacijske terapije. Ovaj zaključak je već iznesen u objavljenim radovima. Ukoliko se terapija heparinom vodi isključivo prema rezultatima INTEM CT testa, rezultat može biti predoziranje ovim antikoagulantom (68).

Slično istraživanje je usporedilo APTV vrijednost s INTEM CT testom. Unatoč postizanju vrijednosti unutar terapijskog intervala APTV testa, više od 50% INTEM CT vrijednosti je bilo unutar normalnog raspona vrijednosti. Vrijednosti APTV testa i INTEM CT testa su slabo korelirale (rho= 0,31, 95% CI [0,17, 0,43]), a promjene APTV-a nisu bile praćene promjenama INTEM CT. Neosjetljivost testa uzrokuje povećanje doze heparina prema INTEM CT vrijednostima za 289% u odnosu na APTV vrijednost. Stoga autori upućuju na oprez prilikom uporabe ROTEM® testova u svrhu vođenja antikoagulacijske terapije heparinom (69). Rezultati naše studije su u skladu s ranije objavljenim podacima, te potvrđuju da nema povezanosti između ovih nalaza; tijekom trajanja potpore APTV rezultat se nalazi unutar ciljnog raspona za heparinsku terapiju, dok je INTEM CT testa unutar normalnih vrijednosti. Moguće objašnjenje ovako velikog odstupanja od očekivanih rezultata proizlazi iz činjenice da se APTV rezultat uzrokuje iz uzorka plazme, za razliku od INTEM CT rezultata koji se uzorkuje iz pune krvi.

Zajednička primjena INTEM i HEPTEM testa omogućuje preciznu detekciju niskih do umjerenih koncentracija heparina. Učinili smo dodatan korak i usporedili omjer i razliku INTEM CT i HEPTEM CT testa sa vrijednostima ACT u obje skupine bolesnika (sa i bez značajnog krvarenja).

Nije pokazana statistički značajna povezanost, osim CT INTEM i HEPTEM međusobno, što je i u skladu sa očekivanjima.

Ostali pozitivni prediktori značajnog krvarenja su ostavljanje medijastinuma nakon operacije otvorenim, transfuzija koncentrata eritrocita, transfuzija koncentrata trombocita, transfuzija svježe smrznute plazme i povećana koncentracija prijeimplantacijskih laktata.

Iz navedenog proizlazi da su bolesnici sa značajnim krvarenjem primili veću količinu prokoagulantnih krvnih pripravaka. Postoji nekoliko razloga za navedeni fenomen koji je nelogičan s obzirom na pretpostavku da primjena prokoagulantnih krvnih pripravaka smanjuje količinu krvarenja. Razlog ovakvog nalaza proizlazi iz činjenice da su prokoagulantni krvni pripravci ordinirani na temelju standardnih laboratorijskih testova te na osnovi kliničke procjene liječnika (vodeći liječnici su bili zasljepljeni za rezultate POC testova), dakle empirijski. U pravilu se radi o nadoknadi već potrošenih komponenti sustava zgrušavanja (izgubljenih samim krvarenjem). Rana fibrinoliza nije zamijećena u ovoj kohorti bolesnika što upućuje na zaključak da antifibrinolitička terapija ne mora biti učinkovita u ovom kontekstu.

6.2. Pregled literature

Više je istraživanja provedeno na pedijatrijskoj populaciji, gdje je potvrđeno da se korištenjem jedinstvenih protokla smanjuje stopa krvarećih komplikacija i potrošnja krvnih pripravaka (70). Iako je 43% centara koristilo tromboelastografiju, ciljni raspon i primjenjene intervencije su bile izrazito raznolike. Rad objavljen 2012. predložio je korištenje ROTEM® i Multiplate® testova tijekom trajanja mehaničke cirkulacijske potpore u svrhu smanjenja krvarećih i tromboembolijskih komplikacija. Uslijed kontinuirane proizvodnje trombina, mijenjanja čvrstoće ugruška i promijenjenog odgovora trombocita predlažu izvođenje ovih testova opetovano tijekom trajanja potpore (25).

ECMO/ECLS terapija je vođena nižom potrebnom koncentracijom nefrakcioniranog heparina (0.1 do 1.0 IJ/ml) od sustava za izvantjelesni krvotok u kardiokirurškoj sali. APTV je bolja mjera odraza djelovanja niže koncentracije nefrakcioniranog heparina nego ACT (71). ACT i APTV međusobno koreliraju samo u umjerenoj mjeri i zato je u slučaju nesuglasica APTV bolja mjera antikoagulacije (72, 73).

Dostupni konvencionalni testovi nisu dorasli raščlanjivanju višeuzročnog poremećaja zgrušavanja. Njima nije moguće procijeniti stupanj agregacije trombocita na temelju receptorskih mehanizama. Nadalje, ključna krajnja točka ROTEM® testa je polimerizacija fibrina, koja se ne može procijeniti kroz APTV i ACT test. ROTEM® i Multiplate® pružaju informacije o cijelom tijeku zgrušavanja u stvarnom vremenu, s posebnim osvrtom na čimbenike zgrušavanja i trombocite, zajedno i pojedinačno, kao i o hipofibrinogenemiji i fibrinolizi. Većina randomiziranih studija koja se bavi usporedbom ova dva testa sa standardnim laboratorijskim testovima učinjena je u domeni kardijalne kirurgije (74-79).

Upravljajući hemostatskim liječenjem prema rezultatima navedenih testova smanjila se potrošnja koncentrata eritrocita i ostalih krvnih pripravaka što je pridonijelo poboljšanju kliničkih ishoda. Zabilježen je kraći boravak u jedinici intenzivnog liječenja, trajanje mehaničke ventilacije, smanjenje broja nuspojava i u konačnici smanjenje troškova liječenja. Dokazano je i smanjenje šestomjesečnog mortaliteta (28).

Prvi se rezultat od uzorkovanja do izrade standardnog laboratorijskog APTV iz plazme dobiva 30 do čak 90 minuta nakon uzorkovanja (80). ECMO/ECLS je dinamična terapija koja predmnijeva dinamičke odluke, što svakako nisu one donešene 90 minuta nakon nastanka problema. Na tržištu je dostupan uređaj koji mjeri vrijednost APTV iz uzorka pune krvi. On također pripada u skupinu POC testova s kratkim vremenskim periodom izrade rezultata, svega 5 minuta. Ovaj uređaj je validiran i rezultati su uspoređeni sa standardnim laboratorijskim koagulacijskim testovima koji se izvode iz uzorka plazme (81). Za jedan je takav POC-APTV test (Hemochron Signature Elite®, Accriva Diagnostics, Piscataway Township, NJ, SAD) dokazana slaba povezanost sa plazmatskim APTV testom (rho=-0.29) (81). Ne postoje studije koje bi usporedile POC APTV test sa plazmatskim APTV testom u ECMO/ECLS bolesnika.

Koncentracija anti-Xa vjerojatno mnogo bolje korelira sa koncentracijom heparina od vrijednosti ACT ili APTV. Većina do sada objavljenih studija je provedena na pedijatrijskoj populaciji. U skupini od 12 novorođenačkih ECMO bolesnika potvrđena je korelacija koncentracije anti-Xa i doze heparina ($r = 0.75$; $p < 0.0001$), no ne i vrijednosti ACT, doze heparina i koncentracije anti-Xa (82). Drugi rad, proveden na skupini 21 novorođenačkih ECMO bolesnika je pomoću koncentracije anti-Xa predskazao nedosljednost APTV i ACT vrijednosti za određivanje terapijske doze razine heparina (71). Slično je potvrđeno u skupini 17 pedijatrijskih ECMO bolesnika, gdje je ponovno dokazano da koncentracija anti-Xa ima čvršću povezanost sa dozom heparina nego

vrijednost APTV ili ACT (83). Najveća studija je izvedena u skupini 34 pedijatrijska ECMO bolesnika gdje je potvrđena pozitivna povezanost između vrijednosti anti-Xa i doze heparina (rho=0.33) na način da je svakim povećanjem doze heparina za 10 IJ/kg/h koncentracija anti-Xa porasla za 0.07 IU/ml. Vrijednost APTV je imala slabu povezanost sa trendom promjene koncentracije anti-Xa (rho=0.17), dok ACT uopće nije imao poveznice sa promjenom koncentracije anti-Xa (r=0.02) (84). Iz navedenog je razvidno da je možda koncentracija anti-Xa najpouzdanija mjera djelotvornosti heparina. Dugo vrijeme izrade je njegov glavni nedostatak što ga uvrštava u rijeđe korištene testove rutinske prakse.

Iz svega navedenog je vidljivo da ne postoji idealan konvencionalan test pomoću kojeg bi se regulirala antikoagulacijska terapija u ECMO/ECLS bolesnika.

Na temelju izloženog, može se zaključiti kako optimalno upravljanje koagulacijom predstavlja osnovu i izazov ECMO/ECLS terapije. Upravo nedostatak jedinstvenih protokola i usuglašenih stavova stručnjaka dovodi do postojanja heterogene skupine antikoagulacijskih protokola. Trenutno prihvaćeni standard praćenja terapije nefrakcioniranim heparinom su još uvijek ACT i APTV unatoč činjenici da postoji značajna intra- i inter-individualna razlikovnost u pacijenata (85). Postoji numerički okvir konačnog ciljnog raspona, ali ne i jedinstven protokol koji bi omogućio njegovo ostvarivanje (85).

Literaturni navodi i dosadašnja istraživanja jasno zazivaju oblikovanje standardiziranih protokola za vođenje antikoagulacijske terapije tijekom ECMO/ECLS potpore. Potrebno je procijeniti jesu li navedeni testovi uistinu superiorni dostupnim laboratorijskim testovima (23).

6.3. Ograničenja istraživanja

Glavni nedostatak istraživanja je malen uzorak što ograničava snagu zaključaka. Pokazana je konzistentna i statistički značajna povezanost između vrijednosti testova rotacijske tromboelastometrije i impedancijske agregometrije trombocita s pojavnošću značajnog krvarenja, no nije moguće izvesti jasne zaključke o potencijalnim terapijskim intervencijama, što valja potvrditi dodatnim istraživanjima. Svakako je otegotni čimbenik i veliki broj varijabli u odnosu na relativno malen broj ispitanika (omjer premašuje 1:5). Taj se nedostatak nastojao kompenzirati korištenjem multivarijatne analize i statističkih testova manje osjetljivih na nepovoljne omjere broja ispitanika i broja varijabli.

Ovisno o strategiji kombiniranja osjetljivosti, specifičnosti, pozitivnih i negativnih prediktivnih vrijednosti, mogu se koristiti dvije strategije; ona u kojoj vrijednosti svih signifikantnih testova moraju biti iznad/ispod graničnih vrijednosti i ona u kojoj bilo koji test mora biti pozitivan. Pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti testova značajno ovise o prevalenciji krvarenja u promatranoj populaciji, što je podatak koji može varirati ovisno o komorbiditetima i drugim čimbenicima koji mogu utjecati na status hemostaze u bolesnika.

7. Zaključci

U ovom prospektivnom istraživanju provedenom na 28 bolesnika liječenih venoarterijskim izvantjelesnom cirkulacijskom potporom analizirana je uporaba specifičnih testova agregacije trombocita i viskoelastičnih svojstva krvnoga ugruška. Pokazano je da se određenim komponentama navedenih testova mogu predvidjeti hemoragijska zbivanja.

a) Podaci dobiveni ovim istraživanjem pokazuju da je značajno krvarenje moguće predvidjeti određenim testovima ROTEM® analize.
b) Predviđanje krvarenja prema rezultatima ROTEM® analize je točnije u odnosu na predviđanje prema rutinski izvođenim testovima koji proučavaju koagulacijski status bolesnika.
c) Osim što su rezultati ovih testova odraz detaljne analize svih aspekata zgrušavanja, oni su dostupni i u kratkoj jedinici vremena.
d) Vrijednosti INTEM CT testa su po danima najpouzdanije korelirale s rizikom krvarenja.
e) Vrijednosti EXTEM CT testa su posebno dobro korelirale s rizikom krvarenja prva dva postoperativna dana.
f) Vrijednosti FIBTEM MCF testa su snažno povezane s rizikom krvarenja svih pet dana postimplantacijskog praćenja. Viša vrijednost FIBTEM MCF je protektivan faktor u predviđanju krvarenja.
g) Navedene vrijednosti imaju značajan prognostički čimbenik u analiziranoj kohorti bolesnika. Testovi su neovisni, statistički značajani, te imaju i klinički značaj zbog velike razlike u omjeru hazarda (posebno INTEM CT).

h) Tijekom trajanja potpore ACT i APTV rezultati se nalaze unutar ciljnog raspona za heparinsku terapiju, dok je INTEM CT testa unutar normalnih vrijednosti normalne populacije. Ta činjenica budi sumnju o pouzdanosti INTEM CT testa u vođenju antikoagulacijske terapije. Ukoliko se terapija heparinom vodi isključivo prema rezultatima INTEM CT testa, rezultat može biti predoziranje ovim antikoagulansom.

i) Usporedbom omjera i razlike INTEM CT i HEPTEM CT testa s vrijednostima ACT testa nije dokazana statistički značajna povezanost.

j) Nije dokazana statistički značajna povezanost između konvencionalnih testova funkcije koagulacije (APTV i ACT) međusobno i u odnosu na rezultate testova impedancijske agregometrije uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije.

k) Pokazana je jaka korelacija gotovo svih testova impedancijske agregometrije uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije i koncentracije fibrinogena.

l) Unatoč korelaciji gotovo svih testova impedancijske agregometrije uzorka pune krvi i rotacijske tromboelastometrije i koncentracije fibrinogena, potonja se nije pokazala kao nezavisni prediktor krvarenja.

m) Rana fibrinoliza nije zamijećena u ovoj kohorti bolesnika što upućuje na zaključak da antifibrinolitička terapija ne mora biti učinkovita u ovom kontekstu.

n) ADP test Multiplate® uređaja je najosjetljiviji test za periimplantacijsku procjenu stečenog poremećaja funkcije trombocita, no vrijednosti ADP testa nisu bili prediktori značajnog krvarenja.

8. Sažetak

Liječenje izvantjelesnom cirkulacijskom potporom koje se bazira na tehnici izvantjelesne membranske oksigenacije završni je stadij liječenja srčanog zatajenja ili kardiogenog urušaja. Sistemska antikoagulacija je nužna, a većina komplikacija poput tromboze i krvarenja, koji su i najčešći uzroci mortaliteta, je često posljedica upravo nekompatibilnosti stijenki sustava i krvi. Iz rutinskih laboratorijskih koagulacijskih testova i broja trombocita ne može se spoznati da li u određenom slučaju postoji kvalitativan poremećaj funkcije trombocita, hiperkoagulabilnost, hiper- ili hipofibrinoliza. Cilj ovog prospektivnog istraživanja provedenog na 28 bolesnika liječenih venoarterijskim izvantjelesnom cirkulacijskom je evaluirati učinak izvantjelesne cirkulacijske potpore na viskoelastična svojstva krvnoga ugruška i funkciju trombocita upotrebom specifičnih testova koagulacije i agregacije. Značajno krvarenje kao mjera ishoda je zabilježeno u 8/28 bolesnika (28 %). Podaci dobiveni ovim istraživanjem pokazuju da je značajno krvarenje moguće predvidjeti određenim testovima ROTEM® analize. Ona je točnija i dostupna u kraćoj jedinici vremena u odnosu na predviđanje prema rutinski izvođenim testovima koji proučavaju koagulacijski status bolesnika. Vrijednosti INTEM CT testa su po danima najpouzdanije korelirale s rizikom krvarenja, dok su vrijednosti EXTEM CT testa korelirale s rizikom krvarenja prva dva postoperativna dana. Vrijednosti FIBTEM MCF testa su snažno povezane s rizikom krvarenja svih pet dana postimplantacijskog praćenja. Rezultati navedenih testova imaju praktičnu vrijednost u liječenju bolesnika na ECMO/ECLS potpori.

Ključne riječi: izvantjelesna cirkulacijska potpora, agregacija, koagulacija, ROTEM®, Multiplate®

9. Summary

Impact of extracorporeal life support on blood clot viscoelastic properties and platelet aggregation, Lucija Svetina, 2018

Extracorporeal life support based on extracorporeal membrane oxygenation is the end-stage treatment of heart failure or cardiogenic shock. Systemic anticoagulation is mandatory, and most of the complications such as thrombosis and bleeding, which are also the most common causes of mortality, are often the result of incompatibility of the extracorporeal system and blood. Routinely performed laboratory blood clotting tests and platelet number do not offer sufficient understanding whether qualitative platelet dysfunction is present in a particular patient nor does it denote hypercoagulability, hyper or hypofibrinololysis. The aim of this prospective study on 28 patients is to evaluate the effect of extracorporeal life support on blood clotting viscoelastic properties and platelet function through specific coagulation and aggregation tests. Data obtained by this study indicate that significant bleeding can be predicted by certain ROTEM® analysis tests, such as INTEM CT, EXTEM CT and FIBTEM MCF. It is more accurate and available in a shorter unit of time compared to the prediction of routine tests that study the coagulation status of the patient. The results of these tests have a practical value in treating patients on ECMO / ECLS support. Literature citations and current research clearly call for the formulation of standardized protocols for conducting anticoagulant therapy during ECMO / ECLS support. It is necessary to assess whether these tests are truly superior to available laboratory tests.

Key words: Extracorporeal life support, aggregation, coagulation, ROTEM®, Multiplate®

10. Popis literature

1. Giamouzis G, Kalogeropoulos A, Georgiopoulou V, Laskar S, Smith AL, Dunbar S, i sur. Hospitalization epidemic in patients with heart failure: risk factors, risk prediction, knowledge gaps, and future directions. J Card Fail. 2011;17(1):54-75.

2. Giamouzis G, Triposkiadis F, Butler J, Westermann D, Giannakoulas G. Heart failure. Cardiol Res Pract. 2011;2011:159608.

3. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, i sur. Executive summary: Heart disease and stroke statistics - 2010 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 2010;121(7):948-54.

4. Ammar KA, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Kors JA, Redfield MM, Burnett JC Jr, i sur. Prevalence and prognostic significance of heart failure stages: application of the American College of Cardiology/American Heart Association heart failure staging criteria in the community. Circulation. 2007;115(12):1563-70.

5. Hershberger RE, Nauman D, Walker TL, Dutton D, Burgess D. Care processes and clinical outcomes of continuous outpatient support with inotropes (COSI) in patients with refractory endstage heart failure. J Card Fail. 2003;9(3):180–7.

6. Aubron C, Cheng AC, Pilcher D, Leong T, Magrin G, Cooper DJ, i sur. Factors associated with outcomes of patients on extracorporeal membrane oxygenation support: a 5- year cohort study. Crit Care. 2013;17(2):73.

7. Mazzeffi M, Greenwood J, Tanaka K, Menaker J, Rector R, Herr D, i sur. Bleeding, transfusion, and mortality on extracorporeal life support: ECLS working group on thrombosis and hemostasis. Ann Thorac Surg. 2016;101(2):682-9.

8. Ranucci M. The conundrum of anticoagulation and hemostatic management in ECMO patients. Minerva Anestesiol. 2016;82(2):147-8.

9. Panigada M, Artoni A, Passamonti SM, Maino A, Mietto C, L'acqua C, i sur: Hemostasis changes during veno-venous extracorporeal membrane oxygenation for respiratory support in adults. Minerva Anestesiol. 2016;82(2):170-9.

10. Chang AC, McKenzie ED. Mechanical cardiopulmonary support in children and young adults: extracorporeal membrane oxygenation, ventricular assist devices, and long-term support devices. Pediatr Cardiol. 2005;26(1):2–28.

11. Slaughter MS, Rogers JG, Milano CA, Russell SD, Conte JV, Feldman D, i sur. Advanced heart failure treated with continuous-flow left ventricular assist device. N Engl J Med. 2009;361(23):2241-51.

12. Crow S, John R, Boyle A, Shumway S, Liao K, Colvin-Adams M, i sur. Gastrointestinal bleeding rates in recipients of nonpulsatile and pulsatile left ventricular assist devices. J Thorac Cardiovasc Surg. 2009;137(1):208–15.

13. Genovese EA, DewMA, Teuteberg JJ, Simon MA, Kay J, Siegenthaler MP, i sur. Incidence and patterns of adverse event onset during the first 60 days after ventricular assist device implantation. Ann Thorac Surg. 2009;88(4):1162–70.

14. Morrison KA, Jorde UP, Garan AR, Takayama H, Naka Y, Uriel N. Acquired von Willebrand disease during CentriMag support is associated with high prevalence of bleeding during support and after transition to heart replacement therapy. ASAIO J. 2014;60(2):241–2.

15. Uriel N, Pak SW, Jorde UP, Jude B, Susen S, Vincentelli A, i sur. Acquired von Willebrand syndrome after continuous-flow mechanical device support contributes to a high prevalence of bleeding during long-term support and at the time of transplantation. J Am Coll Cardiol. 2010;56(15):1207–13.

16. Suarez J, Patel CB, Felker GM, Becker R, Hernandez AF, Rogers JG. Mechanisms of bleeding and approach to patients with axial-flow left ventricular assist devices. Circ Heart Fail. 2011;4(6):779–84.

17. McManus ML, Kevy SL, Bower LK, Hickey PR. Coagulation factor deficiencies during initiation of extracorporeal membrane oxygenation. J Pediatr. 1995;126(6):900-4.

18. Kasirajan V, Smedira NG, McCarthy JF, Casselman F, Boparai N, McCarthy PM. Risk factors for intracranial hemorrhage in adults on extracorporeal membrane oxygenation. Eur J Cardiothorac Surg. 1999;15(4):508-14.

19. Eckman PM, John R. Bleeding and thrombosis in patients with continuous-flow ventricular assist devices. Circulation. 2012;125(24):3038–47.

20. Bartlett RH, Gattinoni L. Current status of extracorporeal life support (ECMO) for cardiopulmonary failure. Minerva Anestesiol. 2010;76(7):534-40.

21. Marasco SF, Lukas G, McDonald M, McMillan J, Ihle B. Review of ECMO (extra corporeal membrane oxygenation) support in critically ill adult patients. Heart Lung Circ. 2008;17 Suppl 4:S41-7.

22. Rastan AJ, Lachmann N, Walther T, Doll N, Gradistanac T, Gommert JF, i sur. Autopsy findings in patients on postcardiotomy extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). Int J Artif Organs. 2006;29(12):1121-31.

23. Bembea MM, Annich G, Rycus P, Oldenburg G, Berkowitz I, Pronovost P. Variability in anticoagulation management of patients on extracorporeal membrane oxygenation: an international survey. Pediatr Crit Care Med. 2013;14(2):e77-84.

24. Fries D, InnerhofermP, Streif W, Schobersberger W, Margreiter J, Antretter H, i sur. Coagulation Monitoring and Management of Anticoagulation During Cardiac Assist Device Support. Ann Thorac Surg. 2003;76(5):1593-7.

25. Görlinger K, Bergmann L, Dirkmann D. Coagulation management in patients undergoing mechanical circulatory support. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2012;26(2):179-98.

26. Crow S, Chen D, Milano C, Thomas W, Joyce L, Piacentino V, i sur. Acquired von Willebrand syndrome in continuous-flow ventricular assist device recipients. Ann Thorac Surg. 2010;90(4):1263-9.

27. Steinlechner B, Dworschak M, Birkenberg B, Duris M, Zeidler P, Fischer H i sur. Platelet dysfunction in outpatients with left ventricular assist devices. Ann Thorac Surg. 2009;87(1):131-7.

28. Weber CF, Klages M, Zacharowski K. Perioperative coagulation management during cardiac surgery. Curr Opin Anaesthesiol. 2013;26(1):60-4.

29. Kozek-Langenecker S. Management of massive operative blood loss. Minerva Anestesiol. 2007;73(7-8):401-15.

30. Tanaka KA, Bolliger D, Vadlamudi R, Nimmo A. Rotational thromboelastometry (ROTEM)-based coagulation management in cardiac surgery and major trauma. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2012;26(6):1083-93.

31. Ganter MT, Hofer CK. Coagulation monitoring: current techniques and clinical use of viscoelastic point-of-care coagulation devices. Anesth Analg. 2008;106(5):1366-75.

32. Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry. Clin Lab Haematol. 2005;27(2):81-90.

33. Jackson GN, Ashpole KJ, Yentis SM. The TEG vs the ROTEM thromboelastography / thromboelastometry systems. Anaesthesia. 2009;64(2):212-5.

34. Bolliger D, Seeberger MD, Tanaka KA. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice. Transfus Med Rev. 2012;26(1):1-13.

35. Toth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. Thromb Haemost. 2006;96(6):781-8.

36. Sankarankutty A, Nascimento B, Teodoro da Luz L, Rizoli S. TEG (R) and ROTEM(R) in trauma: similar test but different results? World J Emerg Surg. 2012;7 Suppl 1:S3.

37. Rugeri L, Levrat A, David JS, Delecroix E, Floccard B, Gros A, i sur. Diagnosis of early coagulation abnormalities in trauma patients by rotation thrombelastography. J Thromb Haemost. 2007;5(2):289-95.

38. Zuckerman L, Cohen E, Vagher JP, Woodward E, Caprini JA. Comparison of thrombelastography with common coagulation tests. Thromb Haemost. 1981;46(4):752-6.

39. Chandler WL. The thromboelastography and the thromboelastograph technique. Semin Thromb Hemost. 1995;21 Suppl 4:1-6.

40. Kang YG, Martin DJ, Marquez J, Lewis JH, Bontempo FA, Shaw BW, i sur. Intraoperative changes in blood coagulation and thrombelastographic monitoring in liver transplantation. Anesth Analg. 1985;64(9):888-96.

41. Hattersley PG. Activated coagulation time of whole blood. JAMA. 1966;196(5):436-40.

42. Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA. Heparin therapy during extracorporeal circulation. II. The use of a dose response curve to individualize heparin and protamine dosage. J Thorac Cardiovasc Surg. 1975;69(5):685-9.

43. Baird CW, Zurakowski D, Robinson B, Gandhi S, Burdis-Koch L, Tamblyn Je, i sur. Anticoagulation and pediatric extracorporeal membrane oxygenation: impact of activated clotting time and heparin dose on survival. Ann Thorac Surg. 2007;83(3):912–19.

44. Chan AK, Leaker M, Burrows FA, Williams WG, Gruenwald CE, Whyte L, i sur. Coagulation and fibrinolytic profile of paediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass. Thromb Haemost. 1997;77(2):270–7.

45. Extracorporeal Life Support Organization. ELSO Anticoagulation guideline 2014. Ann Arbor, MI USA [Internet]. Dostupno:

https://www.elso.org/Portals/0/Files/elsoanticoagulationguideline8-2014-table-contents.pdf

46. Atallah S, Liebl M, Fitousis K, Bostan F, Masud F. Evaluation of the activated clotting time and activated partial thromboplastin time for the monitoring of heparin in adult extracorporeal membrane oxygenation patients. Perfusion. 2014;29(5):456-61.

47. Avidan MS, Levy JH, van Aken H, Feneck RO, Latimer RD, Ott E, i sur. Recombinant human antithrombin III restores heparin responsiveness and decreases activation of coagulation in heparin-resistant patients during cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg. 2005;130(1):107-13.

48. Laine A, Niemi T, Suojaranta-Ylinen R, Raivio P, Soininen L, Lemström K, i sur. Decreased maximum clot firmness in rotational thromboelastometry (ROTEM®) is associated with bleeding during extracorporeal mechanical circulatory support. Perfusion. 2016;31(8):625-33.

49. Ogawa S, Szlam F, Chen EP, Nishimura T, Kim H, Roback JD, i sur. A comparative evaluation of rotation thromboelastometry and standard coagulation tests in hemodilution-induced coagulation changes after cardiac surgery. Transfusion. 2012;52:14–22.

50. Roullet S, Pillot J, Freyburger G, Biais M, Quinart A, Rault A, i sur. Rotation thromboelastometry detects thrombocytopenia and hypofibrinogenaemia during orthotopic liver transplantation. Br J Anaesth. 2010;104:422–8.

51. Harrison P, Wilbourn B, Debili N, Vainchenker W, Breton-Gorius J, Lawrie AS, i sur. Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets. J Clin Invest. 1989;84(4):1320-4.

52. Tanaka KA, Egan K, Szlam F, Ogawa S, Roback JD, Sreeram G, i sur. Transfusion and hematologic variables after fibrinogen or platelet transfusion in valve replacement surgery: preliminary data of purified lyophilized human fibrinogen concentrate versus conventional transfusion. Transfusion. 2014;54(1):109-18.

53. Velik-Salchner C, Haas T, Innerhofer P, Streif W, Nussbaumer W, Klingler A, i sur. The effect of fibrinogen concentrate on thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2007;5:1019–25.

54. Woodman RC, Harker LA. Bleeding complications associated with cardiopulmonary bypass. Blood. 1990;76(9):1680-97.

55. Harker LA. Acquired disorders of platelet function. Ann N Y Acad Sci. 1987;509:188-204.

56. Mutlak H, Reyher C, Meybohm P, Papadopoulos N, Hanke AA, Zacharowski K, i sur. Multiple electrode aggregometry for the assessment of acquired platelet dysfunctions during extracorporeal circulation. Thorac Cardiovasc Surg. 2015;63(1):21-7.

57. Velik-Salchner C, Maier S, Innerhofer P, Kolbitsch C, Streif W, Mittermayr M, i sur. An assessment of cardiopulmonary bypass-induced changes in platelet function using whole blood and classical light transmission aggregometry: the results of a pilot study. Anesth Analg. 2009;108(6):1747-54.

58. Weber CF, Görlinger K, Meininger D, Herrmann E, Bingold T, Moritz A, i sur. Point-of-care testing: a prospective, randomized clinical trial of efficacy in coagulopathic cardiac surgery patients. Anesthesiology. 2012;117(3):531-4.

59. Görlinger K, Dirkmann D, Hanke AA, Kamler M, Kottenberg E, Thielmann M, i sur. First-line therapy with coagulation factor concentrates combined with point-of-care coagulation testing is associated with decreased allogeneic blood transfusion in cardiovascular surgery: a retrospective, single center cohort study. Anesthesiology. 2011;115(6):1179-91.

60. Scharbert G, Kalb M, Marschalek C, Kozek-Langenecker SA. The effects of test temperature and storage temperature on platelet aggregation: a whole blood in vitro study. Anesth Analg. 2006;102(4):1280-4.

61. Hanke AA, Dellweg C, Kienbaum P, Weber CF, Görlinger K, Rahe-Meyer N. Effects of desmopressin on platelet function under conditions of hypothermia and acidosis: an in vitro study using multiple electrode aggregometry. Anaesthesia. 2010;65(7):688-91.

62. Nair P, Hoechter DJ, Buscher H, Venkatesh K, Whittam S, Joseph J, i sur. Prospective observational study of hemostatic alterations during adult extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) using point-of-care thromboelastometry and platelet aggregometry. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2015;29(2):288-96.

63. Faraoni D, Willems A, Romlin BS, Belisle S, Van der Linden P. Development of a specific algorithm to guide haemostatic therapy in children undergoing cardiac surgery: a single-centre retrospective study. Eur J Anaesthesiol. 2015;32(5):320-9.

64. Petricevic M, Biocina B, Milicic D, Konosic S, Svetina L, Lekic A, i sur. Bleeding risk assessment using whole blood impedance aggregometry and rotational thromboelastometry in patients following cardiac surgery. J Thromb Thrombolysis. 2013;36(4):514-26.

65. Petricevic M, Biocina B, Milicic D, Svetina L, Boban M, Lekić A, i sur. Activated coagulation time vs. intrinsically activated modified rotational thromboelastometry in assessment of hemostatic disturbances and blood loss after protamine administration in elective cardiac surgery: analysis from the clinical trial (NCT01281397). J Cardiothorac Surg. J Cardiothorac Surg. 2014;9:129.

66. Dötsch TM, Dirkmann D, Bezinover D, Hartmann M, Treckmann JW, Paul A, i sur. Assessment of standard laboratory tests and rotational thromboelastometry for the prediction of postoperative bleeding in liver transplantation. Br J Anaesth. 2017;119(3):402-10.

67. Fayed N, Mourad W, Yassen K, Gorlinger K. Preoperative thromboelastometry as a predictor of transfusion requirements during adult living donor liver transplantation. Transfus Med Hemother. 2015;42:99–108.

68. Bolliger D, Zenklusen U, Tanaka KA. Point-of-care coagulation management algorithms during ECMO support: are we there yet? Minerva Anestesiol. 2016;82(9):1000-9.

69. Prakash S, Wiersema UF, Bihari S, Roxby D. Discordance between ROTEM® clotting time and conventional tests during unfractionated heparin-based anticoagulation in intensive care patients on extracorporeal membrane oxygenation. Anaesth Intensive Care. 2016;44(1):85-92.

70. Bischof D, Dalbert S, Zollinger A, Ganter MT, Hofer CK. Thrombelastography in the surgical patient. Minerva Anestesiol. 2010;76(2):131-7.

71. Khaja WA, Bilen O, Lukner RB, Edwards R, Teruya J. Evaluation of heparin assay for coagulation management in newborns undergoing ECMO. Am J Clin Pathol. 2010;134(6):950-4.

72. Oliver WC. Anticoagulation and coagulation management for ECMO. Semin Cardiothorac Vasc Anesth. 2009;13(3):154-75.

73. O'Neill AI, McAllister C, Corke CF, Parkin JD. A comparison of five devices for the bedside monitoring of heparin therapy. Anaesth Intensive Care. 1991;19(4):592-6.

74. Shore-Lesserson L, Manspeizer HE, DePerio M, Francis S, Vela-Cantos F, Ergin MA. Thromboelastography-guided transfusion algorithm reduces transfusions in complex cardiac surgery. Anesth Analg. 1999;88(2):312-9.

75. Manikappa S, Mehta Y, Juneja R, Trehan N. Changes in transfusion therapy guided by thromboelastograph in cardiac surgery. Ann Card Anaesth. 2001;4(1):21-7.

76. Royston D, von Kier S. Reduced haemostatic factor transfusion using heparinase-modified thrombelastography during cardiopulmonary bypass. Br J Anaesth. 2001;86(4):575-8.

77. Ak K, Isbir CS, Tetik S, Atalan N, Tekeli A, Aljodi M, i sur. Thromboelastography-based transfusion algorithm reduces blood product use after elective CABG: a prospective randomized study. J Card Surg. 2009;24(4):404-10.

78. Westbrook AJ, Olsen J, Bailey M, Bates J, Scully M, Salamonsen RF. Protocol based on thromboelastograph (TEG) out-performs physician preference using laboratory coagulation tests to guide blood replacement during and after cardiac surgery: a pilot study. Heart Lung Circ. 2009;18(4):277-88.

79. Girdauskas E, Kempfert J, Kuntze T, Borger MA, Enders J, Fassl J, i sur. Thromboelastometrically guided transfusion protocol during aortic surgery with circulatory arrest: a prospective, randomized trial. J Thorac Cardiovasc Surg. 2010;140(5):1117-24.e2.

80. Toulon P, Ozier Y, Ankri A, Fleron MH, Leroux G, Samama CM. Point-of-care versus central laboratory coagulation testing during haemorrhagic surgery. A multicenter study. Thromb Haemost. 2009;101(2):394-401.

81. Gauss T, Hamada S, Jurcisin I, Dahmani S, Boudaoud L, Mantz J, i sur. Limits of agreement between measures obtained from standard laboratory and the point-of-care device Hemochron Signature Elite(R) during acute haemorrhage. Br J Anaesth. 2014;112(3):514-20.

82. Nankervis CA, Preston TJ, Dysart KC, Wilkinson WD, Chicoine LG, Welty SE, i sur. Assessing heparin dosing in neonates on venoarterial extracorporeal membrane oxygenation. ASAIO J. 2007;53(1):111-4.

83. Liveris A, Bello RA, Friedmann P, Duffy MA, Manwani D, Killinger JS, i sur. Anti-factor Xa assay is a superior correlate of heparin dose than activated partial thromboplastin time or activated clotting time in pediatric extracorporeal membrane oxygenation. Pediatr Crit Care Med. 2014;15(2):e72-9.

84. Bembea MM, Schwartz JM, Shah N, Colantuoni E, Lehmann CU, Kickler T, i sur. Anticoagulation monitoring during pediatric extracorporeal membrane oxygenation. ASAIO J. 2013;59(1):63-8.

85. Faraoni D, Levy JH. Algorithm-based management of bleeding in patients with extracorporeal membrane oxygenation. Crit Care. 2013;17(3):432.

11. Životopis

Lucija Svetina je rođena 22.1.1986. godine u Zagrebu.

Upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2004. godine te diplomirala 2010. godine s prosjekom ocjena 4,9. Nagrađena je Dekanovom nagradom za najboljeg studenta treće godine studija te Rektorovom nagradom za najbolji znanstveni rad „Značenje kliničkog statusa glave i vrata u indikaciji, opsegu i ishodu kirurškog liječenja planocelularnog karcinoma kože glave i vrata“. Dodijeljena joj je stipendija Grada Zagreba za diplomski studij.

Po završetku studija je 2011. upisala poslijediplomski doktorski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i završila pripravnički staž u KBC „Zagreb“, gdje je 2012. godine otpočela specijalizaciju iz kardiotorakalne kirurgije, smjer kardijalna kirurgija. Specijalizaciju je završila 2018. godine.

Objavila je 15 radova indeksiranih u Current Contents.

Stručno se usavršavala u Austriji, Italiji i Velikoj Britaniji.