

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Plzni**

**PROBLEMATIKA BIOKOMPATIBILITY
U METOD NAHRAZUJÍCÍCH
FUNKCI LEDVIN**

MUDr. Kamila Polanská

Dizertační práce

Plzeň, 2006

I. interní klinika

Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Plzni



PROBLEMATIKA BIOKOMPATIBILITY U METOD NAHRAZUJÍCÍCH FUNKCI LEDVIN

MUDr. Kamila Polanská

Obor studia: Vnitřní lékařství

MUDr. Kamila Polanská
I. interní klinika LF UK a FN
Alej Svobody 80
304 60 Plzeň

Tel: ++ 420 377 103 285
Fax: ++ 420 377 103 957
e-mail: polanska@fnplzen.cz

Obsah:	strana
1. Teoretický úvod	3
1.1. Biokompatibilita a materiály	3
1.2. Kontinuální metody očišťování krve	4
1.3. Trombogenita jako nejpálčivější problém biokompatibility	4
1.4. Příprava mimotělního oběhu při metodách náhrady funkce ledvin	5
1.5. Formy antikoagulace při mimotělních eliminačních metodách	5
1.6. Regionální citrátová antikoagulace	6
1.7. Různé způsoby provedení regionální citrátové antikoagulace	6
1.8. Klinický význam biokompatibility	8
1.9. Markery ke sledování biokompatibility	9
1.9.1. Trombogenita	9
1.9.2. Vyšetření koagulace	10
1.9.3. Vyšetření fibrinolýzy	11
1.9.4. Vyšetřování endotelové dysfunkce	11
1.10. Nový dialyzátor řady FX	12
1.11. Regionální citrátová antikoagulace při intermitentní hemodialýze	12
1.12. Citrát - kalciový monitor	13
2. Cíle dizertační práce	14
3. Soubory a metodika	15
3.1. Vliv proplachu s heparinem na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin	15
3.2. Vliv regionální citrátové antikoagulace na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin	18
3.3. Parametry trombogenity a aktivace komplementu při intermitentní hemodialýze s novým polysulfonovým dialyzátorem řady FX	21
3.4. Vybrané parametry biokompatibility při intermitentní hemodialýze s regionální citrátovou antikoagulací, kontrolovanou podle hodnot ionizovaného kalcia.	24
4. Výsledky	28
4.1. Vliv proplachu s heparinem na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin	28
4.2. Vliv regionální citrátové antikoagulace na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin	29
4.3. Parametry trombogenity a aktivace komplementu při intermitentní hemodialýze s novým polysulfonovým dialyzátorem řady FX	31
4.4. Vybrané parametry biokompatibility při intermitentní hemodialýze regionální citrátovou antikoagulací, kontrolovanou podle hladin ionizovaného kalcia	32
5. Tabulková příloha a schémata	34
5.1. Vliv proplachu s heparinem na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin	34
5.2. Vliv regionální citrátové antikoagulace na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin	38

5.3. Parametry trombogenity a aktivace komplementu při intermitentní hemodialýze s novým polysulfonovým dialyzátorem řady FX	43
5.4. Vybrané parametry biokompatibility při intermitentní hemodialýze s regionální citrátovou antikoagulací, kontrolovanou podle hladin ionizovaného kalcia	46
5.5. Schémata	50
6. Diskuze	54
6.1. Vliv proplachu s heparinem na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin	54
6.2. Vliv regionální citrátové antikoagulace na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin	57
6.3. Parametry trombogenity a aktivace komplementu při intermitentní hemodialýze s novým polysulfonovým dialyzátorem řady FX	61
6.4. Vybrané parametry biokompatibility při intermitentní hemodialýze s regionální citrátovou antikoagulací, kontrolovanou podle hladin ionizovaného kalcia	64
7. Závěry	68
8. Literatura	70
9. Seznam publikací a přednášek autora	82
10. Poděkování	86
11. Seznam nejčastěji použitých zkratk	87

1. Teoretický úvod

1.1. Biokompatibilita a materiály

Při mimotělních metodách náhrady funkce ledvin dochází vlivem kontaktu krve s umělým povrchem extrakorporálního oběhu k celé řadě často nežádoucích reakcí. Dochází k aktivaci hemostázy, komplementu, uvolnění cytokinů a dalších působků. Umělé povrchy také mohou vést k alergickým či toxickým reakcím, působit kancerogenně, měnit složení krevních bílkovin apod. Obecně takové chování umělých povrchů nazýváme bioinkompatibilní.

Z experimentů s "umělou ledvinou" je téměř století známa schopnost umělých povrchů indukovat či podporovat vznik trombu při jejich kontaktu s krví. Tato vlastnost se nazývá trombogenita. Trombogenita se stala u mimotělních metod náhrady funkce ledvin prvním, dlouho jediným, a i nejdůležitějším ukazatelem biokompatibility. Z četných studií je známo, že zasahuje všechny oblasti hemostázy, tedy koagulaci, fibrinolýzu i trombocyty (viz schéma 1, 2) [Broze 1995, Lane et Bowry 1994, Opatrný et al 1993, Opatrný et al 1991].

Jinou ostře sledovanou oblastí při interakci krve s umělým povrchem je ovlivnění složek komplementu. Od 70. let 20. století je známý přechodný pokles počtu leukocytů a hlavně neutropenie během prvních minut hemodialýzy. Tento jev byl posléze Craddockem a jeho spolupracovníky vysvětlen sekvestrací komplementem aktivovaných leukocytů v plicním řečišti [Craddock et al 1977]. Mezi významné ukazatele biokompatibility materiálů patří i problematika produkce cytokinů a uvolnění bradykininu při kontaktu s krví.

Z dlouhodobého pohledu se bio(in)kompatibilním chováním membrán rozumí jejich vliv na kumulaci molekul o střední velikosti, např. beta-2-mikroglobulinu a jeho souvislost s dialyzační amyloidózou [Jadoul 1998, Pickett et al 2002], kumulaci produktů pokročilé glykace a oxidace včetně oxidačního stresu, a dále vazba pro tělo důležitých látek na umělé povrchy mimotělního oběhu, ať už krevních bílkovin, protilátek, albuminu, koagulačních faktorů či medikamentů.

Cílem metod náhrady funkce ledvin je nejen účinně očistit krev od produktů metabolismu, které se v organismu při selhání ledvin (ať akutním či chronickým) kumulují, ale i minimalizovat negativní působení kontaktu krve s umělým povrchem mimotělního oběhu na pacienta. Proto se podle interakce krve s umělým povrchem začaly materiály dialyzátorů a dalších součástí mimotělního oběhu rozlišovat na méně biokompatibilní, tedy celulozové či z derivátů celulózy (Cuprophane, Haemophane, celulozoacetát apod.), a materiály s tzv. vyšší biokompatibilitou, tzv. syntetické, jako jsou membrány polysulfonové, polyakrylonitrilové, polyamidové, polymethakrylátové, polykarbonátové apod. Vlivu těchto membrán na aktivaci hemostázy a komplementu se věnovala řada studií [Craddock et al 1997, Schultze et al 1992, Krieter et al 1995, Mannstadt et al 1995, Hoenich et al 1995, Bos et al 1997, Lhotta et al 1998, Jorres et al 1999, Cianciolo et al 2001]. Byly zaměřeny především na užití různých membrán při metodách intermitentních.

1.2. Kontinuální metody očišťování krve

V posledních 20ti letech zaznamenaly prudký rozvoj tzv. kontinuální metody náhrady funkce ledvin (CRRT). Jsou jsou účinnou metodou léčby selhání ledvin, především akutního, a získaly místo zejména v léčbě kriticky nemocných v podmínkách intenzivní péče. Nemocní indikovaní k CRRT často trpí multiorgánovou dysfunkcí, která zahrnuje např. plíce, srdce a kardiovaskulární oběh, játra apod. a často bývá provázena i poruchou koagulace [Ronco et al 2001].

U těchto oběhově nestabilních nemocných jsou kontinuální metody náhrady funkce ledvin v poslední době preferovány před procedurami intermitentními zejména pro svoji pomalou, postupnou úpravu vnitřního prostředí, vyšší hemodynamickou stabilitu u kriticky nemocných pacientů, větší možnosti odstranění cytokinů, či lepší kontroly tekutinové bilance [Ronco et al 1998, Ronco et al 2001, Cole et al 2000, Kellum et al 2002].

Stále není jednoznačně vyřešen postoj k včasnosti zahájení náhrady funkce ledvin a vliv včasného napojení na reparaci renálních funkcí a přežití nemocných [Bellomo et Ronco 1998, Conger et al 1994, Gretz et al 1998, Golper 2004, Augustine et al 2004]. Další klíčovou otázkou je u kontinuálních metod volba vhodného protisrážlivého zajištění. Forma antikoagulace často limituje užití těchto metod v léčbě kriticky nemocných. Nadměrná či nedostatečná antikoagulace může dále komplikovat klinický stav pacientů či mít za následek nižší účinnost procedur [Conger et al 1994, Webb et al 1995, Manns et al 1998, Palsson et Niles 1999, Tan et al 2000, Gabutti et al 2002, Gabutti et al 2004].

1.3. Trombogenita jako nejpálčivější problém biokompatibility

Jak již bylo uvedeno výše, při kontaktu krve s umělým povrchem dochází k celé řadě interakcí a trombogenita umělých povrchů se v klinické praxi uplatňuje nejvýrazněji. U kontinuálních metod je bio(in)kompatibilní chování materiálů mimotělního oběhu ještě akcentováno ve srovnání s podobnými vlivy při intermitentních metodách náhrady funkce ledvin [Langenecker et al 1994, Ronco et al 2001, Lhotta et al 1998, Dhondt et al 1998, Hofbauer et al 1999, Frank et al 2001, Schultze et al 1992, Cianciolo et al 2001, Hoenich et al 1995, Janssen et al 1993]. Často jsou tímto způsobem léčeni nemocní, u kterých je antikoagulace nefrakcionovaným heparinem (jež je obvyklá u metod intermitentních) kontraindikovaná především pro riziko krvácivých komplikací. Nemocní často trpí diseminovanou intravaskulární koagulací, jsou časně po operaci či traumatu, mají deficit srážlivých faktorů buď při jaterní dysfunkci či v důsledku neadekvátní substituce krevních ztrát, nebo mají potenciální riziko krvácení do gastrointestinálního traktu (např. při stresových vředech, při akutní nekrotizující pankreatitidě) apod. To vše limituje užití kontinuálních metod náhrady funkce ledvin a činí volbu vhodného antikoagulačního zajištění procedur ještě těžší [Webb et al 1995, Leslie et al 1996, Palsson et Niles 1999, Reeves et al 1999, Tan et al 2000].

1.4. Příprava mimotělního oběhu při metodách náhrady funkce ledvin

Dříve byl obecně přijímán názor, že pro snížení trombogenity mimotělního oběhu je před zahájením procedury nahrazující funkci ledvin vhodné provést proplach fyziologickým roztokem s přísadou heparinu. Ten se podle vazebné schopnosti konkrétního materiálu mimotělních setů a dialyzátoru či filtru váže na umělé povrchy. Zabrání, či omezí se tím aktivace koagulace, ale také komplementu i leukocytů. Tak se zvyšuje biokompatibilita systému a není nezanedbatelná ani možnost redukování dávek antitrombotik, která jsou k omezení trombogenity povrchů podávána [Plötz et al 1992, Cheung et al 1992, Tayama et al 2000]. Tento názor byl však u procedur intermitentních zpochybněn [Opatrný et al 1997]. Ze studie vyplynulo, že obecně doporučovaný proplach mimotělního oběhu s fyziologickým roztokem s heparinem nemá u intermitentní hemodialýzy vliv na parametry koagulace při užití polysulfonových membrán s high-flux či low-flux charakteristikou.

V biokompatibilitě hrají roli i další faktory, jako je složení dialyzačního roztoku, rychlost průtoku krve, její teplota apod. [Schindler et al 1994, Schwarzbeck et al 1977, Skroeder et al 1996, Otte et al 1997]. Proto nelze výsledky z procedur intermitentních automaticky přebírat i pro procedury kontinuální.

Doporučení provádět proplach mimotělního oběhu s fyziologickým roztokem s přísadou heparinu před zahájením očišťovací procedury je u metod kontinuálních do současné doby obecně dodržováno. Je to dáno především snahou omezit trombogenní působení mimotělního oběhu při dlouhodobém kontaktu krve s umělými povrchy, kdy je udržení průchodnosti oběhu často problematické. Avšak u nemocných s vysokým rizikem krvácivých komplikací může proplach s heparinem riziko krvácení dále potencovat.

1.5. Formy antikoagulace při mimotělních eliminačních metodách

Stále není vyřešena problematika optimálního antikoagulans pro kontinuální metody náhrady funkce ledvin především pro vysoké riziko krvácivých komplikací na straně jedné a dlouhodobou expozici krve trombogennímu umělému povrchu na straně druhé.

Klasická antikoagulace nefracionovaným heparinem, která patřila mezi základní formu protisrážlivého zajištění CRRT, byla často neschůdná. Byly zkoušeny varianty s vysokoobjemovou ultrafiltrací a náhradou substitučními roztoky [Tan et al 2000], dále stále méně populární tzv. proplachy mimotělního oběhu fyziologickým roztokem prováděné pravidelně v průběhu procedury, kdy vlivem proplachu dochází k odplavení určitého množství aktivovaných koagulačních faktorů, krevních destiček, aktivovaného komplementu a dalších působků z míst, kde při kontaktu krve s umělým povrchem dochází k jejich aktivaci a produkci. Tento způsob do jisté míry limitoval délku očišťovací procedury na dobu, po kterou mimotělní oběh vydržel průchodný. U kontinuálních metod je tato varianta prakticky neschůdná, pokud nemocný netrpí v rámci syndromu multiorgánové dysfunkce (MODS) výraznou koagulační poruchou. Navíc je tato metoda u kriticky nemocných nevhodná především kvůli aktivaci krevních elementů,

komplementu a další stimulaci tvorby cytokinů, což u nemocných s multiorgánovým selháním může dále prohloubit tíži jejich stavu.

Proto byl postupně preferován nízkomolekulární heparin [Reeves et al 1999, Reeves et Graan 2003], byla zkoušena regionální heparinizace s antagonizací účinku heparinu protaminem sulfátem na konci mimotělního oběhu. Provedení regionální heparinizace však často komplikovaly potíže s adekvátní neutralizací efektu heparinu, monitorace účinnosti této antagonizace a dále dočasný efekt vazby s protaminem. S odstupem 2 - 4 hodin totiž docházelo k uvolnění protaminu z vazby s heparinem účinkem retikuloendotelového systému a nemocní byli ohroženi odloženým krvácením. V současné době se od této formy regionální antikoagulace vesměs upustilo. Antikoagulace prostacyclinem [Langenecker et al 1994, Fiaccadori et al 2002] či nafamostat mesilátem nedoznala většího rozšíření [Ohtake et al 1991, Hu et al 1999]. Další varianta antikoagulace, která získává v posledních letech stále větší oblibu, je regionální antikoagulace citrátem. Jde o metodu popsanou již v roce 1961 [Morita et al 1961], její bezpečné provedení si vyžádalo mnoho let experimentů k vypracování technicky schůdných schémat podání, kontroly účinnosti a bezpečnosti [Kutsogiannis et al 2000, Cointault et al 2004, Tolwani et al 2001, Bunchman et al 2002, Bunchman et al 2003, Palsson et Niles 1999, Meier-Kriesche et al 2001, Nuthall et al 2002, Gabutti et al 2002, Gabutti et al 2004].

1.6. Regionální citrátová antikoagulace

Jde o metodu antikoagulace, která je při správném provedení omezena jen na mimotělní oběh, což má význam především u osob s vysokým rizikem krvácení. Citrát je chelátotvorná sloučenina s vysokou afinitou k divalentním kationtům a váže ionty kalciové a magnezové. Kalciové ionty jsou nezbytné k aktivaci všech koagulačních faktorů s výjimkou faktoru XII, proto je citrát vysoce efektivní formou antikoagulace. Kalciové i magneziové ionty také hrají významnou roli v řadě procesů, jako např. v aktivaci komplementu [Vienken J et al 2004]. Při regionální citrátové antikoagulaci je infundován na počátku mimotělního oběhu roztok s citrátem sodným, tím dojde k vyvážení ionizovaného kalcia i magnezia do komplexů, krev se stává prakticky nesrážlivou nebo jen minimálně srážlivou a aktivace hemostázy kontaktem krve s umělým povrchem je do značné míry omezena. Při návratu krve do oběhu nemocného se různou formou upraví kalcemie na výchozí poměry a obnoví se tak koagulační schopnost krve. Tato varianta antikoagulačního zajištění metod náhrady funkce ledvin byla postupně rozpracována do mnoha způsobů provedení [Mehta et al 1990, Kutsogiannis et al 2000, Palsson et Niles 1999, Tolwani et al 2001, Gabutti et al 2002]. Zpočátku byla aplikována u metod kontinuální náhrady funkce ledvin a posléze přebírána i pro metody intermitentní.

1.7. Různé způsoby provedení regionální citrátové antikoagulace

Ze základních schémat je nutno citovat:

1. Mehtův protokol, kdy při CAVHD je hypertonický citrát sodný aplikován formou infuse do arteriální linky mimotělního oběhu, dialyzát je

bezkalciový a obsahuje magnézium, substituční roztok je na bázi fyziologického;

2. Kutsogiannisův protokol, kdy při CVVHDF je hypertonický citrát sodný aplikován formou infuse do arteriální linky mimotělního oběhu, dialyzát je bezkalciový a obsahuje magnézium, substituční roztok stejný jako dialyzační, ale s přísadou bikarbonátu;
3. Palssonův způsob, kdy při CVVH je isotonický citrát sodný je aplikován formou infuse do arteriální linky, substituční roztok obsahuje také citrát a dále magnézium, je bezkalciový;
4. Tolwaniho metoda, kdy při CVVHD je hypertonický citrát sodný aplikován formou infuse do arteriální linky, dialyzát je bezkalciový a obsahuje magnézium, substituční roztok u CVVHD nebyl použit;
5. Gabuttiho varianta, kdy při CVVHDF citrát sodný obsahuje jak substituční, tak dialyzační roztok, oba roztoky jsou bezkalciové a obsahují magnézium.

Další variantu provedení tvoří úprava kalcemie. Klasicky je prováděna formou infuse na konci mimotělního oběhu či do jiného centrálního žilního katetru, jiní autoři doporučují kalcium obsahující dialyzační roztoky [Evenepoel et al 2002, Marshall et al 2003, Morgera et al 2004]. V poslední době jsou v regionální citrátové antikoagulaci stále více preferovány izotonické roztoky citrátu sodného, neboť při použití hypertonických roztoků citrátu byla pozorována vyšší incidence některých nežádoucích účinků, jako je hypernatremie a metabolická alkalóza, hyper- či hypokalcemie.

Také neexistuje jednotný názor jak kontrolovat dostatečnost dávky podaného citrátu. Někteří autoři doporučují kontrolu hodnot ionizovaného kalcia, jiní jsou zastánci měření koagulačních časů, především hodnot aktivovaného času srážení jako bed-side dostupné metody ke kontrole dávkování citrátu [Kutsogiannis et al 2000, Gabutti et al 2002, Cointault et al 2004]. Způsob standardizovaného provedení není u intermitentních metod zatím plošně zaveden, u metod kontinuálních je variabilita provedení ještě vyšší.

Ve studiích zabývajících se kontrolou RCA podle hodnot ionizovaného kalcia také není jednoznačný konsensus ani v cílových hodnotách Ca^{2+} , zajišťujících účinnou antikoagulaci a tím i dlouhodobou průchodnost mimotělního oběhu. V literatuře je obecně doporučována taková dávka citrátu, která zajistí pokles hodnot ionizovaného kalcia na hodnoty 0,25 - 0,35 mmol/l na výstupu z dialyzátoru/filtru [Kutsogiannis et al 2000], jiní autoři akceptují hodnoty kolem 0,4 mmol/l [Nuthall et al 2002, Tolwani et al 2001] či dokonce 0,5 - 0,7 mmol/l ionizovaného kalcia [Morgera et al 2004]. Dále nepanuje shoda ani v místě, kde má být kalcemie měřena. Podle některých pramenů je měřena v tzv. „arteriální lince“ mimotělního oběhu, jiní autoři monitorují hodnotu Ca^{2+} na výstupu krve z dialyzátoru/filtru. Řízení RCA podle ionizovaného kalcia vyžaduje bed-side ionometr, který je dnes vesměs dobře dostupný na většině dialyzačních center. Hodnoty Ca^{2+} však nic neříkají o hodnotách srážecích časů.

Jak již bylo zmíněno výše, alternativním způsobem kontroly účinnosti RCA je měření aktivovaného času srážení plné krve (ACT). Jde o metodu vyžadující speciální bed-side přístroj (Hemochron, i-Stat apod.), který poskytne ze vzorku krve do 3 minut přehled o účinnosti dané antikoagulace. To má význam především u nemocných s již vstupně porušenou koagulací ve smyslu krvácivých či protrombotických potencií.

Existuje řada studií, které dokumentují bezpečné užití regionální citrátové antikoagulace se zřetelem na životnost dialyzátorů či filtrů, výskyt krvácivých komplikací či projevů citrátové toxicity (metabolická alkalóza, hyper- či hypokalcemie, nízké hodnoty ionizované frakce kalcia, vysoké hodnoty poměru celkového a ionizovaného kalcia či hypernatremie apod.), přežití nemocných či dostatečné účinnosti procedury, a to jak u metod intermitentních, tak i kontinuálních. Existují některé studie zkoumající vliv regionální citrátové antikoagulace na parametry biokompatibility [Janssen et al 1993, Boss et al 1997, Dhondt et al 1998, Hofbauer et al 1999, Apsner et al 2001, Evenepoel et al 2002, Gabutti et al 2004]. Naprostá většina prací je však zaměřena na chování těchto parametrů při intermitentních procedurách. U kontinuálních metod, kdy je kontakt krve s umělým povrchem mimotělního oběhu protrahovaný a nemocní mají často vstupně přítomnou poruchu hemostázy, nebyl ještě vliv regionální antikoagulace citrátem z pohledu biokompatibility dostatečně popsán specifickými a senzitivními markery.

1.8. Klinický význam biokompatibility

U mimotělních očišťovacích procedur se stále více prosazují materiály s vyšší biokompatibilitou. U intermitentních metod je to motivováno snahou co nejvíce omezit důsledky opakované aktivace hemostázy, komplementu a další nežádoucí vlivy bioinkompatibilních materiálů na organismus chronicky dialyzovaných nemocných. Předpokládá se, že mimo jiné v důsledku opakované interakce krve s materiály umělých povrchů jsou akcelerovány jevy jako endotelová dysfunkce, ateroskleróza, udržuje se stav tzv. chronické mikroinflamace, je na jedné straně vyšší sklon k trombózám, na druhé straně sklon k vyššímu výskytu krvácivých komplikací a pod. [Culleton et Wilson 1999; Assouad et Eknayan 1998]. Při vyšší trombogenitě povrchů také klesá účinnost dialyzační procedury a prohlubuje se vesměs přítomná anémie atd.

Biokompatibilita dialyzačních membrán má nepochybný vliv na delší uchování residuální funkce ledvin u chronicky dialyzovaných [McCarthy et al 1997, Hartmann et al 1997]. Byla potvrzena souvislost mezi hypalbuminemií, která je jedním z nejsilnějších nezávislých faktorů rizika smrti chronicky dialyzovaných, a zánětlivou odpovědí organismu. Její příčina není jasná. Spekuluje se o souvislosti s bioinkompatibilitou dialyzačních membrán [Parker et al 1996, Tayeb et al 2000].

U chronicky dialyzovaných byla mimo jiné ze séra izolována celá řada sérových faktorů, které mají inhibiční vliv na různé funkce granulocytů, monocytů a makrofágů a dále různé meziprodukty aktivace komplementu. Jde vesměs o tzv.

molekuly střední velikosti, které se při užití konvenčních nízkopropustných dialyzačních membrán odstraňují neúplně, pokud vůbec. V těle chronicky dialyzovaných se pak kumulují a jsou zodpovědné za poruchy imunity, amyloidózu chronicky dialyzovaných apod. Proto se stále více v praxi uplatňuje užití tzv. high-flux membrán s vyšší propustností pro středně molekulární látky.

1.9. Markery ke sledování biokompatibility

Existuje řada pohledů na biokompatibilní chování materiálů. Již výše bylo zmíněno, že v začátcích dialyzačního léčení to byla především trombogenita povrchů, která komplikovala rozvoj a rozšíření dialyzačních technik do běžného použití. Až získání heparinu v čisté podobě umožnilo další rozvoj dialyzačního léčení, do té doby omezeného především na experimentální a ojedinělé výkony s použitím hirudinu. Trombogenita tak byla prvním a nejvýznamnějším ukazatelem biokompatibility.

1.9.1. Trombogenita

Jak je známo z experimentů při interakci krve a umělých povrchů, dochází k aktivaci hemostázy, která zahrnuje aktivaci trombocytů, koagulace a fibrinolýzy. Při kontaktu trombocytů s umělými povrchy dochází k jejich adhezi, která spouští celou řadu reakcí obecně nazývaných aktivací trombocytů. Mezi ně patří změna jejich tvaru, agregace, uvolnění obsahu granul (tzv. degranulace), exprese některých molekul důležitých pro spuštění a pokračování koagulačního procesu na jejich povrchu, sekreci tromboxanu A₂, ADP a podobně.

Aktivaci destiček lze vyšetřovat poklesem jejich počtu v krvi při jejich adhezi na umělé povrchy, vychytávání ve tvořících se trombech, či sekvestraci poškozených trombocytů ve slezině. Jde však o hrubý ukazatel jejich aktivity.

Jsou dostupné i jiné metody vyšetřování aktivity trombocytů, jako hladiny beta-tromboglobulinu, destičkového faktoru 4 a částečně von Willebrandova faktoru (asi v 15% plasmatického množství je přítomno v trombocytech).

Destičkový faktor 4 (PF4) je specifický destičkový protein s molekulovou hmotností 30 000 daltonů, který je složený ze čtyř identických podjednotek, uvolňuje se z alfa granulí aktivovaných trombocytů a je vázán na endotelové buňky, kde je skladován. Je silný inhibitor heparinové aktivity. Uvolňuje se z destiček při jejich aktivaci při kontaktu se subendotelovými strukturami, aterosklerotickými plaky, imunitními komplexy, umělými povrchy, účinkem trombinu v cirkulaci při hyperkoagulačních stavech a podobně. Také stoupá na počátku léčby heparinem, kdy je uvolňován z cévní stěny, ale klesá při vyčerpání těchto zásob.

Beta-tromboglobulin je vysokomolekulární protein, také uložený v alfa granulích trombocytů. Podobně jako PF4 je uvolňován při aktivaci trombocytů. Je známo, že jeho koncentrace roste v renální insuficienci, a také že některé dialyzační

membrány beta-tromboglobulin adsorbují. To je nutné vzít při interpretaci výsledků do úvahy.

Mezi jiné ukazatele destičkové aktivace patří i tromboxan A_2 . Jde o silný mediátor destičkové agregace. K jeho minitoraci je možné využít hladiny tromboxanu B_2 , který je metabolitem tromboxanu A_2 a je stabilní. V renální insuficienci je však přítomna porucha destičkové cyklooxygenázy a hladiny tromboxanu B_2 jsou také modifikovány počtem trombocytů a hematokritem. Stanovení tromboxanu B_2 je navíc náchylné na zacházení se vzorkem, a proto nedoznalo v diagnostice aktivace trombocytů při nedostatečnosti ledvin významnějšího uplatnění.

Von Willebrandův faktor (vWF) je velký multimérický glykoprotein o molekulové hmotnosti 1 až 20 miliónů daltonů, který se tvoří v endotelových buňkách a megakaryocytech. V buňkách endotelu je skladován ve formě multimérů ve zvláštních cytoplasmatických granulích, v trombocytech pak v tzv. alfa granulích. Von Willebrandův faktor v plasmě plní funkci proteinového nosiče faktoru VIII, jehož plasmatický poločas prodlužuje pětinašobně, a dále se podílí na adhezi a agregaci trombocytů. 15% von Willebrandova faktoru z množství přítomného v krevním kompartmentu se vyskytuje v zásobních granulích destiček, ale většina je ho deponována v endotelových buňkách. Proto je také užíván jako marker endoteliálních funkcí a poškození endotelu, nebo jako marker aktivace trombocytů.

1.9.2. Vyšetření koagulace

Základním parametrem vyšetření koagulace je aktivovaný parciální tromboplastinový čas. Jeho prodloužení ukazuje na deficit koagulačních faktorů zejm. ve vnitřním systému srážení (viz schéma 1) a dále se užívá k monitoraci léčby nefrakcionovaným heparinem. Při aktivaci koagulace pak pozorujeme jeho zkrácení.

Aktivovaný čas srážení plné krve (ACT) je jinou variantou základního vyšetření koagulace. Jeho výhodou je možnost užití přímo u lůžka nemocného, a tudíž se hodí i k monitoraci efektu antikoagulační léčby bed-side. Jde o hrubé ukazatele aktivované koagulace, jejich hodnocení v nepřítomnosti antikoagulancií je problematické.

Citlivějším markerem aktivované koagulace jsou komplexy trombin-antitrombin III. V procesu koagulace dochází ke konverzi protombinu na aktivní trombin, který dále štěpí fibrinogen na fibrin, akceleruje iniciální část koagulační kaskády, aktivuje krevní destičky. V krvi je přítomný jeho přirozený inhibitor, tzv. antitrombin III. Aktivitu antitrombinu III potencuje až tisícinásobně vazba s heparinem. Antitrombin III se váže na trombin za vzniku inaktivního komplexu, jehož hladiny v krvi jsou odrazem míry aktivace koagulační kaskády. Má molekulovou hmotnost 88 000 daltonů, proto nejsou jeho koncentrace zkresleny přestupem do dialyzačního roztoku či ultrafiltrátu.

Jinou specifickou a senzitivní metodou vyšetření koagulace je analýza plasmatických hladin fibrinopeptidu A, který vzniká odštěpením z fibrinogenu působením trombinu. Jeho molekulová velikost je pouhých 1540 daltonů, proto prochází dialyzačními membránami a hladiny v krvi jsou tím ovlivněny. Dále má biologický poločas pouze několik minut a poměrně komplikovanou analytickou část zpracování vzorku, a proto se jako marker aktivované koagulace nerozšířil. Navíc jeho hodnoty jsou v těsné korelaci s dříve zmíněnými komplexy trombin-antitrombin III.

Jinou variantou je měření koncentrací protrombinového fragmentu F1+2, který je odštěpen při konverzi protrombinu. V hodnocení antikoagulace u metod náhrady funkce ledvin zatím není běžně užíván.

1.9.3. Vyšetření fibrinolýzy

Při aktivaci fibrinolýzy se neaktivní zymogen - plasminogen - konvertuje na aktivní plasmin, který je schopen štěpit fibrinogen a fibrin na degradační produkty (viz schéma 2).

K nejvýznamnějším fibrin degradačním produktům (FDP) patří D-dimer. Jde o molekulu tvořenou dvěma sousedními fibrinovými monoméry, které byly spojeny aktivovaným faktorem XIII. Jde o velmi rozšířený specifický marker aktivované fibrinolýzy.

Mezi působky vedoucí k aktivaci plasminogenu patří tkáňový aktivátor plasminogenu (t-PA), aktivátor plasminogenu urokinázového typu (u-PA) a dále aktivátor plasminogenu závislý na kontaktním systému, jež zahrnuje faktor XII, vysokomolekulární kininogen, prekalikrein a faktor XI. Cesty aktivace plasminogenu se mohou navzájem propojovat. Do tohoto procesu dále vstupují inhibitory aktivátoru plasminogenu jako je PAI-1 a PAI-2 inhibující t-PA a u-PA. Dosud je považována za nejdůležitější cestu aktivace ta, která je aktivována t-PA.

1.9.4 Vyšetřování endotelové dysfunkce

Vzhledem k intimní souvislosti procesu aterosklerózy, poškození endotelu a prokoagulačního stavu bývá někdy do hodnocení biokompatibility zahrnováno i hodnocení endotelové dysfunkce. Kromě schopnosti vasodilatace, navozené působením oxidu dusnatého, je možné k vyšetřování endotelové dysfunkce použít plasmatické hladiny von Willebrandova faktoru (vWF), tkáňového faktoru (TF), tkáňového aktivátoru plasminogenu (t-PA), inhibitoru aktivátoru plasminogenu-1 (PAI-1), hladiny trombomodulinu (TM) apod. Většina těchto molekul již byla zmíněna výše.

Tkáňový faktor je transmembránový glykoprotein s molekulovou hmotností cca 47000 daltonů, který pro svoji funkci vyžaduje přítomnost specifických fosfolipidů. Funguje jako receptor a zároveň kofaktor pro koagulační faktor VII a VIIa a má klíčovou roli v inicializaci prokoagulační aktivity vázané na buněčné povrchy (viz schéma 1). Původně byl považován za iniciátor zevní cesty srážení

(aktivovaný f. VII vede k přímé aktivaci f. X). Dnes je známo, že je schopen aktivovat faktor X skrze vnitřní systém srážení pomocí aktivace faktoru IX na IXa. Tkáňový faktor je syntetizován monocyty, makrofágy a fibroblasty, nachází se zejména v plicích, mozku, placentě, některých tumorech. Je spolehlivě izolován od neaktivního faktoru VII cirkulujícího v krvi neporušenou bariérou endotelových buněk. V nich se vyskytuje pouze vzácně a to v konformaci neschopné reagovat s faktorem VII. Porušením endotelu je tkáňový faktor vystaven v cirkulaci přítomnému f. VII a tím je umožněno spuštění koagulační kaskády.

1.10. Nový dialyzátor řady FX

Požadavky na vývoj stále více biokompatibilních dialyzačních membrán by měl splňovat i nový, parou sterilizovaný dialyzátor FX60S (FMC, Bad Homburg, Německo) se syntetickou, polysulfonovou (tedy vysoce biokompatibilní) membránou, s high-flux charakteristikou a s upravenou strukturou této membrány. Úprava spočívá ve změně zvlnění jednotlivých kapilár dialyzátoru, které má za důsledek zmenšení vnitřního průsvitu kapiláry z cca 200 na 185 μm , snížení tloušťky stěny kapiláry ze 40 na 35 μm , vyšší sieving koeficient a vyšší nahuštění kapilár, umožňující zvýšení clearance pro malé i střední molekuly. Výrobce také modifikoval zevní design dialyzátoru, který je celkově menší, má proti obvyklému uspořádání bočně uložené koncovky na napojení krevních setů. To omezuje tvorbu smyček a tendenci k zalomení setů, které mohou vést k turbulenci krevního proudu a zvyšování smykového napětí na povrchu krevních elementů, a tak k hemolýze či předčasnému vysrážení mimotělního oběhu. Zevní pouzdro dialyzátoru je polypropylenové, což proti původnímu polykarbonátovému vede k redukci celkové hmotnosti dialyzátoru.

U tohoto nového dialyzátoru však chyběly poznatky o vlivu nových modifikací na parametry trombogenity a aktivace komplementu před jeho uvedením do rutinního užití.

1.11. Regionální citrátová antikoagulace při intermitentní hemodialýze

Jak již bylo uvedeno výše, u chronicky dialyzovaných v případě zvýšeného výskytu krvácivých komplikací není často možné užití klasické a ověřené antikoagulace nefrakcionovaným či nízkomolekulárním heparinem [Ouseph R et al Semin Dial 2000].

Jako varianta sloužící k omezení především trombogenity mimotělního oběhu je stále více používána technika regionální antikoagulace citrátem (RCA) při intermitentní hemodialýze. Jak bylo uvedeno v předchozích odstavcích, podobně jako u kontinuálních metod je variant provedení RCA mnoho. Existuje množství studií zkoumající životnost filtrů, acidobazickou rovnováhu, minerálové dysbalance, adekvátnost dialýzy, kinetiku citrátu při intermitentní hemodialýze s RCA, jsou některé práce zabývající se vlivem citrátové antikoagulace na parametry koagulace, aktivaci komplementu, aktivaci leukocytů apod. Předpokládalo se snížení těchto nežádoucích reakcí při depleci kalciových iontů,

kteře se uplatňují nejen v hemostáze, ale i v aktivaci komplementu. Nicméně technika regionální antikoagulace citrátem ještě není plošně rozšířena především pro svoji vyšší náročnost na ošetřující personál a vybavení dialyzačních středisek. Není také dosud stanoven doporučený způsob provedení s ohledem na bezpečnost nemocného, dostatečnou úroveň antikoagulace a zatím se tato technika nerozšířila do rutinního užití.

1.12. Citrát - kalciový monitor

Pro usnadnění rutinního provedení regionální citrátové antikoagulace byl v poslední době vyvíjen Univerzitou v Krems v Rakousku přístroj, usnadňující podávání infuze s citrátem na počátku mimotělního oběhu a současně podávání infuze kalciových iontů na konci mimotělního oběhu [Schrefl et al 2001].

Jde o přídatné zařízení k dialyzačnímu přístroji, které je s dialyzačním monitorem propojeno, tím je umožněna synchronizace rychlosti krevního průtoku mimotělním oběhem s množstvím infundovaného citrátu a kalcia. Přístroj funguje na principu řízení RCA podle hodnot ionizovaného kalcia, to je však měřeno pouze v systémové krvi nemocného. Podle vstupní hodnoty ionizovaného kalcia pacienta a na základě jeho opakovaného měření v systémové krvi nemocného, koriguje monitor v pravidelných intervalech rychlost infuze s kalcie tak, aby byla udržena normální hodnota kalciových iontů v pacientské krvi. Tím je zaručena bezpečnost provedení především z pohledu dostatečné restituce kalcemie na konci mimotělního oběhu. Není však dostatek informací o změnách parametrů hemostázy a aktivace komplementu v průběhu mimotělního okruhu, zejména na dialyzační membráně. Tento přístroj, který je ve fázi klinického zkoušení, by znamenal usnadnění provedení této formy antikoagulace jak u metod intermitentních, tak i kontinuálních.

2. Cíle dizertační práce

Problematika biokompatibility je stále více v popředí zájmu v řadě odvětví lidské činnosti. Lidské snažení v medicíně je motivováno snahou co nejméně negativně ovlivňovat lidský organismus léčebnými zásahy. Nejinak je tomu v nefrologii u mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin. Proto se soustřeďuje pozornost na metody zvýšení biokompatibility použitých materiálů, formy provedení procedur a podobně a dále na metody jejího ovlivnění.

Cílem práce bylo:

1. zhodnocení vlivu proplachu mimotělního oběhu u kontinuálních metod náhrady funkce ledvin roztokem s heparinem;
2. popsání vlivu regionální citrátové antikoagulace na parametry hemostázy a aktivaci komplementu ve srovnání s klasickou systémovou antikoagulací heparinem u kontinuálních metod náhrady funkce ledvin;
3. analýza chování parametrů biokompatibility u nového dialyzátoru se syntetickou, polysulfonovou (tedy vysoce biokompatibilní) membránou z řady FX (FMC, Bad Homburg), s charakteristikou high-flux a upravenou strukturou dialyzační membrány u chronicky hemodialyzovaných pacientů;
4. posouzení chování parametrů biokompatibility a aktivace komplementu při regionální citrátové antikoagulaci, kontrolované podle hodnot ionizovaného kalcia při užití nového citrát-kalciového monitoru při intermitentní hemodialýze.

3. Soubory a metodika

Práce se zabývá čtyřmi různými problémy spojenými s biokompatibilitou mimotělních očišťovacích metod nahrazujících funkci ledvin, a proto jsou následující kapitoly členěny do těchto částí:

1. Vliv proplachu s heparinem na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin.
2. Vliv regionální citrátové antikoagulace na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin.
3. Parametry trombogenity a aktivace komplementu při intermitentní hemodialýze s novým polysulfonovým dialyzátorem řady FX.
4. Vybrané parametry biokompatibility při intermitentní hemodialýze s regionální citrátovou antikoagulací, kontrolovanou podle hladin ionizovaného kalcia.

3.1. Vliv proplachu s heparinem na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin

3.1.1. Charakteristika souboru

Vyšetřovaný soubor tvořilo 11 nemocných v kritickém stavu (8 mužů a 3 ženy), průměrného věku 60 ± 5 (aritmetický průměr \pm SEM), kteří trpěli akutním selháním ledvin. Bylo u nich provedeno celkem 26 kontinuálních venovenozních hemodiafiltrací (CVVHDF) v postdilučním uspořádání. Indikací k CVVHDF bylo akutní selhání ledvin, které se u 9 nemocných rozvinulo v rámci multiorgánového selhání (u 3 v důsledku sepse) a u 2 rhabdomyolýzou. Pro závažnost stavu nemocných svědčí další přítomné diagnózy jako hemoragicko-nekrotizující pankreatitida u 2 nemocných, perforace žaludečního vředu u 1 nemocného, ruptura aneurysmatu a. cerebri media u dalšího nemocného a pancytopenie při imunosupresivní léčbě u 1 z nemocných. Při zahájení studie byl soubor charakterizován průměrnou hodnotou APACHE II $28,0 \pm 1,86$, sérového kreatininu $362,2 \pm 51,6$ $\mu\text{mol/l}$, sérové urey $23,7 \pm 2,4$ mmol/l , celkovou bílkovinou v séru $51,3 \pm 2,2$ g/l , hematokritem $30,1 \pm 0,9$ % a C reaktivním proteinem $158,5 \pm 27,8$ mg/l . Kontrolní soubor tvořilo 11 zdravých dobrovolníků, kteří byli k nemocným párováni podle věku a pohlaví.

3.1.2. Provedení CVVHDF

CVVHDF byly provedeny s diafiltry M100 ze soupravy Prisma SET (Hospal Industrie, Meyzieu, Francie) a Ultraflux AV600S (Fresenius Medical Care, St. Wendel, SRN), které obsahovaly high-flux membrány ze syntetických materiálů

(polyakrylonitril AN69 nebo polysulfon). Byly použity monitory Prisma (Hospal Dasco S.p.A., Medolla, Itálie) a Kimal (Middlesex, Anglie). K potřebné náhradě odfiltrovaného množství tekutiny sloužily komerčně vyráběné roztoky Medisol-K3 (Medites Pharma s.r.o., Rožnov pod Radhoštěm, Czech Republic, koncentrace sodíku 140 mmol/l, koncentrace kalcia 1,75 mmol/l, koncentrace hořčíku 1,00 mmol/l, koncentrace chloridů 108,5 mmol/l, koncentrace laktátu 40,0 mmol/l) aplikované v postdilučním uspořádání. Cévní přístup byl zajištěn pomocí dvoucestných katétrů Arrow (Arrow International, Inc., Reading, PA, U.S.A.), zavedených do pravé femorální žíly. Rychlost substituce náhradního roztoku byla nastavena na 1000 ml/h, průtok krve mezi 100 - 150 ml/min a dialyzačního roztoku Medisol-K3 o teplotě 37 st. C na 2000 ml/h. V případě regionální antikoagulace citrátem byl použit magistraliter připravený bikarbonátový roztok (koncentrace bikarbonátu 18 mmol/l, koncentrace sodíku 131 mmol/l, koncentrace kalcia 0 mmol/l, koncentrace chloridů 117 mmol/l. Odchytky od nastavených průtoků byly připuštěny, pokud to závažnost stavu nemocného nezbytně vyžadovala. Pokud nebylo nezbytně nutné, nebyly 30 minut před odběry aplikovány náhradní roztoky (s výjimkou substituce pro CVVHDF) ani krevní deriváty. Diafiltr byl použit maximálně po dobu 24 hodin.

Byly srovnávány 3 způsoby proplachu mimotělního oběhu CVVHDF před zahájením procedury:

1. Proplach s fyziologickým roztokem bez příměsi heparinu, tedy mimotělní okruh byl propláchnut 3000ml fyziologického roztoku bez příměsi heparinu rychlostí 100ml/min bez recirkulace.
2. "Obecně doporučovaný proplach", při kterém byl mimotělní oběh propláchnut 3000 ml fyziologického roztoku s heparinem v koncentraci 2000 IU/l rychlostí 100 ml/min. Proplach byl opět jednorůtočný bez recirkulace. Roztok se po průchodu mimotělním oběhem vypouštěl do odpadu.
3. "Dlouhotrvající proplach s heparinem ve vysoké koncentraci", tj. 2000 ml fyziologického roztoku s 10000 IU heparinu/l rychlostí 100 ml/min po dobu 60 minut. Roztok po tuto dobu recirkuloval v mimotělním oběhu. Následoval jednorůtočný proplach s 500 ml fyziologického roztoku bez heparinu rychlostí 100 ml/min, který měl odstranit veškerý volný heparin a umožnil, aby zůstal pouze heparin případně vázaný na membránu.

Pořadí procedur s různým typem proplachu (1, 2 nebo 3) bylo pro jednotlivé nemocné voleno náhodně. U jednotlivých nemocných proběhly srovnávané procedury za použití stejného typu diafiltru. U některých nemocných se nepodařilo provést všechny 3 způsoby proplachu, neboť u některých nemocných před provedením všech 3 procedur indikace k CVVHDF pominula. Hodnoceno tak bylo 9 procedur s proplachem bez heparinu, 10 s proplachem o nízké a 7 s proplachem o vysoké koncentraci heparinu.

3.1.3. Antikoagulace

Pět minut před napojením na mimotělní oběh byl nemocným nitrožilně podán bolus heparinu (Heparin, Zentiva, Prague, Czech Republic) v dávce 30 IU/kg tělesné hmotnosti. Po napojení byla spuštěna infúze heparinu do arteriální části setu rychlostí 10 IU/kg/h. Způsob nasetování CVVHDF v postdilučním uspořádání je znázorněn na schématu 3 (viz příloha). Dávka heparinu v průběhu procedury byla přizpůsobována podle hodnot aktivovaného času srážení (ACT, Hemochron[®] 401, International Technidyne Corporation Limited, Edison, NJ, USA se zkumavkami P214) tak, aby hodnota ACT měřená v setu přivádějícím krev do diafiltru byla o 10-15 % vyšší než je horní mez referenčního rozmezí. Pokud byla hodnota ACT horní mez referenčního rozmezí, zvýšila se hodinová dávka heparinu o 25%. U tří nemocných byla použita regionální citrátová antikoagulace, kdy byl do mimotělního oběhu CVVHDF před diafiltrem infundován trojsodný citrát ve formě ACD-A roztoku (Baxter Health Care, Deerfield, IL, USA, s koncentrací citrátu 0,113mol/l) s počáteční rychlostí 400 ml/h. Za diafiltrem byl účinek citrátu neutralizován infúzí 10% calcium gluconicum (Calcium Biotika, Hoechst-Biotika spol. s r. o., Martin, Slovenská republika) aplikovaného s výchozí rychlostí 15 ml/h (viz schéma 4). Dávkování citrátu a kalcia bylo upravováno dle hodnot aktivovaného času srážení se stejnými cílovými hodnotami ACT jako při použití heparinu. Do centrálního žilního katétru nemocní dostávali 20% Magnesium sulfuricum (Magnesium sulfuricum Biotika, Hoechst-Biotika spol. s r. o., Martin, Slovenská republika) rychlostí 3 ml/h.

K hodnocení biokompatibility je užívána celá řada parametrů. Pro tuto studii byly vybrány následující:

1. počet leukocytů v krvi (jako marker aktivace leukocytů a dále komplementu) analyzátozem SE 9000 autoanalyzer, Sysmex, Kobe, Japonsko,
2. počet trombocytů v krvi (marker aktivace trombocytů) analyzátozem SE 9000 autoanalyzer, Sysmex, Kobe, Japonsko,
3. hladina beta-tromboglobulinu (marker aktivace trombocytů) kitem Asserachrom[®] Beta-thromboglobulin, Diagnostica Stago, Asnieres-sur-Seine, Francie,
4. aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT, ukazatel hodnotící koagulaci) byl měřený s využitím kefalin-kaolinového reagens firmy EXBIO Olomouc s.r.o. (Olomouc, Česká republika),
5. hladina komplexů trombin-antitrombin III (ukazatel hodnotící koagulaci) kitem Enzygnost[®] TAT micro, Behring Diagnostics GmbH, Marburg, Německo,
6. hladina D-dimeru (ukazatel hodnotící fibrinolýzu) kitem TintElize[®] D-dimer, Biopool International, Umeå, Švédsko,

7. hladina C5a anafylatoxinu (marker aktivace komplementu) kitem Enzygnost[®] C5a micro, Behring Diagnostics GmbH, Marburg, Německo.

Dále byly stanovovány koncentrace heparinu v plasmě pomocí kitu Accuclot Heptest[®] (Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO, USA).

3.1.5. Odběr materiálu k vyšetření

Krev k vyšetření před zahájením procedury byla odebírána z katétru ještě před podáním antikoagulancií. Podle předpokladu, že pokud bude efekt proplachu s heparinem přítomen, projeví se zejména v počátečních fázích procedury, byly stanoveny i jednotlivé odběrové časy. V průběhu CVVHDF byla krev proto získávána v 15., 60. a 360 minutě, vždy na vstupu a výstupu diafiltru. V průběhu procedury byl na přítomnost heparinu, komplexů trombin-antitrombin III, beta-tromboglobulinu, D-dimeru a C5a vyšetřován také diafiltrát. S odebraným diafiltrátem se zacházelo stejně jako s odebranou krví. Vzorky byly zpracovávány podle doporučení v komerčně dostupných kitech.

3.1.6. Statistická analýza

Výsledky jsou uváděny jako aritmetické průměry \pm SEM. Soubor 11 nemocných vyšetřených bezprostředně před zahájením léčby CVVHDF byl srovnán s 11 zdravými dobrovolníky nepárovým t-testem. Nepárový t-test byl použit i ke srovnání výsledků při různých způsobech proplachu (ne všichni nemocní podstoupili všechny varianty proplachu). Párový t-test byl použit pro srovnání výsledků získaných v průběhu procedury. Před statistickou analýzou byly počty buněk a koncentrace látek zjišťované v průběhu procedury korigovány s použitím hematokritu k vyloučení vlivu hemokoncentrace či hemodiluce v průběhu procedury.

3.2. Vliv regionální citrátové antikoagulace na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin

3.2.1. Charakteristika souboru

Devět kriticky nemocných (APACHE II $24,4 \pm 1,6$, aritmetický průměr \pm SEM) s akutním ledvinným selháním ve věku $53,3 \pm 4,6$ let podstoupilo v rámci studie 11 kontinuálních venovenózních hemodiafiltrací (CVVHDF), při kterých byla použita regionální citrátová antikoagulace (RCA). U jiných čtyř kriticky nemocných (APACHE II $27,0 \pm 1,3$, $p=NS$) s akutním selháním ledvin, kteří byli ve věku $67,0 \pm 8,6$ let ($p=NS$), se uskutečnilo 10 CVVHDF se systémovou antikoagulací nefrakcionovaným heparinem. O tom, zda bude CVVHDF

provedena s RCA nebo s antikoagulací heparinem, rozhodoval podle klinického stavu ošetřující lékař. Nemocní byli léčeni na jednotce intenzivní péče interního zaměření nebo na klinice anesteziologie a resuscitace univerzitní nemocnice. Studie byla schválena místní etickou komisí. Nemocní neměli arteriální či žilní trombózu a nebyli léčeni heparinem ani warfarinem. Kontrolní skupina byla sestavena z 11 zdravých osob ve věku $59,8 \pm 4,4$ let.

3.2.2. Provedení CVVHDF

K 11 CVVHDF u nemocných s RCA byl použit hemodiafiltr Ultraflux AV600S (Fresenius Medical Care, St. Wendel, Německo) s high-flux polysulfonovou membránou o ploše $1,4 \text{ m}^2$ sterilizovaný parou. Všechny procedury se systémovou heparinizací byly vykonány s hemodiafiltrem M100 ze soupravy Prisma SET (Hospal Industrie, Meyzieu, Francie) s high-flux polyakrylonitrilovou membránou AN69 o ploše $0,9 \text{ m}^2$ sterilizovaný etylénoxidem. Před zahájením CVVHDF byl proveden proplach mimotělního oběhu se 3 litry fyziologického roztoku s nefrakcionovaným heparinem o koncentraci 2000 IU/l rychlostí 100 ml/min. Proplach byl jednopřůtočný. Roztok k proplachu se neinfundoval do oběhu nemocného. Venovenózní cévní přístup byl zajištěn dvoucestným 12F katétrem Arrow (Arrow International, Inc., Reading, PA, USA). Byly použity monitory Hygiea (Kimal, Middlesex, United Kingdom) a Prisma (Hospal Dasco S.p.A., Medolla, Itálie).

Průtok krve byl v průběhu CVVHDF procedur nastaven na 150 ml/min. Při regionální citrátové antikoagulaci byl k substituci použit magistraliter připravený bikarbonátový roztok (koncentrace bikarbonátu 18 mmol/l, koncentrace sodíku 131 mmol/l, koncentrace kalcia 0 mmol/l, koncentrace chloridů 117 mmol/l), který byl aplikován v postdilučním uspořádání rychlostí 1000 ml/h. V první hodině procedury byla udržována nulová tekutinová bilance. V dalším průběhu závisela míra náhrady filtrátu na klinickém stavu nemocných. Roztok stejného složení byl použit také jako roztok dialyzační. Dialyzační roztok měl pokojovou teplotu a protékal diafiltrem rychlostí 2 litrů/hodinu. U procedur s heparinovou antikoagulací byl jako substituční i dialyzační roztok použit Medisol-K3 (Medites Pharma s.r.o., Rožnov pod Radhoštěm, Czech Republic, koncentrace sodíku 140 mmol/l, koncentrace kalcia 1,75 mmol/l, koncentrace hořčičku 1,00 mmol/l, koncentrace chloridů 108,5 mmol/l, koncentrace laktátu 40,0 mmol/l). Procedury ve studii probíhaly maximálně 24 hodin.

3.2.3. Antikoagulace

Při regionální antikoagulaci citrátem byl do mimotělního oběhu CVVHDF před diafiltrem infundován citrát ve formě ACD-A roztoku (citrát trojsodný 74,8mmol/l a kyselina citrónová 38mmol/l, Baxter Health Care, Deerfield, IL, USA) s počáteční rychlostí 400 ml/h. V průběhu procedury se průměrná rychlost infúze citrátu pohybovala v rozpětí $356,0 \pm 62,7$ až $389,6 \pm 57,9$ ml/h (průměr \pm SD). Za diafiltrem byl účinek citrátu neutralizován infúzí 10% calcium gluconicum (Calcium Biotika, Hoechst-Biotika spol. s r. o., Martin, Slovenská republika), aplikovaného s výchozí rychlostí 15 ml/h (schéma 4, viz příloha). Při

CVVHDF se rychlost infúze mĕnila v rozsahu $13,4 \pm 1,5$ až $15,6 \pm 2,7$ ml/h. Dávkování citrátu a kalcia bylo upravováno dle hodnot aktivovaného času srážení (ACT, Hemochron 401[®], International Technidyne Corporation Limited, Edison, NJ, USA se zkumavkami P214). Snahou bylo hodnotu ACT za diafiltrem držet o 10-15% vyšší, než byla výchozí hodnota. Do centrálního žilního katétru nemocní dostávali 20% Magnesium sulfuricum (Magnesium sulfuricum Biotika, Hoechst-Biotika spol. s r. o., Martin, Slovenská republika) rychlostí 3 ml/h.

Nemocní léčení CVVHDF s užitím systémové heparinizace dostali 5 minut před napojením na mimotĕlní obĕh nitrožilně bolus nefrakcionovaného heparinu z bovinních plic stejné šarže (Heparin, Zentiva, Prague, Czech Republic) v dávce 30 IU/kg tělesné hmotnosti. Po napojení byla spuštěna infúze heparinu do arteriální části setu rychlostí 10 IU/kg hmotnosti/h.

3.2.4. Parametry k hodnocení biokompatibility

V průběhu této studie byly podobně jako v předchozí studii sledovány následující parametry:

1. počet leukocytů v krvi (jako marker aktivace leukocytů a dále komplementu) analyzátozem SE 9000 autoanalyzer, Sysmex, Kobe, Japonsko,
2. počet trombocytů v krvi (marker aktivace trombocytů) analyzátozem SE 9000 autoanalyzer, Sysmex, Kobe, Japonsko,
3. hladina beta-tromboglobulinu (marker aktivace trombocytů) kitem Asserachrom[®] Beta-thromboglobulin, Diagnostica Stago, Asnieres-sur-Seine, Francie,
4. hladiny von Willebrandova faktoru (marker aktivace trombocytů a endotelové dysfunkce)- u pacientů s regionální antikoagulací citrátem kitem IMUBIND[®] vWF ELISA, American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA,
5. aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) (ukazatel hodnotící koagulaci) byl měřený s využitím kefalín-kaolinového reagens firmy EXBIO Olomouc s.r.o., Česká republika),
6. hladina komplexů trombin-antitrombin III (ukazatel hodnotící koagulaci) kitem Enzygnost[®] TAT micro, Behring Diagnostics GmbH, Marburg, SRN,
7. hladina D-dimeru (ukazatel hodnotící fibrinolýzu) kitem TintElize[®] D-dimer, Biopool International, Umeå, Švédsko,
8. hladina C5a anafylatoxinu (marker aktivace komplementu) kitem Enzygnost[®] C5a micro, Behring Diagnostics GmbH, Marburg, SRN.

Dále byly stanovovány koncentrace heparinu v plasmě pomocí kitu Accuclot Heptest[®] (Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO, USA).

3.2.5. Odběr materiálu k vyšetření

Výše zmíněné ukazatele biokompatibility byly vyšetřeny před zahájením CVVHDF před aplikací antikoagulancií, a to z krve odebrané z arteriálního katétru na paži, a dále při CVVHDF v 15., 60., 360. a 1440. minutě. V průběhu CVVHDF byla krev k vyšetřením odebírána na výstupu z diafiltru (u RCA ještě před infúzí kalcia a substitučního roztoku) a na vstupu do diafiltru (u RCA za infúzí citrátu). Při regionální citrátové antikoagulaci bylo kromě toho měřeno ACT v systémové arteriální krvi nemocných. C5a komponenta komplementu a beta tromboglobulin byly analyzovány i ve filtrátu (viz schéma 4).

3.2.6. Statistická analýza

Koncentrace látek a počty buněk zjištěné v průběhu CVVHDF byly s použitím hematokritu korigovány k vyloučení vlivu hemokoncentrace nebo hemodiluce. K statistickému hodnocení byl použit program SigmaStat for Windows 2.03 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). V závislosti od výsledku "normality test" a "Equal Variance Test" byl ke srovnání hodnot zjištěných u nemocných před CVVHDF s RCA, u nemocných před CVVHDF se systémovou heparinizací a u zdravých osob použit test One Way ANOVA nebo Kruskal - Wallisův test. Pokud byl těmito metodami prokázán statisticky významný rozdíl, byl test ANOVA doplněn "Tukey testem" a Kruskal - Wallisův test "Dunnovou metodou". Hodnoty před zahájením procedury byly s hodnotami změřenými v průběhu CVVHD srovnávány párovým t-testem nebo Wilcoxonovým testem opět v závislosti od výsledku "normality test" a "Equal Variance Test". K srovnání ploch pod křivkou (AUC) vybraných parametrů byl užít nepárový t-test.

3.3. Parametry trombogenity a aktivace komplementu při intermitentní hemodialýze s novým polysulfonovým dialyzátorem řady FX

3.3.1. Charakteristika souboru

Otevřené, prospektivní, randomizované, zkřížené studie se zúčastnilo 18 nemocných (9 žen a 9 mužů) s chronickým selháním ledvin, kteří byli léčeni v pravidelném hemodialyzačním programu 34,5 (10-137) měsíců. Průměrný věk nemocných v souboru byl 57,5 let (36-87, uveden medián, min-max). Ze základních onemocnění ledvin se v souboru vyskytovalo 8 pacientů se selháním ledvin při chronické glomerulonefritidě, u 5ti nemocných selhaly ledviny při chronické tubulointersticiální nefritidě, 4 nemocní měli autosomálně dominantně dědičné polycystické ledviny a jeden nemocný byl po oboustranné nefrektomii pro Grawitzův tumor. Na začátku studie měli nemocní vstupní hematokrit 31,3

(21-37) %, sérový albumin 42,0 (37-46) g/l, Kt/V urey 1,4 (1,0-1,7). Kromě předpokládané průvodní poruchy hemostázy nemocných s chronickým selháním ledvin, nikdo z nemocných nebyl léčen antikoagulancii či antiagregancii či jinou s hemostázou interferující léčbou, kromě běžné a chronicky podávané heparinizace během hemodialýzy. Tato dávka zůstávala po celou dobu studie fixní. Nemocní měli stabilní hodnoty hematokritu před vstupem do studie a v průběhu 3 měsíců před zahájením studie byli na stabilní dávce rekombinantního erythropoetinu. Tato dávka zůstávala stejná i po celou dobu studie.

3.3.2. Charakteristiky dialyzátorů použitých ve studii

Nový, parou sterilizovaný dialyzátor FX60S (FMC, Bad Homburg, Německo) má syntetickou, polysulfonovou membránu (Helixone[®], Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) o ploše 1,4 m², ultrafiltrační koeficient 46 ml/mmHg/h, je sterilizována parou a má upravenou strukturu dialyzační membrány. Tato úprava spočívá ve změně zvlnění jednotlivých kapilár dialyzátoru, které má za důsledek zmenšení vnitřního průsvitu kapiláry z cca 200 na 185 μm, snížení tloušťky stěny kapiláry ze 40 na 35 μm, vyšší sieving koeficient a vyšší nahuštění kapilár, umožňující zvýšení clearance pro malé i střední molekuly. Výrobce také modifikoval zevní design dialyzátoru, který je celkově menší, má proti obvyklému uspořádání bočně uložené koncovky na napojení krevních setů. To omezuje tvorbu smyček a tendenci k zalomení setů, které mohou vést k turbulenci krevního proudu a zvyšování smykového napětí na povrchu krevních elementů a tak k hemolýze či předčasnému vysrážení mimotělního oběhu. Zevní pouzdro dialyzátoru je polypropylenové, což proti původnímu polykarbonátovému vede ke snížení celkové hmotnosti dialyzátoru. Tento dialyzátor byl v rámci studie porovnávám s obdobným, již klinicky široce využívaným vysoce propustným dialyzátorem F60S (FMC, Bad Homburg, Německo) s plochou 1,3 m² a ultrafiltračním koeficientem 30,77 ml/mmHg/h, který je také parou sterilizovaný.

3.3.3. Provedení intermitentní hemodialýzy

Nemocní byli randomizováni do 2 skupin po 9ti nemocných. S vybraným dialyzátorem nemocní podstoupili celkem 3 hemodialýzy v týdnu. Skupina A byla 1. týden léčena s použitím dialyzátoru F60S, skupina B hemodialyzována s novým dialyzátorem FX60S. Po týdenní léčbě byla skupina nemocných A převedena na léčbu pomocí FX60S a opačně skupina B léčena s dialyzátorem F60S. Při dialyzačních procedurách byly použity krevní sety FA 204B/FB 204B (FMC, Bad Homburg, Německo). Před dialýzou byl proveden proplach mimotělního oběhu s 500ml fyziologického roztoku bez heparinu. V průběhu procedury byl krevní průtok nastaven v rozmezí 200 - 300ml/min podle průtoku užívaného u konkrétního pacienta před zahájením studie. V průběhu studie byl u každého nemocného tento

průtok fixní po celou dobu sledování. Napojení na mimotělní oběh bylo zajištěno punkcí arteriovenózní fistule pomocí jehel 16G, nebyla používána jednojehlová technika dialýzy. Průtok dialyzačního roztoku byl nastaven na 500ml/min, složení dialyzačního roztoku bylo obvyklé, které bylo používáno před zahájením studie u konkrétního nemocného, a v průběhu procedury se neměnilo. Po punkci

arteriovenozní fistule byly odebrány vzorky ke krevním analýzám před zahájením procedury, pak byl nemocnému podán bolus nefrakcionovaného heparinu z bovinních plic stejné šarže (Heparin, Zentiva, Praha, Česká Republika) do arteriovenozní fistule a po 5ti minutách napojen na mimotělní oběh s kontinuální infusí heparinu. Strategie antikoagulačního zajištění byla shodná s dávkou obvyklou u konkrétního nemocného před vstupem do studie a během sledování se neměnila. U některých nemocných byla kontinuální infuse heparinu ukončena 30 minut před koncem dialýzy. 30 minut před všemi odběry byla u nemocných nastavena fixní ultrafiltrace 10ml/min, která byla po odběrech upravena podle konkrétní potřeby nemocného. V průběhu studie nebyly podávány žádné krevní deriváty.

3.3.4. Odběr materiálu k vyšetření

Odběry krve a dialyzačního roztoku k analýze parametrů trombogenity a biokompatibility byly prováděny vždy při první dialýze s konkrétním dialyzátorem. Vzorky krve byly odebrány bezprostředně před zahájením dialyzační procedury před podáním heparinu a dále v průběhu hemodialýzy v 15. a 60. minutě, kdy bývá interakce krve s umělým povrchem nejvíce vyjádřena. Vzorky byly odebírány vždy na vstupu i výstupu krve z dialyzátoru. Některé parametry byly sledovány i v diafiltrátu ve stejných časech.

3.3.5. Parametry k hodnocení biokompatibility

K hodnocení biokompatibility byly použity následující parametry:

1. počet leukocytů v krvi (jako marker aktivace leukocytů a dále komplementu, analyzátor SE 9000 autoanalyzer, Sysmex, Kobe, Japonsko),
2. počet trombocytů v krvi (marker aktivace trombocytů, analyzátor SE 9000 autoanalyzer, Sysmex, Kobe, Japonsko),
3. destičkový faktor 4 (PF4) v plasmě (marker aktivace trombocytů, kit ELISA, Asserachrom[®] PF4, Boehringer, Mannheim, Germany),
4. aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) (ukazatel hodnotící koagulaci) byl měřený s využitím kefalin-kaolinového reagens firmy EXBIO Olomouc s.r.o. (Česká republika),
5. hladina komplexů trombin-antitrombin III v plasmě (ukazatel hodnotící koagulaci, kit Enzygnost[®] TAT micro, Behring Diagnostics GmbH, Marburg, Německo),
6. hladina D-dimeru v plasmě (ukazatel hodnotící fibrinolýzu, kit TintElize[®] D-dimer, Biopool International, Umeå, Švédsko),

7. hladina C5a anafylatoxinu v plasmě (marker aktivace komplementu, kit Enzygnost[®] C5a micro, Behring Diagnostics GmbH, Marburg, Německo).

Dále byly stanovovány plasmatické koncentrace heparinu v plasmě (Accuclot Heptest[®] kit, Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO, USA). Vybrané parametry byly stanovovány také v dialyzačním roztoku. Konkrétně šlo o hladiny PF4, TAT III komplexy a hladiny D-dimeru. S dialyzačním roztokem se zacházelo stejně jako s krví. Vzorky pro výše uvedené parametry byly zpracovány podle doporučení v komerčně dostupných kitech.

3.3.6. Statistická analýza

Koncentrace látek a počty buněk zjištěné v průběhu hemodialýzy byly pomocí hematokritu korigovány k vyloučení vlivu hemokoncentrace nebo hemodiluce. Byly porovnávány výsledky z procedur provedených s dialyzátorem F60S, s výsledky z procedur vedených s dialyzátorem FX60S párovým Wilcoxonovým testem. Ten byl také použit ke srovnávání výsledků průběhu dialýz s hodnotami v čase 0. min před zahájením procedur v jednotlivých skupinách a dále k porovnání změn, které eventuálně nastávají při průchodu krve dialyzátorem, tedy hodnot na vstupu a výstupu z dialyzátoru. K vyloučení statistické významnosti dané rozdílnými výchozími hodnotami jednotlivých skupin byly výsledky vyjádřeny také jako rozdíly proti času 0. min a ty pak srovnány stejným způsobem jako základní zkorigovaná data.

3.4. Vybrané parametry biokompatibility při intermitentní hemodialýze s regionální citrátovou antikoagulací, kontrolovanou podle hodnot ionizovaného kalcia

3.4.1. Charakteristika souboru

Studie se zúčastnilo celkem 10 dlouhodobě hemodialyzovaných nemocných (8 mužů a 2 ženy), kteří byli ve stabilním klinickém stavu. Průměrný věk nemocných ve studii byl 56,5 let (37-75, uveden medián a min-max). Z příčin selhání ledvin se v souboru vyskytla chronická glomerulonefritida u sedmi nemocných, jednou selhání ledvin při urátové nefropatii, jednou v rámci Goodpastureova syndromu a jedna nemocná měla selhání ledvin při kombinaci hypertenzního poškození a chronické tubulointersticiální nefritidy. Sledovaní pacienti netrpěli interkurentní infekcí, měli stabilní hodnoty hematokritu nad 0,30 při neměnné dávce rekombinantního erythropoetinu, nebyli léčeni žádnými antikoagulancii s výjimkou heparinu podávaného při hemodialýze. Dále neměli projevy kardiální insuficience, hyperhydratace a netrpěli manifestním onemocněním koronárních tepen, neužívali digitalisové přípravky. Žádný z nemocných neměl jaterní insuficienci či malignitu v anamnéze.

3.4.2. Provedení intermitentní hemodialýzy

V rámci studie byli nemocní dialyzováni s použitím regionální citrátové antikoagulace, při které byl použit citrát-kalciový monitor vyvíjený Centrem biomedicínských technologií při Universitě v Krems v Rakousku. Přístroj usnadňuje podávání infuze s citrátem na počátku a současně podávání infuse kalciových iontů na konci mimotělního oběhu. Jde o přídatné zařízení k dialyzačnímu přístroji, které je s dialyzačním monitorem propojeno, a tím je umožněna synchronizace rychlosti krevního průtoku mimotělním oběhem s rychlostí podání infundovaného citrátu a kalcia. Podle vstupní hodnoty ionizovaného kalcia v krvi nemocného a na základě jeho opakovaného měření přístroj v pravidelných intervalech upravuje rychlost infuse kalciových iontů tak, aby byla udržena normální kalcemie v patientské krvi. Během studie s tímto monitorem byly studovány parametry biokompatibility a aktivace komplementu, kdy regionální citrátová antikoagulace byla řízená podle hodnot ionizovaného kalcia.

3.4.3. Postup při provádění hemodialýzy

Při dialyzačních procedurách byly použity dialyzační monitory 4008B, 4008E, 4008S (FMC, Německo), krevní sety FA 204B/FB 204B (FMC, Bad Homburg, Německo) a dialyzátory s low-flux polysulfonovou, parou sterilizovanou membránou. Před dialýzou byl proveden proplach mimotělního oběhu s 500 ml fyziologického roztoku bez heparinu. V průběhu procedury byl krevní průtok nastaven na 200 ml/min. Průtok dialyzačního roztoku byl 500 ml/min a k jeho přípravě byl použit komerčně dostupný bikarbonátový koncentrát BIA-F 8,4% a bezkalciový kyselý koncentrát BIK-F 40 (Medites Pharma spol. s r.o., Rožnov pod Radhoštěm, Česká Republika, výsledná koncentrace natria 140 mmol/l, kalia 2 mmol/l, kalcia 0 mmol/l, magnézia 0,5 mmol/l, chloridů 108,0 mmol/l, bikarbonátu 32 mmol/l, acetátu 3 mmol/l). V případě nutnosti byla korigována kalcemie přísadou chloridu draselného na konečnou koncentraci kalia v dialyzačním roztoku 4 mmol/l. Teplota dialyzačního roztoku byla nastavena na 37 st. C. Ultrafiltrace byla nastavena podle potřeb nemocného, dialýzy trvaly 4 hodiny a v jejich průběhu nebyly podávány krevní převody ani jejich deriváty.

3.4.4. Antikoagulace

Na začátku mimotělního oběhu byla na krevní sety napojena infúze citrátu sodného ve formě ACD-A roztoku (Baxter Health Care, Deerfield, IL, USA, s výslednou koncentrací citrátových a citronanových iontů 0,113 mol/l), jejíž rychlost byla výše zmíněným citrát-kalciovým monitorem automaticky přizpůsobena rychlosti krevního průtoku mimotělním oběhem s výslednou koncentrací citrátu 3,4 mmol v 1 litru krve a s cílovými hladinami ionizovaného kalcia menší či rovno 0,4mmol/l na výstupu z dialyzátoru [Nuthall G et al 2002]. Do návratového setu byl podáván 0,5 mol/l chlorid vápenatý připravený magistraliter v nemocniční lékárně. Rychlost infuse kalciových iontů byla přístrojem automaticky přizpůsobena tak, aby byla hodnota ionizovaného kalcia v systémové krvi nemocného udržena v normálním rozmezí.

3.4.5. Odběr materiálu k vyšetření

Ionizované kalcium bylo měřeno před napojením na mimotělní oběh a dále ve 30., 60., 120., 210. a 240 minutě hemodialýzy na počátku mimotělního oběhu (před infuzí citrátových iontů) na jeho konci (před infuzí kalciových iontů za dialyzátorem). Kromě 60. minuty bylo ve stejných časech měřeno i ACT. K posouzení biokompatibility (viz níže) byla krev odebírána před zahájením hemodialýzy a dále ve 30. a 240. minutě z odběrových míst před a za dialyzátorem. K vyloučení projevů citrátové toxicity byla kontrolována v každém z odběrových časů i acidobazická rovnováha a mineralogram v systémové krvi pacientů na přístroji ABLTM520 Blood Gas System (Radiometer Medical A/S, Copenhagen, Dánsko) .

3.4.6. Parametry k hodnocení biokompatibility

K hodnocení biokompatibility byly v této studii použity následující parametry:

1. počet leukocytů v krvi (jako marker aktivace leukocytů a dále komplementu, analyzátor SE 9000 autoanalyzer, Sysmex, Kobe, Japonsko),
2. počet trombocytů v krvi (marker aktivace trombocytů, analyzátor SE 9000 autoanalyzer, Sysmex, Kobe, Japonsko),
3. hladiny destičkového faktoru 4 (PF4) v plasmě (marker aktivace trombocytů, kit ELISA, Asserachrom[®] PF4, Boehringer, Mannheim, Germany),
4. hladiny von Willebrandova faktoru v plasmě (marker aktivace trombocytů a endotelové dysfunkce, kit IMUBIND[®] vWF ELISA, American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA),
5. hladiny tkáňového faktoru v plasmě (TF, marker endotelové dysfunkce, kit IMUBIND[®] Tissue Factor ELISA, American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA),
6. aktivovaný čas srážení plné krve (ACT) (ukazatel hodnotící koagulaci) byl měřený s použitím bed-side přístroje i-STATTM (i-STAT corporation, East Windsor, NJ, USA) a Celite ACT cartridge,
7. hladina komplexů trombin-antitrombin III v plasmě (ukazatel hodnotící koagulaci, kit Enzygnost[®] TAT micro, Behring Diagnostics GmbH, Marburg, Německo),
8. hladina C5a anafylatoxinu v plasmě (marker aktivace komplementu, kit Enzygnost[®] C5a micro, Behring Diagnostics GmbH, Marburg, Německo).

Vzorky pro výše uvedené parametry byly zpracovány podle doporučení v komerčně dostupných kitech.

3.4.7. Statistická analýza

Koncentrace látek a počty buněk zjištěné v průběhu hemodialýzy byly opět pomocí hematokritu korigovány k vyloučení vlivu hemokoncentrace nebo hemodiluce. Párovým Wilcoxonovým testem byly porovnávány hodnoty před zahájením procedury s hodnotami parametrů během hemodialýzy a také parametry získané na vstupu a výstupu krve z dialyzátoru v tomtéž čase. Po analýze hodnot ionizovaného kalcia na výstupu z dialyzátoru byla oddělena skupina 5 nemocných, kteří v některém ze sledovaných časů nedosáhli požadované meze ionizovaného kalcia $\leq 0,4$ mmol/l a pomocí nepárového Wilcoxonova testu byly porovnány obě skupiny nemocných, u kterých proběhla RCA požadovaným způsobem s těmi, kteří požadovaných hodnot iCa^{2+} nedosáhli. Ke srovnání byly užity přírůstky jednotlivých hodnot proti hodnotě v čase 0. min. Pro korelační analýzu byl použit Spearmanův test.

4. Výsledky

4.1. Vliv proplachu s heparinem na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin

V porovnání se zdravými dobrovolníky měli nemocní indikovaní ke kontinuální venovenozní hemodialfiltraci (CVVHDF) kromě menšího hematokritu, vysokého CRP, hypoproteinemie a renální dysfunkce (viz tabulka 1) již vstupně přítomnou poruchu hemostázy, zvýšený počet leukocytů v krvi a vysoké hodnoty C5a složky komplementu jako markeru aktivace komplementového systému (viz tabulka 2). Nemocní měli signifikantně nižší počet trombocytů v krvi a vyšší hodnoty beta-tromboglobulinu v krvi při aktivaci krevních destiček, měli signifikantně prodloužené aPTT, vyšší koncentraci heparinu v plasmě než zdraví dobrovolníci a dále výrazně elevované koncentrace D-dimeru v plasmě, ukazující i na aktivaci fibrinolýzy. Nemocní také dosáhli sice vyšších hodnot v koncentracích komplexů trombin-antitrombin III, ale tento vzestup nebyl statisticky významný.

Ve studii byly srovnávány tři způsoby přípravy mimotělního okruhu různým způsobem proplachu před zahájením CVVHDF. Jak bylo zmíněno v metodice, byly porovnávány parametry trombogenity, aktivace leukocytů a komplementu při proplachu extrakorporálního oběhu 3000ml fyziologického roztoku bez heparinu (v tabulkách označen 1) s proplachem 3000ml fyziologického roztoku s 2000 jednotek heparinu/l (tzv. obvyklý proplach, v tabulkách značen 2) a také dlouhotrvajícím proplachem s 2000ml fyziologického roztoku s přísadou 10000 jednotek heparinu/l, který recirkuloval 60minut v mimotělním oběhu (označen v tabulkách číslem 3). Výsledky sledovaných ukazatelů byly porovnány pro všechny 3 způsoby proplachu navzájem a jsou uvedeny v tabulkách 3 až 10.

Úroveň antikoagulace hodnocená podle koncentrací heparinu v plasmě se u procedur s různou formou proplachu signifikantně nelišila (viz tabulka 3).

Při srovnání aktivovaného parciálního tromboplastinového času byly sice zjištěny vyšší hodnoty aPTT u procedur po proplachu s heparinem v koncentraci 2000 i 10000 IU/l, ale žádný z rozdílů nedosáhl statistické významnosti (viz tabulka 4).

V tabulkách 5 a 6 jsou uvedeny počty trombocytů v krvi a koncentrace beta-tromboglobulinu v plasmě. Již vstupně byly tyto markery aktivace trombocytů elevované, ale v průběhu procedur nebyl ani v jednom z parametrů mezi jednotlivými formami proplachu prokázán statisticky významný rozdíl.

Koncentrace komplexů trombin-antitrombin III byly u CVVHDF s různými způsoby proplachu vstupně rozdílné, i když tento rozdíl nedosáhl statistické významnosti. Aby bylo zamezeno zkreslení rozdílnými výchozími hodnotami, byly hodnoty v průběhu jednotlivých procedur vyjádřeny jako poměr hodnot aktuálních k hodnotám vstupním a pak porovnány. Statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn (viz tabulka 7).

Koncentrace D-dimerů, jako markeru aktivované fibrinolýzy, byly před zahájením léčby zvýšeny přibližně 30x proti hodnotám u zdravých dobrovolníků, ale u jednotlivých způsobů proplachu nebyl prokázán významný rozdíl (tabulka 8).

V tabulce 9 a 10 jsou uvedeny počty leukocytů v krvi a dále koncentrace C5a složky komplementu v plasmě jako ukazatele aktivace komplementu alternativní cestou. Oba parametry se u CVVHDF s rozdílnou formou proplachu také nelišily ani v jednom ze sledovaných časů.

Ve všech tabulkách jsou uváděny výsledky získané na výstupu krve z diafiltru, tyto hodnoty jsou korigované pomocí hematokritu k vyloučení vlivu hemokoncentrace či hemodiluce. Výše zmíněné parametry byly také sledovány před vstupem do diafiltru, tedy před úsekem mimotělního okruhu, který má vzhledem k ploše a procesům na membráně největší podíl na bioinkompatibilních procesech. Ani v jednom ze sledovaných ukazatelů nebyl v krvi odebrané před diafiltrem prokázán statisticky významný rozdíl (data nejsou ukázána).

Některé látky byly sledovány také v diafiltrátu, byla však zjišťována pouze stopová množství C5a složky komplementu a D-dimeru. Jednotlivé formy proplachu se mezi sebou v koncentraci těchto látek v diafiltrátu statisticky významně nelišily (data nejsou ukázána).

4.2. Vliv regionální citrátové antikoagulace na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin

Ve studii sledující vliv regionální citrátové antikoagulace (RCA) na vybrané parametry biokompatibility byly před zahájením CVVHDF porovnány některé laboratorní ukazatele s hodnotami zjištěnými u nemocných indikovaných k CVVHDF se systémovou antikoagulací heparinem a také se skupinou zdravých dobrovolníků (viz tabulka 11). Nemocní před CVVHDF měli kromě renální dysfunkce i nižší hematokrit, celkovou bílkovinu a vyšší C reaktivní protein ve srovnání se skupinou zdravých osob, v markerech biokompatibility měli nižší počet trombocytů v krvi (pacienti indikovaní k RCA ještě výrazně nižší proti skupině s antikoagulací heparinem), vyšší koncentrace beta-tromboglobulinu, D-dimeru v plasmě a vyšší počet leukocytů v krvi. Nemocní indikovaní k CVVHDF s RCA měli navíc signifikantně vyšší koncentraci heparinu a trombin-antitrombin III komplexů v plasmě proti zdravým osobám (tabulka 12).

Regionální citrátová antikoagulace byla v tomto případě řízena podle hodnot ACT na výstupu krve z diafiltru, paralelně byl sledován ACT v systémové krvi nemocných. V systémové krvi nemocných (odběr byl prováděn z kanyly zavedené do a. radialis) nebyl ACT signifikantně prodloužen, zatímco hodnoty ACT na výstupu krve z diafiltru (před infúzí kalciových iontů, viz schéma 4) dokládají účinnou antikoagulaci, i když po 24 hodinách procedury (tedy v době plánovaného ukončení) již nebylo prodloužení ACT statisticky významné. Citrát tedy nepůsobil mimo mimotělní oběh. Účinnou antikoagulaci v mimotělním oběhu potvrzuje i aPTT měřený po infúzi citrátu před diafiltrem a před infúzí

kalcia za diafiltrem. Výjimkou je opět měření ve 24. hodině při končení procedury. (tabulka 13).

V tabulce 14 jsou uvedeny ukazatele trombogenity, plazmatických koncentrací C5a a počtu leukocytů v krvi v průběhu CVVHDF s regionální antikoagulací citrátem. Porovnání aktuálních hodnot, korigovaných pomocí hematokritu na hemokoncentraci či hemodiluci, s hodnotami vstupními jsou uvedena v dolní části jednotlivých polí. Během CVVHDF s RCA nedocházelo k signifikantním změnám v markerech aktivace trombocytů, tedy počtu trombocytů v krvi, koncentracích beta-tromboglobulinu a von Willebrandova faktoru. Statisticky významně se neměnily ani koncentrace trombin-antitrombin III komplexů, jako markeru aktivované koagulace. Proti stavu před zahájením procedury byly po 1 a 6 hodinách jejího trvání významně vyšší plazmatické koncentrace D-dimeru ukazující na aktivaci fibrinolýzy. Na počátku CVVHDF, konkrétně v 15. minutě došlo k signifikantnímu poklesu počtu leukocytů a dále v 15. i 60. minutě také významně narostly koncentrace C5a složky komplementu.

Během procedur se systémovou antikoagulací heparinem byly ve všech odběrových intervalech hodnoty aPTT na vstupu do diafiltru statisticky významně prodlouženy ve srovnání s hodnotami před zahájením výkonu. Procentuálně se zvýšení pohybovalo mezi 416%-661% výchozí hodnoty. Signifikantně prodloužený aPTT byl měřen i v krvi na výstupu z diafiltru vracející se do oběhu nemocného (viz tabulka 15).

Při CVVHDF se systémovou antikoagulací heparinem byly změny sledovaných parametrů následující (viz tabulka 16). Na výstupu krve z diafiltru nedošlo k signifikantním změnám počtu trombocytů, koncentrací TAT III komplexů a na rozdíl od RCA ani počtu leukocytů v krvi. Podobně jako při procedurách s citrátovou antikoagulací došlo v 15. minutě k signifikantnímu nárůstu koncentrací C5a komponenty komplementu. V 6. hodině a na konci procedury se významně snížily koncentrace D-dimeru a v 60. minutě navíc klesla i hodnota beta-tromboglobulinu.

Některé ukazatele byly sledovány i v ultrafiltrátu. V detekovatelných koncentracích byl izolován pouze beta-tromboglobulin, který byl zjišťován v koncentraci o několik řádů nižší ve srovnání s plasmatickou.

Při analýze ploch pod křivkou (viz tabulka 17) nebyl ve sledovaných ukazatelích zjištěn statisticky významný rozdíl pro koncentrace beta-tromboglobulinu, trombin-antitrombin III, D-dimery či C5a. Jediným rozdílem byly hodnoty aPTT, které byly u CVVHDF s heparinovou antikoagulací statisticky významně vyšší.

V tabulce 18 je uvedeno srovnání celkového a ionizovaného kalcia a vybraných ukazatelů acidobazické rovnováhy před zahájením a po ukončení CVVHDF s regionální citrátovou antikoagulací. Ani v jednom z uvedených parametrů nedošlo ke statisticky významným změnám při dlouhodobé expozici citrátu. Hodnoty kalcemie jsou relativně nižší, ale tento nálezní je u kriticky nemocných obvyklý a i zde koreluje s nízkou hodnotou krevních bílkovin ($r_s=0,743$, $p=0,007$).

4.3. Parametry trombogenity a aktivace komplementu při intermitentní hemodialýze s novým polysulfonovým dialyzátorem řady FX

Otevřené, prospektivní, randomizované, zkřížené studie se zúčastnilo celkem 18 nemocných, z nichž polovina (skupina A) podstoupila v prvním týdnu studie 3 hemodialýzy s dialyzátorem F60S a druhá skupina (B) hemodialýzy s dialyzátorem FX60S. V druhém týdnu studie byl u každé skupiny použit opačný druh dialyzátoru, tedy skupina A měla 3 hemodialýzy s dialyzátorem FX60S a skupina B s dialyzátorem F60S. Statisticky byly srovnány výsledky z veškerých hemodialýz s dialyzátorem F60S a analogicky s dialyzátorem FX60S (blíže viz kapitola Soubory a metodika). Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 19 až 26, jde o hodnoty získané na výstupu krve z dialyzátorů, které jsou pomocí hematokritu korigovány k vyloučení vlivu hemokoncentrace či hemodiluce.

Trombogenita

Při sledování počtu trombocytů v krvi, hrubého markeru aktivace trombocytů, nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v 15. ani v 60. minutě na výstupu krve při porovnání se vstupní hodnotou pro dialyzátor F60S ani FX60S. Při vzájemném porovnání výsledků získaných s oběma typy dialyzátorů nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl v počtu trombocytů ani v jednom ze sledovaných časů (viz tabulka 19). Destičkový faktor 4 je podstatně citlivější ukazatel aktivace trombocytů. Při dialýzách s oběma typy dialyzátoru byl v 15. minutě hemodialýzy zaznamenán vzestup jeho koncentrací, který byl u obou typů dialyzátorů statisticky významný (tabulka 20). Výsledky z procedur s dialyzátorem F60S a FX60S se však navzájem nelišily. V tabulce 21 je vidět, že hodnoty aktivovaného parciálního tromboplastinového času byly u obou typů dialyzátorů statisticky významně prodlouženy v 15. i 60. minutě proti hodnotám vstupním, navzájem se však u obou skupin nelišily. Prodloužení aPTT bylo v soulase s účinnou heparinizací, kterou dokladují statisticky významně vyšší koncentrace heparinu v průběhu procedur (viz tabulka 26), míra antikoagulace se u však u jednotlivých typů dialyzátorů nelišila. Koncentrace komplexů trombin-antitrombin III jsou uvedeny v tabulce 22. U obou typů dialyzátorů došlo k významnému nárůstu TAT III komplexů v 60. minutě. Koncentrace TAT III byly v 60. minutě dokonce u dialyzátoru FX60S statisticky významně vyšší. Koncentrace D-dimeru v plasmě ukazují na stav fibrinolýzy. Pro oba zmiňované dialyzátory nebyl zjištěn statistický rozdíl v hodnotách D-dimeru v 15. ani 60. minutě v porovnání s hodnotou vstupní, podobně při srovnání procedur s F60S a s FX60S se hodnoty významně nelišily (viz tabulka 23).

Aktivace komplementu a leukocytů

V tabulce 23 je patrné, že u procedur s dialyzátorem F60S a stejně i FX60S byl zaznamenán signifikantní pokles počtu leukocytů v 15. minutě procedury. Stupeň tohoto poklesu se pro jednotlivé typy dialyzátorů nelišil. U obou druhů dialyzátorů byl zaznamenán po zahájení procedury vzestup produkce anafylatoxinu C5a, u F60S byl vzestup statisticky významný v 15. minutě a u dialyzátoru FX60S v 15. i 60. minutě. Při porovnání hodnot u obou skupin dialyzátorů nebyl však zjištěn signifikantní rozdíl.

U obou typů dialyzátorů byly výše zmíněné parametry také sledovány před vstupem krve do dialyzátoru. Výsledky srovnání byly obdobné s hodnotami

získanými na výstupu krve z dialyzátoru. K omezení vlivu rozdílných vstupních hodnot jednotlivých parametrů byly výsledky získané v průběhu procedur vyjádřeny jako přírůstky či poklesy od hodnot vstupních. Při srovnání těchto tzv. diferencí byly výsledky statistického hodnocení shodné s výše zmíněným porovnáním absolutních hodnot.

Některé látky byly sledovány i v diafiltrátu. Kromě D-dimeru nebyly v diafiltrátu zjištěny měřitelné koncentrace. V přestupu D-dimeru do dialyzačního roztoku se oba dialyzátory statisticky významně nelišily (data nejsou prezentována).

4.4. Vybrané parametry biokompatibility při intermitentní hemodialýze s regionální citrátovou antikoagulací, kontrolovanou podle hladin ionizovaného kalcia

V této studii bylo u 10 stabilních, dlouhodobě hemodialyzovaných pacientů provedeno 10 hemodialýz s regionální citrátovou antikoagulací (RCA), ke které byl použit citrát – kalciový monitor (blíže viz kapitola Soubory a metodika).

Z tabulky 27 je patrné, že v průběhu hemodialýz s RCA docházelo na výstupu z dialyzátoru (za infuzí citrátu a před infuzí kalciových iontů) k signifikantnímu poklesu hladin ionizovaného kalcia a mediány ve všech odběrových časech dosahovaly cílové hodnoty $\leq 0,4$ mmol/l. U hodnot aktivovaného času srážení plné krve (ACT), který je považován také za jednu z možností kontroly RCA vedle monitorace iCa^{2+} , však v krvi opouštějící dialyzátor nebyl zaznamenán žádný významný nárůst, ve 120. minutě došlo dokonce ke statisticky významnému zkrácení ACT.

Za těchto podmínek byla v parametrech trombogenity, aktivace leukocytů a komplementu zaznamenána následující pozorování, viz tabulka 28. Počet trombocytů statisticky významně klesl ve 30. i 240. minutě, zatímco koncentrace tkáňového faktoru v obou časech signifikantně narostly, hodnoty trombin-antitrombin III komplexů stouply významně až ve 240. minutě. Jiné markery aktivace trombocytů, jako je destičkový faktor 4 a von Willebrandův faktor, sice vykazovaly stoupající trend, ten však nedosáhl statistické významnosti v žádném ze sledovaných časů. Počet leukocytů v průběhu hemodialýzy s RCA významně klesl a současně byl zaznamenán i signifikantní nárůst v produkci C5a složky komplementu v obou odběrových časech.

Při porovnání hodnot na vstupu a výstupu krve z dialyzátoru došlo po průchodu krve dialyzátorem ke statisticky signifikantnímu nárůstu hodnot TAT III komplexů ve 240. minutě, tkáňového faktoru ve 30. minutě a C5a komponenty komplementu v obou sledovaných časech. Počet trombocytů ve 30. i 240. minutě významně klesl po průchodu krve dialyzátorem.

Tabulka 30 vyjadřuje korelace mezi ACT a sledovanými parametry biokompatibility, obdobně jsou korelace ionizovaného kalcia a těchto parametrů uvedeny v tabulce 31. ACT korelovalo s některými ukazateli trombogenity, konkrétně s hodnotami tkáňového faktoru a počtem trombocytů v krvi. Naproti

tomu hodnoty iCa^{2+} nekorelovaly se žádným z uvedených parametrů. Také nebyla zjištěna ani korelace mezi ACT a hodnotami iCa^{2+} ($r_s=0,37$; $p=0,12$).

Při analýze dat bylo zjištěno, že u části nemocných některá z naměřených hodnot ionizovaného kalcia v průběhu hemodialýzy s RCA nedosáhla požadovaných hodnot $\leq 0,4$ mmol/l. Tak vznikla skupina pacientů s RCA provedenou s doporučenou hodnotou iCa^{2+} a skupina nemocných s RCA mimo doporučené rozmezí. Porovnáním výsledků obou skupin nebyl v žádném ze sledovaných parametrů zjištěn statisticky významný rozdíl kromě dosažených hodnot iCa^{2+} (viz tabulka 32).

Hemodialýzy s regionální antikoagulací citrátem proběhly bez klinických komplikací. Navzdory výše uvedeným pozorováním nebyla ani jedna hemodialýza s RCA komplikována předčasným vysrážením systému, nebyly zaznamenány ani vzestupy tlaků či vizuální přítomnost trombů v mimotělním oběhu, předznamenávající tuto komplikaci.

5. Tabulky a schémata

Následující kapitola je členěna do těchto částí:

1. Vliv proplachu s heparinem na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin.
2. Vliv regionální citrátové antikoagulace na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin.
3. Parametry trombogenity a aktivace komplementu při intermitentní hemodialýze s novým polysulfonovým dialyzátorem řady FX.
4. Vybrané parametry biokompatibility při intermitentní hemodialýze s regionální citrátovou antikoagulací, kontrolovanou podle hladin ionizovaného kalcia.
5. Schémata.

5.1. Vliv proplachu s heparinem na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin

Tabulka 1. Srovnání vybraných laboratorních parametrů nemocných před zahájením CVVHDF a zdravých dobrovolníků. Uvedeny průměry \pm SEM.

Parametr	Pac. při CVVHDF (n=11)	Zdraví dobrovolníci (n=11)	Statistická významnost
Věk [roky]	60 \pm 5	59 \pm 4	NS
Hematokrit [%]	30,1 \pm 0,9	45,5 \pm 1,0	p<0,001
Urea v séru [mmol/l]	23,7 \pm 2,4	5,5 \pm 0,4	p<0,001
Kreatinin v séru [μ mol/l]	362,2 \pm 51,6	92,7 \pm 2,7	p<0,001
Natrium v séru [mmol/l]	142,1 \pm 2,6	141,5 \pm 1,0	NS
Kalium v séru [mmol/l]	4,5 \pm 0,1	4,5 \pm 0,1	NS
Chloridy v séru [mmol/l]	106,0 \pm 2,3	106,2 \pm 1,0	NS
Celková bílkovina v séru [g/l]	51,3 \pm 2,2	75,5 \pm 0,8	p<0,001
CRP v séru [mg/l]	158,5 \pm 27,8	3,2 \pm 0,6	p<0,001

Tabulka 2. Srovnání parametrů biokompatibility u nemocných před zahájením CVVHDF a zdravých dobrovolníků. Uvedeny průměry \pm SEM.

Parametr	Pac. před CVVHDF (n=11)	Zdraví dobrovolníci (n=11)	Statistická významnost
Počet leukocytů v krvi [$\times 10^9/l$]	14,8 \pm 2,0	5,7 \pm 0,4	p<0,001
Počet trombocytů v krvi [$\times 10^9/l$]	153,8 \pm 25,4	223,7 \pm 10,4	p<0,01
Koncentrace BTG v plasmě [U/ml]	158,9 \pm 26,4	36,5 \pm 2,8	p<0,001
APTT [s]	44,3 \pm 2,7	36,4 \pm 0,8	p<0,05
Koncentrace heparinu v plasmě [U/ml]	0,1 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	p<0,05
Koncentrace TAT III v plasmě [μ g/l]	13,4 \pm 4,0	5,7 \pm 5,5	NS
Koncentrace DD v plasmě [μ g/l]	1129,6 \pm 223,3	35,8 \pm 14,2	p<0,001
Koncentrace C5a v plasmě [μ g/l]	6,2 \pm 1,4	2,0 \pm 0,2	p<0,01

Tabulka 3. Srovnání úrovně antikoagulace během procedur s různým typem proplachu. Uvedeny koncentrace heparinu [U/ml] na výstupu z diafiltru, použity průměry \pm SEM.

Typ proplachu	0. min CVVHDF	15. min CVVHDF	60. min CVVHDF	360. min CVVHDF
1	0,056 \pm 0,034	0,122 \pm 0,032	0,156 \pm 0,029	0,178 \pm 0,036
2	0,080 \pm 0,025	0,180 \pm 0,040	0,390 \pm 0,135	0,270 \pm 0,100
3	0,071 \pm 0,042	0,329 \pm 0,127	0,257 \pm 0,084	0,300 \pm 0,163
Srovnání 1 vs 2	NS	NS	NS	NS
Srovnání 1 vs 3	NS	NS	NS	NS
Srovnání 2 vs 3	NS	NS	NS	NS

Legenda pro tabulky 3-10:

1=proplach bez heparinu

2=proplach s 2000 I.U. heparinu/l

3=hodinový proplach s 10000 I.U.heparinu/l

Tabulka 4. Srovnání aPTT [s] během procedur s různým typem proplachu na výstupu z diafiltru, použity průměry \pm SEM.

Typ proplachu	0. min CVVHDF	15. min CVVHDF	60. min CVVHDF	360. min CVVHDF
1	44,2 \pm 3,2	100,0 \pm 26,1	70,3 \pm 13,1	66,3 \pm 11,4
2	45,0 \pm 4,9	162,4 \pm 48,0	107,0 \pm 29,4	92,7 \pm 24,6
3	44,6 \pm 4,8	172,4 \pm 65,4	177,1 \pm 67,9	85,0 \pm 15,0
Srovnání 1 vs 2	NS	NS	NS	NS
Srovnání 1 vs 3	NS	NS	NS	NS
Srovnání 2 vs 3	NS	NS	NS	NS

Tabulka 5. Srovnání počtu trombocytů v krvi [$\times 10^9/l$] na výstupu z diafiltru během procedur s různým typem proplachu. Uvedeny průměry \pm SEM.

Typ proplachu	0. min CVVHDF	15. min CVVHDF	60. min CVVHDF	360. min CVVHDF
1	163,2 \pm 29,0	156,1 \pm 27,7	153,5 \pm 29,3	135,7 \pm 20,0
2	175,9 \pm 41,6	170,2 \pm 40,0	186,8 \pm 46,0	175,0 \pm 43,8
3	205,3 \pm 61,4	205,1 \pm 59,3	205,7 \pm 61,2	189,7 \pm 60,0
Srovnání 1 vs 2	NS	NS	NS	NS
Srovnání 1 vs 3	NS	NS	NS	NS
Srovnání 2 vs 3	NS	NS	NS	NS

Tabulka 6. Srovnání koncentrací betatromboglobulinu v plasmě [U/ml] na výstupu z diafiltru během procedur s různým typem proplachu. Uvedeny průměry \pm SEM.

Typ proplachu	0. min CVVHDF	15. min CVVHDF	60. min CVVHDF	360. min CVVHDF
1	131,3 \pm 22,5	103,7 \pm 20,8	77,2 \pm 18,4	109,6 \pm 25,4
2	155,3 \pm 28,2	126,3 \pm 27,8	127,2 \pm 28,2	135,0 \pm 34,5
3	95,0 \pm 21,5	102,0 \pm 29,6	85,2 \pm 20,1	87,3 \pm 17,5
Srovnání 1 vs 2	NS	NS	NS	NS
Srovnání 1 vs 3	NS	NS	NS	NS
Srovnání 2 vs 3	NS	NS	NS	NS

Tabulka 7. Srovnání koncentrací TAT III v plasmě [$\mu\text{g/l}$] na výstupu z diafiltru během procedur s různým typem proplachu, v čase 0. min použita výchozí hodnota, v dalších časech pak poměr hodnoty aktuální k hodnotě v čase 0 min, uvedeny průměry \pm SEM.

Typ proplachu	0. min CVVHDF	15. min CVVHDF	60. min CVVHDF	360. min CVVHDF
1	9,8 \pm 2,6	1,4 \pm 0,3	1,8 \pm 0,5	2,9 \pm 0,7
2	13,3 \pm 4,5	0,7 \pm 0,1	1,0 \pm 0,3	2,4 \pm 0,9
3	4,1 \pm 1,8	0,7 \pm 0,3	1,0 \pm 0,6	6,4 \pm 6,0
Srovnání 1 vs 2	NS	NS	NS	NS
Srovnání 1 vs 3	NS	NS	NS	NS
Srovnání 2 vs 3	NS	NS	NS	NS

Tabulka 8. Srovnání koncentrací D-dimerů v plasmě [$\mu\text{g/l}$] během procedur s různým typem proplachu na výstupu z diafiltru, použity průměry \pm SEM.

Typ proplachu	0. min CVVHDF	15. min CVVHDF	60. min CVVHDF	360. min CVVHDF
1	1014,5 \pm 296,6	1076,1 \pm 268,2	1015,6 \pm 239,7	839,8 \pm 276,9
2	1087,7 \pm 250,6	1023,5 \pm 218,6	1064,5 \pm 217,7	877,0 \pm 193,1
3	847,8 \pm 266,4	856,1 \pm 248,7	790,9 \pm 223,6	541,5 \pm 221,1
Srovnání 1 vs 2	NS	NS	NS	NS
Srovnání 1 vs 3	NS	NS	NS	NS
Srovnání 2 vs 3	NS	NS	NS	NS

Tabulka 9. Srovnání počtu leukocytů [$\times 10^9/\text{l}$] během procedur s různým typem proplachu na výstupu z diafiltru, uvedeny průměry \pm SEM.

Typ proplachu	0. min CVVHDF	15. min CVVHDF	60. min CVVHDF	360. min CVVHDF
1	16,1 \pm 1,9	14,5 \pm 1,9	14,3 \pm 1,5	14,2 \pm 2,0
2	12,7 \pm 1,9	12,3 \pm 1,7	13,4 \pm 1,9	14,0 \pm 2,3
3	17,1 \pm 3,6	14,9 \pm 2,8	15,7 \pm 2,9	14,8 \pm 2,9
Srovnání 1 vs 2	NS	NS	NS	NS
Srovnání 1 vs 3	NS	NS	NS	NS
Srovnání 2 vs 3	NS	NS	NS	NS

Tabulka 10. Srovnání koncentrací C5a v plasmě [$\mu\text{g/l}$] během procedur s různým typem proplachu na výstupu z diafiltru, použity průměry \pm SEM.

Typ proplachu	0. min CVVHDF	15. min CVVHDF	60. min CVVHDF	360. min CVVHDF
1	5,5 \pm 1,6	8,0 \pm 1,9	7,1 \pm 1,8	5,3 \pm 1,1
2	4,9 \pm 1,1	6,5 \pm 1,3	6,4 \pm 1,6	5,2 \pm 1,4
3	4,7 \pm 1,7	7,4 \pm 2,4	7,3 \pm 2,4	6,8 \pm 2,3
Srovnání 1 vs 2	NS	NS	NS	NS
Srovnání 1 vs 3	NS	NS	NS	NS
Srovnání 2 vs 3	NS	NS	NS	NS

5.2. Vliv regionální citrátové antikoagulace na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin

Tabulka 11. Srovnání vybraných laboratorních parametrů nemocných před zahájením CVVHDF s regionální citrátovou antikoagulací (RCA), systémovou antikoagulací heparinem (HA) a zdravých dobrovolníků (HC). Uvedeny průměry \pm SEM.

Parametr	CVVHDF s RCA (n=11)	CVVHDF s HA (n=10)	HC (n=11)	ANOVA či KW
Hematokrit [%]	28,8 \pm 1,0 vs HC: <0,001	30,5 \pm 1,1 vs HC: <0,001	45,5 \pm 1,0	ANOVA: <0,001
Urea v séru [mmol/l]	28,3 \pm 2,3 vs HC: <0,05	19,1 \pm 3,0 vs HC: <0,05	5,5 \pm 0,4	KW: <0,001
Kreatinin v séru [$\mu\text{mol/l}$]	347,1 \pm 34,7 vs HC: <0,001	311,1 \pm 55,4 vs HC: <0,001	92,7 \pm 2,7	KW: <0,001
Natrium v séru [mmol/l]	141,2 \pm 1,9	138,5 \pm 1,8	141,5 \pm 1,0	ANOVA: NS
Kalium v séru [mmol/l]	4,4 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2	4,5 \pm 0,1	ANOVA: NS
Chloridy v séru [mmol/l]	104,7 \pm 1,7	106,6 \pm 1,4	106,2 \pm 1,0	ANOVA: NS
Celk. bílkovina v séru [g/l]	47,5 \pm 2,4 vs HC: <0,001	50,5 \pm 9,2 vs HC: <0,001	75,5 \pm 0,8	ANOVA: <0,001
CRP v séru [mg/l]	152,7 \pm 23,7 vs HC: <0,05	153,5 \pm 99,6 vs HC: <0,05	3,2 \pm 0,6	KW: <0,001

KW = Kruskal – Wallisův test, CRP = C-reaktivní protein

Tabulka 12. Srovnání vybraných parametrů biokompatibility u nemocných před zahájením CVVHDF s regionální citrátovou antikoagulací (RCA), systémovou antikoagulací heparinem (HA) a zdravých dobrovolníků (HC). Uvedeny průměry ± SEM.

Parametr	CVVHDF s RCA (n=11)	CVVHDF s HA (n=10)	HC (n=11)	ANOVA či KW
Počet trombocytů v krvi [$\times 10^9/l$]	95,0 ± 14,0 vs HA: <0,01 vs HC: <0,001	156,3 ± 9,8 vs HC: <0,001	223,7 ± 10,4	ANOVA: <0,001
BTG v plasmě [U/ml]	124,4 ± 29,8 vs HC: <0,05	147,7 ± 19,7 vs HC: <0,05	36,5 ± 2,8	KW: <0,001
APTT [s]	28,0 ± 2,7	40,7 ± 2,1	36,4 ± 0,8	KW: NS
Koncentrace heparinu v plasmě [U/ml]	0,1 ± 0,0 vs HC: <0,05	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	KW: <0,001
TAT III v plasmě [$\mu\text{g/l}$]	14,1 ± 3,5 vs HC: <0,05	8,2 ± 2,7	5,7 ± 5,5	KW: <0,01
DD v plasmě [$\mu\text{g/l}$]	2891,1 ± 1306,2 vs HC: <0,05	830,1 ± 181,8 vs HC: <0,05	35,8 ± 14,2	KW: <0,001
Počet leukocytů v krvi [$\times 10^9/l$]	17,2 ± 3,0 vs HC: <0,05	11,3 ± 1,3 vs HC: <0,05	5,7 ± 0,4	KW: <0,001
C5a v plasmě [$\mu\text{g/l}$]	2,3 ± 0,6	4,0 ± 0,9	2,0 ± 0,2	KW: NS

Legenda:

CVVHDF = kontinuální venovenózní hemodiafiltrace

BTG = beta-tromboglobulin

TAT III = trombin-antitrombin III komplex

KW = Kruskal – Wallisův test

Tabulka 13. ACT a aPTT v průběhu CVVHDF s regionální citrátovou antikoagulací. Udány průměry ± SEM. Tabulka uvedena na následující straně.

Parametr	Trvání procedury CVVHDF [min]				
	0 min	15/20 ⁺ min	60 min	360 min	1440 min
ACT v arteriální krvi [s]	182,6 ± 5,0	203,4 ± 30,5 NS	xx	192,3 ± 7,5 NS	154,3 ± 12,6 NS
ACT na výstupu z diafiltru [s]	--	309,6 ± 87,7 p<0,01	xx	250,3 ± 33,3 p<0,05	226,3 ± 35,2 NS
aPTT na vstupu do diafiltru [s]	28,0 ± 2,7	36,3 ± 2,9 p<0,001	64,2 ± 29,7 p<0,001	38,2 ± 4,2 p<0,01	25,8 ± 4,2 NS
aPTT na výstupu z diafiltru [s]	--	34,5 ± 2,8 p<0,05	35,4 ± 2,1 p<0,01	37,5 ± 2,5 p<0,01	30,0 ± 3,4 NS

Legenda:

xx = neměřeno, ACT = aktivovaný čas srážení plné krve, aPTT= aktivovaný parciální tromboplastinový čas

⁺ ACT bylo měřeno 20 min. po zahájení procedury, aPTT bylo měřeno v 15. min.

Poznámka: Hodnoty získané na vstupu do diafiltru byly za infusí citrátu, vzorky na výstupu krve z diafiltru byly odebírány před infusí kalciových iontů, hodnoty jsou korigované prostřednictvím hematokritu k vyloučení vlivu hemokoncentrace či hemodiluce, ACT v arteriální krvi odebráno z a. radialis a reprezentuje systémové hodnoty u pacienta. V tabulce je uvedeno statistické srovnání hodnot v průběhu procedury s hodnotou v čase 0 min.

Tabulka 14. Srovnání vybraných parametrů biokompatibility u nemocných léčených CVVHDF s regionální citrátovou antikoagulací (RCA). Uvedeny průměry ± SEM.

Parametr	Trvání procedury CVVHDF [min]				
	0 min	15 min	60 min	360 min	1440 min
Trombocyty v krvi [x10 ⁹ /l]	95,0 ± 14,0	89,3 ± 15,0 NS	92,1 ± 15,1 NS	91,9 ± 17,6 NS	127,2 ± 31,3 NS
BTG v plasmě [U/ml]	124,4 ± 29,8	184,5 ± 37,8 NS	150,5 ± 35,5 NS	120,0 ± 25,4 NS	141,8 ± 47,4 NS
vWF v plasmě [mU/ml]	2595,6 ± 137,9	2683,9 ± 156,2 NS	2615,4 ± 143,7 NS	2681,3 ± 186,5 NS	2614,1 ± 318,7 NS
TAT III v plasmě [µg/l]	14,1 ± 3,5	14,4 ± 3,0 NS	13,3 ± 2,3 NS	15,1 ± 4,0 NS	9,0 ± 2,3 NS
DD v plasmě [µg/l]	2891,1 ± 1306,2	3038,0 ± 1327,0 NS	3565,6 ± 1533,6 p<0,05	3857,6 ± 1701,9 p<0,05	3956,1 ± 2677,7 NS
Leukocyty v krvi [x10 ⁹ /l]	17,2 ± 3,0	15,5 ± 2,7 p<0,01	16,7 ± 2,6 NS	17,4 ± 2,6 NS	18,5 ± 4,2 NS
C5a v plasmě [µg/l]	2,3 ± 0,6	7,2 ± 2,1 p<0,001	8,3 ± 3,5 p<0,001	4,8 ± 2,2 NS	6,5 ± 3,9 NS

Legenda:

CVVHDF = kontinuální venovenozní hemodiafiltrace

BTG = beta-tromboglobulin,

TAT III = komplex trombin-antitrombin III

vWF = von Willebrandův faktor.

Poznámka: Hodnoty před CVVHDF byly získané z cévního přístupu, vzorky na výstupu krve z diafiltru byly odebírány před infusí kalciových iontů, hodnoty jsou korigované prostřednictvím hematokritu k vyloučení vlivu hemokonzentrace/hemodiluce. V tabulce je uvedeno statistické srovnání hodnot v průběhu procedury s hodnotou v čase 0 min.

Tabulka 15. aPTT v průběhu CVVHDF při systémové antikoagulaci heparinem.

Parametr	Trvání procedury CVVHDF [min]				
	0 min	15 min	60 min	360 min	1440 min
aPTT na vstupu do diafiltru [s]	40,7 ± 2,1	259,7 ± 47,1 p<0,01	215,6 ± 53,1 p<0,05	180,3 ± 39,3 p<0,01	169,9 ± 35,2 p<0,05
aPTT na výstupu z diafiltru [s]	--	249,0 ± 52,2 p<0,01	196,0 ± 48,3 p<0,05	122,5 ± 21,6 p<0,01	117,9 ± 25,2 p<0,05

Legenda:

aPTT= aktivovaný parciální tromboplastinový čas

Poznámka: Hodnoty před CVVHDF byly získané z cévního přístupu, hodnoty v průběhu CVVHDF jsou korigované prostřednictvím hematokritu k vyloučení vlivu hemokonzentrace/hemodiluce. Udány průměry ± SEM. V tabulce je uvedeno statistické srovnání hodnot v průběhu procedury s hodnotou v čase 0 min.

Tabulka 16. Srovnání vybraných parametrů biokompatibility u nemocných při CVVHDF se systémovou antikoagulací heparinem. Uvedeny průměry ± SEM.

Parametr	Trvání procedury CVVHDF [min]				
	0 min	15 min	60 min	360 min	1440 min
Trombocyty v krvi [$\times 10^9/l$]	156,3 ± 9,9	159,7 ± 10,8 NS	161,5 ± 12,5 NS	158,0 ± 13,0 NS	150,4 ± 15,5 NS
BTG v plasmě [U/ml]	147,7 ± 19,7	122,2 ± 21,2 NS	83,1 ± 15,0 p<0,01	130,0 ± 35,3 NS	116,9 ± 21,2 NS
TAT III v plasmě [$\mu g/l$]	8,2 ± 2,7	9,0 ± 3,1 NS	6,8 ± 2,2 NS	13,7 ± 4,5 NS	9,4 ± 4,0 NS
DD v plasmě [$\mu g/l$]	830,1±181,8	800,3±177,7 NS	803,5±168,0 NS	634,6±171,7 p<0,05	413,1±90,5 p<0,05
Leukocyty v krvi [$\times 10^9/l$]	11,3 ± 1,3	11,3 ± 1,2 NS	11,7 ± 1,1 NS	10,5 ± 1,1 NS	11,4 ± 2,0 NS
C5a v plasmě [$\mu g/l$]	4,0 ± 0,9	6,4 ± 1,3 p<0,05	6,0 ± 1,4 NS	5,2 ± 1,3 NS	4,5 ± 1,2 NS

Legenda:

CVVHDF = kontinuální venovenozní hemodiafiltrace

BTG = beta-tromboglobulin,

TAT III = trombin-antitrombin III komplex,

DD = D-dimer.

Poznámka: Hodnoty jsou korigované prostřednictvím hematokritu k vyloučení vlivu hemokoncentrace či hemodiluce. V tabulce je uvedeno statistické srovnání hodnot v průběhu procedury s hodnotou v čase 0 min.

Tabulka 17. Srovnání vybraných parametrů biokompatibility pomocí ploch pod křivkou v průběhu CVVHDF s regionální citrátovou antikoagulací a systémovou antikoagulací heparinem. Uvedeny průměry \pm SD.

Parametr	CVVHDF s citrátem	CVVHDF s heparinem	P
aPTT [s*min]	216,04 \pm 43,72	999,34 \pm 604,61	0,003
BTG v plasmě [U/ml*min]	840,55 \pm 573,35	643,24 \pm 428,01	0,38
TAT III v plasmě [μ g/l*min]	84,84 \pm 58,02	59,44 \pm 54,59	0,31
DD v plasmě [μ g/l*min]	21798,1 \pm 24428,7	4400,41 \pm 3157,30	0,10
C5a v plasmě [μ g/l*min]	39,66 \pm 50,88	33,72 \pm 24,94	0,74

Plocha pod křivkou vypočtena z výchozí hodnoty získané z cévního přístupu před CVVHDF a dále z hodnot na výstupu z diafiltru (v případě RCA před infusí kalciových iontů).

Tabulka 18. Srovnání kalcemie a vybraných parametrů acidobazické rovnováhy před a po CVVHDF s RCA. Uvedeny průměry \pm SEM.

Parametr	Před CVVHDF	Po CVVHDF	p
Sérové kalcium [mmol/l]	1,74 \pm 0,08	1,81 \pm 0,09	0,320
Ionizované kalcium [mmol/l]	0,79 \pm 0,08	0,84 \pm 0,10	0,413
pH krve	7,36 \pm 0,03	7,35 \pm 0,03	0,695
Aktuální HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	22,3 \pm 1,45	21,3 \pm 1,57	0,818
BE [mmol/l]	-2,56 \pm 1,74	-3,6 \pm 1,97	0,878

5.3. Parametry trombogenity a aktivace komplementu při intermitentní hemodialýze s novým polysulfonovým dialyzátorem řady FX

Tabulka 19. Srovnání počtu trombocytů v krvi během hemodialýz s různým typem dialyzátoru. Uvedeny počty trombocytů v krvi [$\times 10^9/l$] na výstupu z dialyzátoru, uvedeny mediány (min-max).

Počet trombocytů v krvi [$\times 10^9/l$]	Trvání hemodialýzy [min]		
	0 min	15 min	60 min
F60S	175,0 (85,0 - 262,0)	179,8 (80,3 - 260,7) NS	179,5 (86,4 - 264,8) NS
FX60S	166,5 (94,0 - 269,0)	164,9 (90,1 - 267,5) NS	167,1 (86,5 - 404,4) NS
F60S vs FX60S	NS	NS	NS

Legenda pro tabulky 19 – 26:

F60S= hemodialýzy provedené s dialyzátorem F60S (skupina A v 1. týdnu a skupina B v 2. týdnu studie)

FX60S= hemodialýzy provedené s dialyzátorem FX60S (skupina A v 2. týdnu a skupina B v 1. týdnu studie)

Statisticky byly porovnány hodnoty v průběhu procedury s hodnotou vstupní před hemodialýzou - data uvedena pro každý dialyzátor zvlášť - a dále ve spodním řádku tabulky je uvedeno srovnání výsledků z procedur s dialyzátorem F60S a FX60S navzájem, srovnání bylo provedeno párovým Wilcoxonovým testem.

Tabulka 20. Srovnání koncentrací PF4 v plasmě během hemodialýz s různým typem dialyzátoru. Uvedeny koncentrace PF4 v plasmě [U/ml] na výstupu z dialyzátoru, uvedeny mediány (min-max).

Koncentrace PF4 v plasmě [U/ml]	Trvání hemodialýzy [min]		
	0 min	15 min	60 min
F60S	14,5 (10,0 – 52,0)	22,6 (12,9 – 67,3) $p < 0,05$	15,3 (10,7 – 37,3) NS
FX60S	13,5 (8,0 – 39,0)	25,3 (10,7 – 53,3) $p < 0,01$	16,5 (8,7 – 34,4) NS
F60S vs FX60S	NS	NS	NS

Tabulka 21. Srovnání aPTT [s] během hemodialýz s různým typem dialyzátoru. Uvedeny aPTT [s] na výstupu z dialyzátoru, uvedeny mediány (min-max).

aPTT [s]	Trvání hemodialýzy [min]		
	0 min	15 min	60 min
F60S	34,0 (30,0 - 61,0)	66,0 (50,0 - 95,0) p<0,01+	51,0 (43,0 - 82,0) p<0,01+
FX60S	35,0 (30,0 - 43,0)	65,0 (47,0 - 95,0) p<0,001	52,0 (43,0 - 89,0) p<0,001
F60S vs FX60S	NS	NS	NS

+ dostupných pouze 14 měření

Tabulka 22. Srovnání koncentrací TAT III v plasmě během hemodialýz s různým typem dialyzátoru. Uvedeny koncentrace TAT III v plasmě [μg/l] na výstupu z dialyzátoru, uvedeny mediány (min-max).

Koncentrace TAT III v plasmě [μg/l]	Trvání hemodialýzy [min]		
	0 min	15 min	60 min
F60S	3,0 (2,0 - 24,0)	3,0 (1,9 - 7,6) NS	4,5 (2,8 - 21,8) p<0,01
FX60S	3,0 (2,0 - 6,0)	2,9 (1,9 - 5,9) NS	5,8 (2,7 - 21,8) p<0,001
F60S vs FX60S	NS	NS	p<0,05

Tabulka 23. Srovnání koncentrací D-dimeru v plasmě během hemodialýz s různým typem dialyzátoru. Uvedeny koncentrace D-dimeru v plasmě [μg/l] na výstupu z dialyzátoru, uvedeny mediány (min-max).

Koncentrace DD v plasmě [μg/l]	Trvání hemodialýzy [min]		
	0 min	15 min	60 min
F60S	94,0 (14,0 - 857,0)	122,6 (1,0 - 763,8) NS	116,5 (5,9 - 999,4) NS
FX60S	99,0 (1,0 - 610,0)	93,1 (0,0 - 694,9) NS	99,2 (0,0 - 681,2) NS
F60S vs FX60S	NS	NS	NS

Tabulka 24. Srovnání počtu leukocytů v krvi během hemodialýzy s různým typem dialyzátoru. Uvedeny počty leukocytů v krvi [$\times 10^9/l$] na výstupu z dialyzátoru, uvedeny mediány (min-max).

Počet leukocytů v krvi [$\times 10^9/l$]	Trvání hemodialýzy [min]		
	0 min	15 min	60 min
F60S	5,6 (3,6 – 7,9)	5,0 (2,4 – 7,5) p<0,01	5,5 (2,6 – 8,2) NS
FX60S	6,1 (2,8 – 9,2)	5,2 (2,3 – 7,7) p<0,01	6,0 (2,5 – 8,7) NS
F60S vs FX60S	NS	NS	NS

Tabulka 25. Srovnání koncentrací C5a v plasmě během hemodialýzy s různým typem dialyzátoru. Uvedeny koncentrace C5a v plasmě [$\mu g/l$] na výstupu z dialyzátoru, uvedeny mediány (min-max).

Koncentrace C5a v plasmě [$\mu g/l$]	Trvání hemodialýzy [min]		
	0 min	15 min	60 min
F60S	2,6 (0,0 – 9,0)	4,2 (1,7 – 7,9) p<0,01	3,2 (1,2 – 5,9) NS
FX60S	2,3 (0,0 – 11,0)	4,8 (1,9 – 9,4) p<0,01	3,4 (0,7 – 6,5) p<0,01
F60S vs FX60S	NS	NS	NS

Tabulka 26. Srovnání koncentrací heparinu v plasmě během hemodialýzy s různým typem dialyzátoru. Uvedeny koncentrace heparinu v plasmě [U/ml] na výstupu z diafiltru, použity mediány (min-max).

Koncentrace heparinu v plasmě [U/ml]	Trvání hemodialýzy [min]		
	0 min	15 min	60 min
F60S	0,0 (0,0 - 0,0)	0,30 (0,10 - 0,50) p<0,001	0,20 (0,10 - 0,40) p<0,001
FX60S	0,0 (0,0 - 0,0)	0,30 (0,10 - 0,50) p<0,001	0,20 (0,10 - 0,50) p<0,001
F60S vs FX60S	NS	NS	NS

5.4. Vybrané parametry biokompatibility při intermitentní hemodialýze s regionální citrátovou antikoagulací, kontrolovanou podle hodnot ionizovaného kalcia

Tabulka 27. Ionizované kalcium a aktivovaný čas srážení plné krve (ACT) na výstupu krve z dialyzátoru (před infusí kalciových iontů) v průběhu hemodialýzy (HD) s regionální citrátovou antikoagulací (RCA). Uvedeny mediány (min-max).

Parametr	Trvání hemodialýzy [min]					
	0 (před HD)	30	60	120	210	240
iCa ²⁺ [mmol/l]	1,22 (1,03-1,38)	0,38 (0,35-0,46) p<0,01	0,375 (0,35-0,46) p<0,01	0,39 (0,35-0,54) p<0,01	0,4 (0,36-0,82) p<0,01	0,395 (0,36-0,79) p<0,01
ACT [s]	162,5 (135-213)	156,5 (133-184) NS	xx	142,5 (113-173) p<0,05	147,5 (118-201) NS	142 (129-186) NS

xx = neměřeno

Tabulka 28. Vybrané parametry biokompatibility v průběhu hemodialýzy s regionální citrátovou antikoagulací (RCA). Uvedeny mediány (min-max).

Parametr	Trvání hemodialýzy [min]		
	0 (před HD)	30	240
Počet trombocytů v krvi [x10 ⁹ /l]	173,5 (140,0-413,0)	155,8 (81,7-332,8) p<0,01	152,6 (105,0-330,5) p<0,01
PF 4 [μg/l]	176,5 (88,5-294,2)	200,2 (100,9-249,3) NS	214,9 (92,1-254,6) NS
vWF [mU/ml]	1983,4 (1178,0-4456,5)	2188,0 (1007,3-4054,9) NS	2348,6 (1577,0-4251,1) NS
TF [ng/l]	381,1 (275,0-533,2)	460,6 (288,7-550,6) p<0,05	495,0 (234,7-643,3) p<0,05
TAT III [μg/l]	3,57 (3,21-4,83)	3,63 (2,94-6,36) NS	73,02 (13,75-98,15) p<0,01
Počet leukocytů v krvi [x10 ⁹ /l]	7,3 (3,1-9,1)	4,9 (2,5-6,7) p<0,01	6,1 (3,5-8,7) p<0,05
C5a [μg/l]	0,05 (0,00-0,32)	3,95 (1,48-5,98) p<0,01	0,59 (0,17-1,01) p<0,01

Poznámka: Udány hodnoty korigované na změny hematokritu v průběhu hemodialýzy, párovým Wilcoxonovým testem srovnány hodnoty na výstupu z dialyzátoru (před infusí kalciových iontů) v průběhu hemodialýzy s hodnotami před zahájením hemodialýzy.

Tabulka 29. Parametry trombogenity, C5a a počet leukocytů v krvi na vstupu a výstupu z dialyzátoru při hemodialýze s regionální antikoagulací citrátem. Uvedeny mediány (min-max).

Parametr	30. min		240. min	
	Vstup dialyzátoru	Výstup dialyzátoru	Vstup dialyzátoru	Výstup dialyzátoru
Počet trombocytů v krvi [$\times 10^9/l$]	159,0 (98,0-347,0)	155,5 (81,7-343,3)	172,5 (122,0-357,0)	160,5 (116,7-346,1)
	p<0,01		p<0,05	
PF 4 [$\mu g/l$]	204,7 (53,4-263,3)	205,0 (94,3-262,3)	242,4 (49,6-301,8)	239,7 (101,1-285,0)
	NS		NS	
vWF [mU/ml]	2019,3 (961,4-3859,6)	2157,4 (1039,0-4054,9)	2325,6 (1428,4-4649,1)	2422,4 (1651,4-4728,7)
	NS		NS	
TF [ng/l]	403,1 (215,6-531,5)	470,8 (304,4-570,3)	528,0 (321,0-654,7)	546,1 (243,5-699,9)
	p<0,05		NS	
TAT III [$\mu g/l$]	3,88 (3,45-5,41)	3,80 (3,05-6,36)	26,61 (5,48-83,69)	80,76 (14,96-95,89)
	NS		p<0,01	
Počet leukocytů v krvi [$\times 10^9/l$]	5,1 (2,5-6,7)	4,9 (2,6-6,9)	6,3 (4,3-9,7)	6,4 (4,2-9,6)
	NS		NS	
C5a [$\mu g/l$]	0,64 (0,00-2,39)	4,08 (1,54-6,25)	0,04 (0,00-0,50)	0,61 (0,19-1,13)
	p<0,01		p<0,01	

Poznámka: Párovým Wilcoxonovým testem srovnány hodnoty na vstupu a výstupu z dialyzátoru s použitím hodnot korigovaných na změny hematokritu.

Tabulka 30. Korelace mezi ACT a parametry trombogenity, C5a a počtem leukocytů v krvi.

Parametr	Parametr	Korelační koeficient	p
ACT	TAT III	-0,28	0,23
	TF	-0,60	0,009
	vWF	-0,28	0,23
	PF 4	-0,19	0,42
	Počet trombocytů v krvi	-0,63	0,006
	C5a	0,28	0,23
	Počet leukocytů v krvi	-0,43	0,06

Poznámka: Hodnoty byly vyjádřeny jako rozdíly od hodnot v čase 0 min a k analýze byl použit Spearmanův test.

Tabulka 31. Korelace mezi iCa^{2+} a parametry trombogenity, C5a a počtem leukocytů v krvi.

Parametr	Parametr	Korelační koeficient	p
Ionizované Ca^{2+}	TAT III	-0,02	0,93
	TF	0,16	0,50
	vWF	0,18	0,44
	PF 4	-0,22	0,35
	Počet trombocytů v krvi	0,27	0,25
	C5a	0,08	0,73
	Počet leukocytů v krvi	0,41	0,08

Poznámka: Hodnoty byly vyjádřeny jako rozdíly od hodnot v čase 0 min a k analýze byl použit Spearmanův test.

Tabulka 32. Srovnání pacientů s RCA s „doporučenou“ hodnotou iCa^{2+} na výstupu z diafiltru a pacientů s RCA „mimo doporučené rozmezí“. Použity rozdíly od výchozích hodnot před zahájením HD, uvedeny mediány (min-max).

Parametr	RCA s „doporučenou“ hodnotou iCa^{2+}	RCA „mimo doporučené rozmezí“	p
Počet trombocytů v krvi [$\times 10^9/l$]	-22,5 (-92,0 - 17,0)	-6,5 (-66,0 - 14,0)	0,13
PF4 [$\mu g/l$]	18,69 (-118,4 - 185,2)	9,6 (-164,3 - 211,28)	0,61
TAT III [$\mu g/l$]	1,99 (-0,09 - 94,10)	6,87 (-0,33 - 94,81)	0,89
TF [ng/l]	58,2 (-77,6 - 237,9)	52,0 (-300,3 - 347,2)	0,59
vWF [mU/ml]	146,9 (-1035,1 - 794,4)	228,8 (-216,6 - 1376,9)	0,41
Počet leukocytů v krvi [$\times 10^9/l$]	-1,1 (-3,9 - 2,3)	-1,6 (-3,5 - 1,3)	0,16
C5a [$\mu g/l$]	0,51 (-0,01 - 6,31)	0,54 (-0,04 - 6,40)	0,67
ACT [s]	-19,00 (-65,0 - 51,0)	-21,00 (-44,0 - 21,00)	0,68
Ca^{2+} [mmol/l]	-0,85 (-1,02 - -0,83)	-0,74 (-0,88 - -0,28)	0,007

Legenda:

RCA=regionální citrátová antikoagulace.

RCA s „doporučenou“ hodnotou Ca^{2+} = na výstupu z diafiltru byly všechny změřené hodnoty $iCa^{2+} \leq 0,4\text{mmol/l}$, RCA „mimo doporučené rozmezí“= na výstupu z diafiltru byly některé hodnoty $iCa^{2+} > 0,4\text{mmol/l}$.

Tabulka 33. Vybrané parametry mineralogramu a acidobazické rovnováhy před a po HD s RCA. Uvedeny mediány (min-max).

Parametr	před HD	po HD	p
Sérové kalcium [mmol/l]	2,20 (2,00 – 2,69)	2,86 (0,91 – 3,70)	0,074
Ionizované kalcium [mmol/l]	1,22 (1,03 – 1,38)	1,30 (1,08 – 1,42)	0,333
Sérové magnézium [mmol/l]	1,06 (0,84 – 1,20)	1,00 (0,79 – 1,18)	0,154
pH krve	7,35 (7,28 – 7,41)	7,42 (7,33 – 7,44)	0,007
Aktuální HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	20,4 (15,2 – 24,6)	22,6 (20,4 – 23,8)	0,013
BE [mmol/l]	-4,2 (-10,0 – 0,5)	-1,4 (-2,7 - -0,2)	0,013

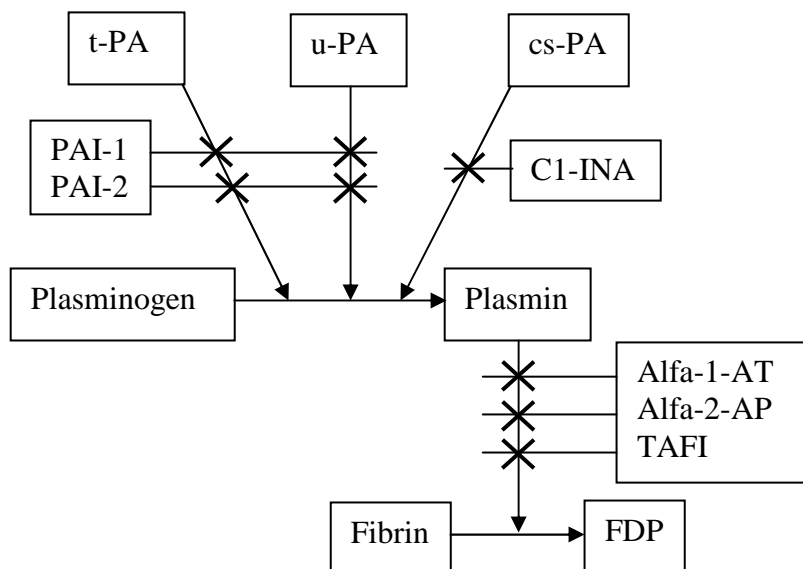
Legenda:

HD= hemodialýza

Hodnoty byly změřené před a po hemodialýze z odběru vzorku z arteriovenózní fistule. Statistické srovnání provedeno párovým Wilcoxonovým testem.

Schéma 2.

Schéma fibrinolýzy



Legenda:

t-PA – tkáňový aktivátor plasminogenu

u-PA – aktivátor plasminogenu urokinázového typu

cs-PA – aktivátor plasminogenu závislý na kontaktním systému

PAI- 1 a 2 – inhibitor aktivátoru plasminogenu 1 a 2

C1-INa – C1 inhibitor

Alfa-1-AT – alfa-1-antitrypsin

Alfa-2-AP – alfa-2-antiplasmin

TAFI – trombinem aktivovatelný inhibitor fibrinolýzy

FDP – fibrin-degradační produkty

Upraveno podle: Opatrný K Jr, Biokompatibilita dialyzačních membrán, 2000

Schéma 3.

Schéma CVVHDF se systémovou antikoagulací heparinem.

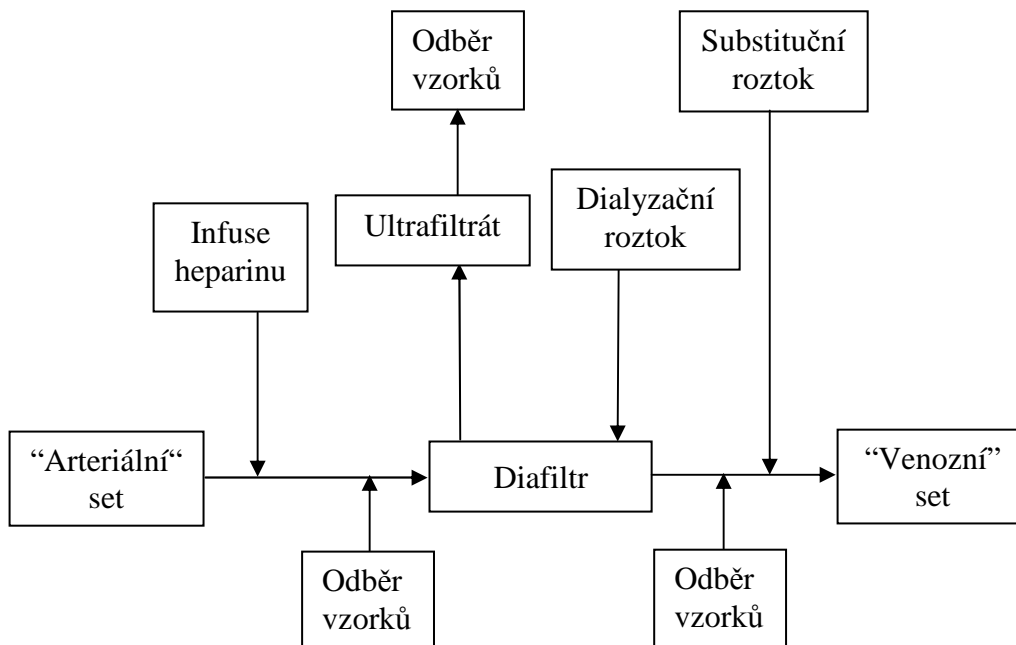


Schéma 4.

Schéma CVVHDF s regionální antikoagulací citrátem

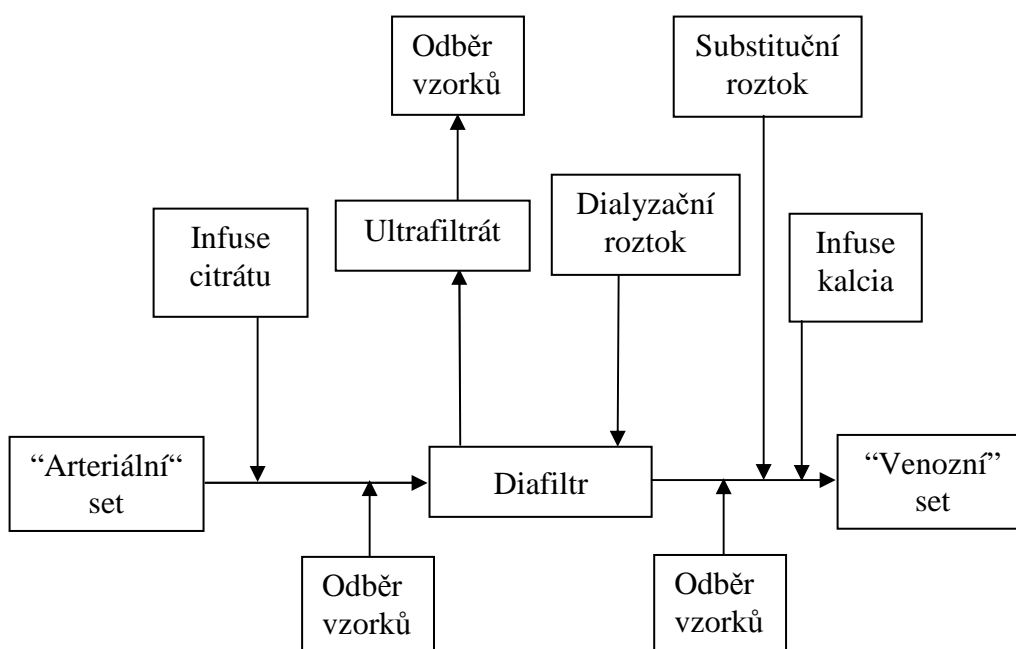
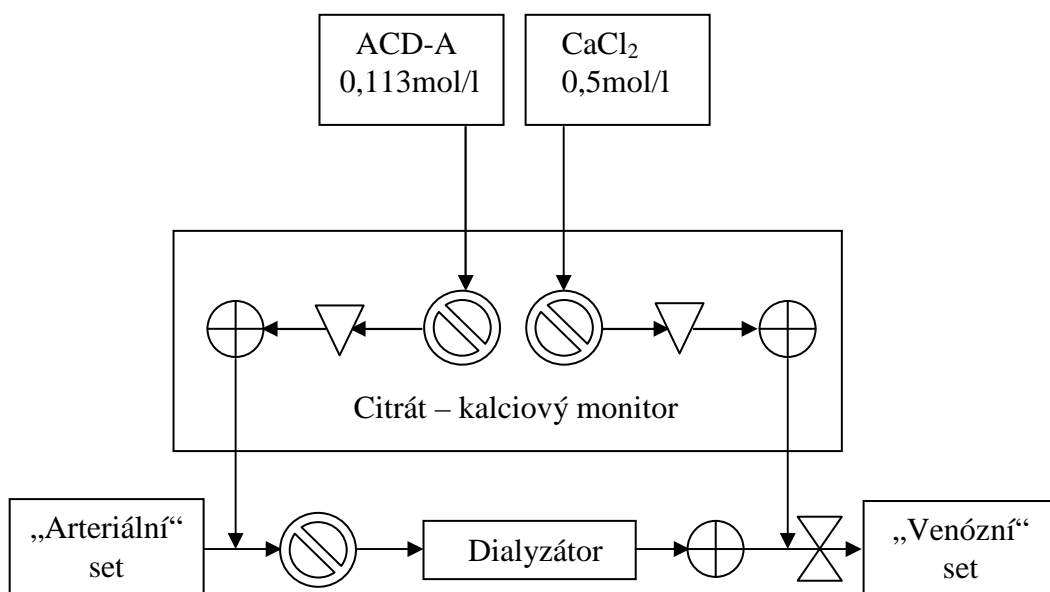


Schéma 5.

Schéma citrát – kalciového monitoru



Legenda:



vzduchový detektor



tlakový senzor



venózní klapka



krevní pumpa

Poznámka:

ACD-A roztok obsahuje 74,8 mmol/l citrátu sodného a 38 mmol/l kyseliny citrónové, výsledná koncentrace citrátových a citronanových iontů je 0,113mol/l.

6. Diskuse

6.1. Vliv proplachu s heparinem na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin

Studie měla dva hlavní cíle. Jednak posoudit hemostázu u nemocných s akutním selháním ledvin v kritickém stavu indikovaných k CVVHDF, jednak zjistit, jaký vliv má na biokompatibilitu, především na trombogenitu a potřebu antikoagulancií v průběhu procedury, proplach mimotělního oběhu roztokem s heparinem.

Proplach s heparinem je obecně doporučován jako snadno proveditelné opatření, které sníží trombogenitu mimotělního oběhu a potřebu antitrombotik. Tím by měl proplach s heparinem snížit rizika častých a obávaných komplikací u nemocných s akutním selháním ledvin, kterými jsou srážení krve v mimotělním oběhu při dlouhé expozici umělému povrchu, ale i krvácení z podávání antikoagulancií. Kromě ukazatelů trombogenity byla podle koncentrací C5a také hodnocena aktivace komplementu, která je v současné době, společně se změnami počtu leukocytů v krvi, považována za obligátní ukazatel biokompatibility.

U nemocných indikovaných ke kontinuální venovenozní hemodiafiltraci byly již před zahájením náhrady funkce ledvin přítomny odchylky v hemostáze a v ukazatelích používaných k posuzování trombogenity. Nemocní měli významně nižší počet trombocytů v krvi a vyšší koncentrace beta-tromboglobulinu než kontrolní soubor zdravých dobrovolníků. Beta-tromboglobulin je uvolňován z trombocytů při jejich aktivaci a jeho plazmatické koncentrace jsou proto citlivým ukazatelem této aktivace. Plazmatické koncentrace beta-tromboglobulinu se zvyšují s poklesem ledvinných funkcí. U vyšetřovaných nemocných však byly plazmatické koncentrace beta-tromboglobulinu neúměrně vyšší, než odpovídalo poklesu ledvinných funkcí, a proto skutečně dokládají aktivaci trombocytů. Dále byly u nemocných signifikantně delší hodnoty aPTT, které ukazují na poruchu ve vnitřním systému srážení. Vyšší plazmatické koncentrace heparinu, který je často u kriticky nemocných preventivně používán, mohly k prodloužení aPTT přispívat. Významně zvýšené koncentrace D-dimeru ukazují na aktivaci fibrinolytického systému u nemocných s akutním selháním ledvin. Významně zvýšené koncentrace C5a v plasmě dokládají aktivaci komplementu již před zahájením CVVHDF a zvýšený počet leukocytů ukazuje, ve shodě s vysokým C reaktivním proteinem, na systémovou zánětlivou odpověď u vyšetřované skupiny.

Při popisu trombogenity rozeznáváme markery popisující aktivaci trombocytů, koagulaci a fibrinolýzu. Mezi stěžejní parametr popisující trombogenitu již historicky patří počet trombocytů v krvi. Při interakci s umělým povrchem dochází často k poklesu jejich počtu. V uvedené studii při srovnávání počtu trombocytů mezi třemi různými proplachy nebyl zjištěn významný rozdíl. Podstatně citlivějším ukazatelem aktivace trombocytů při kontaktu s cizím povrchem jsou změny plazmatických koncentrací beta-tromboglobulinu. Ani v tomto ukazateli se tři sledované proplachy mezi sebou nelišily.

Mezi základní testy posuzující stav koagulace patří v první řadě aktivovaný parciální tromboplastinový čas. Při aktivaci koagulace kontaktem s umělým

povrchem dochází k jeho zkrácení. Toto zkrácení je však málo citlivým ukazatelem trombogenity povrchu. Větší význam má prodloužení aPTT svědčící pro poruchu vnitřního systému koagulační kaskády a také pro vliv antitrombotik. V prezentované studii bylo již vstupně aPTT prodloužené, v průběhu procedury vlivem efektu heparinu aPTT dále stoupl. U procedur s proplachem s příměsí heparinu v obvyklé či vyšší koncentraci byly sice zjištěny vyšší hodnoty aPTT, ale toto prodloužení nedosáhlo statistické významnosti. Obdobně vyšší koncentrace heparinu v plasmě nemocných byly zjištěny při procedurách s proplachy s přísadou heparinu, ani tento rozdíl však nebyl signifikantní.

Citlivějším ukazatelem aktivované koagulace jsou koncentrace trombin-antitrombin III komplexů. Přes pozorované nevýznamné změny v hodnotách aPTT nebyl v koncentracích TAT III mezi jednotlivými proplachy zjištěn rozdíl.

K posouzení fibrinolýzy byly v prezentované studii použity koncentrace D-dimeru v plasmě jako jednoho z fibrin-degradačních produktů. Mezi procedurami s různým typem proplachu nebyly v koncentracích D-dimeru prokázány žádné významné rozdíly. Stejně pozorování platilo i pro koncentrace C5a složky komplementu, markeru aktivace komplementu alternativní cestou, i pro počet leukocytů v krvi, které těsně s aktivací komplementu souvisejí [Craddock et al 1977].

V této studii bylo zvoleno postdiluční uspořádání CVVHDF úmyslně. Je známo, že při postdilučním setování je interakce krve s umělým povrchem v důsledku hemokoncentrace intenzivnější a tato forma je ke vzniku trombózy náchylnější než při predilučním uspořádání CVVHDF [Kaplan 1985]. Záměrem bylo, aby interakce krve s umělým povrchem byla co nejintenzivnější, a aby se případné změny vyvolané různou formou proplachu co nejvíce zviditelnily.

Ve studii byly sledovány i některé ukazatele biokompatibility v diafiltrátu. V případě, že by některé z látek přecházely do dialyzačního roztoku, mohly by být plazmatické koncentrace na výstupu krve z diafiltru tímto přestupem přes membránu diafiltru zkresleny. Při vyšetření diafiltrátu byly zjišťovány pouze stopové koncentrace D-dimeru a C5a složky komplementu, které se při různých typech proplachu nelišily. Plazmatické koncentrace beta-tromboglobulinu a C5a jsou ovlivňovány také adsorpcí k polyakrylonitrilové membráně AN69 [Cheung et al 1990, Opatrný et al 1995], která byla u části nemocných použita. Povrchy s imobilizovaným heparinem mají schopnost adsorbovat některé proteiny [Cheung et al 1992]. V současné době není prokázáno, že by proplach mimotělního oběhu adsorpci k povrchu ovlivňoval a tak mohl ovlivnit plazmatické koncentrace sledovaných markerů v této studii.

Prezentovaná studie tedy ukázala, že nemocní indikovaní k léčbě CVVHDF mají poruchu hemostázy, která zahrnuje trombocyty, koagulaci i fibrinolýzu. Zároveň z ní vyplývá, že již před zahájením léčby CVVHDF mají tyto nemocní změny v ukazatelích, podle kterých se hodnotí trombogenita. Soubor sledovaných nemocných se odlišoval od zdravých osob také v plazmatických koncentracích C5a a v počtu leukocytů v krvi, které jsou běžnými markery biokompatibility.

Studie neprokázala, že by proplach mimotělního oběhu roztokem s heparinem, provedený před zahájením CVVHDF, přinesl prospěch ve smyslu snížení trombogenity mimotělního oběhu a potřeby antikoagulancií v průběhu procedury, či měl jinak pozitivní vliv na některé další ukazatele biokompatibility. Proplach s heparinem je proto možné považovat za zbytečný. Toto tvrzení platí pro podmínky uskutečněné studie, kdy byly použity polysulfonové a polyakrylonitrilové membrány, které při kontinuálních metodách nepochybně patří k nejužívanějším [Ronco et al 2001], a pro nejobvyklejší antikoagulační schéma, kdy proplach je následován podáním antikoagulancií v průběhu procedury. Z hlediska trombogenity je zpochybnění významu proplachu s heparinem ve shodě s výsledky získanými při intermitentní hemodialýze u nemocných s chronickým selháním ledvin [Opatrný et al 1997].

Soubor sledovaných nemocných byl relativně malý. Bylo velmi těžké provést studii u nemocných s akutním selháním ledvin v kritickém stavu tak, aby u jednotlivých nemocných byly CVVHDF s různým proplachem provedeny za jinak standardních a shodných podmínek.

Je na zvážení, zda by při větším souboru rozdílly v hodnotách aPTT a v koncentracích heparinu, kde byla naznačena tendence k vyšším hodnotám při proplachu s heparinem, nedosáhly statistické významnosti. Pro posouzení trombogenity však mají podstatně vyšší sensitivitu a specificitu koncentrace komplexů trombin-antitrombin III a beta-tromboglobulinu, které se významně nelišily ani nejevily tendenci k rozdílům. I kdyby aPTT či koncentrace heparinu dosáhly s větším počtem vyšetření statistické významnosti, nesvědčilo by to v prospěch proplachu s heparinem. Naopak by to mohlo znamenat, že proplach s heparinem znamená větší zatížení oběhu nemocných příměsí heparinu (potenciálně nebezpečnou pro nemocné z hlediska krvácení), aniž příznivě ovlivní podstatně sensitivnější a specifitější ukazatele trombogenity, kterými jsou plazmatické koncentrace komplexů trombin-antitrombin III a beta-tromboglobulinu.

Ve studii byly použity dvě membrány s různou biokompatibilitou a systémová antikoagulace heparinem či regionální citrátem. U jednotlivých nemocných, kteří při hodnocení proplachu byli sami sobě kontrolou, však bylo zachováno pravidlo, že jeden nemocný měl vždy stejnou membránu a stejné antikoagulans po celou dobu studie se všemi způsoby proplachu.

Nabízí se otázka, zda proplach s heparinem má význam při užití jiných membrán než jsou polysulfon a AN69. Lze uvažovat o příznivém vlivu nově vyvinuté membrány AN69ST. Podle dostupných zpráv má tato membrána schopnost vázat heparin způsobem, při kterém je zajištěna jeho účinnost po delší dobu [Renaux et al 2001, Lavaud et al 2003]. Tyto zprávy o AN69ST se však zatím netýkají kontinuálních procedur. Navíc testy použité k hodnocení trombogenity nebyly dostatečně sensitivní. Vzhledem k rozdílným nábojům je heparin vázán také celulóзовou membránou s di-etyl-amino-etylovými skupinami (Hemophan). Podle zkušeností některých autorů [Opatrný et al 1992, Schulze et al 1992] je tato vlastnost z hlediska trombogenity spíše nevýhodou. Při dlouhodobém proplachu s heparinem ve vysoké koncentraci lze snad potřebu dalšího podávání heparinu v průběhu intermitentní hemodialýzy s Hemophanem snížit [Gretz et al 1998, Lee

et al 2004]. Dlouhodobý proplach mimotělního oběhu je však z praktického hlediska nešikovný a Hemophan v high-flux úpravě nedosáhl většího uplatnění [Ward et al 1993]. Při dnešním trendu preferovat metody s vyšším podílem filtrace je užití Hemophanu s high-flux úpravou spíše teoretickou možností. Úvahy o možném příznivém účinku proplachu mimotělního oběhu roztokem s heparinem při užití jiných membrán než polysulfon a AN69 nelze bez experimentů s příslušnými membránami definitivně uzavřít.

6.2. Vliv regionální citrátové antikoagulace na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin.

Při regionální citrátové antikoagulaci (RCA) jsou podáním citrátu na začátku mimotělního oběhu vyvázány divalentní kationty jako kalcium a magnézium. Kalciové ionty jsou nezbytné k aktivaci všech koagulačních faktorů s výjimkou faktoru XII a dále se účastní mnoha dalších procesů, jako např. aktivace komplementu [Vienken et al 2004]. Účinkem citrátu se krev v mimotělním oběhu stává nesrážlivou, či je výrazně snížena její srážlivost a aktivace hemostázy kontaktem krve s umělým povrchem je do značné míry omezena. Aby měl citrát pouze lokální efekt v mimotělním oběhu, je nutno před návratem krve do oběhu nemocného upravit kalcémii na původní hodnoty, a tak obnovit v ideálním případě srážlivost krve na původní úroveň. Komplexy citrátu s divalentními kationty jsou neaktivní a ze systémové cirkulace jsou odstraňovány v těle nemocného metabolizací v játrech či v mimotělním oběhu přestupem přes dialyzační membránu. Tento způsob antikoagulačního zajištění je ve srovnání s klasickou heparinizací technicky i personálně náročnější. Klinické zkušenosti však ukazují, že ve srovnání se systémovou heparinizací nefrakcionovaným či nízkomolekulárním heparinem je riziko krvácivých komplikací nižší [Flanigan et al 1987, Mehta et al 1990, Monchi et al 2004].

U kriticky nemocných s akutním selháním ledvin bývá často přítomná porucha hemostázy ať ve smyslu krvácivých, tak i prokoagulačních stavů. Přesná diagnostika je možná jen laboratorně. Takto potencionálně změněnou hemostázu nemocných dále ovlivňuje interakce krve s umělým povrchem mimotělního oběhu při CRRT, antitrombotika podávaná k překonání této interakce, nebo i indukovaná spotřební koagulopatie při nedostatečné dávce antitrombotik. U nemocných se tak porucha hemostázy může dále prohloubit. Z tohoto pohledu je překvapivé, jak málo informací o vlivu CRRT na změny hemostázy, které by byly popsány specifickými a senzitivními laboratorními metodami [Lane et Bowry 1994], je v literatuře k dispozici. Většina prací se zaměřuje na klinické hodnocení průběhu CRRT s ohledem na životnost filtrů, průvodní krvácivé komplikace apod. [Palsson et Niles 1999, Kutsogiannis et al 2000, Gabutti et al 2002, Bunchman et al 2003, Gupta et al 2004]. V některých případech je hemostáza hodnocena exaktními laboratorními metodami, ale tyto práce se vesměs týkají heparinové antikoagulace [Stefanidis et al 1995, Salmon et al 1997, Cardigan et al 1999, Opatrný et al 2002]. Hemostáza u regionální antikoagulace citrátem při CRRT byla dosud laboratorně hodnocena pouze podle časů srážení, které nedávají dostatečnou informaci o trombogenním působení mimotělního oběhu. Poznatky o

ovlivnění trombogenity i dalších procesů při RCA, jako je aktivace komplementu a leukocytů, prezentovaná studie doplnila.

Z vyšetření před zahájením CVVHDF s RCA je patrné, že nemocní podstupující léčbu trpí komplexní poruchou hemostázy, zahrnující všechny tři oblasti. Při vstupním vyšetření byla zřejmá aktivace trombocytů (pokles jejich počtu spolu se vzestupem plazmatických koncentrací beta-tromboglobulinu), aktivace koagulace (vzestup plazmatických koncentrací komplexů trombin-antitrombin III, možná i podle zkrácení aPTT, které nebylo ještě statisticky významné proti skupině s heparinovou antikoagulací) a aktivace fibrinolýzy (vzestup koncentrací D-dimeru). Že plazmatické koncentrace beta-tromboglobulinu rostou s poklesem ledvinných funkcí, bylo již konstatováno v předchozích odstavcích, ale v tomto souboru jeho hladina nekorelovala se sérovým kreatininem, takže podíl aktivace trombocytů na jejich vzestupu je zřejmý ($n=11$, Pearsonův korelační koeficient $r=-0,20$, $p = 0,56$). Znamky aktivace koagulačního systému nebo trombocytů u kriticky nemocných s akutním selháním ledvin prokázali také jiní autoři [Stefanidis et al 1995, Salmon et al 1997]. Jde tedy o častou poruchu hemostázy a vzhledem k její závažnosti a možným důsledkům pro nemocné je nutno její ovlivnění při CRRT dále zkoumat.

Citrátová antikoagulace byla podle hodnot koagulačních časů skutečně omezená pouze na mimotělní oběh. V průběhu procedury nedošlo k poklesu počtu trombocytů nebo vzestupu plazmatických koncentrací beta-tromboglobulinu, které by svědčily pro další aktivaci krevních destiček. Neměnily se ani hodnoty von Willebrandova faktoru, jako markeru stimulace endotelu i trombocytů, také nebyl zaznamenán další vzestup koncentrací komplexů trombin-antitrombin III, které by svědčily pro potencování již vstupně aktivované koagulace pomocí CVVHDF s regionální citrátovou antikoagulací. Vyšetření výše uvedených markerů v diafiltrátu vyloučilo zkreslení plazmatických koncentrací jejich odstraněním do diafiltrátu. Buď v něm vůbec nebyly prokázány, nebo - v případě beta-tromboglobulinu - byly zjištěny pouze ve stopových koncentracích. Zkreslení koncentrací sledovaných parametrů adsorpcí na membránu je nepravděpodobné, protože použitá polysulfonová membrána uvedené látky významně neadsorbuje. Jedinou statisticky významnou změnou v průběhu CVVHDF s RCA byl přechodný vzestup plazmatických koncentrací D-dimeru. Pro tento vzestup není jednoznačné vysvětlení. Při analýze koncentrací D-dimeru před diafiltrem a za ním se hodnoty nijak významně nelišily, a tudíž vzestup nemohl vzniknout při průtoku diafiltrem. Vzhledem k tomu, že procedurou CVVHDF s RCA nebyly indukované jiné změny hemostázy, je předpoklad, že vzestup D-dimerů nemá být hodnocen jako negativní účinek procedury. Snad může být projevem zvýšené fibrinolytické aktivity organismu při odpovědi na spotřební koagulopatii, přítomnou již před zahájením procedury.

Tranzitorní leukopenie, zjištěná na začátku CVVHDF, je dobře známa z intermitentních procedur s heparinem. Je charakteristická pro interakci krve s polysulfonovou membránou, použitou i zde [Hoenich et al 1996]. Citrát, alespoň v koncentracích zajišťujících účinnou antikoagulaci, nemá na tuto změnu podstatný vliv. Podobně se chová i anafylatoxin C5a, další indikátor bioinkompatibility, jehož plazmatické koncentrace v krvi na výstupu z diafiltru přechodně mírně narostly navzdory tomu, že high-flux polysulfonovou

membránou prochází. V 15. minutě koncentrace v krvi na výstupu z diafiltru významně korelovaly s koncentracemi v diafiltrátu (n=11, Pearsonův korelační koeficient $r=0,84$, $p<0,01$).

U nemocných indikovaných k CVVHDF se systémovou heparinovou antikoagulací (HA) byla také přítomna porucha hemostázy, která však byla méně výrazná. Na rozdíl od skupiny pacientů před CVVHDF s RCA zde chyběla elevace koncentrací komplexů trombin-antitrombin III, citlivého ukazatele aktivace koagulace. Nebyla zjištěna ani trombocytopenie. Aktivaci trombocytů však dokládaly vysoké koncentrace beta-tromboglobulinu. Koncentrace beta-tromboglobulinu také nekorelovaly se sérovým kreatininem (n=10, $r=0,16$, $p=0,655$) a nelze je tudíž vysvětlit poklesem ledvinných funkcí.

Hodnoty aPTT při systémové heparinizaci svědčily pro účinnou, dokonce až příliš vysoko nastavenou antikoagulaci. Dávky heparinu byly voleny podle zkušenosti ošetřujícího personálu a vzhledem k absenci klinických známek krvácení u nemocných, či srážení v mimotělním oběhu, nebyly u lůžka nemocného dále upravovány. Za těchto podmínek nebyly v průběhu procedury zaznamenány projevy aktivace trombocytů, koagulace, ani fibrinolýzy. V dřívější práci Stefanidis a spol. se heparinizací také podařilo v průběhu CRRT zabránit aktivaci koagulace, avšak zvýšila se aktivace trombocytů [Stefanidis et al 1995]. V jiné práci byly přes podání heparinu nalezeny vyšší koncentrace komplexů trombin-antitrombin III a tedy zvýšená aktivace koagulačního systému [Cardigan et al 1999]. Je možné, že v naší studii bylo zabráněno aktivaci hemostázy přílišnou heparinizací. Jde však o spekulaci, protože ani v jedné ze dvou citovaných prací s průkazem aktivace koagulace nebo trombocytů není úroveň heparinizace přesně popsána. Na významně snížených plazmatických koncentracích beta-tromboglobulinu, zjištěné v naší studii v jednom z odběrových intervalů, se mohla podílet jeho adsorpce k polyakrylonitrilové membráně [Opatrný et al 1995]. Významnou změnou byl také pokles D-dimeru. Jeho pokles nelze vysvětlit přestupem přes membránu diafiltru, neboť koncentrace v diafiltrátu byly řádově nižší než v plazmě a při porovnání koncentrací na vstupu a výstupu krve z diafiltru nebyl zjištěn významný rozdíl. Souvislost poklesu koncentrací D-dimeru s CVVHDF je proto problematická.

V prezentované studii jsou předvedeny nejen výsledky s CVVHDF s RCA ale i s CVVHDF se systémovou heparinizací. Vzájemné srovnání obou typů antikoagulace s sebou nese při použité metodice určité problémy. Výběr nemocných pro regionální antikoagulaci citrátem či systémovou heparinizaci nebyl randomizován a nemocní byli vybíráni podle klinických kritérií. Nemocní s vysokým rizikem krvácení či nedávnou krvácivou komplikací byli indikováni k RCA, tedy pro ně potenciálně bezpečnější metodě antikoagulace. Navzdory silněji aktivované hemostáze u nemocných před zahájením CVVHDF s RCA, nebyla zaznamenána její další aktivace v průběhu procedury. Toto zjištění podporuje opodstatněnost užití RCA u kriticky nemocných.

Druhým potenciálním metodickým problémem pro přímé srovnání procedur je použití polysulfonové membrány u procedur s regionální citrátovou antikoagulací a polyakrylonitrilové membrány u systémové heparinizace. Je otázkou, zda se materiál obou membrán liší v jeho trombogenitě. S použitím sensitivních a

specifických testů se tímto problémem zabývaly některé studie v podmínkách intermitentních procedur a dospěly k rozporným nálezům [Frank et al 2001; Ivanovich et al 1993]. V podmínkách CRRT bylo také sledováno, zda se dříve vysráží hemofiltr s polysulfonovou nebo polyakrylonitrilovou membránou [Silvester et al 1996]. Významný rozdíl nebyl nalezen. Jednoznačný rozdíl v trombogenitě obou užitých membrán tedy dosud nebyl zjištěn. Použité membrány se však lišily ve velikosti jejich plochy. Použitá polysulfonová membrána u CVVHDF s RCA byla větší než u procedur se systémovou heparinizací. Větší plocha znamená i větší interakci krve s umělým povrchem, a tedy i větší trombogenní potenciál. Ačkoliv byla plocha polysulfonové membrány užitá při RCA větší než u antikoagulace heparinem, byly hodnoty markerů trombogenity (kromě aPTT, viz níže) srovnatelné. To opět podporuje tvrzení o vhodnosti regionální antikoagulace citrátem u rizikových nemocných. Dalším rozdílem v provedení procedur s RCA a HA byla úroveň antikoagulace. U obou typů antikoagulace byla zjištěna srovnatelná aktivace trombocytů, koagulace i fibrinolýzy hodnocené plochami pod křivkou pro beta-tromboglobulin, komplexy trombin-antitrombin III a D-dimer. Tato aktivace byla srovnatelná - za podmínek podstatně většího prodloužení aPTT u procedur s heparinem – s nálezy u regionální antikoagulace citrátem (hodnoceno opět plochou pod křivkou). Je třeba podotknout, že na rozdíl od citrátové antikoagulace, která byla čistě regionální, nebyl účinek heparinu při návratu krve do oběhu nemocných nijak antagonizován. Van de Wetering a spolupracovníci ukázali, že již hodnoty aPTT v rozmezí 45-55 sekund jsou spojeny s trojnásobně zvýšeným rizikem krvácení [Van de Wetering et al 1996]. Výrazně prodloužené koagulační časy na výstupu krve z diafiltru v této studii tak dokládají, jak silně antikoagulovaná krev se vracela do oběhu nemocných, což bylo nepochybně spojeno se zvýšeným rizikem krvácení.

Existují také studie o pozitivním vlivu citrátové antikoagulace u intermitentních procedur na některé ukazatele bio(in)kompatibility, jako je aktivace komplementu, leukopenie či produkce cytokinů [Bohler et al 1996; Gabutti et al 2004]. Příznivý vliv RCA na aktivaci komplementu a přechodnou leukopenii byl pozorován při použití cuprofanové membrány, která je silným aktivátorem komplementu [Bohler et al 1996; Gabutti et al 2004; Wiegmann et al 1988]. Když byla ve stejné studii použita polymethylmetakrylová membrána, která je slabším aktivátorem komplementu, pozitivní vliv citrátu se nemanifestoval [Bohler et al 1996]. Pokud byla testována celulozo-triacetátová membrána- také slabší aktivátor komplementu ve srovnání s Cuprophanem nebyl v míře aktivace komplementu mezi heparinovou a citrátovou antikoagulací rozdíl [Bos et al 1997]. Složitost problému dokládá, že byla publikována i studie popisující větší aktivaci komplementu při nezměněné aktivaci koagulace v průběhu intermitentní hemodialýzy s RCA v porovnání s heparinovou antikoagulací, když byla použita high-flux polysulfonová membrána.

V naší studii došlo krátce po zahájení CVVHDF s heparinovou antikoagulací v krvi, která opouštěla diafiltr, k přechodnému, statisticky významnému vzestupu hladiny C5a přesto, že tranzitorní leukopenie nebyla zaznamenána. Obě pozorování odpovídají výsledkům známým z intermitentních hemodialýz s membránou AN69 při heparinové antikoagulaci [Wegmuller et al 1986] a také schopnosti AN69 absorbovat produkty aktivace komplementu [Cheung et al

1990]. Mírná, ale signifikantní leukopenie byla pozorována u CVVHDF s RCA při použití polysulfonové membrány. Při intermitentních procedurách s polysulfonovou membránou a heparinovou antikoagulací byly popsány stejné nálezy [Hoenich et al 1996]. To samé platí i pro přechodný a mírný nárůst koncentrací C5a složky komplementu. Z toho vyplývá, že citrátová antikoagulace neeliminuje u CVVHDF aktivaci komplementu a přechodnou leukopenii ani při užití membrány, která slabě aktivuje komplement.

Hlavním sdělením prezentované studie je, že regionální citrátovou antikoagulací je možné provádět tak, že při nezměněných koagulačních časech v krvi nemocného je překonána trombogenita umělého povrchu a nedochází k aktivaci hemostázy v mimotělním oběhu. K tomuto zjištění se dospělo u kriticky nemocných, jejichž hemostáza byla výrazně narušena, právě ve smyslu její aktivace, již před zahájením CVVHDF. Další aktivaci hemostázy se podařilo zabránit po celou dobu kontinuální procedury, navíc uskutečněné v postdilučním uspořádání, které je z hlediska indukce srážení rizikovější než prediluční [Davenport 1997]. Podobných výsledků bylo dosaženo i při CVVHDF se systémovou heparinací, ale jen za cenu vysokého rizika krvácení. Výsledky podporují představu o bezpečnosti RCA jak z hlediska krvácivých, tak trombotických komplikací.

Dalším poznatkem studie je, že při RCA se počty leukocytů v krvi a C5a komponenta komplementu chovají tak, jak je známo z intermitentních procedur s heparinem. Determinující je v tomto případě membrána, nikoli způsob antikoagulace.

6.3. Parametry trombogenity a aktivace komplementu při intermitentní hemodialýze s novým polysulfonovým dialyzátorem řady FX

Hlavním cílem prospektivní, randomizované, zkřížené studie bylo zhodnotit biokompatibilitu, konkrétně trombogenitu, aktivaci komplementu a změny počtu leukocytů, u nového vysoce propustného polysulfonového dialyzátoru (FX řada, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Německo). Rozdíl v konstrukci nového dialyzátoru spočívá ve změně vlastností krevního proudu při průtoku dialyzátorem a ve zvýšení vnitřní filtrace díky změně v průměru kapilár [Ronco et al 2002]. Nová membrána (Helixon) má větší průměr pórů, menší tloušťku stěny, a tím i větší propustnost. Díky tomu by např. při hemokoncentraci vlivem vyšší filtrace docházelo k silnější aktivaci hemostázy vlivem kontaktu s umělým povrchem membrány. Dále je možno zvažovat, že v důsledku nárůstu zpětné filtrace mohou pronikat některé látky z dialyzačního roztoku snadněji, a tak napomáhat aktivaci hemostázy a pod. [Bommer et al 1996]. Dále je třeba vzít do úvahy i změnu reologických vlastností krve [Ward 1995]. Dialyzátor řady FX byl proto srovnáván s klasickým dialyzátorem z řady F, který je také polysulfonový a má také charakteristiku high-flux. Biokompatibilita dialyzátorů řady F byla opakovaně testována a je srovnatelná s dialyzátory obsahujícími membrány z polyakrylonitrilu či polyamidu [Mujais et al 1995; Hoenich et al 2000]. Srovnání obou dialyzátorů bylo prováděno v takových podmínkách, aby byly vyloučeny či minimalizovány potencionální interferující faktory. Plocha membrán

byla téměř identická, průtok krve i dialyzačního roztoku byl stejný, byla i stejná technika sterilizace, teplota dialyzačního roztoku a neměnné antikoagulační schéma. Studie byla zkřížená, takže každý nemocný byl sobě kontrolou, aby byla vyloučena interindividuální variabilita.

Dodnes nejsou v běžné praxi dostupné materiály pro dialyzační membrány či části mimotělního oběhu, které by neměly trombogenní vlastnosti. V drtivé většině případů je nutno během hemodialýzy podávat antitrombotika, která by toto negativní působení umělého povrchu překonala. Jejich podání je však spojeno - aspoň u nemocných se selháním ledvin- se zvýšením rizika krvácení, ale i některých metabolických komplikací [Elisaf et al 1997; Lai et al 2001]. Navzdory podávání antitrombotických látek je možné pomocí senzitivních a specifických testů prokázat aktivaci hemostázy i při hemodialýze, která proběhne bez klinicky zjevných známek srážení [Opatrný et al 1997]. Tromby mohou vznikat na povrchu dialyzační membrány, což vede ke snížení účinnosti procedury a nárůstu residuálního objemu krve v dialyzátoru. Opakovaná a dlouhodobá aktivace krevních destiček i koagulačních faktorů v krvi, vrácené nemocnému, může být spojena u chronicky dialyzovaných s aterosklerotickými a trombotickými komplikacemi [Culleton et Wilson 1999; Assouad et Eknayan 1998].

K hodnocení potenciální trombogenity testovaného dialyzátoru byly použity doporučené senzitivní a specifické ukazatele [Lane et Bowry 1994; Lindhout 1994]. Byly sledovány markery hodnotící aktivaci trombocytů, koagulaci i fibrinolýzu.

Přestože počet trombocytů je hrubý ukazatel k posuzování trombogenity, patří mezi základní a povinné parametry v jejím hodnocení. Citlivější markery ke sledování aktivace trombocytů jsou působky, které se při jejich aktivaci uvolňují do oběhu. Z nich byl v této studii použit destičkový faktor 4 (PF4). Jeho hladina v plasmě je však ovlivněna i uvolněním z cévní stěny účinkem heparinu. Je také silným inhibitorem heparinové aktivity. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas slouží hlavně k hodnocení intenzity heparinizace (zde byly sledovány i hladiny heparinu v krvi), ale vlivem aktivace koagulace trombogenním povrchem může docházet ke zkrácení aPTT. Koncentrace komplexů trombin-antitrombin III (TAT III) byly použity k hodnocení aktivované koagulace, neboť zkrácení aPTT není dostatečně senzitivním ukazatelem. Plasmatické hladiny D-dimeru sloužily k posouzení míry aktivace fibrinolytického systému.

U dialyzátoru FX řady bylo zjištěno prodloužení aPTT ve srovnání se vstupními hodnotami, které bylo dáno nárůstem hladin heparinu v plasmě. Vzestup plasmatických hladin PF4 byl také nejspíše dán účinkem heparinu, neboť v počtu trombocytů v krvi nedocházelo k žádným významným změnám. Hodnoty D-dimeru se v průběhu procedury také významně neměnily. Koncentrace TAT III komplexů poněkud narostly v 60. minutě procedury s dialyzátorem řady FX. Při dialýzách s dialyzátorem F60 byly zjištěny podobné změny jako u řady FX včetně signifikantního, ale mírného nárůstu koncentrací TAT III v 60. minutě dialýzy, které ukazují na aktivaci koagulace.

Při srovnání výsledků z procedur s oběma typy dialyzátoru byl zjištěn statisticky významný rozdíl pouze v jednom z odběrových časů v hladinách TAT III

komplexů, které byly signifikantně vyšší u dialyzátoru řady FX. Nicméně průměrná hodnota TAT III byla i u dialyzátoru FX v rozmezí, které jsou běžné i u jiných, tzv. biokompatibilních dialyzátorů [Mujais et al 1995; Schultze et al 1992]. Při dialýze s cuprophanovou membránou, která koagulaci aktivuje mírně, byla koncentrace TAT III komplexů v plasmě 7,5 µg/l ve 180. minutě [Kolb et al 1991], zatímco u hemophanové membrány (silně aktivující koagulaci) byly ve stejném čase registrovány hodnoty TAT III dokonce 15,3 µg/l.

Klinický význam aktivace komplementu a s ní spojeného poklesu počtu leukocytů, je při hodnocení biokompatibility membrán nepochybný a existují důvody, proč se užití materiálů s vysokým stupněm aktivace komplementu vyvarovat [Bloembergen et al 1999]. Anafylatoxin C5a byl v této studii vybrán k hodnocení aktivace komplementu alternativní cestou. Důvodem bylo jednak široké spektrum potenciálně škodlivých biologických účinků C5a (uvolnění histaminu z žírných buněk, zvýšení propustnosti kapilár, kontrakce hladké svaloviny, indukce degranulace neutrofilů, podpora transkripce a uvolnění cytokinů a pod.), jednak možnost detektovat i C5a_{desArg}, který má biologický účinek sice slabší, nicméně nezanedbatelný, a nelze od C5a odlišit běžnými laboratorními testy. Jak ukazuje vzestup koncentrací C5a na výstupu krve z dialyzátoru, dialyzátor řady FX mírně aktivoval komplement na počátku hemodialyzační procedury a způsoboval i malý pokles počtu leukocytů v krvi. Podobné nálezy byly zjištěny i při procedurách s dialyzátorem řady F, který patří mezi dialyzátory s nízkým stupněm aktivace komplementu [Grooteman et al 1995; Bloembergen et al 1999; Tayeb et al 2000]. Oba typy dialyzátoru se v těchto parametrech nelišily. Stále zůstává nezodpovězená otázka, zda aktivace komplementu může být zcela eliminována a zda by tato eliminace mohla mít další klinický prospěch.

Ve studii byly prezentovány výsledky získané na výstupu krve z dialyzátoru, tedy po průchodu místem, kde je interakce krve s umělým povrchem nejvýraznější. Při srovnání výsledků získaných na vstupu krve do dialyzátoru, které odrážejí stav v oběhu nemocných, byly zjištěny obdobné nálezy jako na výstupu krve z něj. Pokud by sledované látky procházely high-flux membránou do dialyzačního roztoku, mohly by být koncentrace na výstupu krve z dialyzátoru zkresleny [Opatrný et al 1993]. Proto byly některé sledované substance analyzovány i v dialyzačním roztoku a kromě D-dimeru zde nebyly zastíženy. Koncentrace D-dimeru pak byla o několik řádů nižší než v plasmě. Při porovnání obou typů dialyzátorů nebyl zjištěn rozdíl v jejich koncentracích v dialyzačním roztoku. Plazmatické hladiny markerů biokompatibility mohou být ovlivněny i adsorpcí k umělému povrchu [Cheung et al 1990; Opatrný et al 1995]. Adsorpce k membráně nebyla v této studii sledována. Nicméně adsorpční schopnost použité polysulfonové membrány je minimální a není zde důvod, aby byla adsorpční kapacita dialyzátorů řady F a FX rozdílná.

Na základě prezentovaných výsledků je možné vyslovit závěr, že úprava designu nového, vysoce propustného, polysulfonového dialyzátoru řady FX, která umožňuje vyšší efektivnost v očišťování krve, nemá vliv na trombogenitu hodnocenou markery aktivace trombocytů a fibrinolýzy. Ačkoliv jedním z parametrů byla zastížena aktivace koagulace a byla mírně vyšší než u dialyzátoru řady F, pohybovala se v rozmezí, které je obvyklé pro jiné

biokompatibilní dialyzátory. Pokud jde o aktivaci komplementu a změny v počtu leukocytů byl nový dialyzátor také srovnatelný s jinými biokompatibilními dialyzátory.

Kromě trombogenity, aktivace komplementu a změn v počtu leukocytů v krvi, je třeba zohlednit i další aspekty bio(in)kompatibility [Hoerl 2002; Opatrný 2003]. Při přípravě této studie se objevily dvě zprávy hodnotící biokompatibilitu FX dialyzátoru. V jedné z nich nebyl zjištěn rozdíl v zánětlivé odpovědi organismu, hodnocené plasmatickými koncentracemi leukocytární elastázy, solubilní mezibuněčné adhezivní molekuly 1 a C-reaktivního proteinu mezi dialyzátory FX a F řady [Stefoni et al 2003]. Autoři jiné studie uzavírali svá pozorování tak, že ve srovnání s nízkou propustnou membránou řady F nevede high-flux dialyzátor řady FX k významným změnám plasmatických hladin některých cytokinů. Zjišťovali však, že po stimulaci krve odebrané nemocným dlouhodobě dialyzovaným s membránou FX kmenem *Staphylococcus epidermidis*, se obnovuje utlumená produkce interferonu gama v odebrané krvi [Lonnemann et al 2003].

Helixonová membrána, která je součástí dialyzátorů řady FX, má vyšší permeabilitu, a tak mohou vlivem zpětné filtrace přecházet z dialyzačního roztoku do krve látky, které indukují tvorbu cytokinů. Z tohoto důvodu byla zkoumána i propustnost polysulfonových membrán pro pyrogeny [Schindler et al 2003]. V této studii, která probíhala *in vitro*, byl vědomě kontaminován dialyzační kompartment lipopolysacharidy z *Escherichia coli* či *Stenotrophomonas maltophilia*. V krevním kompartmentu při použití dialyzátoru řady FX nebo řady F nebyla zjištěna významná produkce interleukinu-1 (IL-1), interleukinu-6 (IL-6) či tumor-necrosis faktoru (TNF) ve srovnání s kontrolami bez kontaminace. Nicméně významný vzestup produkce IL-1, IL-6 i TNF při použití vysoce propustné polysulfonové membrány DIAPES nasvědčuje, že ne všechny polysulfonové membrány se chovají stejně ve smyslu propustnosti pyrogenů a obě řady dialyzátorů F i FX jsou z pohledu možné kontaminace dialyzačního roztoku bezpečné [Schindler et al 2003].

6.4. Vybrané parametry biokompatibility při intermitentní hemodialýze s regionální citrátovou antikoagulací, kontrolovanou podle hladin ionizovaného kalcia

Regionální citrátová antikoagulace (RCA) se stala nedílnou součástí léčby mimotělními metodami očišťování krve u nemocných s krvácivými komplikacemi. Od toho, co byla poprvé popsána [Morita et al 1961], byla tato metoda postupně rozpracována do mnoha způsobů úspěšného provedení [Kutsogiannis et al 2000, Cointault et al 2004, Tolwani et al 2001, Bunchman et al 2002, Bunchman et al 2003, Palsson et Niles 1999, Meier-Kriesche et al 2001, Nuthall et al 2002, Gabutti et al 2002, Gabutti et al 2004]. Potenciální metabolická rizika spojená s RCA, jako je alkalóza, acidóza, hypernatrémie, hypokalcémie, hyperkalcémie, přestávají být s narůstajícími zkušenostmi a při řádné monitoraci problémem, pokud metodu provádí zkušený a zodpovědný personál. Zkušenost řady autorů je taková, že se při RCA vyskytují krvácivé příhody méně často, než při použití jiné formy antikoagulace, a zároveň mimotělní oběh zůstává dobře průchodný [Apsner et al 2001, Gabutti et al 2002, Janssen et al 1993]. Tyto studie

se však zaměřují především na sledování udržení průchodnosti oběhu, výskyt krvácivých komplikací, životnost dialyzátorů či diafiltrů a jen málo z nich posuzuje hemostázu laboratorními parametry. Studií s přesným posouzením hemostázy a trombogenity specifickými a senzitivními metodami při RCA je málo [Gabutti et al 2004, Apsner et al 2001]. Přitom platí, že pro hodnocení poruch hemostázy a trombogenity je laboratorní vyšetření nezbytné.

Antikoagulační účinek citrátu v mimotělním oběhu se běžně kontroluje podle koagulačních časů [Janssen et al 1993, Mehta 1998; Flanigan et al 1996]. Bylo zjištěno, že v určitém rozmezí korelují hodnoty aktivovaného koagulačního času s dobou fungování filtrů [Stefanidis et al 1995] a je-li RCA řízena podle koagulačních časů, je možné kompletně překonat trombogenitu a předejít aktivaci hemostázy [Polanská et al 2004].

V posledních letech se opakovaně v literatuře objevila sdělení, doporučující kontrolu citrátové antikoagulace a titrování dávky citrátu podle hodnot ionizovaného kalcia (iCa^{2+}) v krvi opouštějící dialyzátor [Kutsogiannis et al 2000, Nuthall et al 2002, Cointault et al 2004, Gupta et al 2004]. Zatímco existuje korelace mezi aktivovaným časem srážení a životností filtrů, nemocní s vysráženými a nevysráženými filtry se neliší v hodnotách iCa^{2+} , změřených v krvi za dialyzátorem [Tolwani et al 2001; Tobe et al 2003]. Nebylo však dosud provedeno porovnání, zda je řízení regionální antikoagulace citrátem podle hodnot ionizovaného kalcia srovnatelné s kontrolou RCA podle koagulačních časů. Existuje málo studií zabývajících se trombogenitou a hemostázou při RCA, žádná z nich se nezabývá hodnocením těchto vlastností při RCA řízené podle hodnot iCa^{2+} .

V uvedené studii byly všechny mediánové hodnoty iCa^{2+} v průběhu hemodialýzy na výstupu z dialyzátoru $\leq 0,4$ mmol/l, tedy v rozmezí, které většina autorů považuje za cílové pro plně účinnou antikoagulaci citrátem [Nuthall et al 2002, Tolwani et al 2001, Morgera et al 2004]. Za těchto podmínek však byly zjištěny nepochybné známky aktivace koagulace (vzestup plazmatických koncentrací TAT III a TF) a spotřeby trombocytů (pokles jejich počtu v krvi) při srovnání hodnot vstupních a v průběhu dialýzy na výstupu z diafiltru. Souvislost interakce krve s umělým povrchem s uvedenými změnami je umocněna poklesem počtu trombocytů nebo vzestupem TAT III a tkáňového faktoru při porovnání hodnot na výstupu krve z dialyzátoru oproti hodnotám na vstupu. Hodnoty aktivovaného času srážení plné krve (ACT) - ověřeného parametru kontroly účinnosti RCA - však svědčily pro neúčinnou antikoagulaci v mimotělním oběhu. ACT také nekorelovalo s hodnotami iCa^{2+} . Ionizované kalcium v séru nekorelovalo ani s žádným z ukazatelů aktivace hemostázy a trombogenity. Mezi aktivovaným časem srážení a některými ukazateli trombogenity naproti tomu závislosti zjištěny byly.

Jednotlivé prameny, které doporučují kontrolu RCA podle hodnot ionizovaného kalcia a cílové hodnoty $iCa^{2+} \leq 0,4$ mmol/l, se liší v množství podávaného citrátu sodného. Ve studii vedené Cointaultem a spolupracovníky byl podáván citrát ve formě ACD-A roztoku rychlostí 29,37 mmol/h (v rozmezí 21,46-31,63 mmol/h), v Guptově studii 16,9 mmol/h, a Kutsogiannis a spoluautoři podávali citrát rychlostí 25 mmol/h. Rozdíly jsou pochopitelné, protože efekt citrátu závisel na

rychlosti krevního průtoku, typu procedury [Davenport 2004], složení dialyzačního roztoku (roztoky s různým obsahem kalcia a/nebo magnezia či bez nich) a dalších faktorech. Rychlost podání citrátu však nedává dostatečnou informaci o antikoagulačním efektu citrátu. Všichni tři citovaní autoři, kteří doporučují kontrolu antikoagulace podle hodnot ionizovaného kalcia, dokumentovali klinicky uspokojivý průběh procedur s RCA. V práci Cointaulta došlo k vysrážení diafiltru v 18% všech 22 procedur s průměrnou dobou vysrážení po 29 hodinách trvání léčby. Kutsogiannis udával u 38% diafiltrů nutnost ukončení procedury pro vysoký transmembránový tlak. To napovídá, že v obou studiích byla hemostáza aktivovaná. Dá se předpokládat, že při použití senzitivních a specifických metod k hodnocení trombogenity, by autoři dospěli k podobným pozorováním jako ve zde prezentované studii.

Doporučené hodnoty ionizovaného kalcia $\leq 0,4$ mmol/l po průchodu dialyzátorem/filtrem vycházejí vesměs ze studií při kontinuálních metodách očišťování krve. Je otázka, zda tyto cílové hladiny je možno považovat za doporučené i pro intermitentní procedury. Pouze práce Morgery a spol. se týkají RCA monitorované podle hodnot iCa^{2+} u intermitentní hemodialýzy [Morgera et al 2004]. Při použití 4% citrátu sodného na počátku mimotělního oběhu jsou Morgerou a spolupracovníky doporučeny cílové hodnoty pro ionizované kalcium za dialyzátorem 0,5-0,7 mmol/l. Navíc dialyzační roztok ve Morgerově studii obsahoval 1 mmol Ca^{2+} v litru roztoku a nebyla ani rutinně upravována kalcemie na konci mimotělního oběhu infusí kalciových iontů. V této práci byla efektivita antikoagulace hodnocena klinicky a požadovaná délka dialýzy dosažena u všech 27 nemocných kromě jednoho. Hemostatické ukazatele nebyly hodnoceny. Na základě těchto informací není možné jednoznačně vytyčit optimální cílové hladiny pro iCa^{2+} na výstupu krve z dialyzátoru při intermitentní hemodialýze. Je zapotřebí dalších studií, které by měly ukázat, zda doporučené cílové hladiny pro kontinuální metody náhrady funkce ledvin jsou stejné i pro metody intermitentní. Takové studie budou vyžadovat současné podrobnější zhodnocení hemostázy, jako bylo provedeno ve zde prezentované studii. V tomto případě koagulační časy a další parametry komplexně posuzující hemostázu poskytovaly přesnější informaci o míře aktivace hemostázy, než hodnoty ionizovaného kalcia, které poskytovaly jen informaci nepřímou.

Je otázka, jaké klinické důsledky mají laboratorní nálezy pro běžnou praxi. V naší studii nebyly, podobně jako u autorů hodnotící RCA dle klinického průběhu procedur, pozorovány žádné známky srážení v mimotělním oběhu. Nicméně aktivovaná hemostáza zvyšuje riziko jednak trombotických komplikací v mimotělním oběhu i v těle nemocných, jednak riziko krvácení při konsumpci koagulopatii. Je známo, že plasmatické hladiny TAT III rostou významně u trombotických stavů, jako je disseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) [Wada et al 1999; Watanabe et al 2001] či akutní infarkt myokardu, u kterého je nárůst hladin TAT III komplexů spojen s vyšší mortalitou [Scharfstein et al 1996]. Ve naší studii byl vzestup hladin TAT III větší, než byl registrován u DIC nebo akutního infarktu myokardu [Wada et al 1999, Watanabe et al 2001, Scharfstein et al 1996]. Nedávno byla uveřejněna studie o rutinním dlouhodobém opakovaném užití citrátové antikoagulace u nemocných s chronickým selháním ledvin [Apsner et al 2005], která byla opět zaměřena spíše na klinický průběh a sledování event. minerálních posunů a změn acidobazické rovnováhy. Avšak opakovaná,

klinicky latentní aktivace hemostázy může mít ještě další negativní důsledky [Culleton et Wilson 1999; Assouad et Eknayan 1998]. Při akutním selhání ledvin a multiorgánové dysfunkci (MODS) je subklinická aktivace hemostázy ještě více nežádoucí, pravděpodobně významně přispívá k rozvoji MODS [Hack et Zeerleder 2001]. Nemocní v naší studii však netrpěli před zahájením studie krvácivými problémy, ani trombózu, a tak mohli být k uvedeným komplikacím méně náchylní.

Význam aktivace komplementu s přechodnou leukopenií je v souvislosti s biokompatibilitou desítky let diskutován. Přestože není hodnocení jejich klinického významu jednoznačné, z obavy z možných důsledků byly upřednostněny materiály, které mají malou schopnost aktivovat komplement a vyvolat tranzitorní leukopenii [Hakim 1998]. V uvedené studii byla zjištěna významná aktivace komplementu i přechodná leukopenie. Intenzita obou změn odpovídala použité dialyzační membráně a regionální antikoagulace citrátem je nebyla schopna zcela eliminovat. Podobně, jako v případě parametrů hemostázy a trombogenity, nebyla mezi koncentracemi C5a a počtem leukocytů na straně jedné a iCa^{2+} na straně druhé zjištěna žádná korelace. C5a složka komplementu a počet leukocytů v krvi nekorelovaly ani s aktivovaným časem srážení a ukazateli trombogenity. Nárůst C5a a pokles počtu leukocytů byl významný i v podskupině nemocných, kde hemodialýzy proběhly podle doporučení o cílových hladinách iCa^{2+} . Podobné nálezy byly pozorovány u polymetylmetakrylátu či celulózetátu, tedy membrán slabě aktivujících komplement, kde regionální citrátová antikoagulace ve srovnání s heparinizací již dále nevedla ke snížení aktivace komplementu a poklesu leukocytů v krvi [Böhler et al 1993; Bos et al 1997]. Někteří data ukazují, že při silné aktivaci komplementu a hluboké neutropenii při užití cuprophanové membrány může být situace jiná a RCA může mít na tyto fenomény příznivý účinek [Böhler et al 1993; Wiegmann et al 1988]. Všichni autoři však k tomuto závěru nedospěli [Janssen et al 1993]. Ve studii prezentované autorkou nebyla sledována degranulace leukocytů. Pro ni je podle pokusů in vitro i in vivo klíčovým mediátorem kalcium a nikoli komplement. Tomu odpovídá i zjištění, že RCA při užití různých dialyzačních membrán úplně eliminuje nebo významně inhibuje uvolnění myeloperoxidázy a lactoferinu [Böhler et al 1993; Bos et al 1997; Gitters et al 2005].

Není možné vyloučit, že dosažení ještě nižších koncentrací ionizovaného kalcia by omezilo aktivaci komplementu a leukopenii nebo je úplně eliminovalo. Pokud by se v dalších studiích ukázalo, že nižší hladiny iCa^{2+} snižují nebo eliminují i zde přítomnou aktivaci komplementu a leukopenii, bylo by třeba vyřešit, zda tyto změny jsou ještě klinicky významné.

7. Závěry

7.1. Vliv proplachu s heparinem na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin

Studie sledující vliv proplachu s heparinem na parametry biokompatibility u kontinuálních metod náhrady funkce ledvin ukázala, že nemocní indikovaní k CVVHDF mají komplexní poruchu hemostázy, která zahrnuje aktivaci trombocytů, koagulaci i fibrinolýzu.

Současně u takových nemocných byly zjištěny vysoké hladiny C5a a vysoký počet leukocytů krvi, které jsou běžnými markery biokompatibility, v porovnání s kontrolním souborem zdravých osob.

Studie dále neprokázala, že příprava mimotělního oběhu před CVVHDF různým způsobem proplachu (fyziologický roztok bez heparinu, fyziologický roztok s přísadou 2000 IU heparinu/l a hodinový proplach fyziologickým roztokem s 10000 IU heparinu/l s recirkulací) má vliv na chování parametrů trombogenity, aktivaci komplementu a počet leukocytů v krvi během kontinuální venovenozní hemodialyzační či ovlivní spotřebu podávaných antikoagulací.

Lze tedy uzavřít, že proplach mimotělního oběhu roztokem s heparinem, provedený před zahájením CVVHDF nepřináší prospěch z pohledu snížení trombogenity, potřeby antikoagulací a eliminace negativního vlivu umělého povrchu na další parametry biokompatibility. Proplach s heparinem lze proto považovat za zbytečný.

7.2. Vliv regionální citrátové antikoagulace na vybrané parametry biokompatibility u kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin.

Z práce studující vliv regionální antikoagulace citrátem (RCA) u kontinuální venovenozní hemodialyzační vyplývá, že u nemocných indikovaných k CVVHDF s regionální antikoagulací citrátem, kteří mají výrazně narušenou hemostázu již před začátkem léčby mimotělní eliminační metodou, dokáže RCA překonat trombogenitu umělého povrchu a vyloučit další aktivaci hemostázy v mimotělním oběhu. To navíc platí pro CVVHDF s tzv. postdilučním uspořádáním, které je z hlediska srážení krve v mimotělním okruhu rizikovější. Přitom je možné RCA vést tak, že nedochází ke změně koagulačních časů v krvi nemocných, což má podstatný význam v redukci počtu krvácivých příhod u nemocných s vysokým rizikem krvácení.

Podobného překonání trombogenity mimotělního systému bylo dosaženo i při CVVHDF se systémovou heparinizací, ale jen za cenu podstatně prodloužených koagulačních časů v systémové krvi nemocných, tedy za cenu vysokého rizika krvácení.

V uvedené studii bylo zjištěno, že citrátová antikoagulace neeliminuje u CVVHDF aktivaci komplementu a přechodnou leukopenii ani při užití membrány, která slabě aktivuje komplement. Chování obou parametrů je obdobné, jako u intermitentních procedur s heparinem a determinující je v tomto případě membrána, nikoli způsob antikoagulace.

7.3. Parametry trombogenity a aktivace komplementu při intermitentní hemodialýze s novým polysulfonovým dialyzátorem řady FX

Ze sledování parametrů trombogenity, aktivace komplementu a změn počtu leukocytů u nového, vysoce propustného, polysulfonového dialyzátoru řady FX, plyne, že úprava designu nemá vliv na trombogenitu hodnocenou markery aktivace trombocytů a fibrinolýzy.

Aktivace koagulace zjištěná jedním z ukazatelů v jednom z odběrových časů byla sice mírně vyšší u testovaného dialyzátoru FX než u dialyzátoru řady F, ale pohybovala se v mezích, které jsou obvyklé i u jiných, vysoce biokompatibilních membrán.

Při hodnocení intenzity aktivace komplementu a poklesu počtu leukocytů v krvi bylo chování nového dialyzátoru obdobné jako u dalších dialyzátorů s vysokou biokompatibilitou.

7.4. Vybrané parametry biokompatibility při intermitentní hemodialýze s regionální citrátovou antikoagulací, kontrolovanou podle hladin ionizovaného kalcia

V práci zabývající se kontrolou regionální antikoagulace citrátem podle hodnot ionizovaného kalcia u intermitentní hemodialýzy bylo zjištěno, že přes dosažení doporučených cílových hodnot ionizovaného kalcia $\leq 0,4$ mmol/l – dosud považovaných za účinně bránící srážení krve – není kompletně překonána aktivace hemostázy v mimotělním oběhu. Tato aktivace hemostázy je však pouze subklinická.

Dále bylo shledáno, že při hemodialýze s RCA nekorelují hodnoty iCa^{2+} s koagulačními časy a s ukazateli trombogenity, zatímco aktivovaný čas srážení (ACT) koreluje s některými ukazateli trombogenity.

Při hemodialýze s polysulfonovými dialyzátory nezabrání regionální citrátová antikoagulace mírné, ale statisticky významné aktivaci komplementu a poklesu počtu leukocytů v krvi.

Doporučené cílové hodnoty iCa^{2+} pro RCA při intermitentní hemodialýze je třeba dále přesněji stanovit a posoudit význam subklinicky aktivované hemostázy na organismus jak z pohledu krátkodobého, tak i při opakované dlouhodobé expozici.

8. Literatura

1. **Apsner R, Buchmayer H, Gruber D, Sunder-Plassmann G:** Citrate for long-term hemodialysis: prospective study of 1,009 consecutive high-flux treatments in 59 patients. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 557-64
2. **Apsner R, Buchmayer H, Lang T, Unver B, Speiser W, Sunder-Plassmann, Hörl WH:** Simplified citrate anticoagulation for high-flux hemodialysis. *Am J Kid Dis* 2001; 38: 979-987
3. **Assouad M, Eknayan G:** Does the choice of renal replacement therapy adversely affect the hypercoagulability associated with renal disease? *Am J Nephrol* 1998, 18: 175-8
4. **Augustine JJ, Sandy D, Seifert TH, Paganini EP:** A randomized controlled trial comparing intermittent with continuous dialysis in patients with ARF. *Am J Kidney Dis* 2004; 44: 1000-1007
5. **Bellomo R, Ronco C:** Indications for initiating renal replacement therapy in the intensive care unit. *Kidney Int* 1998; 53: S106-S109
6. **Bloembergen WE, Hakim RM, Stannard DC, Held PJ, Wolfe RA, Agodoa LY, Port FK:** Relationship of dialysis membrane and cause-specific mortality. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 1-10
7. **Böhler J, Donauer J, Birmelin M, Schollmeyer PJ, Hörl WH:** Mediators of complement-independent granulocyte activation during haemodialysis: role of calcium, prostaglandins and leukotrienes. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 1359-1365
8. **Böhler J, Schollmeyer P, Dressel B, Dobos G, Hörl WH:** Reduction of granulocyte activation during hemodialysis with regional citrate anticoagulation: dissociation of complement activation and neutropenia from neutrophil degranulation. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 234-241
9. **Bommer J, Becker KP, Urbaschek R:** Potential transfer of endotoxin across high-flux polysulfone membranes. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 883-8
10. **Bos JC, Grooteman MPC, Van Houte AJ, Schoorl M, van Limbeek J, Nubé MJ:** Low polymorphonuclear cell degranulation during citrate anticoagulation: a comparison between citrate and heparin dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1387-1393
11. **Broze GT Jr:** Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coagul Fibrin* 1995; 6: S7-S13
12. **Bunchman TE, Maxvold NJ, Barnett J, Hutchings A, Benfield MR:** Pediatric hemofiltration: Normocarb dialysate solution with citrate anticoagulation. *Pediatr Nephrol* 2002; 17: 150-154

13. **Bunchman TE, Maxvold NJ, Brophy PD:** Pediatric convective hemofiltration: Normocarb replacement fluid and citrate anticoagulation. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 1248-1252
14. **Cardigan RA, Mc Gloin H, Mackie IJ, Machin J, Singer M:** Activation of the tissue factor pathway occurs during continuous venovenous hemofiltration. *Kidney Int* 1999; 55: 1568-1574
15. **Cheung AK, Parker CJ, Janatova J, Brynda E:** Modulation of complement activation on hemodialysis membranes by immobilized heparin. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2: 1328-1337
16. **Cheung AK, Parker CJ, Wilcox LA, Janatova J:** Activation of complement by hemodialysis membranes: polyacrylonitrile binds more C3a than cuprophan. *Kidney Int* 1990; 37: 1055-59
17. **Cianciolo G, Stefoni S, Donati G, De Pascalis A, Iannelli S, Manna C, Coli L, Bertuzzi V, La Manna G, Raimondi C, Boni P, Stefoni V:** Intra- and post-dialytic platelet activation and PDGF-AB release: cellulose diacetate vs polysulfone membranes. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1222-1229
18. **Cointault O, Kamar N, Bories P, Lavayssiere L, Angles O, Rostaing L, Genestal M, Durand D:** Regional citrate anticoagulation in continuous venovenous haemodiafiltration using commercial solutions. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19: 171-178
19. **Cole L, Bellomo R, Silvester W, Reeves JH:** A prospective, multicenter study of epidemiology, management, and outcome of severe acute renal failure in a "closed" ICU system. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 191-196
20. **Conger JD, Schultz MF, Miller F, Robinette JB:** Responses to hemorrhagic arterial pressure reduction in different ischemic renal failure models. *Kidney Int* 1994; 46: 318-323
21. **Craddock PR, Fehr J, Birgham KL, Kronenberg RJ, Jacob HJ:** Complement and leukocyte-mediated pulmonary dysfunction in hemodialysis. *N Engl J Med* 1977; 296: 769-774
22. **Culleton BF, Wilson PWF:** Thrombogenic risk factors for cardiovascular disease in dialysis patients. *Semin Dial* 1999; 12: 117-25
23. **Davenport A:** The coagulation system in the critically ill patient with acute renal failure and the effect of an extracorporeal circuit. *Am J Kidney Dis* 1997; 30(5, Suppl.4): S20-S27
24. **Davenport A:** Anticoagulation for continuous renal replacement therapy. *Contrib Nephrol* 2004; 144, 228-238

25. **Dhondt A, Vanholder R, Waterloos MA, Glorieux G, De Smet R, Lameire N:** Citrate anticoagulation does not correct cuprophane biocompatibility as evaluated by the expression of leukocyte surface molecules. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1752-1758
26. **Elisaf MS, Germanos NP, Bairaktari HT, Pappas MB, Koulouridis EI, Siamopoulos KC:** Effects of conventional vs. low-molecular-weight heparin on lipid profile in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 1997; 17: 153-7
27. **Evenepoel P, Maes B, Vanwalleghem J, Kuypers D, Messiaen T, Vanrenterghem Y:** Regional citrate anticoagulation for hemodialysis using a conventional calcium-containing dialysate. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 315-323
28. **Fiaccadori E, Maggiore U, Rotelli C, Minari M, Melfa L, Cappe G, Cabassi A:** Continuous haemofiltration in acute renal failure with prostacyclin as the sole anti-haemostatic agent. *Intensive Care Med* 2002; 28: 586-593
29. **Flanigan MJ, Pillsbury L, Sadewasser G, Lim VS:** Regional hemodialysis anticoagulation: hypertonic tri-sodium citrate or anticoagulant citrate dextrose-A. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 519-524
30. **Flanigan MJ, Von Brecht J, Freeman RM, Lim VS:** Reducting the hemorrhagic complications of dialysis. A controled comparison of low dose heparin and citrate anticoagulation. *Am J Kidney Dis* 1987; 9: 147-153
31. **Frank RD, Weber J, Dresbach H, Thelen H, Weiss C, Floege J:** Role of contact system activation in hemodialyzer-induced thrombogenicity. *Kidney Int* 2001; 60: 1972-1981
32. **Gabutti L, Ferrari N, Mombelli G, Keller F, Marone C:** The favorable effect of regional citrate anticoagulation on interleukin-1beta release is dissociated from both coagulation and complement activation. *Journal of Nephrology* 2004; 17: 819-825
33. **Gabutti L, Marone C, Colucci G, Duchini F, Schönholzer C:** Citrate anticoagulation in continuous venovenous hemodiafiltration: a metabolic challenge. *Int Care Med* 2002; 28: 1419-1425
34. **Gritters M, Grooteman MPC, Schoorl M, Schoorl M, Bartels PCM, Scheffer PG, Teerlink T, Schalkwijk CG, Spreeuwenberg M, Nubé MJ:** Citrate anticoagulation abolishes degranulation of polymorphonuclear cells and platelets and reduces oxidative stress during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 153-159

35. **Golper TA:** Continuous renal replacement therapy in acute renal failure. Up To Date 12 2004
36. **Gretz N, Quintel M, Kränzlin B:** Extracorporeal therapies in acute renal failure: Different therapeutic options. *Kidney Int* 1998; 64: S57-S60
37. **Grooteman MP, Nube MJ, van Limbeek J, van Houte AJ, Daha MR, van Geelen JA:** Biocompatibility and performance of a modified cellulosic and a synthetic high flux dialyzer. A randomized crossover comparison between cellulose triacetate and polysulphone. *ASAIO J* 1995; 41: 215-20
38. **Gupta M, Wadhawa NK, Bukovsky R:** Regional citrate anticoagulation for continuous hemodiafiltration using calcium-containing dialysate. *Am J Kidney Dis* 2004; 43 (1): 67-73
39. **Hack CE, Zeerleder S:** The endothelium in sepsis: source of and target for inflammation. *Crit Care Med* 2001; 29 (Suppl): 21-27
40. **Hakim RM:** Influence of the dialysis membrane on outcome of ESRD patients. *Am J Kidney Dis* 1998; 32 (Suppl 4): 71-75
41. **Hartmann J, Fricke H, Schiffel H:** Biocompatible membranes preserve residual renal function in patients undergoing regular hemodialysis. *Am J Kid Dis* 1997, 30: 366-373
42. **Hoenic NA, Stamp S, Roberts SJ:** A microdomain-structured synthetic high-flux hollow-fiber membrane for renal replacement therapy. *ASAIO J* 2000; 46: 70-5
43. **Hoenic NA, Woffindin C, Brennan A, Cox PJ, Matthews JN, Goldfinch M:** A comparison of three brands of polysulfone membranes. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 871-876
44. **Hoenic NA, Woffindin C, Mathews JNS, Vienken J:** Biocompatibility of membranes used in the treatment of renal failure. *Biomaterials* 1995; 16: 587-592
45. **Hoerl WH:** Hemodialysis membranes: interleukins, biocompatibility, and middle molecules. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13, Suppl 1: S62-71
46. **Hofbauer R, Moser D, Frass M, Oberbauer R, Kaye AD, Wagner O, Kapiotis S, Druml W:** Effect of anticoagulation on blood membrane interactions during hemodialysis. *Kidney Int* 1999; 56: 1578-1583
47. **Hu ZJ, Iwana H, Suzuki R, Kobayashi S, Akutsu I:** Time course of activated coagulation time at various sites during continuous

haemodiafiltration using nafamostat mesilate. *Intensive Care Med* 1999; 25: 524-527

48. **Ivanovich P, Hammerschmidt DE, Quintanilla A, Kishimoto T, Tanaka H, Levin N, Klinkmann H:** Behaviour of platelets and beta-thromboglobulin. *Nephrol Dial Transplant*. 1993; 8 (Suppl) 2: 15-19
49. **Jadoul M:** Dialysis-related amyloidosis: importance of biocompatibility and age. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13 Suppl 7: 61-64
50. **Janssen MJFM, Huijgens PC, Bouman AA, Oe PL, Donker AJM, Muelen J:** Citrate versus heparin anticoagulation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 1228-1233
51. **Janssen MJFM, Muelen J:** The bleeding risk in chronic hemodialysis: preventive strategies in high-risk patients. *Netherlands Journal of Medicine* 1996; 48: 198-207
52. **Jörres A, Gahl GM, Dobis C, Polenakovic MH, Cakalaroski K, Rutkovski B, Kisielnicka E, Krieter DH, Rumpf KW, Guenther Ch, Gaus W, Hoegel J:** Haemodialysis-membrane bioincompatibility and mortality of patients with dialysis-dependent acute renal failure: a prospective randomised multicentre trial. *Lancet* 1999; 354: 1337-1341
53. **Kaplan AA:** Predilution versus postdilution for continuous arteriovenous hemofiltration. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1985; 31: 28-32
54. **Kellum JA, Mehta RL, Angus DC, Palevsky P, Ronco C:** The first international consensus conference on continuous renal replacement therapy. *Kidney Int* 2002; 62: 1855-1863
55. **Kolb G, Fischer W, Seitz R, Müller T, Egbring R, Lange H, Havermann K:** Hemodialysis and blood coagulation: the effect of hemodialysis on coagulation factor XIII and thrombin-antithrombin III complex. *Nephron* 1991; 58: 106-108
56. **Kriether DH, Fink E, Bönner G, You HM, Eisenhauer T:** Anaphylactoid reactions during haemodialysis in sheep are associated with bradykinin release. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 509-513
57. **Kutsogiannis JD, Mayers I, Nin Chin WD, Gibney N:** Regional citrate anticoagulation in continuous venovenous hemodiafiltration. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 802-811
58. **Lai KN, Ho K, Cheung RC, Lit LC, Lee SK, Fung KS, Tong MK, Lam CW:** Effect of low molecular weight heparin on bone metabolism and hyperlipidemia in patients on maintenance hemodialysis. *Int J Artif Organs* 2001 ; 24: 447-55

59. **Lane DA, Bowry SK:** The scientific basis for selection of measures of thrombogenicity. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9: S18-S28
60. **Langenecker SA, Felfering M, Werba A, Mueller CM, Chiari A, Zimpfer M:** Anticoagulation with prostacyclin and heparin during continuous venovenous hemofiltration. *Crit Care Med* 1994; 22: 1774-1781
61. **Lavaud S, Canivet E, Wuillai A, Maheut H, Randoux C, Bonnet JM, Renaux JL, Chanard J:** Optimal anticoagulation strategy in haemodialysis with heparin-coated polyacrylonitrile membrane. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (10): 2097-104
62. **Lee KB, Kim B, Lee YH, Yoon SJ, Kang WH, Huh V, Kim DJ, Oh HY, Kim YG:** Hemodialysis using heparin-bound Hemophan in patients at risk of bleeding. *Nephron Clin Pract* 2004; 97 (1): c5-10
63. **Leslie GD, Jacobs IG, Clarke GM:** Proximally delivered dilute heparin does not improve circuit life in continuous venovenous haemodiafiltration. *Intensive Care Med* 1996; 22: 1261-1264
64. **Lhotta K, Würzner R, Kronenberg F, Oppermann M, König P:** Rapid activation of the complement system by cuprophane depends on component C4. *Kidney Int* 1998; 53: 1044-1051
65. **Lindhout T:** Biocompatibility of extracorporeal blood treatment. Selection of haemostatic parameters. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9: Suppl 2: 83-89
66. **Lonnemann G, Novick D, Rubinstein M, Passlick-Deetjen J, Lang D, Dinarello CA :** A switch to high-flux Helixone® membranes reverses suppressed interferon-gamma production in patients on low-flux dialysis. *Blood Purif.* 2003; 21: 225-31
67. **Manns M, Sigler MH, Teehan BP:** Continuous renal replacement therapies: an update. *Am J Kidney Dis* 1998; 2: 185-207
68. **Mannstadt M, Touam M, Fink E, Urena P, Hraby M, Zingraff J, Uhlenbusch-Körwer I, Grassmann A, Lemke HD, Drüeke TB:** No generation of bradykinin with a new polyacrylonitrile membrane (SPAN) in haemodialysis patients treated with ACE inhibitors. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 1696-1700
69. **Marshall MR, Ma TM, Eggleton K, Ferencz A:** Regional citrate anticoagulation during simulated treatments of sustained low efficiency dialysis. *Nephrology* 2003; 8: 302-310

70. **McCarthy TC, Jenson BM, Squillace DP, Williams AW:** Improved perservation of residual renal function in chronic hemodialysis patients using polysulfone dialyzers. *Am J Kidney Dis* 1997, 29: 576-583
71. **Mehta RL:** Anticoagulation for continuous renal replacement therapies. In: Ronco C, Bellomo R (eds): *Critical Care Nephrology*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 1998, pp 1199-1211
72. **Mehta RL, McDonald BR, Aguilar MM, Ward DM:** Regional citrate anticoagulation for continuous arteriovenous hemodialysis in critically ill patients. *Kidney Int* 1990; 38: 976-981
73. **Meier-Kriesche HU, Gitomer J, Finkel K, DuBose T:** Increased total to ionised calcium ratio during continuous venovenous hemodialysis with regional citrate anticoagulation. *Crit Care Med* 2001; 29: 748-752
74. **Morgera S, Scholle C, Melzer C, Slowinski T, Liefeld L, Baumann G, Peters H, Neumayer HH:** A simple, safe and effective citrate anticoagulation protocol for the genius dialysis system in acute renal failure. *Nephron Clin Pract* 2004; 98: 35-40
75. **Monchi M, Berghmans D, Ledoux D, Canivet JL, Dubois B, Damas P:** Citrate vs heparin for anticoagulation in continuous venovenous hemofiltration: a prospective randomized study. *Int Care Med* 2004; 30(2): 260-265
76. **Morita Y, Johnson RW, Dorn RE, Hall DS:** Regional anticoagulation during hemodialysis using citrate. *Am J Med Sci* 1961; 242: 32-43
77. **Mujais SK, Schmidt B, Hacker H, Opatrný K Jr, Gurland HJ:** Synthetic modification of PAN membrane: biocompatibility and functional characterization. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: Suppl 3: 46-51
78. **Nuthall G, Skippen P, Daoust Ch, Al-Jofan F, Seear M:** Citrate anticoagulation in piglet model of pediatric continuous renal replacement therapy. *Crit Care Med* 2002; 30: 900-903
79. **Ohtake Y, Hirasawa H, Sugai T, Oda S, Shiga H, Matsuda K, Kitamura N:** Nafamostat mesylate as anticoagulant in continuous hemofiltration and continuous hemodiafiltration. *Contrib Nephrol* 1991; 93: 215-217
80. **Opatrný Jr K:** Clinical importance of biocompatibility and its effect on hemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18, Suppl 5: 41-44
81. **Opatrný K, Bouda M, Kohoutková L:** A clinical study to assess the effect of heparin in dialyzer rinsing solutions. *Int J Artif Organs* 1997; 20: 112-118

82. **Opatrný K Jr, Opatrný K, Vít L, Racek J, Válek A:** What are the factors contributing to the changes in tissue-type plasminogen activator during haemodialysis? *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: S26-S30
83. **Opatrný K Jr, Polanská K, Kroužecký A, Vít L, Novák I, Kasal E:** The effect of heparin rinse on the biocompatibility of continuous venovenous hemodiafiltration. *Int J Artif Organs* 2002; 25 (6): 520-528
84. **Opatrný K Jr, Sulková S, Lopot F, Vít L, Válek A, Opatrný K:** A clinical study on high-flux cuprammonium rayon haemodialysis membranes. *Int J Artif Organs* 1993; 17: 971-976
85. **Opatrný K Jr, Sulková S, Vít L, Vienken J, Korwer-Uhlenbusch I, Šefrna F, Válek A, Bláha J:** A clinical study of biocompatibility of dialysis membranes made from non-modified and modified cellulose. *Čas Lék Čes* 1992; 131: 457-61
86. **Opatrný K Jr, Vít L, Opatrná S, Polakovič V, Šefrna F, Sulková S, Opatrný K:** Hemocompatibility in hemodialysis and erythropoietin therapy. *Int J Artif Organs* 1995; 19: 814-20
87. **Otte KE, Jensen PB, Svendsen P, Gram J, Starklint H, Jorgensen KA:** Heparin-free hypothermal hemodialysis at 20°C improves biocompatibility. *Blood Purif* 1997; 15: 200-207
88. **Ouseph R, Ward RA:** Anticoagulation for intermittent hemodialysis. *Semin Dial* 2000; 13: 181-187
89. **Palsson R, Niles JL:** Regional citrate anticoagulation in continuous venovenous hemofiltration in critically ill patients with high risk of bleeding. *Kidney Int* 1999; 55: 1991-1997
90. **Parker TF 3rd, Wingard RL, Husni L, Ikizler TA, Parker RA, Hakim RM:** Effect of membrane biocompatibility on nutritional parameters in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49: 551-556
91. **Pickett TM, Cruickshank A, Greenwood RN, Taube D, Davenport A, Farrington K:** Membrane flux not biocompatibility determines beta-2-microglobulin levels in hemodialysis patients. *Blood Purif* 2002; 20: 161-166
92. **Plötz FB, van Oeveren W, Hultquist KA, Miller C, Bartlett RH, Wildevuur CA:** A heparin-coated circuit reduces complement activation and release of leukocyte inflammatory mediators during extracorporeal circulation in a rabbit. *Int J Artif Organs* 1992; 16: 366-370

93. **Polanská K, Opatrný K Jr, Rokyta R, Vít L:** Thrombogenicity and biocompatibility in CVVHDF with regional citrate anticoagulation. *Blood Purif* 2004; 22: 393-394
94. **Reeves JH, Cumming AR, Gallagher L, O'Brien JL, Santamaria JD:** A controlled trial of low-molecular-weight heparin (dalteparin) versus unfractionated heparin as anticoagulant during continuous venovenous hemodialysis with filtration. *Crit Care Med* 1999; 27: 2224-2228
95. **Reeves JH, Graan M:** Randomised controlled trial enoxaparin versus heparin in continuous renal replacement therapy. *Blood Purif* 2003; 21: 183-207
96. **Renaux JL, Thomas M, Crost T, Paris JM:** Heparin adsorption on Nephral ST: In vitro/ex vivo results. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: A165
97. **Ronco C, Bellomo R, Zaccarie R:** Continuous renal replacement therapy in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 Suppl 5: 67-72
98. **Ronco C, Bowry SK, Brendolan A, Crepaldi C, Soffiati G, Fortunato A, Bordoni V, Granziero A, Torsello G, La Greca G:** Hemodialyzer: From macro-design to membrane nanostructure; the case of the FX-class of hemodialyzers. *Kidney Int* 2002; 61 (Suppl 80): S126-142
99. **Ronco C, Brendolan A, Bellomo R:** Continuous versus intermittent renal replacement therapy in the treatment of acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13 Suppl 6: 79-85
100. **Ronco C, Zanella M, Brendolan A:** Management of severe acute renal failure in critically ill patients: an international survey in 345 centres. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 230-237
101. **Salmon J, Cardigan R, Mackie I, Cohen SL, Machin S, Singer M:** Continuous venovenous haemofiltration using polyacrylonitrile filters does not activate contact system and intrinsic coagulation pathways. *Intensive Care Med* 1997; 23: 38-43
102. **Scharfstein JS, MD, Abendschein DR, Eisenberg PR, Georgie D, Canon CP, Becker RC, Sobel B, Cupples LA, Braunwald E, Loscalzo J:** Usefulness of fibrinolytic and procoagulant markers during thrombolytic therapy in predicting clinical outcomes in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1996; 78: 503-510
103. **Schindler R, Christ-Kohlrausch F, Frei U, Shaldon S:** Differences in the permeability of high-flux dialyser membranes for bacterial pyrogens. *Clin Nephrol* 2003; 59: 447-454

104. **Schindler R, Lonnemann G, Schaffer J, Shaldon S, Koch KM, Krautzig S:** The effect of ultrafiltered dialysate on cellular content of interleukin-1 receptor antagonist in patients on chronic hemodialysis. *Nephron* 1994; 68: 229-233
105. **Schrefl A, Kellner KH, Hartmann J, Strobl W, Falkenhagen D:** A novel monitor for anticoagulation with citrate. *Int J Artif Organs* 2001; 24: 535
106. **Schultze G, Hollmann S, Sinah P:** Formation of thrombin-antithrombin III complex using polyamide and Hemophan dialyzers. *Int J Artif Organs* 1992; 15: 370-373
107. **Schwarzbeck A, Wagner L, Squarr HU, Strauch M:** Clotting in dialyzers due to low pH of dialysis fluid. *Clin Nephrol* 1977; 7:125-127
108. **Silvester W, Honoré P, Sieffert E, Valentine J, Wagle S, Smithies M, Bihari D:** Interleukins 6 and 8, tumour necrosis factor alpha and complement D clearance by polyacrylonitrile and polysulphone membranes during haemofiltration in critically ill patients. Continuous haemofiltration in intensive care, Meeting, Paris: 1996
109. **Skroeder NR, Kjellstrand P, Holmquist B, Nilsson U, Jacobson SH:** Increased amounts of C3a and the terminal complement complex at high dialysis blood-flow: the relation with dialysis efficiency. *Nephron* 1996; 72: 523-529
110. **Stefanidis I, Hägel J, Kierdorf H, Maurin N:** Influencing hemostasis during continuous venovenous hemofiltration after acute renal failure: comparison with intermittent hemodialysis. *Contrib Nephrol* 1995; 116: 140-144
111. **Stefanidis I, Hägel J, Maurin N:** Influence of coagulation parameters on filter running time during continuous venovenous hemofiltration. In: Sieberth HG, Stummvoll HK, Kierdorf H, eds: Continuous extracorporeal treatment in multiple organ dysfunction syndrome. *Contrib Nephrol Basel: Karger, 1995, vol 116, 145-149*
112. **Stefoni S, Coli L, Cianciolo G, Donati G, Ruggeri G, Ramazzotti E, Pohlmeier R, Lang D:** Inflammatory response of a new synthetic dialyzer membrane. A randomized cross-over comparison between polysulfone and helixone. *Int J Artif Organs* 2003 ;26: 26-32
113. **Tan HK, Baldwin I, Bellomo R:** Continuous veno-venous hemofiltration without anticoagulation in high-risk patients. *Int Care Med* 2000; 26: 1652-1657
114. **Tayama E, Hayashida N, Akasu K, Kosuga T, Fukunaga S, Akashi H, Kawara T, Aoyagi S:** Biocompatibility of heparin-coated

extracorporeal bypass circuits: New heparin bonded bioline system. *Int J Artif Organs* 2000; 24: 618-623

115. **Tayeb JS, Provenzano R, El-Ghoroury M, Bellovich K, Khairullah Q, Pieper D, Morrison L, Calleja Y:** Effect of biocompatibility of hemodialysis membranes on serum albumin levels. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 606-610
116. **Tobe SW, Aujla P, Walele AA, Oliver MJ, Naimark DMJ, Perkins NJ, Beardsall MA:** Novel regional citrate anticoagulation protocol for CRRT using only commercially available solutions. *Critical Care* 2003; 18: 121-129
117. **Tolwani AJ, Campbell RC, Schenk MB, Allon M, Warnock DG:** Simplified citrate anticoagulation for continuous renal replacement therapy. *Kidney Int* 2001; 60: 370-374
118. **Van de Wetering J, Westendorp RG, van der Hoeven JG, Stolk B, Feuth JD, Chang PC:** Heparin use in continuous renal replacement procedures: the struggle between filter coagulation and patient hemorrhage. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 145-150
119. **Vienken J, Uhlenbusch-Körwer I, Bonnie-Schorn E, Grassmann A:** Basic principles of biocompatibility assessment; in *Understanding Membranes and Dialysers*. Lengerich, Pabst Science Publishers, 2004; pp 199-260
120. **Wada H, Sakuragawa N, Mori Y, Takali M, Nakasaki T, Shimura M, Hiyoyama K, Nisikawa M, Gabazza EC, Deguchi K, Kazama M, Shiku H:** Hemostatic molecular markers before the onset of disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol* 1999; 60: 273–278
121. **Wanner Ch, Metzger T:** C-reactive protein a marker for all-cause and cardiovascular mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: Suppl. 8: 29-32
122. **Ward RA:** Effects of haemodialysis on coagulation and platelets: are we measuring membrane biocompatibility? *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: Suppl. 10: 12-17
123. **Ward RA, Schaefer RF, Falkenhagen D, Joshua MS, Heidland A, Klinkmann H, Gurland HJ:** Biocompatibility of a new high-permeability modified cellulose membrane for haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 47-53
124. **Watanabe R, Wada H, Watanabe Y, Sakakura M, Nakasaki T, Mori Y, Nishikawa M, Gabazza EC, Nobori T, Shiku H:** Activity and antigen levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in

plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 2001; 104: 1–6

125. **Webb AR, Mythen MG, Jacobson D, Mackie IJ:** Maintaining blood flow in the extracorporeal circuit: haemostasis and anticoagulation. *Int Care Med* 1995; 21: 84-93
126. **Wegmuller E, Montandon A, Nydegger U, Descoedres C:** Biocompatibility of different hemodialysis membranes: activation of complement and leukopenia. *Int J Artif Organs* 1986; 9: 85-92
127. **Wiegmann TB, McDougall ML, Diederich DA:** Dialysis leukopenia, hypoxemia, and anaphylatoxin formation: effect of membrane, bath, and citrate anticoagulation. *Am J Kidney Dis* 1988; 11: 418-424

9. Seznam publikací a přednášek autora

Přednášky:

1. K. Opatrný Jr., A. Kroužecký, **K. Polanská**, J. Mareš, L. Vít, M. Tomšů, + FMC Bad Homburg. Comparison of FX60S versus F60S dialyzer: Clinical investigation for the evaluation of the thrombogenicity of FX60S dialyzer. FX Investigator`s meeting, Bad Homburg, Germany, 28. dubna 2000
2. **K. Polanská**, A. Kroužecký, L. Vít, V. Šrámek, I. Novák, E. Kasal. Důsledky interakce krve s umělým povrchem při kontinuální mimotělní náhradě ledvinných funkcí (CRRT) na hemostázu a aktivaci komplementu. 40. studentská vědecká konference Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Plzeň, 25. května 2000
3. K. Opatrný Jr., A. Kroužecký, **K. Polanská**, L. Vít, E. Kasal, V. Šrámek. Biocompatibility in continuous renal replacement therapy. 5th International symposium: Metabolic changes in chronic renal failure, Košice, Slovenská republika, 24. června 2000
4. K. Opatrný Jr., **K. Polanská**, A. Kroužecký, L. Vít, E. Kasal, I. Novák, V. Šrámek. Biokompatibilita kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin (CRRT). 28. český nefrologický kongres, Plzeň, 5. září 2000
5. **K. Polanská**, A. Kroužecký, L. Vít, I. Novák. Vyžadují kontinuální metody očišťování krve (CRRT) proplach mimotělního oběhu heparinem? 41. studentská vědecká konference Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Plzeň, 16. května 2001
6. **K. Polanská**, A. Kroužecký, L. Vít, M. Matějovič, R. Rokyta jr., K. Opatrný jr. Kontinuální mimotělní metody očišťování krve a jejich biokompatibilita. Jubilejní XX. dny mladých internistů 2001, Olomouc 31. května 2001
7. K. Opatrný Jr., **K. Polanska**, A. Krouzecky, L. Vit, I. Novak. Do continuous renal replacement therapies (CRRT) require heparin rinse? XXVIII ESAO Congress, Gent Belgium, 22. – 25. září 2001
8. Opatrný K. Jr., **Polanská K.**, Kroužecký A. Vít L., Kasal E., Novák I. Vliv proplachu s heparinem na trombogenitu, aktivaci komplementu a počet leukocytů v krvi při kontinuální venovenozní hemodiafiltraci (CVVHDF), 29. Český nefrologický kongres, Liberec, 20. - 23. června 2002
9. **Polanská K.**, Opatrný K, Jr, Rokyta R, Jr, Vít L. Trombogenita a biokompatibilita při CVVHDF s regionální citrátovou antikoagulací. XI. kongres České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny ČLS J.E.P., Liberec, 30. září – 2. října 2004
10. P. Zemanova, K. Opatrný Jr., **K. Polanska**, J. Wirth, F. Sefrna, M. Brandl, D. Falkenhagen: It is appropriate to tune regional citrate anticoagulation during

hemodialysis by ionized calcium levels? 23rd Annual Meeting of the ISBP, Rotterdam, Belgie, 31. srpna – 2. září 2005

Postery:

1. **K. Polanska**, K. Opatrny Jr., A. Krouzecky, L. Vit, E. Kasal, V. Sramek, I. Novak: The effect of continuous veno-venous hemodiafiltration on hemostasis and complement activation. 18th Annual Meeting of The International Society of Blood Purification, Řím, Itálie, 6.-8. září 2000, poster s ústní prezentací
2. Opatrny Jr. K., Krouzecky A., **Polanska K.**, Vit L., Sramek V., Novak I., Kasal E: The thrombogenicity of continuous renal replacement therapy and effect of heparin rinse, ESICM – 13th Annual Congress, Rome Italy, 1.– 4. září 2000, poster s ústní prezentací
3. **Polanská K.**, Opatrný K, Jr, Rokyta R, Jr, Vít L: Thrombogenicity and biocompatibility in CVVHDF with regional citrate anticoagulation. 22th Annual Meeting of the ISBP, London, 3. – 5. září 2004, poster s ústní prezentací

Publikace s IF:

1. Opatrny K Jr, **Polanska K.**, Krouzecky A, Vit L, Novak I, Kasal E. The effect of heparin rinse on the biocompatibility of continuous venovenous hemodiafiltration. *Int J Artif Organs* 2002, 25 (6): 520-8 (IF 2002: 1,192)
2. **Kamila Polanská**, Karel Opatrný Jr., Richard Rokyta Jr., Aleš Kroužecký, Ladislav Vit, Eduard Kasal. The effect of regional citrate anticoagulation on thrombogenicity and biocompatibility during CVVHDF, *Renal Fail* 2006, 28: 107-118 (IF 2004: 0,355)
3. Karel Opatrny, Jr., Pavlina Richtrova, **Kamila Polanska**, Jan Wirth, Frantisek Sefrna, Martin Brandl, Dieter Falkenhagen. Citrate anticoagulation control by ionized calcium levels does not prevent hemostasis and complement activation during hemodialysis. *Blood Purif* – v tisku (IF 2004: 1,789)

Publikace bez IF:

1. Opatrný K. Jr., **Polanská K.**, Wirth J., Novák I: Akutní selhání ledvin. *Akt Nefrol* 2002, 8 (1), 21-25
2. Karel Opatrný Jr., Aleš Kroužecký, **Kamila Polanská**, Jan Mareš, Martina Tomšů, Sudhir K. Bowry, Jörg Vienken. Does an alteration of dialyzer design and geometry affect biocompatibility parameters? *Haemodialysis International* 2006; 10: 201-208 (IF není stanoven)

Abstrakta:

1. **K. Polanská**, A. Kroužecký, L. Vít, V. Šrámek, I. Novák, E. Kasal. Důsledky interakce krve s umělým povrchem při kontinuální mimotělní náhradě ledvinných funkcí (CRRT) na hemostázu a aktivaci komplementu. Sborník abstrakt 40. studentské vědecké konference Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, květen 2000 – abstrakt
2. K. Opatrný Jr., **K. Polanská**, A. Kroužecký, L. Vít, E. Kasal, I. Novák, V. Šrámek. Biokompatibilita kontinuálních mimotělních metod nahrazujících funkci ledvin (CRRT). Akt Nefrol 2000, 6 (1): 28 – abstrakt
3. **K. Polanska**, K. Opatrny Jr., A. Krouzecky, L. Vit, E. Kasal, V. Sramek, I. Novak: The effect of continuous veno-venous hemodiafiltration on hemostasis and complement activation. Blood Purif 2001, 19: 91 - abstrakt
4. Opatrny Jr. K., Krouzecky A., **Polanska K.**, Vit L., Sramek V., Novak I., Kasal E: The thrombogenicity of continuous renal replacement therapy and effect of heparin rinse. Intensive Care Medicine 2000, 26 (suppl. 2) – abstrakt
5. K. Opatrný Jr., **K. Polanská**, A. Kroužecký, L. Vít, E. Kasal, I. Novák, V. Šrámek: Biocompatibility of Continuous Renal Replacement Therapies (CRRT). Kidney and Blood Pressure Research 2001, 24 (2): 137 - abstrakt
6. **K. Polanská**, A. Kroužecký, L. Vít, I. Novák. Vyžadují kontinuální metody očišťování krve (CRRT) proplach mimotělního oběhu heparinem? Sborník abstrakt 41. studentské vědecké konference Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni- květen 2001 – abstrakt
7. K. Opatrny Jr, **K. Polanska**, A. Krouzecky, L. Vit, I. Novak: Do continuous renal replacement therapies (CRRT) require heparin rinse? Int. J of Artif Organs 2001, 24 (8): 535 - abstrakt
8. Opatrný J. Jr., **Polanská K.**, Kroužecký A., Vít L., Kasal E, Novák I: Vliv proplachu s heparinem na trombogenitu, aktivaci komplementu a počet leukocytů v krvi při kontinuální venovenozní hemodiafiltraci (CVVHDF), Akt Nefrol 2002, 8 (suppl. 1): 29 - abstrakt
9. **Polanská K**, Opatrný K, Jr, Rokyta R, Jr, Vít L: Thrombogenicity and biocompatibility in CVVHDF with regional citrate anticoagulation. Blood Purif 2004, 22: 393 – abstrakt
10. **Polanská K**, Opatrný K, Jr, Rokyta R, Jr, Vít L: Trombogenita a biokompatibilita při CVVHDF s regionální citrátovou antikoagulací. Sborník abstrakt z XI. kongresu České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny ČLS J.E.P., p. 36 – abstrakt

11. P. Zemanova, K. Opatrny Jr., **K. Polanska**, J. Wirth, F. Sefrna, M. Brandl, D. Falkenhagen: It is appropriate to tune regional citrate anticoagulation during hemodialysis by ionized calcium levels? *Blood Purif* 2005, 23: 407
- abstrakt

10. Poděkování

Moje poděkování patří těm, kteří mě v mém snažení při přípravě dizertace jakkoliv podpořili - morálně, intelektuálně, pracovně či materiálně.

Především pak děkuji svému školiteli, prof. MUDr. Karlu Opatrnému Jr., DrSc., bez jehož podpory by tato práce nemohla vzniknout a který se bohužel již nedočkal její finální podoby.

Nemůžu opomenout poděkovat i své školitelce, doc. MUDr. Sylvii Opatrné, Ph.D., která mně pomohla v závěrečných fázích přípravy této práce cennými radami a připomínkami.

V neposlední řadě děkuji celé mé rodině a přátelům, kteří mně nezištně pomáhali a podporovali.

11. Seznam nejčastěji použitých zkratk

HD = hemodialýza

RCA = regionální citrátová antikoagulace.

CRRT = kontinuální metody očištění krve,

kontinuální metody náhrady funkce ledvin

CVVHDF = kontinuální venovenozní hemodiafiltrace

BTG = beta-tromboglobulin,

TAT III = trombin-antitrombin III komplex

DD = D-dimer

aPTT = aktivovaný parciální tromboplastinový čas

vWF = von Willebrandův faktor

ACT = aktivovaný čas srážení plné krve

TF = tkáňový faktor

PK = prekallikrein

HK = vysokomolekulární kininogen

PL = destičkové fosfolipidy

t-PA = tkáňový aktivátor plasminogenu

u-PA = aktivátor plasminogenu urokinázového typu

cs-PA = aktivátor plasminogenu závislý na kontaktním systému

PAI- 1 a 2 = inhibitor aktivátoru plasminogenu 1 a 2

C1-INA = C1 inhibitor

Alfa-1-AT = alfa-1-antitrypsin

Alfa-2-AP = alfa-2-antiplasmin

TAFI = trombinem aktivovatelný inhibitor fibrinolýzy

FDP = fibrin-degradační produkty

F60S = dialyzátor F60S, Fresenius Medical Care

FX60S = dialyzátor FX60S, Fresenius Medical Care

iCa²⁺ = ionizované kalcium v séru

p = hladina významnosti

NS = nesignifikantní rozdíl při statistickém zhodnocení

SEM = standardní chyba průměru

SD = standardní odchylka

Souhlasím s půjčováním mé dizertační práce.

MUDr. Kamila Polanská

V Plzni 10. února 2006