

Laboratorní monitorování antikoagulační léčby

Doporučení pro klinickou praxi



Sekce pro trombózu a hemostázu České hematologické společnosti
České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

M.Pecka

II. interní klinika Fakultní nemocnice – Oddělení klinické hematologie a Katedra interních oborů Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové

vydáno 16:03:2006 u příležitosti konání XII. Pařížkových dní

dostupné na www.thrombosis.cz a www.pr-lab.cz

Laboratorní monitorování antikoagulační léčby

M. Pecka

II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie a Katedra interních oborů Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové

Souhrn

K monitorování antikoagulační, trombolytické a antiagregační léčby lze použít řady testů, z nichž ne všechny zcela přesně sledují léčebný efekt použitého preparátu. Některé z nich mají lineární charakter a sledují přesně léčebnou dávku, jiné mají řadu nespecifických reakcí a léčebný efekt je těmito okolnostmi výrazněji ovlivněn. Práce popisuje jednotlivé monitorovací systémy, zabývá se jejich možným ovlivněním, případně je diskutována otázka monitorování léčby u různých diagnostických stavů.

Antitrombotická léčba

Za určitých podmínek je aktivace hemostatických mechanismů nežádoucí a život ohrožující a je potřeba její aktivitu tlumit. K inhibici primární hemostázy jsou k dispozici protidestičkové léky a ke tlumení sekundární hemostázy antikoagulantia. Spontánní fibrinolýzu fibrinového trombu, spočívající v aktivaci plazminogenu na plazmin, je možné terapeuticky potencovat podáním t-PA nebo lze přímo podat přirozená fibrinolytika, či jejich analoga (1).

Léčebné zákroky u projevů trombogeneze vychází z toho, že podaná účinná látka může:

- zabránit zvětšování trombu, případně rozpustí jeho fibrinovou složku
- zamezit dalšímu shlukování trombocytů
- snížit hyperkoagulabilitu systému

Rozlišujeme antitrombotickou léčbu:

- antikoagulační
- trombolytickou
- antiagregační

Laboratorní hodnoty použitých testů by se během antitrombotické léčby měly pohybovat v léčebném rozmezí. Jsou-li nižší (nedostatečný čas) je nemocný ohrožen **tromboembolickými příhodami**, jsou-li naopak vyšší (nadměrný čas) je nemocný ohrožen **krvácivými komplikacemi**.

Antikoagulační léčba

Hlavním záměrem antikoagulační léčby je co nejrychlejší dosažení stabilní účinné léčebné dávky, udržení této dávky v terapeutických mezích a vyloučení významnějšího

předávkování antikoagulačním působkem. Léčba zabraňuje vzniku trombu, tím že brání genezi trombinu a následné přeměně fibrinogenu na fibrin a to tak, že brání vzniku plně hodnotných faktorů (*preparáty kumarinového typu*) nebo se potencuje účinek antitrombinu k nepřímému vyvázání trombinu (*nefrakcionovaný heparin*), či k vyvázání aktivovaného F Xa (*frakcionovaný heparin*), případně se využije účinku přímých inhibitorů trombinu. Sníženou tvorbou nebo vyvazováním trombinu z koagulačního děje se výrazně omezuje i riziko aktivace trombocytárního systému.

Potlačení aktivovaného koagulačního procesu lze dosáhnout řadou způsobů:

- **Inhibicí iniciální fáze koagulace** (TFPI a inhibitory ostatních koagulačních faktorů)
- **Zamezením přeměny protrombinu na trombin** (inhibitory faktorů IXa a Xa)
- **Blokádou účinku trombinu** (přímé a nepřímé inhibitory trombinu)
- **Posílení přirozené antikoagulační odpovědi organismu** (rekombinantní protein C a trombomodulin).
- **Potlačení geneze faktorů závislých na vitaminu K** (kumarinové preparáty)

Nepřímé inhibitory trombinu

Nepřímé inhibitory trombinu vyžadují další látku, která jim umožní připojit se k molekule trombinu. Mezi působky, které usnadňují připojení inhibitoru k molekule trombinu patří např. heparin (2). Samotný heparin má minimální antikoagulační účinky. Antikoagulační účinek heparinu je zprostředkován 2 cestami:

- **Antitrombinem** – vzniká komplex s heparinem a následně s trombinem
- **TFPI** – uvolňuje TFPI, který vyvazuje vnější tenázu [FVIIa, TF]

Rozlišujeme 2 druhy heparinů:

Název	Označení	MW	Monitorování léčby
Nefrakcionovaný heparin	UFH	3-40 tisíc Da	APTT
Nízkomolekulární heparin	LMWH	4,5-6 tisíc Da	Aktivita anti-Xa

Za vazbu heparinu na trombin je odpovědná pentasacharidová sekvence, proto jako antikoagulans lze použít i molekulu obsahující pouze tuto sekvenci (pentasacharidy).

Monitorování léčby nefrakcionovaným heparinem (UFH)

Monitorování léčby heparinem představuje stále velký problém. Dosud není k dispozici test, který by odrážel antitrombotické působení heparinu u nemocného. Příčiny jsou jednak v polyvalentním účinku heparinu a dále v testu samotném. Během léčby je důležité zajistit vyváženou hladinu nefrakcionovaného heparinu, která je schopna udržovat efektivní hypokoagulační stav a současně neohrozí pacienta krvácením. Pro rychlost svého účinku se hodí heparin spíše k ošetření akutních stavů při vzniku cévní příhody.

a) Nižší léčebné dávky nefrakcionovaného heparinu se sledují pomocí **aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (APTT)**. U těchto dávek se předpokládá, že koagulační čas je přímo úměrný hladině heparinu v plazmě nemocného. APTT popisuje zejména vnitřní cestu koagulačního děje. V přítomnosti fosfolipidů krevních destiček a po kontaktní aktivaci plasmy chudé na destičky se test startuje přidáním chloridu vápenatého.

- *Heparin má poněkud odlišné vlastnosti v systému in vivo a in vitro, ke kterým je nutné během monitorování přihlížet. V systému in vivo je heparin z části vyvazován PF4 uvolněným z krevních destiček. Dále je nutné brát odlišnou účast v systému antitrombinové a anti Xa aktivity. K antikoagulačnímu efektu přispívají i některé další fyziologické faktory jako je tělesná hmotnost, plasmatické proteiny (zejména v době zánětu), cirkadiální rytmus. Toto vše souhrnně přispívá k citlivosti reagensů v případě vyhodnocení terapeutického účinku heparinu v systému APTT.*
- *V některých případech zejména tam, kde dochází k výraznějšímu vyvazování heparinu na plasmatické proteiny, může docházet k tomu, že dávky a hladiny APTT nekorelují. V takových případech je vhodné sledovat hladinu heparinu v plazmě jinými metodami (např. chromogenní metodou).*
- *Během monitorování hladin heparinu, zejména při antikoagulační terapii žilní trombózy může docházet k následujícím problémům:*

1. *Jde o akutní stav, který je provázen vzestupem bílkovin akutní fáze, které soutěží s antitrombinem o vazbu na UFH. Jedná se zejména o tyto sloučeniny: vitronectin, na histidin bohatý glykoprotein - HRG (histidin rich glycoprotein) a PF4.*
2. *Pokles antitrombinu – při poklesu pod 50 % může docházet k tzv. "heparinové rezistenci" – tj. nedostatku antitrombinu, při kterém nedochází ke vzniku ternárního komplexu [antitrombin . trombin . heparin]. Zjišťují se kratší časy APTT, než by odpovídalo dané léčbě.*
3. *Zvýšené hladiny F VIII a fibrinogenu (vyvolané akutním stavem). Dochází ke zkrácení časů APTT i při terapeutických dávkách heparinu, díky zvýšené aktivitě FVIII a zvýšeným hladinám fibrinogenu. Hovoříme o tzv. „nepravé heparinové rezistenci“.*
4. *Dochází k prodloužení APTT a to:*
 - *extrémně: při deficitu F XII a faktorů kontaktní fáze (plná korekce po přidání normální plazmy)*
 - *méně výrazně: v přítomnosti protilátek typu lupus antikoagulans - LA (nedojde ke korekci)*

b) Při heparinizaci krve u mimotělních oběhů se využívá vysokých dávek heparinu, které nejsou měřitelné APTT. V těchto případech se léčba heparinem monitoruje **pomocí aktivovaného koagulačního testu - ACT**. ACT je metoda zavedená v r. 1966 Hattersleyem a podobná svým principem APTT, ale provádí se na rozdíl od APTT přímo s krví. Metoda využívá kontaktních látek, jako jsou silica, celite nebo kaolin, ale bez přidání fosfolipidů. Kontaktní aktivátory jsou umístěny ve speciálních „cartridges“, které jsou uzpůsobeny k měření ACT pomocí zvláště k tomuto účelu uzpůsobených přístrojů. Po přidání vzorku do „cartridges“ se iniciuje kontaktní fáze srážecího procesu a tvorba fibrinu je měřena mechanickými nebo optickými přístroji.

Časy kontrolní plasmy: 120 – 180 s

Terapeutické hodnoty: 300 – 600 s

ACT je výrazně ovlivněn hladinou heparinu (prodloužený čas je úměrný koncentraci heparinu). Test dále ovlivňují tyto faktory: nevyváženost v poměrech aktivovaných koagulačních faktorů a inhibitorů, lýza destiček, zvýšená hemodiluce, hypotermie u nemocných a jiné. Test je závislý zejména na kontaktní fázi a získané časy mohou mít značný rozptyl. Výhody tohoto testu jsou v jeho jednoduchém provedení a v použití přímo na klinickém pracovišti ke kontrole heparinové dávky. ACT je využitelný jen pro nefrakcionovaný heparin, který je podáván ve vysokých dávkách při mimotělovém oběhu, tak jak je tomu při hrudní chirurgii nebo u dialýzy.

Monitorování léčby nízkomolekulárním heparinem (LMWH)

U LMWH je podobně jako u UFH antikoagulační účinek podmíněn potlačením tvorby trombinu. LMWH velmi účinně potlačuje v přítomnosti AT inhibiči faktoru Xa. Vazba pentasacharidové sekvence LMWH na antitrombin mění konformaci molekuly a usnadní vazbu F Xa k této molekule. Dojde k výraznému zesílení inhibičního efektu a ke snížení produkce trombinu, zatímco aktivace ostatními mechanismy je v tomto případě zachována (3).

Na podkladě anti Xa aktivity nízkomolekulárních frakcí heparinu je založen princip jeho stanovení v plazmě. Nízkomolekulární heparin tvoří s antitrombinem dimerní komplex [antitrombin . LMWH], který vyvazuje v nadbytku dodané definované množství čistého F Xa. Zbytekové množství F Xa lze měřit koagulačně nebo metodou chromogenních substrátů. Pokles faktoru Xa je nepřímě úměrný koncentraci LMWH. S testem neinterferují fibrin degradační produkty (FDP) a zvýšené hladiny F VIII, tedy složky které výrazně ovlivňují APTT a ACT. Laboratorní kontroly se využívá zejména při monitorování léčby LMWH v době těhotenství a u malých dětí.

Terapeutické hodnoty: 0,3 – 0,7 anti Xa U/ml

Monitorování léčby přímými inhibitory trombinu

Přímé inhibitory trombinu inhibují trombin tak, že se váží přímo na jeho molekulu bez působení další zprostředkující látky. Mezi nejsilnější inhibitory trombinu se řadí hirudiny. Hirudin tvoří s trombinem dimerní komplex [hirudin . trombin]. Takto vyvázaný trombin ztrácí své proteolytické schopnosti a to jak v hemostatických procesech, tak i mimo ně. Léčebný antikoagulační účinek hirudinu je srovnatelný s LMWH.

Když vyloučíme APTT, který je v případě hirudinu spojen s řadou problémů, zbývá několik testů, kterými lze přesně stanovit hladinu hirudinu v plazmě (např. chromogenní metoda, ELISA a j.). V praxi se však nejčastěji používá **ecarinový test - ECT (4)**.

Sledovaný systém: po aktivaci koagulačního systému ecarinem dochází k přeměně protrombinu na trombin a následně fibrinogenu na fibrin. Při reakci se nejprve tvoří mezotrombin, který je rychle inaktivován ecarinem na mezotrombin – des - F1, jež spontánně přechází na α trombin. Trombin pak vyvolá přeměnu fibrinogenu na fibrin.

Reakční směs: vyšetřovaná plazma

Startovací reagentie: ecarin

Heparin neovlivňuje výsledek testu. ECT může být vyšetřen v plné krvi nebo plazmě.

Protrombinázou vyvolaný koagulační test (Prothrombinase induced clotting test – PiCT) je nový test vyvinutý Calatzisem v r. 2000, který je možné použít k monitorování všech typů heparinů a inhibitorů trombinu, jako je hirudin.

Test je založen na aktivaci plazmy enzymem jedu Russelovy zmiže, který aktivuje pouze F V (RVV-Va). V přítomnosti fosfolipidů, Ca^{2+} a přidaného F Xa dojde k tvorbě protrombinázy na povrchu aktivovaných destiček. Po určité době inkubace se nastartuje tvorba trombinu, která vede k následné přeměně fibrinogenu na fibrin.

Monitorování léčby preparáty kumarinu

Mezi antagonisty vitamínu K patří preparáty kumarinu. Jejich účinkem vznikají faktory, které nemají plnou fyziologickou funkci při vazbě na fosfolipidovou matrix - tzv. PIVKA faktory (PIVKA = Protein Induced by Vitamin K Antagonist).

K monitorování léčby preparáty kumarinové řady se používá **protrombinový test - PT**, který zachycuje vnější cestu aktivace koagulačního děje, při kterém přeměna fibrinogenu na fibrin není ovlivněna faktory XII, XI, IX, VIII a fosfolipidy krevních destiček. Test je startován přidáním kalciového tromboplastinu (směs tromboplastinu a iontů Ca^{2+}) k plazmě (5).

Po doporučení ICSH (Mezinárodní výbor pro standardizaci v hematologii) a WHO byl v r. 1982 zaveden pro vyjádření protrombinového testu u léčených nemocných: Mezinárodní normalizovaný poměr – INR (International Normalized Ratio). Výsledek laboratoře je vyjádřen poměrem tromboplastinového času nemocného (t_P) a času směsné kontrolní plazmy (t_N). Podle rozhodnutí WHO jsou laboratorní výsledky vyjadřovány v mezinárodních normalizovaných poměrech - INR. Tento způsob je jednotný v celém světě. INR vyjadřuje poměr t_P/t_N získaný s tromboplastinem BCT 67/40 (referenční reagentie WHO od r. 1978, lidský tromboplastin uložený v lyofilizované formě v kapalném dusíku).

U ostatních tromboplastinů se zjišťuje **Index citlivosti – ISI** (International Sensitivity Index), který udává směrnici používaného tromboplastinu, která byla získána porovnáním referenčního tromboplastinu s tromboplastinem kalibrovaným. Hodnota INR pro daný vzorek a aktuální tromboplastin se vypočte ze vztahu:

$$INR = \left(\frac{t_P}{t_N} \right)^{ISI}$$

Fyziologické rozmezí INR: přihlíží se k diagnóze a stavu nemocného.

Faktorů, které mohou ovlivňovat účinné nastavení antikoagulační léčby a možnosti jejího sledování, je dnes známa celá řada. Patří mezi ně zejména věk nemocných, náležitá informovanost nemocného, ale také spolupráce pacienta na léčbě, případně lékové interakce. Některé práce popisují na dávce závislý vliv přísunu vitamínu K v potravě.

U neléčených pacientů nebo pro porovnání studií s protrombinovým testem se nadále používá vyjádření časů nebo poměru časů vyšetřované osoby a normální plazmy.

Monitorování trombolytické léčby

Trombolytická léčba je vedle chirurgické léčby jedinou aktivní metodou léčby trombózy. Úspěšnost trombolytické léčby odvisí na časném začátku (6). **Trombolytika aktivují fibrinolytické vlastnosti krve zejména v oblasti trombu.** Cílem trombolytické léčby je zprůchodnění tepny nebo žíly, bypassu či dialyzačního zkratu. Důsledkem včasné úpravy cirkulačních poměrů je zlepšení funkce postiženého orgánu či končetiny, a tím snížení mortality (úmrtnosti).

• Jednorázové podání trombolytika

Indikace: infarkt myokardu do 6 hodin od vypuknutí obtíží (retrosternální bolesti)

Léčba: Jednorázová dávka trombolytika (streptáza 1 - 1,5 milionu jednotek + hydrokortison)

Monitorování: neprovádí se

• Kontinuální podávání trombolytika

Indikace: arteriální a žilní uzávěry, plicní embolie

Léčba: kontinuální dávkování trombolytika (streptáza 3 – 5 milionu jednotek + hydrokortison k zabránění alergické reakce)

Monitorování: **trombinový test**

Léčebné rozmezí: 30 – 90 sekund

Monitorování antiagregační léčby

Antiagregační léčba je zaměřena na omezení shlukovací schopnosti krevních destiček (7). Přijdou-li krevní destičky během cirkulace do styku s obnaženým kolagenem v subendoteliální vrstvě cévní stěny v důsledku ruptury aterosklerotického plátu, dochází v tomto místě k jejich adhezi. Záleží na rovnováze proagregačních a antiagregačních mechanismů, zda tento děj přestoupí do tvorby destičkového trombu (8).

V současnosti dostupné protideštičkové léky interferují s různými kroky aktivačních procesů, včetně adheze, uvolňovací reakce nebo agregace a snižují riziko arteriální trombózy, ale mohou zvýšit riziko krvácení při jejich předávkování. Indikace protideštičkové léčby vyplývá především z přítomnosti rizikových faktorů tepenné okluze. Nejčastěji se v rámci antiagregační léčby monitoruje účinek acetylsalicylové kyseliny – ASA. K monitorování lze použít několika technik, z nichž se zmíníme o dvou technikách:

Sledování inhibice agregační křivky stimulované kolagenem

Zjistí se hodnota agregační křivky po stimulaci kolagenem před zahájením léčby a následně se tato hodnota sleduje po celou dobu léčby přibližně v měsíčních intervalech

Léčebné rozmezí: 15 - 30 % maxima křivky před léčbou

Sledování inhibice agregační křivky stimulované kationickým propylgalátem

Sleduje se agregační křivka po stimulaci kationickým propylgalátem (CPG). Stanovení probíhá v optickém agregometru za použití destičkami bohaté (PRP) a chudé (PPP) plasmy. Měří se výška maximální amplitudy (ma), rychlost náběhu agregační křivky (ms - slope) a doba potřebná k dosažení 50 % ma (T50). Je - li to možné změní se agregační odpověď před podáním protideštičkové terapie (ASA) a pak se provádí pravidelná měření v průběhu terapie, dokud se nedosáhne optimálního snížení hodnoty slope. Kontroly po dosažení této hodnoty je potom možné provádět v delších časových intervalech.

- Heparin do hodnoty 4,0 IU/ml nemá vliv na výsledek vyšetření
- Počty destiček pod $100 \times 10^9/l$ mohou významně ovlivnit výsledek testu
- Nelze stanovit vzorky s chylózní, ikterickou a hemolytickou plazmou

Existuje fenomén, který se nazývá „rezistence na ASA“. O tomto jevu lze hovořit buď z klinického pohledu – jako o selhání protektivního účinku ASA před trombotickou komplikací, nebo ji lze definovat laboratorně - jako neschopnost způsobit in vitro prokazatelnou inhibici destičkových funkcí (9, 10).

Diskutovaná vyšetření jsou testy, které mohou složit k monitorování antitrombotické léčby některými popsány preparáty. Jejich prodloužení však nemusí být nutně spjata s hladinou sledovaného léku. Prodloužené časy mohou být souhrou řady interakcí s některými léky, případně potravinami, ale mohou mít také velmi jednoduché příčiny, způsobené chybami v preanalytické a analytické části vyšetření.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906

Doc. RNDr. Miroslav Pecka, CSc.

2. Interní klinika, Oddělení klinické hematologie FN a Katedra interních oborů LF UK, Hradec Králové

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové

Tel.č.: 495832649(mobil: 606317154)

E-mail: pecka@fnhk.cz

Literatura

1. Bultas, J. a Karetová, D.: Léčba trombotických stavů – kde jsme a kam se ubíráme. Remedica 2004; 14: 182 – 200.
2. McLean, J.: The thromboplastic action of cephalin. Am J Physiol 1916; 41: 250 – 257.
3. Andersson, L.O., Borrowcliffe, T.W., Holmer, E., et al. Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X. Effect of heparin neutralization in plasma. Thromb Res 1979; 115: 531–541.
4. Novak, J. a Bucha, S.: Ecarin test. Semin. Thrombos Haemostas 1996; 22:197–202.
5. Pecka, M. Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patofyziologie hemostázy. 1. vydání; Český Těšín: Finidr 2004.
6. Marder, V.J. a Sherry, S.: Thrombolytic therapy: Current status (2). New Engl Med 1988; 318: 1512-1520.
7. Badimon, L. a Badimon, J.J.: Interaction of platelet activation and coagulation. In: Fuster, V., Topol, E.J., eds. Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia 1996, Lippincott - Raven Publishers, 639 – 656.
8. Vojáček, J., Malý, M., Hraboš, V. et al: Hladina tkáňového faktoru, inhibitoru tkáňového faktoru a solubilního P-selektinu u nemocných s akutním koronárním syndromem. Cor Vasa 2002; 44: 148 – 151.
9. Hilmerová, J. a Filipovský, J.: Klinický význam aspirinové rezistence. Vnitř Lék 2004; 50: 462 – 469.
10. Malý, J., Pecka, M., Gregor, J. a spol. Rezistence na kyselinu acetylosalicylovou (bioindikátor léčebné strategie). Transfuzie a hematologie dnes 2005; Suppl.2, 11: 41-45.