

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Motole

Vliv krystaloidů a koloidů na krevní srážlivost
s využitím metody rotační tromboelastometrie
(ROTEM)

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Praha 2019

MUDr. Silvie Binterová

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Experimentální chirurgie



MUDr. Silvie Binterová

Vliv krystaloidů a koloidů na krevní srážlivost s využitím metody rotační tromboelastometrie (ROTEM)

Influence of crystalloids and colloids on blood coagulation using therotational thromboelastometry (ROTEM) method

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
doc. MUDr. Miroslav Durila, Ph.D.

Praha, 2019

Poděkování:

Srdečně děkuji mému školiteli doc. MUDr. Miroslavovi Durilovi, Ph.D. za odborný dohled a podporu během celého postgraduálního studia. Zároveň bych chtěla poděkovat mému manželovi, Tomášovi Binterovi, za grafickou úpravu této práce, včetně tvorby obrázků.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze,

Silvie Binterová

Identifikační záznam:

BINTEROVÁ, Silvie. *Vliv krystaloidů a koloidů na krevní srážlivost s využitím metody ROTEM®. [Influence of crystalloids and colloids on blood coagulation using the ROTEM® method]*. Praha, 2019. XXs., X. příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny. Vedoucí práce Durila.

Obsah

Předmluva.....	7
Seznam zkratk použitých v textu.....	8
1. Úvod.....	10
2. Teoretická část.....	12
2.1. Infuzní roztoky	12
2.1.1. Krystaloidní roztoky	12
2.1.2. Koloidní roztoky	13
2.1.3. Nebalancované roztoky.....	17
2.1.4. Balancované roztoky.....	19
2.2. Hemostáza	22
2.2.1. Primární hemostáza.....	22
2.2.2. Sekundární hemostáza	23
2.3. Hodnocení hemostázy	29
3. Stanovení hypotézy, cíl práce.....	42
4. Soubor a metoda.....	42
5. Výsledky.....	45
5.1. Výsledky studie „Vliv krystaloidů a koloidů na krevní srážlivost in vitro s využitím metody ROTEM“	45
5.2. Výsledky studie „Vliv krystaloidů a koloidů na krevní srážlivost in vivo s využitím metody ROTEM“	49
5.3. Výsledky studie „Vliv času na stabilitu krevního vzorku s využitím metody ROTEM“	53
6. Diskuse.....	55
6.1. Vliv infuzních roztoků na krevní srážlivost	55
6.2. Porovnání výsledků studií	63
6.3. Infuzní roztok versus hemostáza	64
6.4. Limity disertační práce	66
7. Závěr.....	66
8. Literatura	68

Předmluva

Pro intravaskulární objemovou resuscitaci kriticky nemocného pacienta jsou dnes indikovány krystaloidní a koloidní tekutinové roztoky. V současnosti je hodně diskutované téma, jaký typ roztoků by měl být preferován zejména v perioperační medicíně, a to s ohledem na jejich možný negativní účinek na hemokoagulaci. Tento aspekt je nesmírně důležitý v perioperační medicíně a zejména u život ohrožujícího krvácení, právě proto je stále hledán infuzní roztok s minimálním vlivem na krevní srážlivost.

Během mého postgraduálního studia jsme na naší klinice provedli studie in vitro a in vivo týkající se ovlivnění krevní srážlivosti po podání balancovaných infuzních roztoků. Ke sledování koagulopatie jsme zvolili metodu rotační tromboelastometrie.

Práce má za cíl zhodnotit vliv balancovaných krystaloidních a koloidních roztoků a dle dostupných dat určit infuzní roztok, který nejméně ovlivňuje krevní srážlivost.

Seznam zkratek použitých v textu

- A5 a A10– amplitude 5 a 10 (amplituda 5 a 10 minut od iniciace koagulace)
- ASPI – arachidonic acid (kyselina arachidinová)
- ADP – adenosindifosfát
- AT – antitrombin
- APC – aktivovaný protein C
- aPTT – activated partial thromboplastin time (aktivovaný částečný tromboplastinový čas)
- aPTTR – activated partial thromboplastin time ratio (hodnota pro srovnání s parametrem standardní plazmy)
- COL – collagen (kolagen)
- CFT – clot formation time (propagační fáze srážení)
- CT – clotting time (iniciační fáze srážení)
- „CT“ – „closure time“ (čas uzavření)
- ERAS – enhanced recovery after surgery (zlepšená/potencovaná rekonvalescence po operaci)
- HMWK – high molecular weight kininogen (vysokomolekulární kininogen)
- INR – international normalized ratio (mezinárodní normalizovaný poměr)
- kDa – kilodalton
- LI 30, LI 60 – lysis index 30 a 60 (lýza 30 a 60 minut od CT)
- MA – maximal amplitude (maximální amplituda)
- MCF – maximum clot firmness (maximální síla koagula)
- ML – maximal lysis (maximální lýza)
- PAI – plasminogen activator inhibitor (inhibitor aktivátorů plasminogenu)
- PFA – platelet function analyser (přístroj k vyšetření funkce krevních destiček)
- PGE – prostaglandin
- PKK – prekalikrein
- PL – phospholipids (fosfolipidy)
- POC – point of care
- POCT – point of care testing
- PT – prothrombin time (protrombinový čas)
- PTA – plasma thrombin antecedent, antihemofilický faktor C
- RISTO – ristocetin test

ROTEM – rotační tromboelastometrie

t-PA – tissue plasminogen activator (tkáňový aktivátor plasminogenu)

TAFI – thrombin activated fibrinolysis inhibitor (trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy)

TEG – tromboelastografie

TFPI – tissue factor pathway inhibitor (inhibitor cesty zevního faktoru)

TRAP – thrombin receptor activating peptide (peptid aktivující trombinový receptor)

u-PA – urokináza

vWF – von Willebrandův faktor

1. Úvod

Tekutinová terapie patří mezi nezbytnou součást léčby nemocných, jak na jednotkách intenzivní péče, tak na operačních sálech. Avšak i infuzní roztok je lék. Má potenciál škodit nejen kvantitativně, ale představuje i riziko kvalitativní toxicity dané složením roztoků. Při volbě tekutiny je tedy nezbytné zohlednit charakteristiky jednotlivých roztoků a infuzní terapii vždy přizpůsobit dané klinické situaci. Cílem tekutinové resuscitace může být náhrada cirkulujícího objemu, udržení orgánové perfuze nebo obnovení rovnováhy mezi potřebou a dodávkou kyslíku tkáním. Pro tyto situace jsou dnes indikovány krystaloidní a koloidní roztoky [1-3].

Infuzní roztoky se liší svým fyzikálním a chemickým složením. Vůči krevní plasmě mohou být izotonické, hypotonické nebo hypertonické. Podle množství a koncentrace jednotlivých složek se krystaloidy i koloidy dělí na nebalancované a balancované. Nebalancované roztoky jsou rozpuštěny v 0,9% roztoku chloridu sodného (NaCl), balancované roztoky mají složení blízké krevní plasmě [1-6].

Krystaloidy i koloidy se zásadně odlišují koloidně-osmotickou aktivitou, tedy přítomností nebo nepřítomností vysomolekulárních látek, např. polysacharidů či bílkovin. Krystaloid je elektrolytovým roztokem, některé druhy mají navíc nízkomolekulární cukr. Krystaloidní roztok volně prostupuje přes buněčnou membránu, po jeho infuzi zůstává intravaskulárně přibližně $\frac{1}{4}$ podaného množství. Koloidní roztoky jsou tvořeny makromolekulami a mají vysokou molekulární hmotnost. Díky těmto vlastnostem za ideálních podmínek jen obtížně procházejí přes endotel cév. Na základě Starlingova zákona se k dosažení stejného hemodynamického efektu podává 3–4krát vyšší objem krystaloidu než koloidu. V současnosti je ale mnohem více prozkoumán tzv. glykokalyx, klíčová komponenta endoteliální bariéry, která se významně podílí na pohybu tekutin. Dle nejnovějších studií, které neopomíjí glykokalyx, je třeba k tekutinové resuscitaci maximálně 1,6krát více krystaloidu než koloidu [1, 7, 8].

Z krystaloidů se nejčastěji používá samotný 0,9% roztok NaCl a v posledních letech se do popředí dostávají balancované roztoky [1, 4-6]. Z koloidů jsou podávány syntetické roztoky škrobové, syntetická želatina, a dále albumin, který má biologický původ. Prvním syntetizovaným koloidem byla želatina z hovězího kolagenu. Později se objevil oxypolyželatinový přípravek, dnes je na trhu k dispozici ureaželatina a sukcinylovaná želatina. Tato novodobá želatina má molekulární hmotnost sice jen kolem 30 kDa, ale díky

speciální molekulové struktury dosahuje stejného objemového efektu jako její předchůdci [9-11]. Roztoky škrobu jsou rozděleny na tři generace dle molekulární hmotnosti, molární substituce a C2/C6 poměru. Vysokomolekulární škroby první generace měly významné nežádoucí účinky a v současné době nemají žádné medicínské uplatnění. Druhá generace má molekulární hmotnost 200-250 kDa, molární substituci 0,5 a 0,6. Třetí generace škrobů má molekulární hmotnost 130 kDa a molární substituci 0,4. Tato nejnovější generace i přes menší molekulární hmotnost dosahuje díky velkému množství malých onkoticky aktivních molekul podobného objemového efektu jako škroby starší generace [1, 3, 9, 12]. Albumin se pro medicínské účely získává z krevní plazmy dárců. Je to jeden z hlavních plasmatických proteinů, je v ní obsažen v koncentraci 40-45 g/l a zodpovídá za 75-80 % onkotického tlaku. Jeho molekulová hmotnost je 69 kDa [1, 3, 9].

Akutní krevní ztráta s následnou objemovou náhradou je denním problémem anesteziologů a intenzivistů. Navzdory mnoha publikovaným studiím, neexistuje dosud jasný závěr, který z infuzních roztoků je ideální pro perioperační management a má nejmenší vliv na krevní srážlivost, natož který z novodobých balancovaných syntetických roztoků je tím nejlepším.

K hodnocení hemokoagulace se běžně používají standardní laboratorní testy (PT, aPTT), z krevního obrazu se zaměřujeme na počet trombocytů. Tato vyšetření jsou někdy doplněna stanovením hladiny fibrinogenu, antitrombinu, D-dimerů. Vyšetření jednotlivých koagulačních faktorů, dysfunkce krevních destiček, určení aktivity fibrinolytického systému a přirozených inhibitorů koagulace (APC rezistence, protein C, protein S) se provádějí v daleko nižším počtu. Nesmí být opomíjen dotaz na výskyt krvácivých poruch v rodině a u vyšetřovaného pacienta. Většina uvedených vyšetření hodnotí srážení krve až po její centrifugaci, tedy po odstranění buněčných složek včetně trombocytů, de facto hodnotí srážení krevní plazmy [13,14].

Avšak nový buněčný model hemostázy, který bude dále zmíněn v textu, klade důraz na velmi důležitou roli trombocytů ve srážení krve. Z tohoto hlediska je více opodstatněné vyšetřovat srážení tzv. „plné krve“. Jako jedna z mála metod, která pracuje s plnou krví je rotační tromboelastometrie (ROTEM). Tato metoda hodnotí viskoelastické vlastnosti plné krve a v porovnání s rutinními koagulačními testy (PT, aPTT) poskytuje mnohem rychleji informaci o krevní srážlivosti. První výsledky jsou k dispozici během 5-10 minut, navíc je možné tuto metodu použít přímo u lůžka pacienta [14,15]. Právě rychlá dostupnost výsledků

je zásadní pro management život ohrožujícího krvácení. V takové situaci jsou běžné testy nepraktické, neboť laboratoř poskytuje výsledky za 45–60 minut, a to už je klinická situace zcela odlišná.

Z výše uvedených důvodů jsme se rozhodli použít právě metodu ROTEM k hodnocení vlivu roztoků na hemokoagulaci.

2. Teoretická část

2.1. Infuzní roztoky

Infuzní roztoky dělíme na krystaloidy a koloidy. Obě skupiny dále na nebalancované a balancované roztoky podle množství a koncentrace jednotlivých složek. Koloidy je možné rozdělit i dle původu na biologické, kam patří albumin a syntetické, mezi něž řadíme hydroxyethyl škrob a želatinu. Při podávání infuzního roztoku, ať krystaloidu nebo koloidu, nesmí být opomíjeny jejich rozdílné vlastnosti. Každý roztok má jiné fyzikální a chemické složení. Z toho plyne jejich různé klinické použití, rozdílné žádoucí a nežádoucí účinky a maximální dávka. Správná volba infuzního roztoku i management jeho podávání mají významný podíl na výsledcích léčby [1, 6].

2.1.1. Krystaloidní roztoky

Krystaloid je roztokem elektrolytů, některé přípravky obsahují navíc nízkomolekulární cukr. Krystaloidní roztok volně difunduje skrze buněčnou membránu, v cévním řečišti setrvává přibližně $\frac{1}{4}$ podaného objemu, jeho hlavní osmoticky účinnou částicí je sodík. V porovnání s krevní plasmou mohou být tyto roztoky izotonické, hypotonické nebo hypertonické [1,7].

K výhodám krystaloidních roztoků patří to, že mají minimální vliv na hemostázu, o čemž pojednává tato práce, dále nejsou nefrotoxické a nezpůsobují alergické reakce. V neposlední řadě jsou levné a snadno dostupné. Za nevýhodu lze považovat malou volumexpanzi a s tím související nutnost podávání vyšších dávek. To může vést k hypervolemii a v případě podávání neohřátých infuzních roztoků k hypotermii, a to se všemi klinickými důsledky [1-6].

2.1.2. Koloidní roztoky

Koloidy jsou heterogenní skupinou roztoků. Mezi přirozeně se vyskytující patří pouze roztoky albuminu. Prvním synteticky používaným koloidním roztokem byla želatina. Následoval dextrans, což byl polysacharid tvořený glukózou. Pro vysoký anafylaktický potenciál a významný negativní vliv na renální funkce a koagulace je jeho použití obsolentní. Od roku 1974 se na trhu začaly objevovat hydroxyethyl škroby [1].

Koloidní roztoky jsou tvořeny makromolekulami a mají vysokou molekulární hmotnost. Želatina se skládá ze směsi polypeptidů získaných štěpením kolagenu. Hydroxyethyl škroby jsou syntetické polymery odvozené z amylopektinu, které tvoří rozvětvené řetězce molekul glukózy získávaných z brambor nebo kukuřice. Rozpustnost ve vodě a ochrana před degradací je u škrobů dosažena hydroxyethylací molekul glukózy. Albumin představuje hlavní sérovou bílkovinou, která se významně podílí na onkotickém tlaku plasmy a má transportní funkci pro mnoho látek [1, 6, 9, 10].

Koloidní roztoky za ideálních podmínek díky svým makromolekulám jen obtížně procházejí přes endotel cév a tím teoreticky mohou setrvat intravaskulárně déle než krystaloidní roztok. Je obecně známo, že k dosažení stejného hemodynamického efektu se podává 3–4krát vyšší objem krystaloidu než koloidu [7]. Po podání krystaloidů totiž dochází k jejich rychlé redistribuci v celém extracelulárním prostoru v důsledku volné difuze skrze buněčnou membránu. Tento pohyb tekutin se popisuje Starlingovým zákonem, dle nějž transkapilární přesuny tekutin závisí na změnách hydrostatického a onkotického tlaku mezi tkáněmi a krví [1]. Dle nejnovějších poznatků je ale stále častěji brán v potaz tzv. revidovaný Starlingův zákon. Ten neopomíjí glykokalyx, jakožto klíčovou komponentu endoteliální bariéry. Tato struktura pokrývá vnitřní povrch cév celého lidského těla, je složena z proteoglykanů a glykoproteinů. Přestože je bariéra jen několik μm tenká, za fyziologických podmínek váže 700–1700 ml tekutiny, což představuje 25–50 % objemu plasmy. Intaktní glykokalyx významně ovlivňuje chování podaných roztoků, avšak jeho integritu narušují zánětlivé působky, ischémie, reperfuze, hypoxie. Jedná se právě o situace, kdy indikujeme podání tekutin, tedy septický stav, trauma, operační výkon, hyperglykémie aj. Z pohledu tekutinové léčby by měla být endoteliální glykokalyx zachována a tímto způsobem zabránit patologickým přesunům tekutiny do intersticia. Při porušení této bariéry dochází k úniku onkoticky aktivního koloidu do intersticia [1, 16, 17]. Dle těchto poznatků je u nemocných pacientů s poškozeným glykokalyxem použití 3- 4x vyššího objemu krystaloidu než koloidu k dosažení stejného hemodynamického efektu

považováno za obsolentní. Naopak dle nejnovějších studií je třeba k tekutinové resuscitaci u pacientů s poškozeným glykokalyxem maximálně 1,6krát více krystaloidů než koloidů [7, 8].

- **želatina**

První želatina pro lidské použití byla syntetizována z hovězího kolagenu již v roce 1915. Tyto původní preparáty často obsahovaly bakterie *Clostridium tetani*, spory antraxu, měly vysoký anafylaktický potenciál a při pokojové teplotě želírovaly. Až o 40 let později se na trhu objevil čištěný oxypolyželatinový přípravek (Gelifundol), následovaný ureaželatinou (Haemaccel) a moderní sukcinylovanou želatinou (Gelofusin, Geloplasma, Gelaspan).

Novodobá sukcinylovaná želatina se skládá z 18 aminokyselin a má molekulovou hmotnost kolem 30 kDa. Negativní náboj molekuly vyvolaný sukcylnací vede k expanzi molekuly, molekulární objem je proto vyšší než u nesukcinylované želatiny stejné molekulární hmotnosti. Sukcinylovaná želatina díky této speciální molekulové úpravě dosahuje objemového efektu srovnatelného s moderními škroby. Po podání se rychle distribuuje do intravaskulárního prostoru a objemový účinek vykazuje přibližně po dobu 4 hodin. Novodobá želatina není metabolizována, ale eliminuje se z 95 % močí a z 5 % stolicí.

U moderní želatiny nebyl prokázán únik do retikuloendoteliálního systému a ani u pacientů s chronickou renální insuficiencí nebyla pozorována její kumulace v organismu i přes opakované podávání. Moderní želatinové roztoky nemají vůbec stanovenou hranici maximální bezpečné denní dávky. Z nežádoucích účinků se může ojediněle vyskytnout zvýšení tělesné teploty a alergické kožní reakce. Těžké anafylaktické reakce se objevují jen vzácně. Moderní želatina ve srovnání s hydroxyethylškroby méně ovlivňuje koagulace a nepředstavuje riziko akutního renálního selhání [10, 11, 18, 19].

V České republice se v současnosti užívají přípravky pouze na bázi sukcinylované želatiny (Gelofusine, Geloplasma, Gelaspan), ve světě je ale stále dostupný i Haemaccel na bázi ureaželatiny.

- **hydroxyethyl škroby**

Roztoky škrobu jsou rozděleny na tři generace dle molekulární hmotnosti, molární substituce a C2/C6 poměru.

Molární substituce vyjadřuje poměr mezi počtem hydroxyethylových skupin a počtem jednotek glukózy, tedy míru, v jaké je molekula škrobu nahrazena hydroxyethylovou skupinou. Za nízkou molární substitucí považujeme hodnoty 0,4 a 0,5, vysoká molární substituce má hodnoty 0,6 a 0,7. V případě vícečetné substituce uvnitř prstence glukózy

nabývá molární substituce hodnotu větší než 1. Poměr C2/C6 udává poměr mezi polohami substituovaných hydroxyethylových skupin v molekule glukózy. Substituce hydroxyethylovou skupinou na C2 více inhibuje účinek plazmatické amylázy než substituce na C6. Proto čím vyšší C2/C6 poměr, tím pomalejší odbourávání. C2/C6 poměr nabývá hodnot 9:1, 7:1 nebo 6:1.

Důležitou charakteristikou škrobových přípravků je i jejich koncentrace, která též do značné míry ovlivňuje jejich objemový efekt. K dispozici máme 6% HES, který je isoonkotický ke krevní plasmě a 10% hyperonkotický HES.

Použití vysokomolekulárních škrobů první generace nemá pro své významné nežádoucí účinky v současné medicíně žádné uplatnění. Druhá generace přípravků má molekulární hmotnost 200-250 kDa, molární substituci 0,5 a 0,6. Třetí, nejmodernější generaci, zastupují škroby s molekulární hmotností 130 kDa, molární substituce je u nich rovna 0,4. Tyto roztoky mají díky velkému množství malých onkoticky aktivních molekul podobnou volumexpanzi jako škroby starší generace.

Farmakokinetika HES závisí na molekulové hmotnosti a na stupni molární substituce. Po intravenózní aplikaci jsou menší molekuly, než je renální práh (60–70 kDa) ihned vylučovány močí, zatímco větší molekuly jsou metabolizovány plazmatickou alfa-amylázou [1, 3, 9, 12, 20].

I přes snahu vyvinout moderní škrobový roztok s minimem nežádoucích účinků jsou hydroxyetylované škroby v posledních letech stále ostře diskutované jak v oblasti intenzivní medicíny, tak u septických pacientů. V červnu 2013 dokonce Farmakovigilanční výbor pro posuzování rizik léčiv při Evropské lékové agentuře doporučil pozastavení jejich registrace kvůli významnému negativnímu vlivu na renální funkce a pro vyšší riziko mortality dle výsledků dostupných studií (studie VISEP, 6S, CHEST). Po důkladném přehodnocení uvedených studií se však objevily závažné výhrady k jejich metodologii. Na podzim 2013 Farmakovigilanční výbor schválil použití HES pro určité situace a vyžádal si provedení dalších studií u pacientů s traumatem a u pacientů s plánovaným chirurgickým zákrokem. Dle současných doporučení (červenec 2018) by přípravky obsahující HES měly být použity pouze v léčbě hypovolemie způsobené akutní ztrátou krve, nejsou-li roztoky krystaloidů dostačující. Nicméně doporučení nezmiňují žádné informace o jejich vlivu na hemokoagulaci, i to byl jeden z důvodů pro vznik této disertační práce. Roztoky HES nesmějí být dle doporučení podány pacientům se sepsí, poruchou funkcí ledvin či u kriticky nemocných pacientů, k dalším kontraindikacím patří dehydratace, popáleniny, intrakraniální nebo mozkové krvácení. Dále nesmějí být indikovány u pacientů s objemovým přetížením, plicním edémem,

u nemocných se závažnou koagulopatií a s těžkou poruchou jaterních funkcí. Dle stanoviska mají být tyto přípravky používány v nejnižší možné dávce (<30 ml/kg) a po co nejkratší dobu (< 24 hodin). Léčba musí být vedena za kontinuálního hemodynamického monitorování a při dosažení hemodynamických cílů má být podávání přípravku ihned zastaveno [21].

- **albumin**

Albumin je jeden z proteinů krevní plazmy, tvoří jej řetězec 585 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 69 kDa. Představuje hlavní determinantu pro udržení cirkulujícího krevního objemu. Normální plasma obsahuje albumin v koncentraci 40-45 g/l a tím je tedy zodpovědný za 75-80 % onkotického tlaku. Koloidně osmotický tlak jak plazmy, tak lidského albuminu je 25–28 mmHg.

Vedle koloidně osmotické aktivity má albumin výbornou vazebnou kapacitu pro mnoho látek špatně rozpustných ve vodě (nekonjugovaný bilirubin, hormony, léky, kovové ionty). Je zdrojem aminokyselin pro proteosyntézu, má pufrální schopnost. Dále se předpokládá jeho význam jako zametače volných radikálů a toxických substancí, což hraje určitou roli v patogenezi sepse. Pro klinické použití se získává z plasmy dárců a v různých obměnách je používán od druhé světové války.

V České republice je dostupný lidský albumin ve dvou koncentracích, 5% albumin s 50 g/l albuminu, jenž je vůči plasmě isotonický a 20% albumin s 200 g/l albuminu, který má čtyřikrát vyšší koloidně osmotický účinek než krevní plasma. 400ml krevní plasmy může být tedy teoreticky nahrazeno podáním 100 ml 20% albuminu, navíc v prvních dvou hodinách po infuzi setrvává v intravaskulárním prostoru stále více než 90 % podaného albuminu. Jiná situace ale nastává u kriticky nemocných, kdy kvůli zvýšené kapilární permeabilitě dochází k úniku značného množství albuminu z vaskulárního prostoru a navíc rychlostí, kterou nelze předvídat. Tato problematika byla rozebrána v podkapitole „Koloidní roztoky“. Ve světě je k dispozici i 25% albumin [1, 3, 9, 19, 22].

I přes své výhodné vlastnosti je roztok albuminu používán jen okrajově kvůli vysoké ceně, ve srovnání s ostatními koloidy je mnohonásobně dražší.

2.1.3. Nebalancované roztoky

Roztoky, jejichž základem je 0,9% roztok chloridu sodného, označujeme jako nebalancované infuzní roztoky. Svým složením jsou odlišné od lidské plasmy. Těmto roztokům chybí podstatné elektrolyty (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) a látka s pufrovací schopností, naopak mají nadbytek natria a chloridů. Fyziologickým parametrům odpovídají pouze tím, že jsou izotonické s plasmou. Nebalancované roztoky mohou způsobit iontovou dysbalanci nebo metabolickou acidózu. Masivní objemové substituce těmito roztoky mohou vést k hyperchlorémii a hyperchloremické metabolické acidóze, tím ke snížení pH, zvýšení deficitu bazí a poklesu plasmatických koncentrací hydrogenukarbonátu [1, 4, 5].

- nebalancované krystaloidní roztoky

Mezi nejčastěji podávaný nebalancovaný krystaloid patří tzv. fyziologický roztok. Jedná se o 0,9% roztok chloridu sodného, je používán od konce 19. století a jen v USA je ročně podáno více než 200 milionů litrů tohoto roztoku. První roztoky soli pro infuzní terapii se objevily v roce 1831 při pandemii cholery v Evropě. Během 19. století vědci objevovali různé variace solných roztoků, bylo zjištěno, že 0,6% roztok je izotonický se sérem žab, ale až ke konci 19. století Hamburger objevil, že pro isotonicitu se savčí plasmou musí být roztok více koncentrovaný. Dle svých pokusů s erytrocyty in vitro vyvodil, že právě 0,92% koncentrace solného roztoku je normální, tedy „fyziologická“ a odpovídá plasmě savců. Pojem „fyziologický roztok“ se prvně objevil ve vědeckém časopise Lancet v roce 1888. Je až mysteriózní, že na základě vědeckého poznatku in vitro před více než 120 lety, je dodnes tento roztok celosvětově používán pro intravenózní tekutinovou terapii in vivo. Navíc vžité pojmenování fyziologický roztok je zavádějící, tato tekutina rozhodně není fyziologická. Vzhledem k plasmě se jedná o roztok isotonický, jinak je ale jeho složení zásadně odlišné od plazmy kvůli vysoké koncentraci chloridů a natria a chybění jiných podstatných elektrolytů. Jeden litr obsahuje 154 mmol Na^+ a 154 mmol Cl^- , tedy 9 g soli, přitom doporučená denní dávka soli dle Světové zdravotnické organizace je pouze 5 g. Schopnost lidského těla vypořádat se s nadbytkem soli je málo efektivní a závislá na pomalém potlačení osy renin-angiotensin-aldosteron. Zdravému organismu trvá dva dny, než vyloučí přebytek soli po podání 2 litrů fyziologického roztoku, u kriticky nemocných je tato schopnost ještě více potlačena. 0,9% roztok NaCl při masivní objemové substituci vede k hyperchlorémii a hyperchloremické metabolické acidóze, tím se snižuje pH, zvyšuje deficit bazí a klesá

koncentrace bikarbonátu v plazmě. Hyperchlorémie má navíc i negativní dopad na ledviny. S ohledem na uvedené negativní vlastnosti by fyziologický roztok až na určité klinické situace neměl být používán. Takovou výjimkou může být těžká hypochloremická alkalóza v důsledku masivního zvracení, případně pacienti s kraniocerebrálním poraněním či korekce hyponatremie. Existují i 5, 85% a 10% roztoky chloridu sodného, které mají stejně přísně omezené indikace jako fyziologický roztok. Pro vyšší obsah natriových a chloridových elektrolytů je lze s výhodou využít u pacientů, u nichž je nutný, co nejmenší externí přívod tekutin [1, 4, 5, 19, 23, 24].

Ringerův roztok, označován jako R1/1, oproti fyziologickému roztoku lépe imituje složení krevní plazmy přidávkem draselných a vápenatých iontů. Avšak pro vysoké množství chloridů a absenci pufru patří též mezi nebalancované roztoky [19].

K doplnění ztráty tělesných tekutin při těžké hypokalémii je v České republice registrován přípravek Ardeaelytosol D 1/1, ve světě známý pod názvem Darrowův roztok. Tento roztok je tvořen chloridem sodným, chloridem draselným a laktátem sodným. Roztok je isotonický vůči plasmě, ale obsah kalia je 35, 8 mmol/l a množství laktátu 52, 9 mmol/l [19].

V rámci tekutinové terapie se můžeme setkat i s roztokem glukózy. K dispozici je 5% roztok glukózy, který je izotonický a roztoky hypertonické (10 / 20 / 40% roztok glukózy). Po podání tohoto typu roztoku dochází k metabolizaci glukózy a čistá voda uniká do intersticiálního a intracelulárního kompartmentu. Při masivní substituci může vést podání tohoto roztoku k celulárnímu edému a tím k poškození buněk. Roztok s glukózou rozhodně není indikován k volumoterapii, své uplatnění má při korekci hypernatremie [19, 24].

- **nebalancované koloidní roztoky**

K nebalancovaným želatinovým roztokům patří sukcinylovaná želatina 4% Gelofusin používáná i v České republice a 3, 5% ureaželatina Haemacel.

Haemacel je ve světě registrovaný též pod názvy Emagel, Polygelin a Solucel. Některými autory je sice považován za balancovaný koloid, protože nosný roztok obsahuje vedle iontů Na^+ , Cl^- , i ionty K^+ a Ca^{2+} . Přípravek ale nemá žádný pufr a množství kalcia je značně vyšší, než je fyziologická hladina vápníku v krvi, a to 6, 25 mmol/l. Infuzní roztok Haemacel může být tedy s výhodou indikován při hypokalcémii. Je třeba mít na paměti, že kvůli kalciumu nesmí být tento infuzní roztok podán do jedné intravenózní linky spolu s erytrocytárním koncentrátem, který obsahuje citrát jako antikoagulans. V přítomnosti vápníku by došlo k neutralizaci antikoagulačního efektu citrátu a tvorbě mikrotrombů [25].

Mezi nebalancované škroby patří 6% a 10% Voluven. Jak je výše uvedeno, tyto roztoky jsou kontraindikovány při sepsi, poškození ledvin a u kriticky nemocných. Jsou vyrobeny ze škrobu kukuřice voskové. 6% Voluven má v jednom litru 60 g hydroxyethylamylu, hyperonkotický 10 % Voluven obsahuje 100 g hydroxyethylamylu/l. Jejich molární substituce je 0,38 – 0,45 a molární hmotnost 130 kDa [19].

2.1.4. Balancované roztoky

Dle současných studií většina nemocných profituje z podávání balancovaných roztoků. Jde o roztoky s vyváženým, tedy balancovaným složením, proto název balancované roztoky, které navíc mají minimum nežádoucích účinků při zachování vlastností infuzního roztoku.

Ideální balancovaný roztok je izotonický, obsahuje elektrolyty stejně jako plazma a je vybaven komponentou s pufrovací schopností.

Izotonický balancovaný roztok má stejnou aktuální osmolalitu jako plazma, tedy 288 mosmol/kg. Izotonicita roztoku se významně podílí na udržení tekutiny intravaskulárně. Pokud je podáván hypotonický roztok dochází k jeho úniku do intracelulárního prostoru. V případě tekutinové terapie velkým objemem hypotonického roztoku mohou nastat závažné komplikace, např. hyponatremická encefalopatie, cerebrální edém, respirační insuficience.

Plně plazma-adaptovaný roztok má stejné elektrolytové složení jako plazma, včetně Ca^{2+} a Mg^{2+} . Ionty vápníku jsou základním kofaktorem v koagulační kaskádě a jejich přítomnost je nezbytná pro správnou funkci srážení krve. Stejně tak ionty magnesia ovlivňují krevní srážlivost, tím že potencují koagulační aktivitu srážecího faktoru IX. Roztoky s balancovaným nosným roztokem udržují tedy koagulaci lépe než nebalancované roztoky.

Nepufrovaný infuzní roztok může způsobit diluční acidózu. Balancované roztoky jsou pufrované, čímž snižují riziko této komplikace. Hlavním plazmatickým pufrovacím systémem je bikarbonát, který ale pro svou chemickou nestabilitu nelze použít v infuzních roztocích. K vytvoření pufrovací kapacity infuzního roztoku se používají prekurzory bikarbonátu (acetát, malát) nebo látky s vlastní pufrovací schopností (laktát, glukonát). Laktát je metabolizován oxidací a glukoneogenezí převážně v játrech. Použití roztoků s laktátovým pufrům je proto nevhodné u pacientů s jaterní dysfunkcí, u nichž přívod laktátu ex externo může vést ke zvýšení laktacidémie. Naproti tomu acetát je konvertován na bikarbonát i extrahepatálně, jeho nástup účinku je rychlejší než u ostatních pufrů a má vyšší alkalizační efekt. To je s výhodou u šokových stavu, kdy nízké pH dále zhoršuje klinický stav a přispívá ke koaguloopatii.

Glukonát je z 80 % eliminován v nezměněné formě do moči a má sice vlastní puřovací efekt, který je ale pomalý. Stejně tak malát vykazuje pomalý alkalizující efekt. Z tohoto důvodu se glukonát a malát využívají u dvojité puřovaných roztoků, používají se v kombinaci s acetátem.

Dle výsledků dostupných studií byl dále prokázán pokles výskytu akutního selhání ledvin při použití balancovaných roztoků a snížení výskytu infekčních komplikací díky restrikci chloridů [4-6].

Na základě vyjmenovaných charakteristik balancovaných roztoků by tyto přípravky měly být vždy tekutinou první volby.

- **balancované krystaloidní roztoky**

Z balancovaných krystaloidních roztoků jsou v České republice dostupné Hartmannův roztok, Plasmalyte, Ringerfundin, Isolyte, a Benelyte. Hartmannův roztok, také znám jako Ringer laktát je prvním z balancovaných roztoků. Vznikl ve 30. letech 20. století přidáním laktátového puřru k Ringerovu roztoku a úpravou jeho iontového složení. Plasmalyte byl v Evropě registrován v roce 1976. V současnosti je na trhu i Plasmalyte roztok s 5% glukózou, který je ale hypertonický vůči plasmě, čímž nesplňuje podmínky balancovaného roztoku. Jeho přibližná osmolarita je 572 mOsm/l. Ringerfundin byl poprvé registrován v roce 2005 a Isolyte v roce 2009. Novinkou pro perioperační tekutinovou strategii dětských pacientů je roztok Benelyte, díky přidavku 1% glukózy snižuje výskyt hypoglykémie. Ve světě je dostupný Ringer-acetát, který obsahuje Na^+ , K^+ , Cl^- , ale i Mg^{2+} a Ca^{2+} a acetátový puřr, dále Normosol, což je ekvivalent roztoku Plasmalyte a Sterofundin ISO, jenž odpovídá složení Ringerfundinu.

Složení jednotlivých roztoků je podobné, ovšem ne identické. I tyto malé rozdíly by měly být brány v potaz. Například obsah natria je velmi podobný u všech balancovaných krystaloidů, ale i těchto malých diferencí lze využít v klinické praxi. Roztoky s nižší koncentrací sodíku, než je plasmatická hladina sodíku, lze s výhodou podávat při chronické hyponatremii, kde je riziko rychlé korekce natremie. Množství chloridů se mezi jednotlivými roztoky liší významněji, až o 30 mmol/l. Např. roztok Plasmalyte obsahuje 98 mmol/l, Isolyte 110 mmol/l, ale Ringerfundin 127 mmol/l. Při běžné tekutinové terapii tak může rozdíl v chloridové náloži přesáhnout 100 mmol za 24 hodin. V případě, že je roztok obohacen i o kalcium, nesmí tento roztok nikdy kapat do stejné linky s krevními deriváty. Důvod byl vysvětlen u nebalancovaných koloidních roztoků.

Roztoky kromě rozdílného složení elektrolytů obsahují i různé pufrů, resp. prekurzory bikarbonátu s alkalizačním potenciálem. V Hartmannově roztoku je přítomen laktát, který je oxidován na bikarbonát. Ringerfundin obsahuje acetát a malát, což jsou soli produkující bikarbonát, v Plasmalytu je přítomen acetát a glukonát, v roztocích Isolyte a Benelyte pufrací složku zastupuje acetát. Podání alkalizačního roztoku je s výhodou např. i v případě hyperkalémie, i přesto, že v balancovaných roztocích je kalium přítomno. Díky alkalizačním vlastnostem roztoků kalium difunduje z plasmy do buněk. Naopak „fyziologický roztok“, ačkoli kalium neobsahuje, by svými acidifikačními vlastnostmi mohl hyperkalémii dále zhoršit [19].

- **balancované koloidní roztoky**

Z balancovaných želatinových přípravků jsou dostupné 3% Geloplasma (ve Francii je znám pod názvem Plasmion) a 4% Gelaspan. Jsou to isoonkotické a isotonické roztoky, které mají podobné složení jako plasma, i když obsah natria je vysoký, kolem 150mmol/l. Díky přítomnosti pufrů neovlivňují acidobazickou rovnováhu. Geloplasma obsahuje laktátový pufr, v Gelaspanu zastupuje pufrací aktivitu acetát. Gelaspan jakožto 4% roztok má o 25% větší objemový efekt než 3% Geloplasma. Navíc Gelaspan obsahuje i vápník, což je důležité pro správnou funkci krevního srážení a díky přítomnosti acetátu neovlivňuje acidobazickou rovnováhu. 4% Gelaspan je dokonce i součástí protokolu ERAS (Enhanced Recovery After Surgery), což je koncept komplexní anesteziologické péče (předoperační, perioperační a pooperační) pro zlepšení léčebných výsledků a zkrácení celkové délky hospitalizace u pacientů podstupující chirurgický výkon [18, 19, 24].

Z balancovaných škrobových roztoků je v současné době dostupný pouze 6% Volulyte. Stejně jako nebalancovaný Voluven obsahuje 60 g hydroxyethylamylu v jednom litru a je vyroben ze škrobu kukuřice voskové. Pufrovací aktivitu zajišťuje acetát. U dříve užívaného 6% a 10% Tetraspanu, který též odpovídal elektrolytovému složení plasmy i včetně obsahu Ca^{2+} a Mg^{+} , bylo v září 2018 držitelem rozhodnutí o registraci oznámeno ukončení jeho dodávky na český trh. Pokud nastane klinická situace s nutností užití HES, balancovaný HES by měl být preferován před nebalancovanými, i tak je ale nutné respektovat všechny kontraindikace a dodržet maximální stanovenou denní dávku, tedy 30ml/kg [19, 21].

Přípravky albuminu (5% a 20% Human albumin, 5% a 20% Alburnorm, 5% a 20% Albutein, 20% Alburex a 20% Flexbumin) jsou vyrobeny z lidské plasmy, tudíž bychom je měli zařadit mezi balancované koloidy. Ovšem nosným roztokem přípravku albuminu je chlorid sodný. Tuto skutečnost nesmíme opomíjet u 5% roztoků, které jsou indikované pro

tekutinovou terapii a na trhu jsou dostupné ve 250ml nebo 500ml baleních. Množství sodíku je u těchto 5% roztoků uváděno kolem 130 – 160mmol/l. U přípravku 5% Alburnorm je k dispozici přesnější informace o obsahu iontů, v jednom litru má 144–160 mmol/l sodíku a 7,7 g/l chloridu sodného, což už téměř odpovídá množství NaCl ve „fyziologickém roztoku“. Navíc nosný roztok neobsahuje žádný pufr. Pomocnými látkami u přípravků albuminu je natrium oktanoát a sodná sůl acetyltryptofanu.

Hyperonkotický 20% albumin je dostupný v lahvičkách o maximálním objemu 100 ml, zde je naopak přítomno nižší množství sodíku, než je hladina sodíku v plazmě. Tento hyperonkotický roztok je podáván při hypoproteinémii, resp. hypoalbuminémii a při stavech s hypoalbuminémií související (ARDS, těžké popáleniny, syndrom dechové tísně dospělých), specifickou indikací je hemolytická nemoc novorozenců.

V případě podávání roztoku albuminu nesmí být zapomínáno, že se jedná o produkt vyrobený z lidské plasmy. Přípravky albuminu jsou plně vyšetřeny na přítomnost infekčních agens, dále jsou ošetřeny alkoholovou frakcionací a po dobu 10 hodin zahřívány na 60 °C pro případnou inaktivaci infekčních působků. Ačkoli je tedy riziko přenosu infekčního agens extrémně vzácné, každé podání albuminu by mělo být z tohoto důvodu pečlivě zváženo [19, 22, 24].

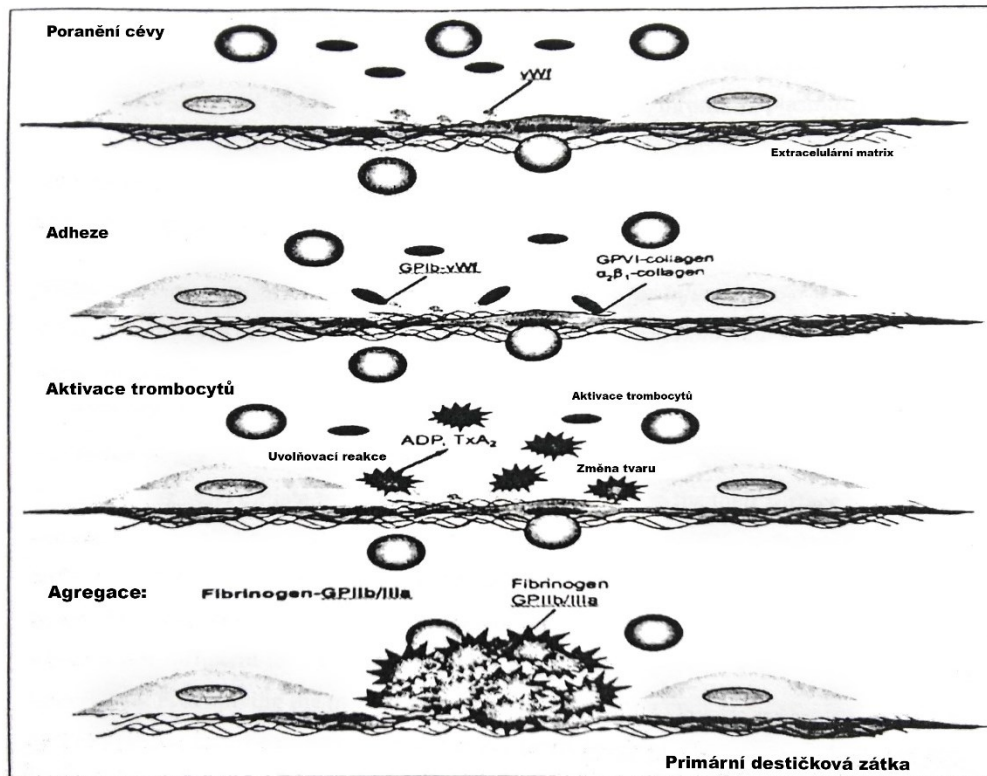
2.2. Hemostáza

Hemostáza je dynamický a komplexní mnohastupňový proces vedoucí ke vzniku trombu. Proces je zahájen bezprostřední vasokonstrikcí v místě poškození cévy, následně aktivací destičkových funkcí a koagulační kaskády. Současně je spuštěn antikoagulační a fibrinolytický systém, aby nedošlo k úplnému uzavření cévy vznikajícím trombem. Jedná se o několik stupňovitý proces [26, 27].

2.2.1. Primární hemostáza

Primární hemostáza vede k vytvoření primární hemostatické zátky, tedy destičkového trombu. Při poranění cévní stěny dochází k obnažení subendoteliálně uloženého kolagenu, ke kterému se pomocí glykoproteinových receptorů (GPIb) přichytí trombocyty. Tento proces se nazývá adheze, podílí se na něm von Willebrandův faktor a fibronektin. Adhezí se změnil tvar trombocytů a kaskádou biochemických pochodů dochází k aktivaci glykoproteinových

receptorů a trombocytů. Proces aktivace trombocytů je provázen uvolněním silných proagregačních působků (adenosindifosfát, tromboxan A₂, fibrinogen). Pomocí glykoproteinových receptorů trombocytů (GPIIb/IIIa) a fibrinogenu dochází k vzájemnému pospojování trombocytů, tedy agregaci a tím vzniká primární destičková zátka [26, 27, 28].



Obrázek 1. Vznik primární destičkové zátky

2.2.2. Sekundární hemostáza

Sekundární hemostáza, přesněji hemokoagulace, představuje vytvoření fibrinové sítě, která zachytává erytrocyty, leukocyty a trombocyty z krevního řečiště a tvoří definitivní fibrinovou zátku, tzv. trombus [26, 27].

Koagulační faktory

Celý proces je řízen řadou koagulačních faktorů. Jedná se o komplexní proces akcí a interakcí mnoha prokoagulačních a antikoagulačních faktorů. Známý pojem „koagulační kaskáda“ je název pro původní pohled na hemokoagulaci, dnes se preferuje vysvětlovat proces

pomocí buněčného modelu. Koagulační faktory jsou označovány římskými číslicemi a aktivované formy jsou doplněny písmenem „a“.

I	Fibrinogen	VIII	Antihemofilický
II	Protrombin	IX	Christmasův
III	Tkáňový tromboplastin	X	Stuart-Prowerové
IV	Vápenaté ionty	XI	PTA (plasma thrombin antecedent, antihemofilický faktor C)
V	Proakcelerin	XII	Hagemanův
VII	Prokonvertin	XIII	Fibrin stabilizující

V tabulce jsou uvedeny základní koagulační faktory. K dalším koagulačním faktorům řadíme von Willebrandův faktor (vWF), vysokomolekulární kininogen (HMWK neboli Fitzgeraldův faktor), prekalikrein (PKK neboli Fletcherův faktor), kalikrein a destičkové fosfolipidy.

Faktory II, VII, IX, X, XI, XII a prekalikrein dokáží štěpit a zároveň aktivovat další koagulační faktory, řadí se mezi tzv. serinové proteázy. FVIII, FV a HMWK se po rozštěpení účastní tvorby koagulačně aktivních komplexů (vnitřní tenáza, protrombináza) a chovají se jako kofaktory [26, 27,28, 31].

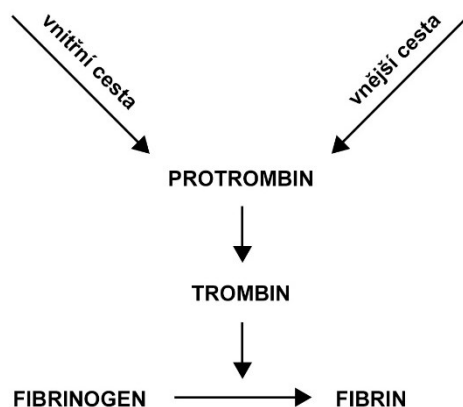
Starý a nový model koagulace

V současné době se můžeme setkat s dvěma pohledy na hemokoagulaci – tzv. starý a nový (revidovaný) model koagulace. Starý „biochemický“ model je založen na popisu kaskádovité aktivace koagulačních faktorů, která je rozdělena na tzv. vnitřní a vnější cestu a na společnou část. Tento původní model dobře funguje in vitro, ale vůbec nezohledňuje úlohu trombocytů a jiných krevních buněk, vysvětluje vlastně koagulaci plasmy. Nový „buněčný“ model vychází z původního pohledu na hemokoagulaci, ale na

rozdíl od starého modelu mnohem lépe objasňuje průběh krevního srážení in vivo, a to včetně patologie některých klinických stavů [26, 27-30].

starý model koagulace

Podle tohoto modelu můžeme krevní srážení pro zjednodušení rozdělit na tři fáze – **tvorba protrombinového aktivátoru, přeměna protrombinu na trombin a vznik fibrinu z fibrinogenu**. Limitujícím faktorem celého srážení je tedy přítomnost protrombinového aktivátoru, ten vzniká buď vnitřní nebo vnější cestou koagulační kaskády.



Obrázek 2. Základní schéma vzniku fibrinu

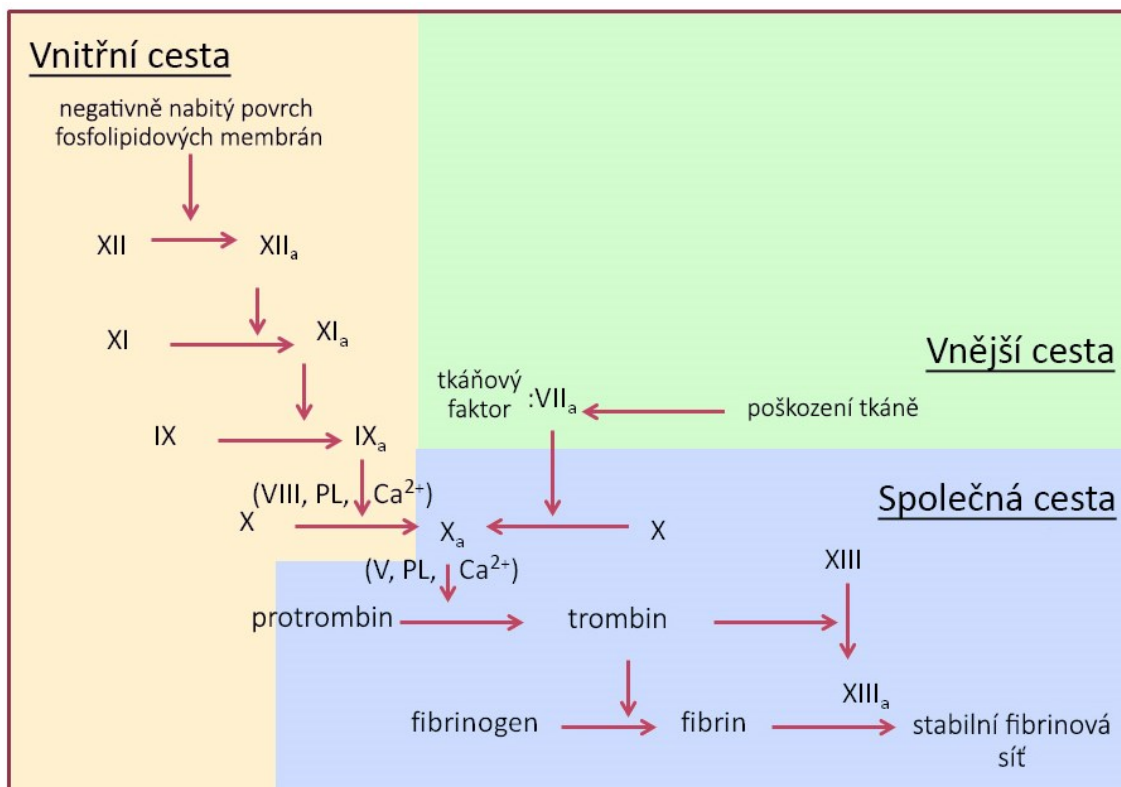
- *vnější cesta hemokoagulační kaskády*

Aktivace vnější cesty hemokoagulační kaskády je odpovědí na poškození tkání. Vnější cesta začíná kontaktem krve s faktorem III (tkáňovým tromboplastin). Za normální situace tento faktor není v kontaktu s krví, ale představuje integrální glykoprotein cytoplazmatických buněk subendotelu, nemá enzymovou aktivitu a slouží jako kofaktor. Kontakt krve s faktorem III vede k aktivaci koagulačního faktoru VII (prokonvertin), který následně v přítomnosti Ca^{2+} aktivuje faktor X (Stuart-Prowerové). Ten se váže na fosfolipidy faktoru III a s pomocí faktoru V (proakcelerin) vytváří aktivátor protrombinu.

- *vnitřní cesta hemokoagulační kaskády*

Vnitřní systém hemokoagulační kaskády se uplatňuje při abnormalitách cévní stěny nebo při omezení toku krve. Začíná kontaktní aktivací faktoru XII (Hagemanův) prostřednictvím jeho styku s negativně nabitým povrchem fosfolipidových membrán. Aktivovaný faktor XII aktivuje faktor XI (PTA neboli antihemofilický faktor C) a ten dále v přítomnosti Ca^{2+} aktivuje faktor IX (Christmasův). Aktivovaný faktor IX (IXa) za přítomnosti faktoru VIII,

destičkových fosfolipidů a Ca^{2+} aktivuje faktor X, který spolu s faktorem Va vytváří aktivátor protrombinu.



Obrázek 3. Hemokoagulace dle starého modelu, tzv. „biochemický model“ (PL – fosfolipidy trombocytů)

- **společná cesta hemokoagulační kaskády**

1. **přeměna protrombinu na trombin**

Faktor II (protrombin) je plasmatický protein produkováný v játrech. Obě cesty se spojují při aktivaci faktoru X. Aktivovaný faktor X vytváří komplex se svým kofaktorem – faktorem V. Tento komplex nazývaný protrombináza proteolyticky mění protrombin na aktivní trombin.

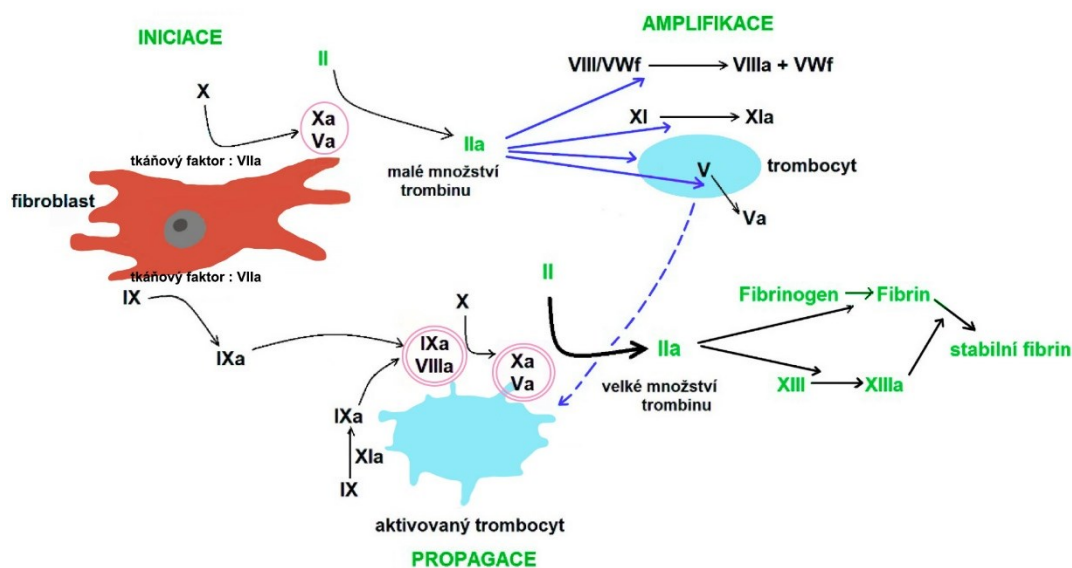
2. **přeměna fibrinogenu na fibrin**

Faktor I (fibrinogen) je také plasmatický protein syntetizovaný v játrech. Katalytickým působením trombinu dochází k odštěpení několika peptidů z fibrinogenu za vzniku monomerního fibrinu, který dále polymerizuje vznik fibrinové sítě. Stabilizaci fibrinové sítě zajišťuje faktor XIII (fibrin stabilizující faktor) spolu s Ca^{2+} kovalentním provázáním jednotlivých řetězců [26-28, 30].

nový model koagulace

Nový buněčný model hemostázy klade důraz na velmi důležitou roli trombocytů ve srážení krve. Dále byla rozpoznána aktivní úloha monocytů, leukocytů, erytrocytů a endoteliálních buněk a jejich receptorů v hemokoagulaci, stejně tak úloha cirkulujících mikroparticulí sloužících k přenosu některých působků a informací. Z těchto nových poznatků je právě odvozen název „buněčný model“, ke srážení krve jsou totiž důležité i buňky, ne pouze faktory srážení. Nový model je založen na popisu tří fází koagulace tzv. **iniciace, amplifikace a propagace**. Současně nový model připisuje klíčovou roli vnějšímu systému a trombinu.

Dle buněčného modelu proces srážení při krvácení začíná vnější cestou. Ta je důležitá k nastartování srážení krve, jde tedy o iniciační fázi srážení se vznikem malého množství trombinu. Tato fáze začíná tvorbou komplexu aktivního faktoru VII (prokonvertin) s faktorem III (tkáňový tromboplastin), který se nachází zejména na povrchu fibroblastů v subendoteliální vrstvě při poškození endotelu. Vzniklý komplex vede k aktivaci faktoru X (Stuart-Prowerové), v menší míře i k aktivaci faktoru IX (Christmasův) na IXa a k tvorbě malého množství trombinu. Vzniklý trombin vede k aktivaci trombocytů a na povrchu aktivovaných trombocytů dochází k aktivaci faktorů vnitřní cesty (faktor VIII, faktor XI, faktor V), tuto část srážení označujeme jako amplifikaci. Při propagační fázi srážení se pomocí faktorů VIII (antihemofilický) a V (proakcelerin) na povrchu trombocytů aktivuje faktor X, což má za následek vznik velkého množství trombinu. Toto množství je dostatečné pro přeměnu fibrinogenu na fibrin, zároveň se aktivuje faktor XIII (fibrin stabilizující), který fibrin stabilizuje [27-31].



Obrázek 4. Hemokoagulace dle nového modelu, tzv. „buněčný model“

Přirozená inhibice koagulace

Pro udržení fluidity krve je nezbytná rovnováha mezi prokoagulačními a antikoagulačními systémy. V případě narušení rovnováhy nastává hypokoagulační nebo hyperkoagulační stav. Základem kontroly hemostázy je nesmáčivý povrch endotelií. Normální cévní endotel má vysoce antitrombogenní potenciál. Dále existují tři systémy přirozených inhibitorů koagulace a tzv. fibrinolýza.

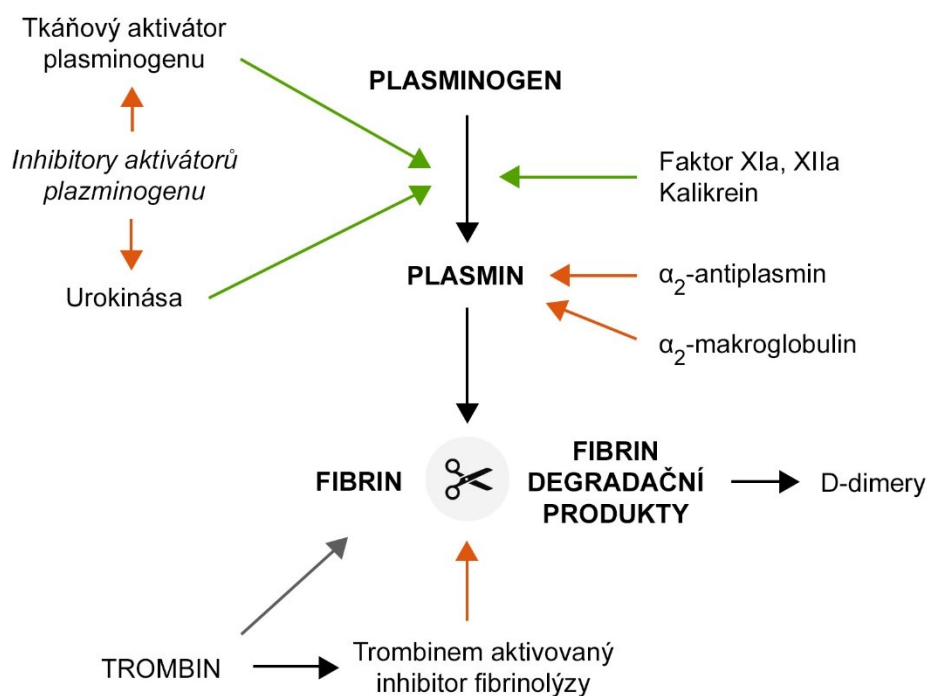
První ze složek systému přirozených inhibitorů je **inhibitor cesty zevního faktoru** (TFPI, tissue factor pathway inhibitor), který se váže na aktivní komplex faktor III-faktor VII, čímž brání nepřiměřené aktivaci zevní cesty. Druhým přirozeným inhibítorem je **antitrombin** (AT III). Účinně inhibuje nejen trombin, ale i všechny ostatní aktivované koagulační systémy. Třetí složku systému přirozených inhibitorů zajišťuje **aktivovaný protein C** (APC, activated protein C). Protein C je aktivován účinkem trombinu. Trombin má vysokou afinitu k endotelovému receptoru trombomodulinu, po vazbě na tento receptor přestává působit v koagulační kaskádě a štěpit fibrinogen, naopak aktivuje protein C. Aktivovaný protein C inaktivuje faktory Va a VIIa a zároveň podporuje uvolňování tkáňového aktivátoru plasminogenu. Účinek proteinu C zvyšuje vznik jeho komplexu s proteinem S [26-28].

Fibrinolýza

Fibrinolýza je nutná k odstranění fibrinové zátky. Základní složkou fibrinolytického systému je plasminogen. Ten je aktivován tkáňovým aktivátorem plasminogenu (t-PA) a

urokinázou (u-PA), které jsou secernovány endotelem. Plasminogen je prekurzorem plasminu. Plasmin působí proteolyticky v místě fibrinového koagula, a tím dochází k rozpustění koagula. Vznikají fibrin degradační produkty, konečným produktem štěpení jsou D-dimery.

K inhibitorům fibrinolýzy patří inhibitor aktivátorů plasminogenu (PAI), α_2 antiplasmin, α_2 makroglobulin a trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI). PAI jak z názvu napovídá inhibuje t-PA a u-PA, působí tedy proti aktivaci plasminogenu, tzn. ještě před aktivací fibrinolýzy. α_2 antiplasmin a α_2 makroglobulin inhibují vytvořený plasmin. TAFI je aktivován trombinem, zajišťuje rezistenci fibrinové zátky k fibrinolýzy [26-28, 31].



Obrázek 5. Schéma fibrinolýzy (zelené šipky označují aktivátory, oranžové šipky označují inhibitory)

2.3. Hodnocení hemostázy

Monitorování hemostázy, resp. hemokoagulace patří k důležité součásti péče o nemocné jak perioperačně, tak i u pacientů v intenzivní péči.

V denní praxi jsou k hodnocení hemokoagulace nejčastěji využívány standardní laboratorní testy (PT, aPTT) a stanovení počtu trombocytů. Dále je možné vyšetřit hladinu fibrinogenu, antitrombinu, D-dimerů, jednotlivých koagulačních faktorů, posoudit dysfunkci krevních destiček, aktivitu fibrinolytického systému a stav přirozených inhibitorů koagulace.

V rámci intenzivní medicíny se stále více rozmáhá globální vyšetření krevní srážlivosti viskoelastickými metodami. K tomu slouží přístroje pro tromboelastografii (TEG) a rotační tromboelastometrii (ROTEM), které jsou k dispozici přímo u lůžka nemocného a v reálném čase zachycující graficky celý průběh krevního srážení a fibrinolýzy. Tato vyšetření mají pro rychlou diagnostiku koagulopatie nesporné přednosti před vyšetřením v laboratoři. Zatímco při zpracování krevního vzorku v laboratoři lze očekávat výsledky za více než 40 minut, vyšetření viskoelastickými metodami přináší první výsledky do 5-10 minut [14, 15].

Limitem zmíněných metod je, že nedokáží hodnotit poruchy primární hemostázy, tedy adhezi a agregaci trombocytů vedoucí ke vzniku primárního destičkového trombu [14]. K vyšetření poruch primární hemostázy jsou dnes k dispozici přístroje PFA 100 a PFA 200 (platelet function analyser) a k hodnocení agregace trombocytů agregometr Multiplate. Oba přístroje pracují s plnou krví a je možné je použít přímo u lůžka pacienta, tedy jako POCT.

Pro všechna koagulační vyšetření, vyjma agregometrie přístrojem Multiplate, se používají zkumavky, které obsahují pufrovaný roztok citrátu sodného, v poměru jeden díl citrátu k devíti dílům krve. Při odběru je nutné dodržet přesný objem krve dle velikosti zkumavky, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků kvůli nezachování poměru krev : citrát. Pro vyšetření Multiplate se používá speciální zkumavka s hirudinem. Během transportu vzorku do krevní laboratoře je nutné dbát na to, aby nedocházelo k traumatizaci vzorku (otřesy, třepání). Velmi důležitá je i tzv. „stabilita vzorku“. Tímto pojmem rozumíme dobu, která uplyne od odběru primárního vzorku do jeho vyšetření. Dle doporučení České hematologické společnosti je stabilita vzorku pro PT test 6 hodin, pro APTT test 4 hodiny, avšak vzorek s heparinem pro APTT test se musí centrifugovat již do 1 hodiny [32]. Vyšetření ROTEM je nejvhodnější provést do 2 hodin od odběru, kdy je vzorek nejstabilnější. Stabilitu vzorků pro vyšetření pomocí PFA 100 a 200 udávají laboratoře do 4 hodin, pro vyšetření Multiplate je uveden čas kolem 2 hodin. Na našem pracovišti máme přístroj ROTEM delta, ROTEM sigma, PFA 200 i Multiplate k dispozici přímo u lůžka nemocného. Krevní vzorky zpracováváme ihned po odběru. V případě vyšetření ROTEM NATEM vyčkáme 30 minut, protože dle recentní studie jsou parametry NATEM nejstabilnější mezi 30.- 60. minutou [33].

- **standardní laboratorní testy**

Nejčastěji je koagulační stav pacienta hodnocen pomocí rutinních laboratorních testů – PT (Quick) a aPTT, ačkoli tyto testy byly původně zavedeny pro monitoraci účinnosti léčby dikumariny (PT) a heparinem (aPTT).

Protrombinový čas (PT) poskytuje informaci o zevní cestě koagulační kaskády. Při tomto testu se měří čas potřebný ke koagulaci citrátové plazmy po přidání tkáňového tromboplastinu a kalcia. Fyziologická norma tohoto testu je 12–15 s. Analýza vzorku probíhá při 37 °C. Test je prodloužen při deficitu faktorů I, II, V, VII, X a při rozvoji diseminované intravaskulární koagulopatie. Při podávání heparinu je PT prodloužen, ale tento test je k monitoraci heparinu méně citlivý než aPTT. Naopak PT test se používá k sledování léčby warfarinem. V této souvislosti většinou hodnotíme International Normalized Ratio (INR), tedy exponenciální poměr naměřeného času pacienta a času naměřeného v normální plazmě, fyziologické rozmezí je 0,8 – 1, 2.

Test APTT se provádí též při teplotě 37 °C, do dekalifikované plazmy je přidán kaolin-kefalinový komplex spolu s vápenatými ionty, čímž se aktivuje vnitřní cesta. Měří se čas do vzniku fibrinové sraženiny, který je fyziologicky 25,9 – 40 s. Kaolín působí jako povrchový aktivátor, na němž se aktivují faktory vnitřní cesty XII a XI. Fosfolipid je nutný ke konverzi faktoru X a protrombinu. APTT tedy informuje o vnitřní cestě koagulační kaskády, udává se též jako exponenciální poměr dvou časů - APTTR, tj. hodnota pro srovnání s parametrem standardní plamy v rozmezí 0,8 – 1,3. APTT je prodloužen při hemofilii A (nedostatek faktoru VIII), hemofilii B (nedostatek faktoru IX) a při hemofilii C (nedostatek faktoru XI). APTT je dále prodloužen při intravenózní léčbě heparinem a podávání warfarinu, u von Willebrandovy choroby, antifosfolipidového syndromu a při rozvoji konsumpční koagulopatie [27].

Nevýhodou obou testů je, že měří čas tvorby fibrinového vlákna z plazmy po odstranění pevných složek krve (trombocyty, erytrocyty atd.) [14].

- viskoelastické metody, ROTEM

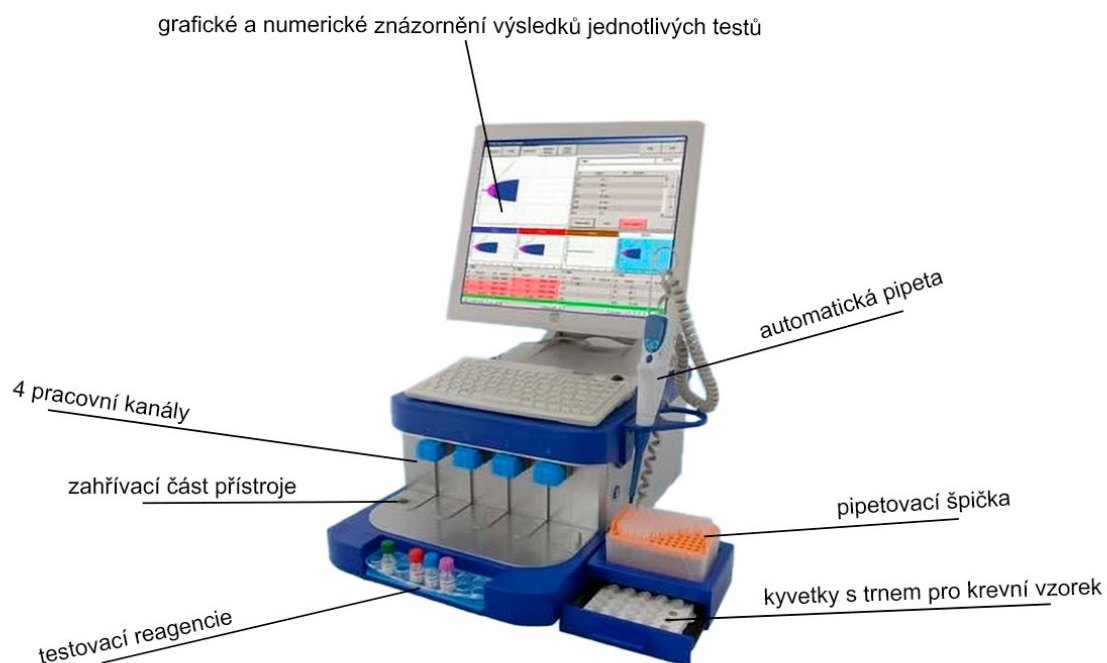
K viskoelastickým metodám patří tromboelastografie (TEG) a rotační tromboelastometrie (ROTEM). Na rozdíl od standardních laboratorních testů vyšetřují srážení plné krve. Další výhodou je možnost vyšetření plné krve přímo u lůžka pacienta, jsou označovány jako „bed-side“, neboli POC testy. Informace o stavu koagula jsou k dispozici již do 5-10 minut, což je zásadní při léčbě život ohrožujícího krvácení. V takovém případě postrádají rutinní koagulační testy (PT, aPTT) význam. Výsledky z laboratoře jsou dostupné přibližně za 40 minut. Během tohoto časového úseku se však může koagulační stav krvácejícího pacienta dramaticky změnit. Korigovat koagulopatii dle neaktuálních hodnot nemůžeme v současné době označit za správný přístup. Metoda rotační tromboelastometrie je zahrnuta i do

nejnovějších Evropských a Česko-slovenských doporučených postupů pro management traumat a perioperačního krvácení, jak pro dospělé, tak i dětské pacienty [14, 34, 35].

Viskoelastické metody hodnotí vzájemnou interakci srážecích faktorů, trombocytů, erytrocytů a fibrinogenu. Umožňují dynamické vyšetření krve, a tím získání informací o funkčním stavu koagula v průběhu jeho tvorby, tedy během iniciační a propagační fáze srážení, dále poskytují informace o maximální síle koagula a intenzita fibrinolýzy odráží stabilitu koagula. Není proto překvapující, že běžné laboratorní testy pro srážení krve nekorelují s vyšetřením TEG/ROTEM. V případě těžkého krvácení lze pomocí rychlé diagnostiky koagulopatie cíleně zasáhnout do terapie pomocí jednotlivých srážecích faktorů. Specifickou terapií se daří snížit podávání trombocytů a krevní plazmy, které může být spojeno s vyšší mortalitou a morbiditou pacientů [14, 15, 36]. V současnosti navíc přibývají práce, které popisují hyperkoagulační stav dle ROTEM i přes prodloužené hodnoty PT/aPTT. Studie prokazují, že invazivní výkony mohou být provedeny bez krvácivých komplikací i při hodnotách PT-INR > 1,5, pokud je výsledek ROTEM v normě [36-38].

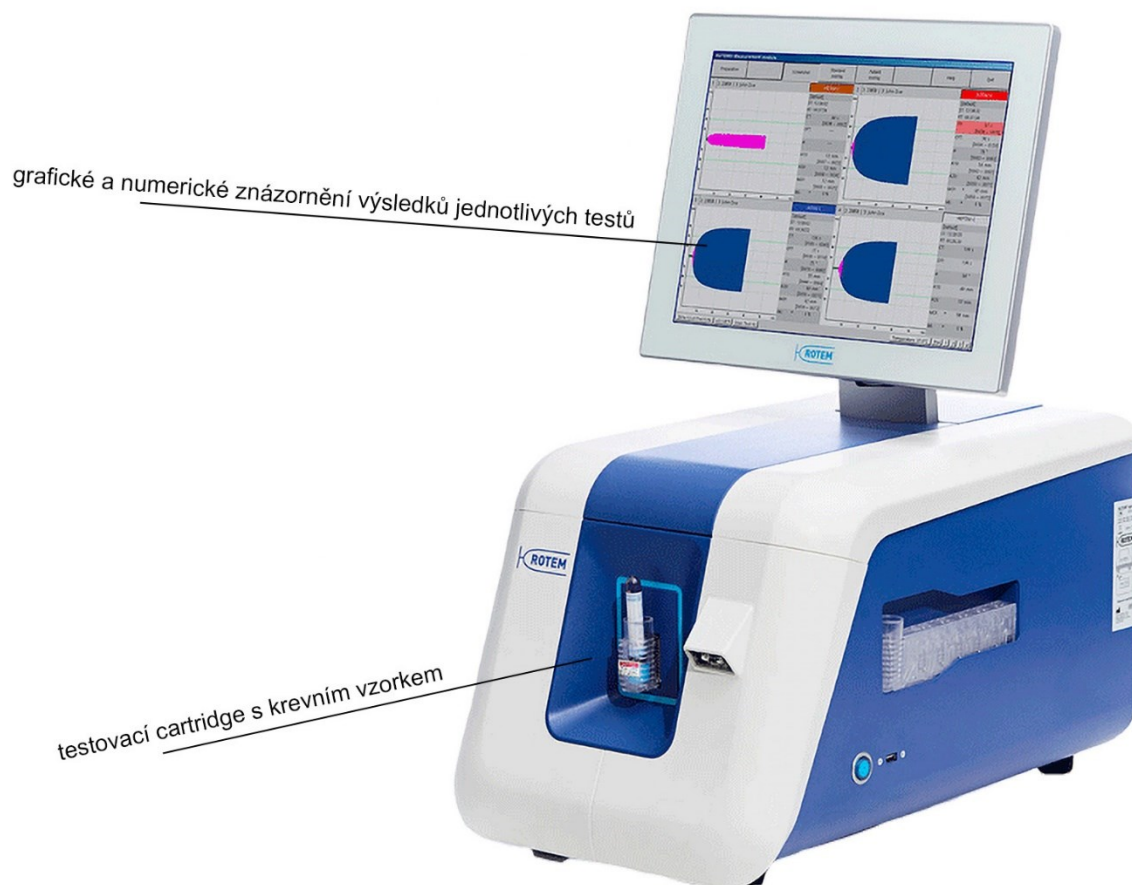
ROTEM je dnes již poměrně široce rozšířenou bed-side metodou. Na trhu je k dispozici přístroj ROTEM delta a ROTEM sigma. Přístroj ROTEM delta má oproti TEG výhodu automatické pipety, čímž se práce s touto technologií usnadnila. Pro vyšetření se používá nesrážlivá krev antikoagulovaná citrátem, k aktivaci vzorku se přidává kalcium a poté dle typu testu aktivační reagentie. Základem přístroje ROTEM delta je statická kyveta, do které se přidává 300 μ l krve. Do vzorku krve je ponořen trn, který vykonává oscilační rotační pohyb. V okamžiku, kdy se začnou vytvářet první fibrinová vlákna, dochází ke zpomalení pohybu trnu zvýšeným odporem proti fibrinovým vláknům. Tyto změny pohybu jsou transformovány do elektrického signálu přes optický systém. Na trnu je zrcátko, které tyto amplitudy zaznamenává a odráží optický paprsek pod změněným úhlem. Výsledkem je grafický záznam změn elasticity v reálném čase v podobě tromboelastometrické křivky.

Přístroj ROTEM má čtyři kanály a umožňuje provést vyšetření celého procesu sekundární hemostázy přidáním specifických reagentií. Všechny pracovní kanály lze využít současně. Dle přidání aktivační reagentie rozlišujeme tyto testy: EXTEM, FIBTEM, INTEM, HEPTTEM, APTEM a NATEM.



Obrázek 6. Přístroj ROTEM delta

Nejmodernějším a nejkomfortnějším systémem pro vyšetření krvácení na principu tromboelastografie je přístroj ROTEM sigma. Jedná se o plně automatický „point-of-care“ analyzátor. Vyšetřovaná krev je přístrojem automaticky natažena do testovací cartridge přímo ze zkumavky, tím odpadá nutnost pipetování. Přístroj má 4 kanály a jedním spuštěním je možné provést až 4 testy současně.



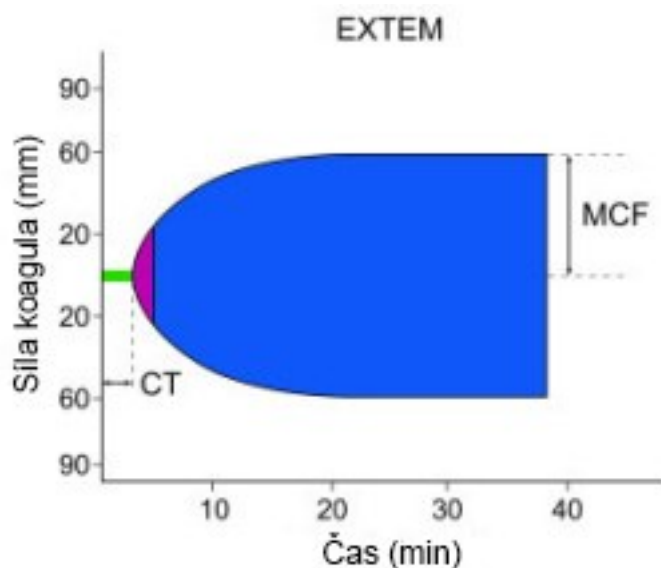
Obrázek 7. Přístroj ROTEM sigma

Při jednotlivých testech se popisují následující parametry: CT („clotting time“, iniciační fáze vzniku koagula), úhel α a CFT („clot formation time“, propagační fáze tvorby koagula), amplituda A5 a A10 (síla koagula 5 a 10 minut od CT), parametr MCF („maximum clot firmness“, maximální síla koagula). Amplituda A5 a A10 koreluje s MCF. V naléhavých stavech je možné se řídit tímto parametrem ještě před dosažením MCF a tím terapeuticky zasáhnout co nejvčasněji. K dalším běžně hodnoceným parametrům patří parametry fibrinolýzy LI 30, LI 60, ML (lysis index 30 a 60 minut od CT, maximální lýza). Tyto parametry představují procento lýzy koagula z hodnoty MCF a vypovídají o stabilitě koagula [14, 15].

U vyšetření TEG se hodnotí parametr R (reakční čas) popisující iniciační fázi, parametr K (kinetika srážení) a úhel α pro propagační fázi, MA (maximal amplitude) maximální síla koagula, dále parametry fibrinolýzy v čase 30 a 60 minut od dosažení maximální síly koagula (LY 30, LY 60). TEG má možnost nastavení různé teploty na jednotlivých kanálech, což je

s výhodou používáno u hypotermického pacienta k vyloučení hypotermické koagulopatie [14, 39].

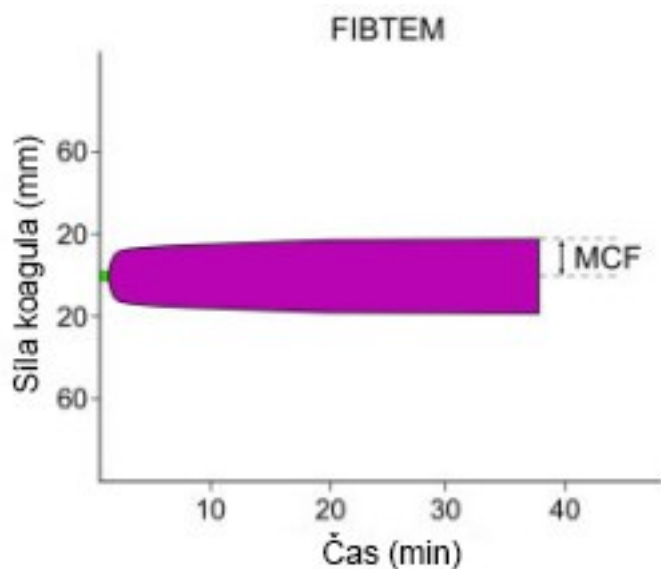
Základním vyšetřením při použití přístroje ROTEM je EXTEM test, který podává informaci o vnější cestě sekundární hemostázy. Ta má pro krevní srážlivost organismu zásadní roli. Parametr CT bývá prodloužen v případě deficitu faktorů vnější cesty. Počet trombocytů a hladina fibrinogenu ovlivňují parametry CFT, úhel α a MCF. Při hypokoagulačním stavu, kdy je prodloužené CFT, nízká hodnota úhlu α a nízká hodnota MCF, je nutné odlišit, zda chybí trombocyty nebo fibrinogen. Může se jednat i o kvalitativní deficit, tedy přítomnost nefunkčních trombocytů či fibrinogenu. V takovém případě by laboratorní hodnoty krevního obrazu byly v normálním referenčním rozmezí. K rozlišení deficitu používáme FIBTEM test, který obsahuje cytochalasin D, což je ireversibilní blokátor trombocytů. V rámci FIBTEM testu hodnotíme parametr MCF. Je-li jeho hodnota nízká, je na místě podání fibrinogenu, v opačném případě je nutné substituovat trombocyty. Dalším doplněním EXTEM testu je APTEM test. Ten slouží k potvrzení skutečné fibrinolýzy při vysokém procentu LI 30 a LI 60. Obraz fibrinolýzy při EXTEM testu může totiž vzniknout i retrakcí koagula při hyperkoagulačních stavech, kdy dochází k odtržení fibrinových vláken od stěny kyvety, což se zobrazí jako fibrinolýza. Z tohoto důvodu je důležité odlišit skutečnou fibrinolýzu a retrakci koagula provedením APTEM testu, ve kterém se přidává aprotinin jakožto antifibrinolytikum. Pokud je křivka APTEM testu normální, jedná se o skutečnou fibrinolýzu a indikujeme podání antifibrinolytik.



EXTEM

CT	38 – 79 s
CFT	34 – 159 s
úhel α	63 – 83 °
A10	43 – 65 mm
MCF	50 – 72 mm
LI30	94 – 100 %
ML	<15 %

Obrázek 8. Základní schéma křivky EXTEM (zeleně: iniciační fáze – parametr CT, růžově: propagační fáze – úhel α a parametr CFT, modře: síla koagula – A10, MCF; lýza není zobrazena), referenční hodnoty jsou uvedeny v tabulce



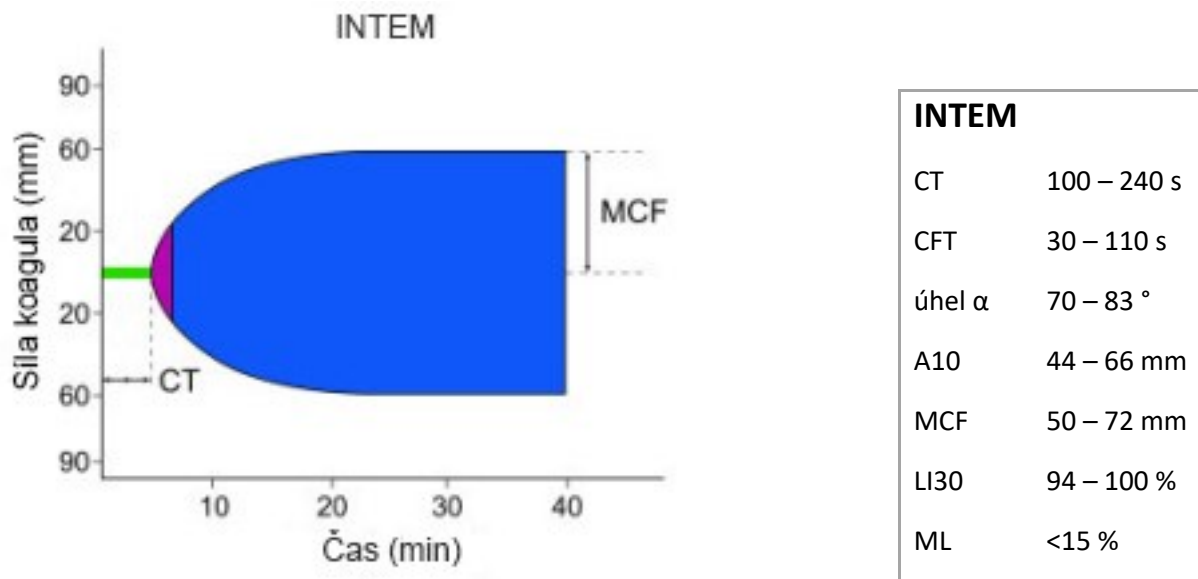
FIBTEM

A10	7 – 23 mm
MCF	9 – 25 mm

Obrázek 9. Základní schéma křivky FIBTEM, referenční hodnoty jsou uvedeny v tabulce

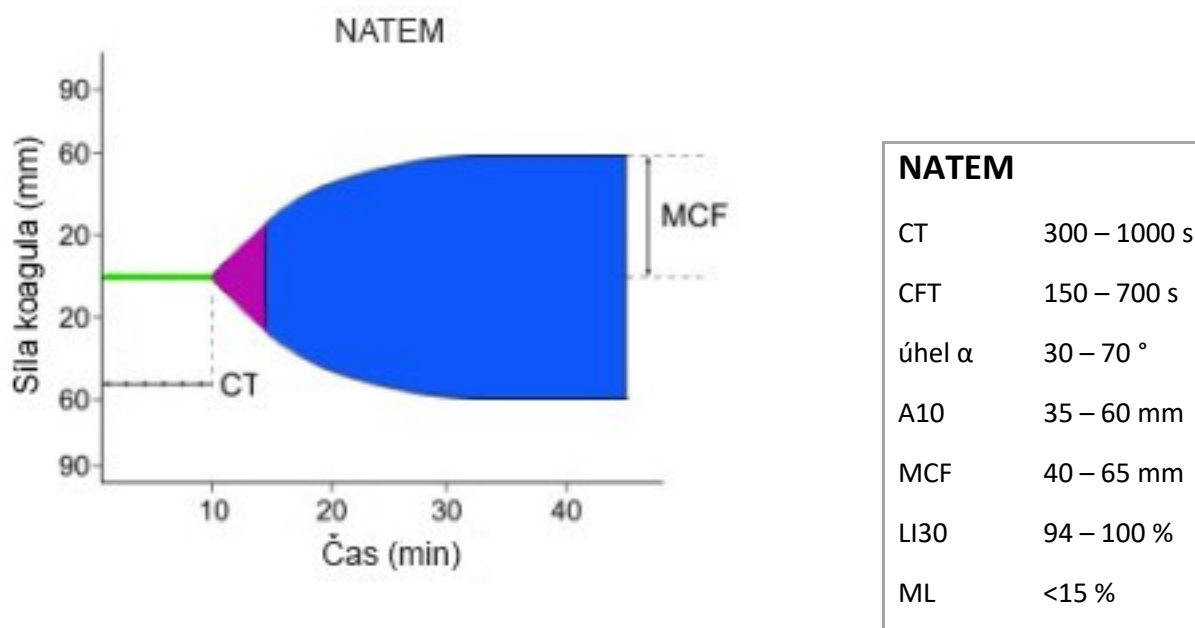
K vyšetření vnitřní cesty hemokoagulace se používá INTEM test, který je aktivován kyselinou ellagovou. Při testu INTEM je nejpřínosnější hodnocení parametru CT. Ten může být prodloužen např. při hemofilii, kdy chybí faktory vnitřní cesty nebo v důsledku působení heparinu. Ovlivnění výsledku heparinem je možno ověřit HEPTEM testem, který obsahuje

heparinázu k neutralizaci heparinu. Rovněž je možné INTEM test využívat pro monitoraci účinku heparinu [14, 15, 39, 40].



Obrázek 10. Základní schéma křivky INTEM (zeleně: iniciační fáze – parametr CT, růžově: propagační fáze – úhel α a parametr CFT, modře: síla koagula – A10, MCF; lýza není zobrazena), referenční hodnoty jsou uvedeny v tabulce

NATEM test se provádí bez aktivační reagentie, ke vzorku nesrážlivé krve se přidává pouze kalcium. Tento test dokáže detekovat i vliv nízkomolekulárního heparinu či jiné jemné koagulopatie např. fibrinolýzu. V důsledku chybění aktivátoru, je však čas do iniciace srážení kolem 10–15 minut. To představuje velkou časovou prodlevu při péči o krvácejícího pacienta. NATEM test není tedy v akutní péči běžně používán. Na druhou stranu existují práce, kdy pacient i přes normální hodnoty při vyšetření ROTEM EXTEM/INTEM krvácel a vyšetření ROTEM NATEM odhalilo fibrinolýzu nebo koagulopatii při přítomnosti endogenních heparinoidů [41, 42]. Ve sporných případech je určitě s výhodou NATEM test provést.



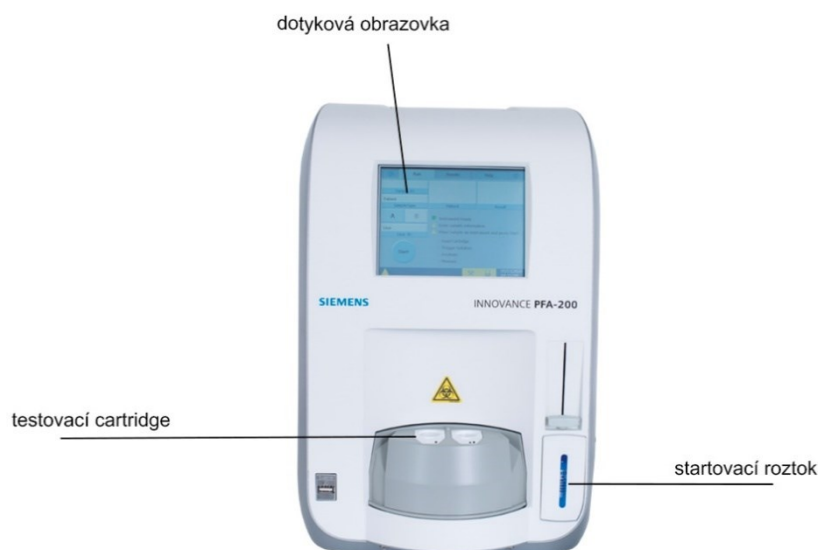
Obrázek 11. Základní schéma křivky NATEM (zeleně: iniciační fáze – parametr CT, růžově: propagační fáze – úhel α a parametr CFT, modře: síla koagula – A10, MCF; lýza není zobrazena), referenční hodnoty jsou uvedeny v tabulce

- hodnocení primární hemostázy

K základnímu hodnocení primární hemostázy patří vyšetření kapilární krvácivosti a vyšetření trombocytů včetně stanovení jejich počtu. K určování fragility kapilár se používá tzv. Rumpel – Leede test. Na paži se nasadí manžeta tonometru, která se nechá tlakem kolem 100 mmHg působit 5 minut, za 15 minut se odečte počet vzniklých petechií na předloktí. Standardem je maximálně 10 nově vytvořených petechií. Vyšetření trombocytů lze hodnotit stanovením času krvácení. Existují nejrůznější provedení, např. test dle Dukeho měří čas potřebný pro zastavení krvácení z vpichu do ušního lalůčku, standardně by k vzniku primárního trombu mělo dojít do 4 minut. Test dle Ivyho hodnotí dobu krvácivosti po nářezu předloktí, kde by ke spontánní zástavě krvácení mělo dojít do 9 minut. Všechny tyto testy jsou málo citlivé, obtížně standardizovatelné a postupně mizí z klinické praxe [27].

Dnes jsou k dispozici k hodnocení primární hemostázy přístroje PFA 100, PFA 200 a agregometr Multiplate. Přístroj PFA se používá pro sledování správné funkce primární hemostázy, která je zejména ovlivněna funkcí trombocytů, simuluje adhezi a agregaci. Metoda pomocí přístroje PFA 100 nebo novějšího typu PFA 200 je založena na principu měření doby, za kterou se otvor v membráně testovací cartridge uzavře vznikající primární destičkovou zátkou. Tento časový interval přístroj zaznamená jako tzv. „čas uzavření“ („CT“,

closure time). Membrána testovací cartridge obsahuje kolagen v kombinaci s adenosindifosfátem (test COL/ADP) nebo epinefrinem (test COL/EPI). Všechny tyto látky jsou aktivátory trombocytů v organismu. Referenční rozmezí pro „čas uzavření“ pro COL/ADP je 71–118 s u přístroje PFA 100, pro PFA 200 je toto rozmezí 62–100 s. Prodloužení „času uzavření“ u COL/ADP může být způsobeno vrozenými trombocytopeniemi (např. von Willebrandova nemoc, Bernardův-Soulierův syndrom, Glanzmannova trombastenie aj.), jaterním onemocněním, urémií, dále při použití mimotělního oběhu a při léčbě inhibitory GpIIb/IIIa (abciximab). U cartridge COL/EPI je norma pro „čas uzavření“ 85–165 s u PFA 100, 82–150 s u PFA 200. Oproti COL/ADP je „čas uzavření“ navíc prodloužen při užívání preparátů s kyselinou acetylsalicylovou a při podávání nesteroidních antirevmatik. Pokud je počet trombocytů pod $150 \cdot 10^9/l$, nebo je-li hodnota hematokritu pod 0,35, mohou být výsledky prodloužené. Nicméně, i v případě nízkého počtu trombocytů, ale při fyziologických hodnotách „času uzavření“ lze konstatovat, že primární hemostáza je funkční [43].



Obrázek 12. Přístroj PFA 200

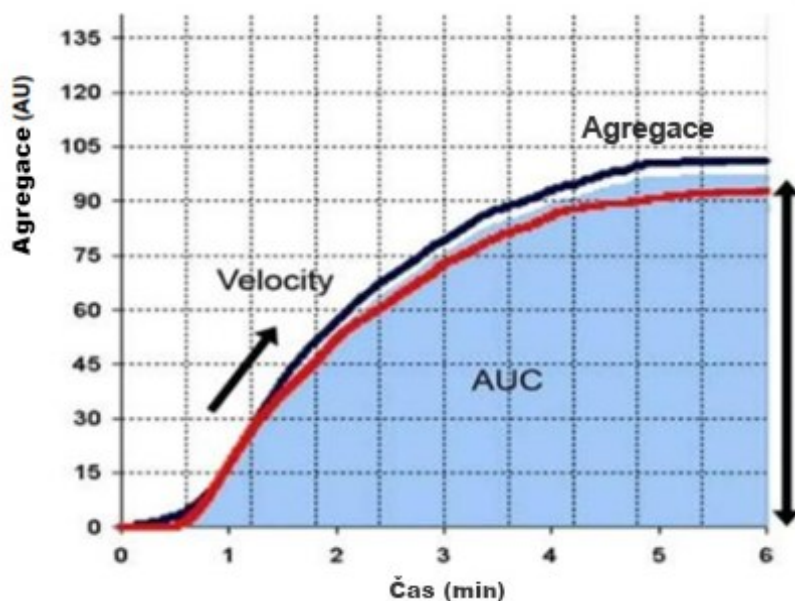
Přístroj Multiplate funguje na principu impedanční agregometrie. Díky němu jsme schopni odhalit nejen funkční defekty destiček, ale pomocí specifických testů monitorovat i

antiagregační léčbu.



Obrázek 13. *Přístroj Multiplate*

K vyšetření se používají speciální kyvety. V každé kyvetě je dvojice měděných elektrod potažených stříbrem. Účinkem induktoru dochází u trombocytů ke změně tvaru, následné adhezi na elektrody a vzájemné agregaci. V okamžiku, kdy trombocyty obalí elektrody, dochází mezi nimi ke zvýšení elektrického odporu. Tato změna impedance v čase je kontinuálně zaznamenávána a graficky vyhodnocena jako agregační křivka.



Obrázek 12. *Agregační křivka*

Na křivce hodnotíme maximální amplitudu (agregace, AU), rychlost nárůstu agregační křivky (AU/min) a plochu pod křivkou, tedy AUC („area under curve“, AU*min).

Pro základní vyšetření trombocytů jsou k dispozici následující induktory: adenosindifosfát (ADP), kyselina arachidonová (ASPI), kolagen (COL), ristocetin (RISTO), peptid aktivující trombinový receptor (TRAP - 6) a prostaglandin PGE – 1. Agregometrem Multiplate jsme schopni detekovat von Willebrandovu nemoc, Bernardův-Soulierův syndrom, Glanzmannovu trombastenii. Zároveň nám může pomoci v hodnocení antiagregační léčby, k čemuž se využívají tyto induktory: ASPI pro sledování účinku kyseliny acetylsalicylové, ADP při léčbě clopidogrelem, ticlodipinem a TRAP pro hodnocení účinku abciximabu.

PFA i Multiplate hodnotí jak adhezi, tak agregaci, ale přístroj PFA je více citlivý k adhezi, agregometr Multiplate lépe detekuje poruchy agregace. Použití obou metod zároveň nám může pomoci v diferenciální diagnostice poruch primární hemostázy. V předešlé kapitole byla zmíněna nezastupitelnost von Willebrandova faktoru během adheze. V případě, že přístrojem PFA získáme patologické hodnoty, ale testy ADP, ASPI, TRAP provedené agregometrem Multiplate jsou v normě a test RISTO patologický, s velkou pravděpodobností se jedná o von Willebrandovu chorobu. V této situaci je indikováno podání desmopresinu, který zvyšuje uvolňování vWF z endotelu nebo podání přípravku Haemate P, což je koncentrát faktoru VIII a vWF. V případě patologických křivek testů TRAP, ADP a ASPI u krvácivého pacienta bychom měli terapeuticky zasáhnout podáním trombocytů [44].

Dnes už existuje i několik publikovaných prací, které se zabývaly hodnocením ovlivnění krevní srážlivosti po podání infuzních roztoků za využití právě metod PFA a Multiplate. Některé z těchto studií budou zmíněny dále v textu.

3. Stanovení hypotézy, cíl práce

Existují práce, které popisují koagulopatický efekt po podání infuzních roztoků. Avšak většina těchto studií hodnotila vliv na koagulaci pomocí standardních laboratorních testů (PT, aPTT). Dále autoři často pracovali s nebalancovanými krystaloidními roztoky nebo porovnávali navzájem nebalancované infuzní roztoky (zejména 0,9% NaCl) s balancovanými. V mé práci jsem se věnovala studiu vlivu novodobých-balancovaných krystaloidních a koloidních roztoků na hemokoagulaci, jak in vitro, tak in vivo s využitím metody ROTEM.

Cíl práce: Zhodnotit vliv balancovaných krystaloidních a koloidních roztoků pomocí rotační tromboelastometrie a najít nejvhodnější roztok pro perioperační použití s nejmenším vlivem na krevní srážlivost.

Hypotéza: Balancované krystaloidy a koloidy do různé míry negativně ovlivňují krevní srážlivost plné krve hodnocenou pomocí metody ROTEM.

4. Soubor a metoda

Během mého postgraduálního studia jsme na naší klinice provedli dvě studie týkající se vlivu krystaloidů a koloidů na krevní srážlivosti. První studie byla provedena in vitro, druhá in vivo. V obou studiích jsme ovlivnění koagulace hodnotili metodou ROTEM.

Výše jsem zmínila v rámci metody rotační tromboelastometrie NATEM test. Tento test sice není běžně používán při péči o krvácejícího pacienta, ale může pomoci odhalit sporné případy koagulopatie. Pro zlepšení standardizace tohoto testu jsem v rámci svého postgraduálního studia zkoumala i vliv času na stabilitu krevního vzorku s využitím metody ROTEM.

Všechny studie byly schváleny Etickou komisí pro multicentrické klinické hodnocení ve Fakultní nemocnici Motol. Každý účastník studie podepsal informovaný souhlas.

Provedené studie:

1. Vliv krystaloidů a koloidů na krevní srážlivost in vitro s využitím metody ROTEM

Při této studii jsme od 20 zdravých dobrovolníků odebrali krev do zkumavky pro koagulační vyšetření s pufrovaným roztokem citrátu sodného o koncentraci 3,2 %. Jednalo se o pacienty podstupující artroskopii kolenního kloubu ve věku 34 ± 6 let, s indexem tělesné hmotnosti $26 \pm 2,4$. Muži i ženy byli zastoupeni ve stejném poměru. Ze studie byli vyloučeni kuřáci, pacienti s anamnézou krvácivých projevů, s poruchou krevní srážlivosti, dále pacienti užívající antikoagulační a antiagregační léky, ženy s hormonální antikoncepcí.

Testovali jsme balancovaný krystaloid (Plasmalyte), z balancovaných koloidních roztoků hydroxyethyl škrob (6% Tetraspan) a želatinu (4% Gelaspan).

Rotační tromboelastometrii jsme provedli test EXTEM pro zhodnocení vnější cesty koagulační kaskády, měřili jsme parametry CT (clotting time, iniciační fáze srážení), úhel α a CFT (clot formation time, propagační fáze srážení) a parametr MCF (maximum clot firmness, maximální síla koagula). Pro posouzení funkční hladiny fibrinogenu jsme udělali FIBTEM test reprezentován parametrem MCF. K hodnocení ovlivnění krevní srážlivosti jsme zvolili uvedené testy, protože právě tyto dva testy jsou nejběžněji používané v klinické praxi během managementu krvácení či pro rychlé zhodnocení koagulačního stavu nemocného.

Před úvodem do celkové anestezie jsme odebrali 8 ml žilní krve. Krev byla odebírána do čtyř zkumavek po 2 ml pro koagulační vyšetření. Standardní množství krve pro vyšetření ROTEM pro jeden test je 300 μ l. Při snaze dosáhnout 20% diluce jsme přidali 60 μ l krystaloidu nebo škrobu nebo želatiny přímo do kyvety přístroje. 20% diluci jsme zvolili z toho důvodu, že nejlépe odráží in vivo podmínky, neboť perioperačně je většinou podáváno 1000 ml infuzního roztoku. V případě, že dospělý pacient má přibližně 5 l krve, podání 1000 ml roztoku navodí právě 20% diluci krve. Pracovali jsme současně s dvěma přístroji ROTEM, z nichž každý má čtyři pracovní kanály. Na prvních dvou kanálech přístroje jsme hodnotili kontrolní vzorky, tedy bez přidání infuzního roztoku a provedli test EXTEM a FIBTEM. Dalších šest kanálů bylo využito pro analýzu vlivu jednotlivých roztoků na krevní srážlivost, pro každý roztok byl též udělán test EXTEM a FIBTEM.

Statistické zhodnocení: Zjištěná data byla statisticky analyzována párovým t-testem v programu GraphPad Prism 6.0, výsledek byl statisticky významný, pokud $p < 0.05$.

2. Vliv krystaloidů a koloidů na krevní srážlivost in vivo s využitím metody ROTEM

Krevní vzorky jsme získali od zdravých dobrovolníků podstupující artroskopii kolenního kloubu (věk 44 ± 7 let, index tělesné hmotnosti $25 \pm 2,5$). Krev byla odebírána do koagulačních zkumavek s 3,2% citrátem sodným. Do studie bylo zahrnuto 15 mužů a 15 žen. Ze studie byli vyřazeni kuřáci, pacienti s anamnézou krvácivých projevů, s poruchou krevní srážlivosti, též pacienti na antiagregační a antikoagulační terapii, ženy užívající hormonální antikoncepci.

Hodnotili jsme balancovaný krystaloidní roztok (Plasmalyte), z koloidů balancovaný hydroxyethyl škrob (6% Volulyte) a balancovanou želatinu (4% Gelaspan).

Ovlivnění koagulace jsme hodnotili metodou ROTEM, provedli jsme EXTEM a FIBTEM test. U testu EXTEM, který hodnotí vnější cestu koagulační kaskády jsme měřili parametry CT (clotting time, iniciační fáze srážení), úhel α a CFT (clot formation time, propagační fáze srážení) a parametr MCF (maximum clot firmness, maximální síla koagula). Parametr MCF u FIBTEM testu nám pomohl k posouzení funkční hladiny fibrinogenu. Jedná se o testy nejběžněji používané v klinické praxi, proto jsme si je zvolili v naší studii k hodnocení ovlivnění krevní srážlivosti po podání infuzních roztoků.

Před úvodem do celkové anestezie jsme odebrali jednu zkumavku pro koagulační vyšetření o objemu 2 ml. U tohoto kontrolního vzorku jsme provedli EXTEM a FIBTEM test a zhodnotili jejich parametry. Po úvodu do celkové anestezie bylo dle randomizace pacientům podáno 500 ml krystaloidu nebo hydroxyethyl škrobu nebo želatiny během 10 minut. Tímto objemem vznikne 10% diluce. Jedná se sice o menší diluci než ve studii prováděné in vitro, ale navozením nižší diluce jsme chtěli zabránit případné diluční koagulopatii a tím lépe posoudit přímý vliv infuzních roztoků na krevní srážlivost.

Statistické zhodnocení: Data byla statisticky analyzována párovým t-testem v programu GraphPad Prism 6.0. Výsledek byl statisticky významný, pokud $p < 0.05$. Randomizace pacientů do jednotlivých skupin se stanovila pomocí generátoru náhodných čísel v tabulkovém procesoru.

3. Vliv času na stabilitu krevního vzorku s využitím metody ROTEM

Od 20 zdravých dobrovolníků byly odebrány čtyři citrátové koagulační zkumavky (3,2% citrát sodný). Před vyšetřením byl vzorek skladován při pokojové teplotě, pět minut před vlastní analýzou byl zahřát na nastavenou teplotu přístroje v zahřívací části přístroje, vyjma tedy času 0, kdy byl vzorek ihned analyzován. Před samotným napipetováním krve do

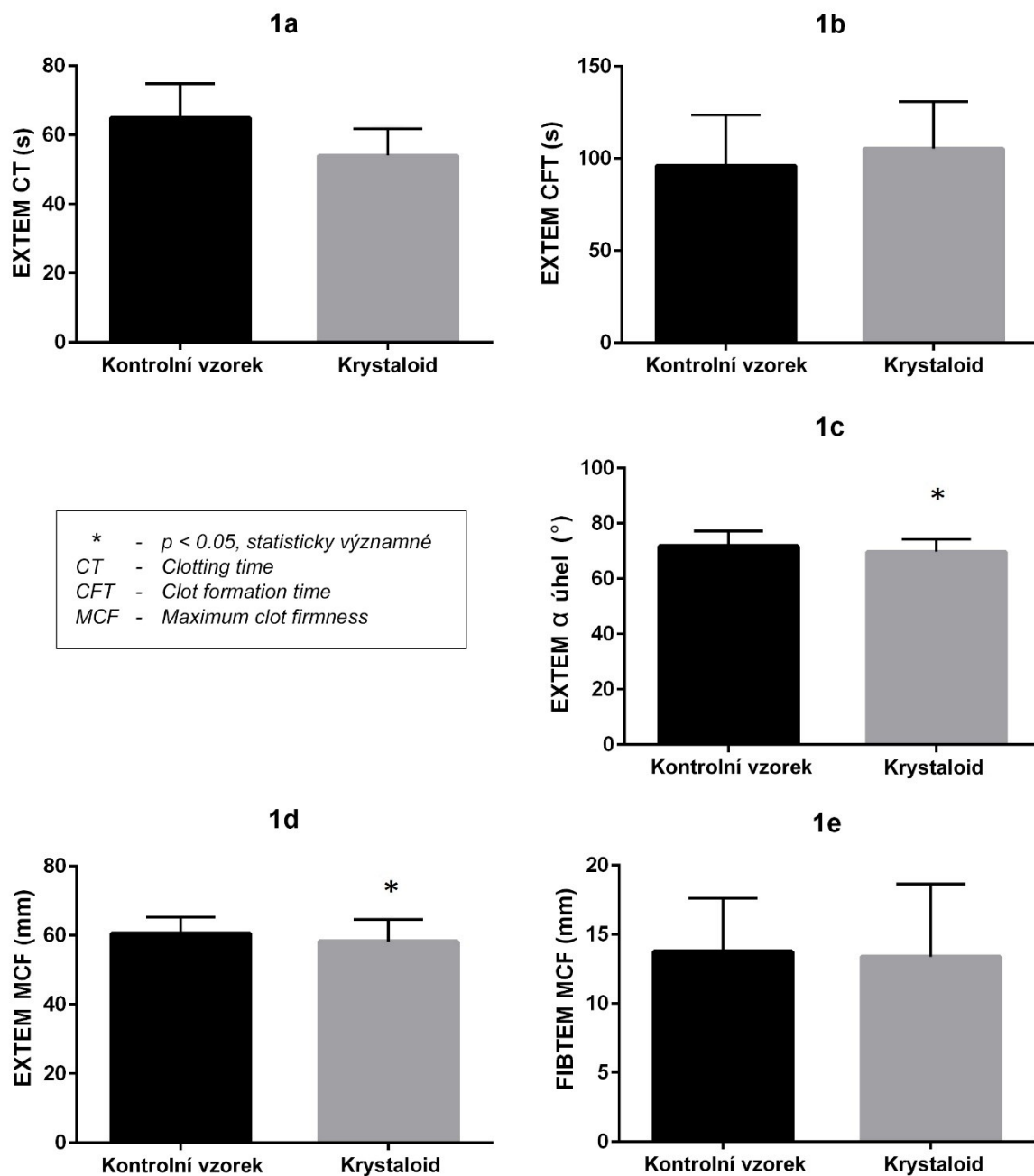
kyvetky přístroje byl vzorek důkladně, ale opatrně promíchán. Z každé zkumavky se krev napipetovávala maximálně dvakrát, a to z důvodu minimalizace rizika poškození krevních elementů opakovaným pipetováním. To byl důvod, proč byly odebrány čtyři zkumavky. Prováděli jsme vyšetření ROTEM NATEM v čase 0, 5, 10, 15, 20, 30 a 60 minut od odběru krevního vzorku. NATEM test se provádí pouze přidáním tzv. startovací reagentie (Startem), kterou představuje 20 μ l 0,2 mmol/l CaCl_2 , k rekalcifikaci citrátového vzorku.

Statistické zhodnocení: Data byla statisticky analyzována párovým t-testem, pro mnohočetné porovnávání byl použit Tukeyho test. Výsledek byl statisticky významný, pokud $p < 0.05$. Ke statistickému zhodnocení jsme využili program GraphPad Prism 6.0.

5. Výsledky

5.1. Výsledky studie „Vliv krystaloidů a koloidů na krevní srážlivost in vitro s využitím metody ROTEM“

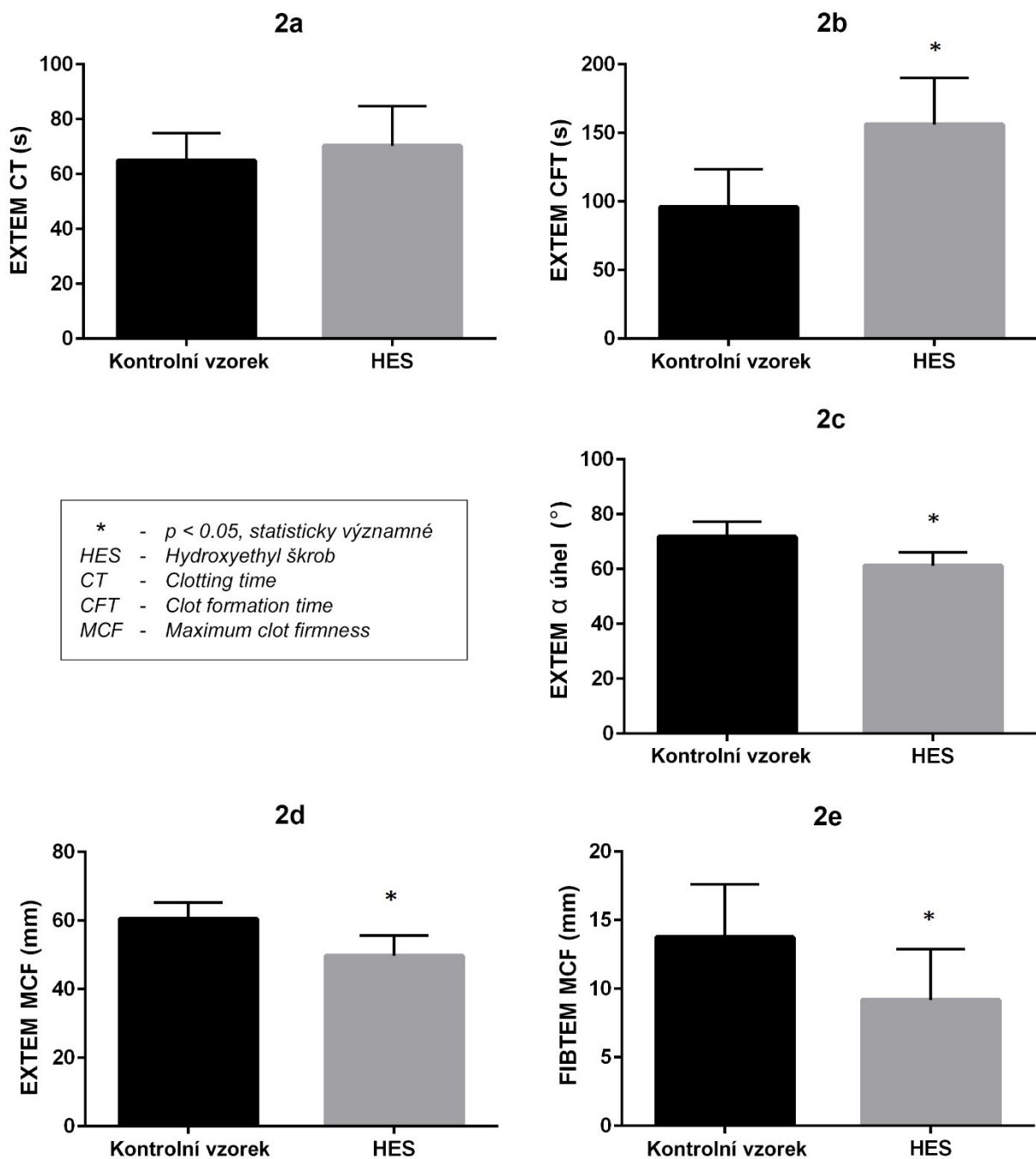
Žádný z vyšetřovaných roztoků statisticky významně neovlivnil parametr EXTEM CT ($p > 0.05$) (Graf 1a, 2a, 3a). Parametr EXTEM CFT byl statisticky významně prodloužen podáním hydroxyethyl škrobu a želatiny ($p < 0.05$), zatímco krystaloid tento parametr statisticky významně nezměnil ($p > 0.05$) (Graf 1b, 2b, 3b). Parametr EXTEM α úhel byl ve studii statisticky významně ovlivněn po přidání všech roztoků ($p < 0.05$) (Graf 1c, 2c, 3c). Parametr EXTEM MCF byl statisticky významně snížen po přidání všech typů infuzních roztoků ($p < 0.05$) (Graf 1d, 2d, 3d). Parametr FIBTEM MCF byl statisticky významně snížen pouze přidáním hydroxyethyl škrobu ($p < 0.05$), krystaloidní roztok a želatina tento parametr statisticky významně neovlivnily ($p > 0.05$) (Graf 1e, 2e, 3e).



Graf 1a – 1e

Vliv krystaloidu na koagulaci in vitro hodnocenou metodou ROTEM

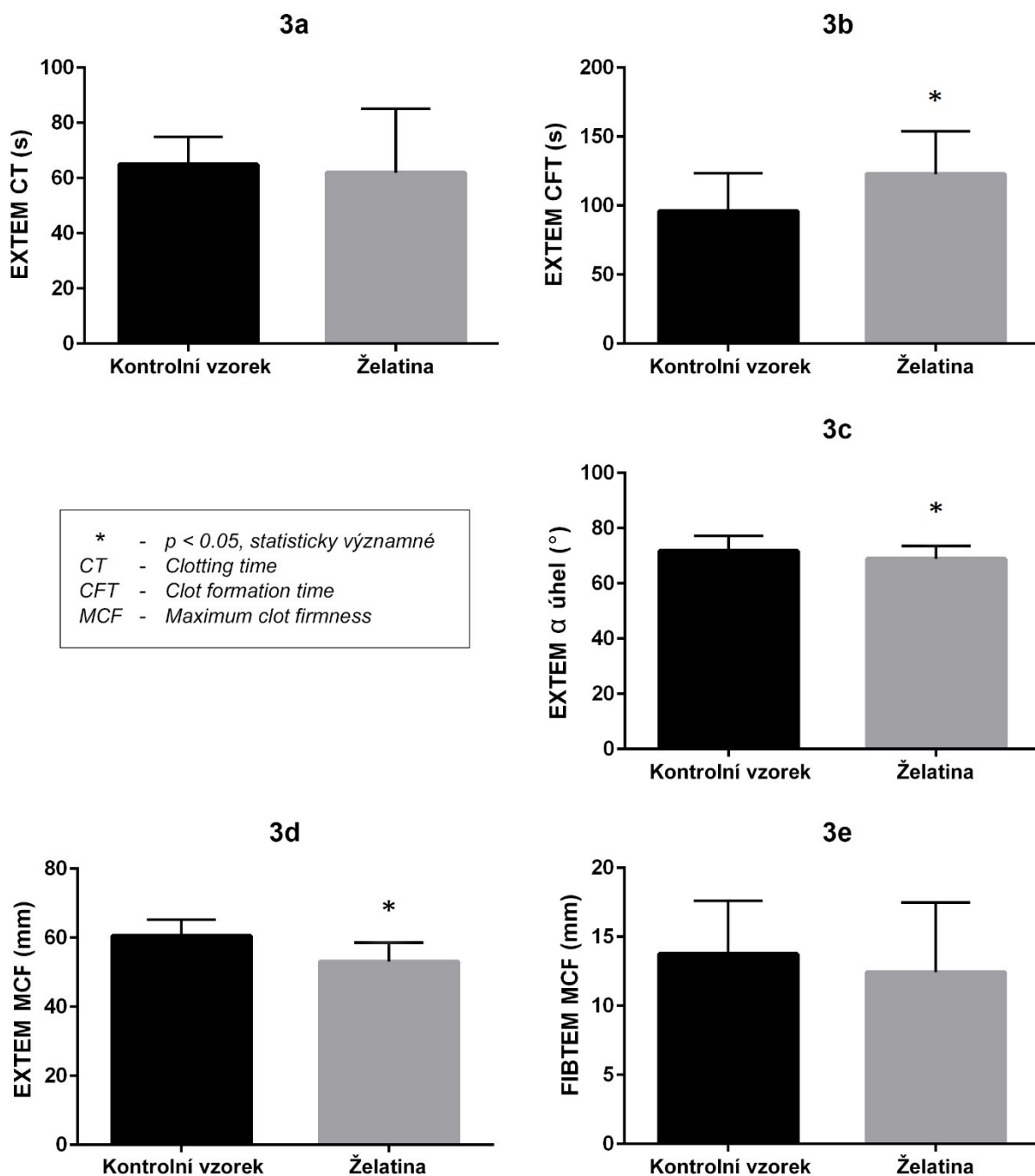
první (tmavý) sloupec ve všech grafech znázorňuje koagulační stav kontrolního vzorku pro příslušný parametr ROTEM, druhý (světlejší) sloupec reprezentuje změny parametrů ROTEM po přidání hydroxyethyl škrobu



Graf 2a – 2e

Vliv hydroxyethyl škrobu na koagulaci in vitro hodnocenou metodou ROTEM

první (tmavý) sloupec ve všech grafech znázorňuje koagulační stav kontrolního vzorku pro příslušný parametr ROTEM, druhý (světlejší) sloupec reprezentuje změny parametrů ROTEM po přidání hydroxyethyl škrobu



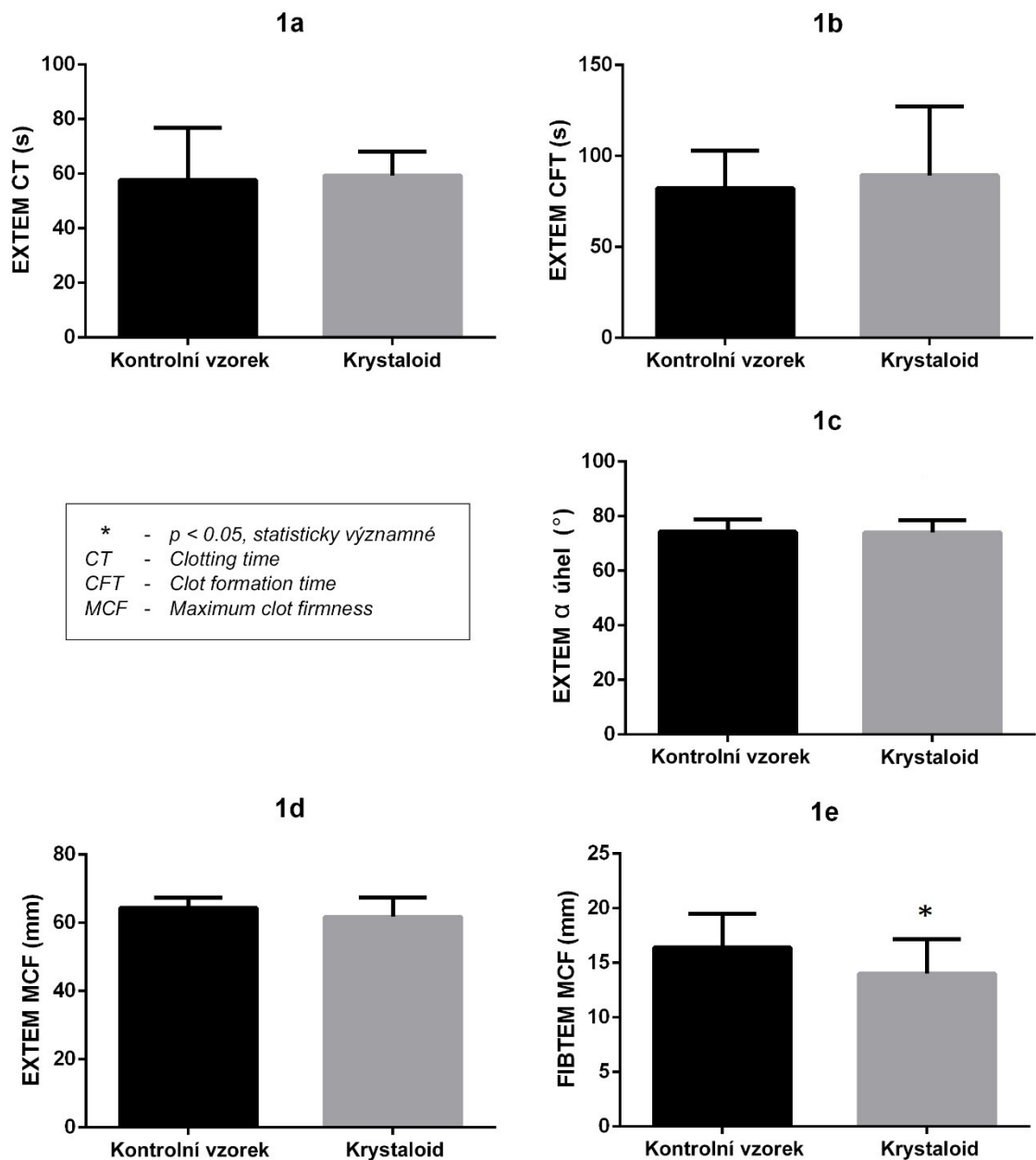
Graf 3a – 3e

Vliv želatiny na koagulaci in vitro hodnocenou metodou ROTEM

první (tmavý) sloupec ve všech grafech znázorňuje koagulační stav kontrolního vzorku pro příslušný parametr ROTEM, druhý (světlejší) sloupec reprezentuje změny parametrů ROTEM po přidání želatiny

5.2. Výsledky studie „Vliv krystaloidů a koloidů na krevní srážlivost in vivo s využitím metody ROTEM“

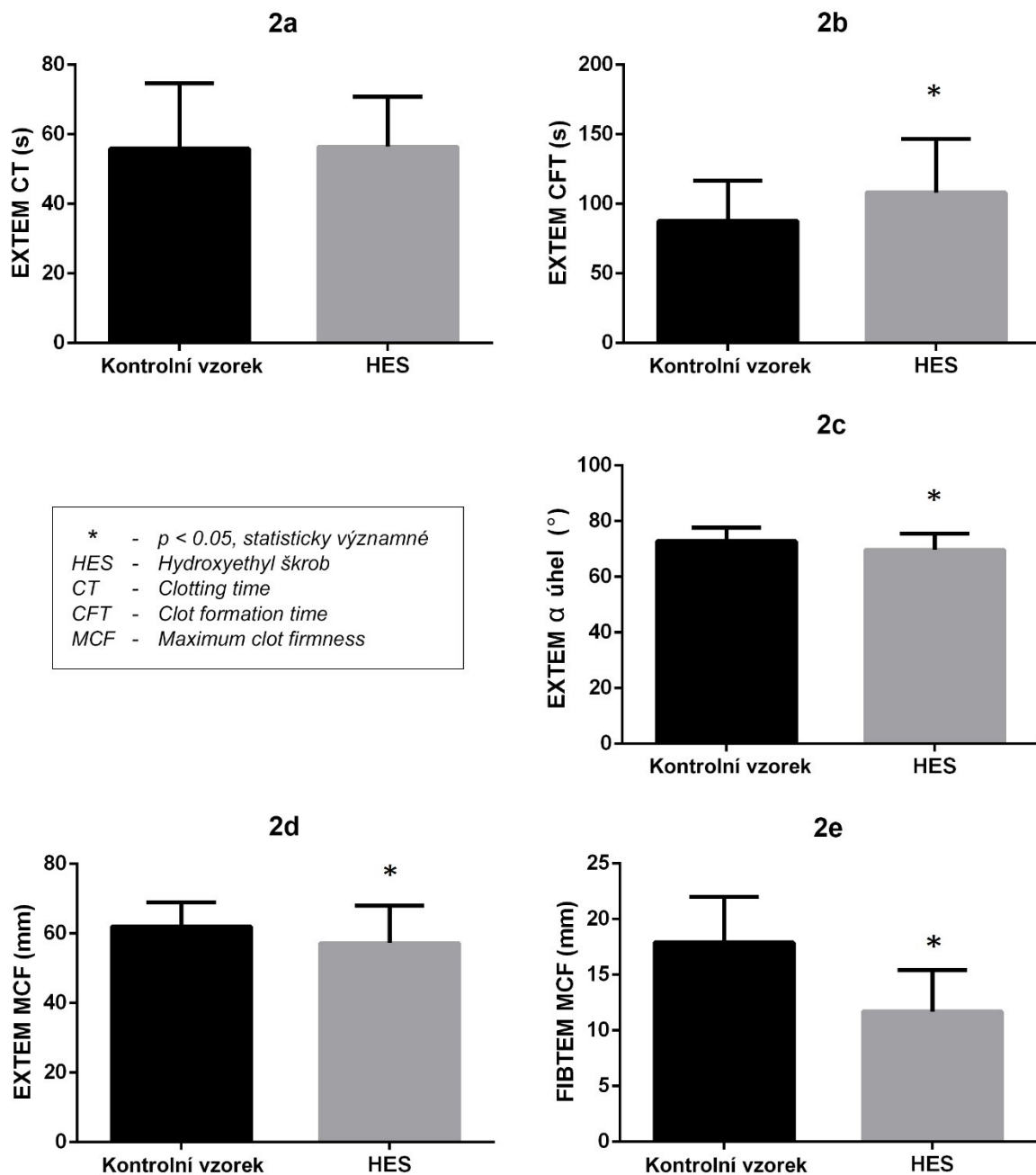
Parametr EXTEM CT nebyl statisticky významně ovlivněn žádným z podaných roztoků. ($p > 0.05$) (Graf 1a, 2a, 3a). Parametr EXTEM CFT byl statisticky významně ovlivněn podáním hydroxyethyl škrobu a želatiny ($p < 0.05$), podání krystaloidu tento parametr statisticky významně nezměnilo ($p > 0.05$) (Graf 1b, 2b, 3b). Parametr EXTEM α úhel byl statisticky významně ovlivněn podáním hydroxyethyl škrobu a želatiny ($p < 0.05$), po podání krystaloidního roztoku nebyl tento parametr statisticky významně změněn ($p > 0.05$) (Graf 1c, 2c, 3c). Statisticky významný hypokoagulační efekt na parametr EXTEM MCF byl zaznamenán pouze po podání hydroxyethyl škrobu ($p < 0.05$) (Graf 1d, 2d, 3d), ostatními roztoky nebyl tento parametr ovlivněn. Parametr FIBTEM MCF byl statisticky významně ovlivněn krystaloidním roztokem i hydroxyethyl škrobem ($p < 0.05$), u želatiny jsme nezaznamenali statisticky významnou změnu pro tento parametr ($p > 0.05$) (Graf 1e, 2e, 3e).



Graf 1a – 1e

Vliv krystaloidu na koagulaci in vivo hodnocenou metodou ROTEM

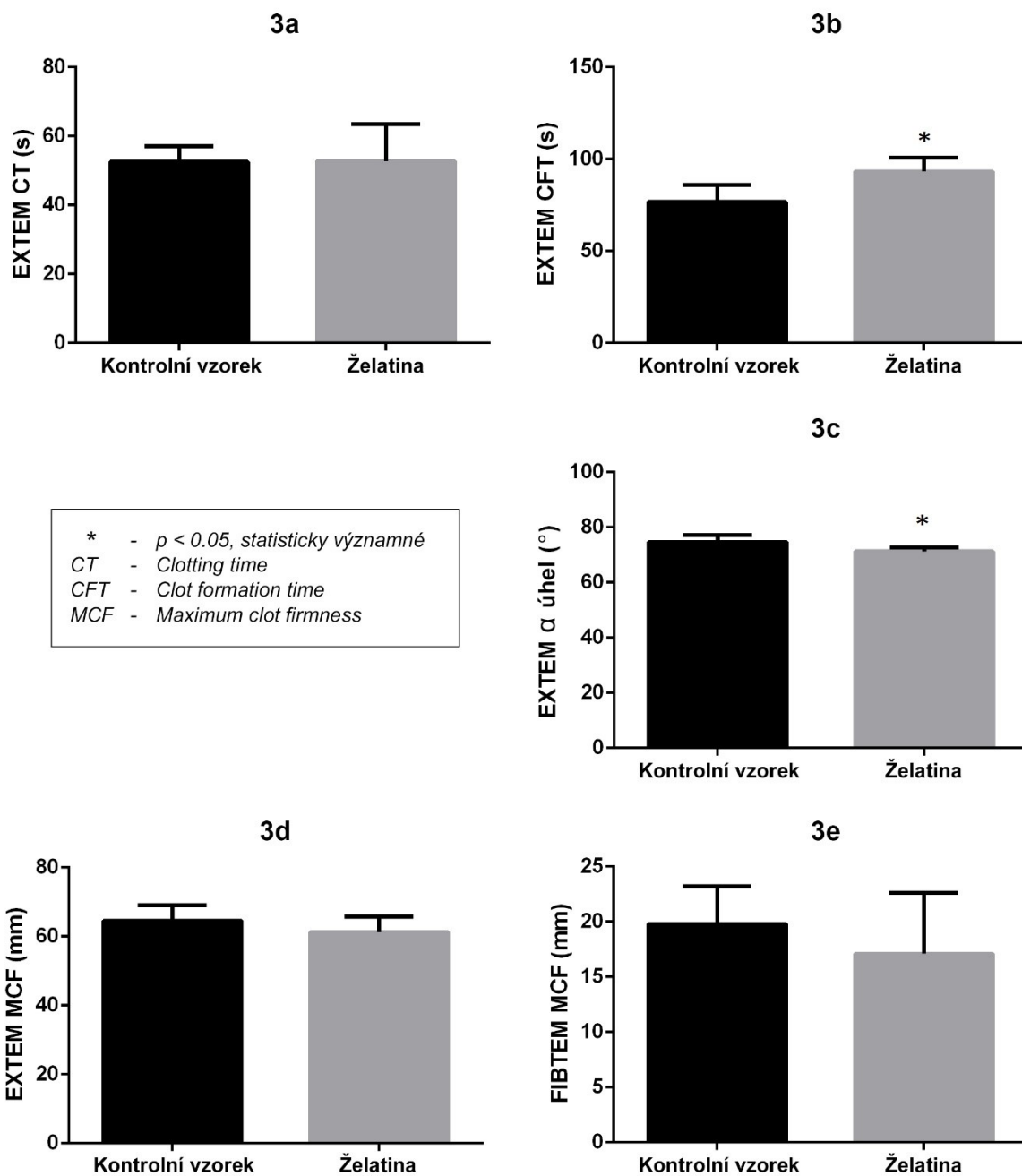
první (tmavý) sloupec ve všech grafech znázorňuje koagulační stav kontrolního vzorku pro příslušný parametr ROTEM, druhý (světlejší) sloupec reprezentuje změny parametrů ROTEM po přidání krystaloidu



Graf 2a – 2e

Vliv hydroxyethyl škrobu na koagulaci in vivo hodnocenou metodou ROTEM

první (tmavý) sloupec ve všech grafech znázorňuje koagulační stav kontrolního vzorku pro příslušný parametr ROTEM, druhý (světlejší) sloupec reprezentuje změny parametrů ROTEM po přidání hydroxyethyl škrobu



Graf 3a – 3e

Vliv želatinu na koagulaci in vivo hodnocenou metodou ROTEM

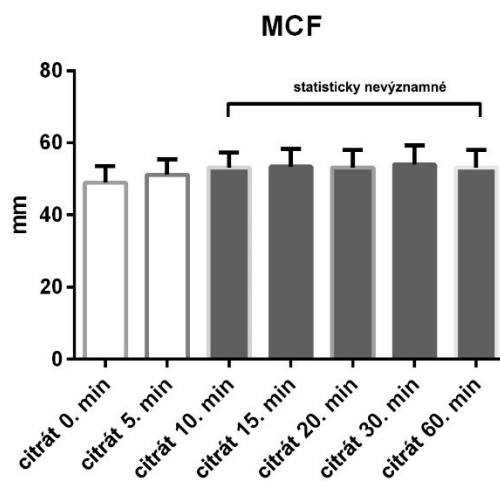
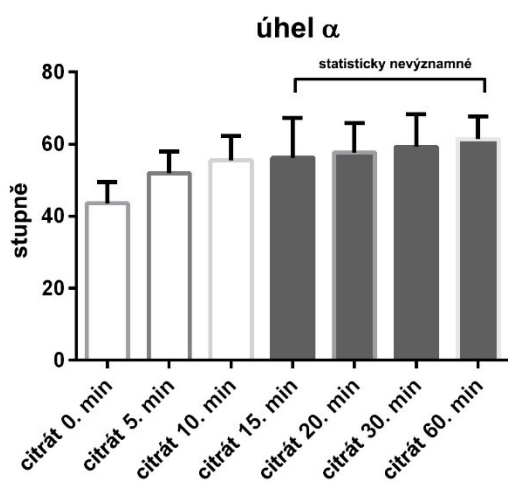
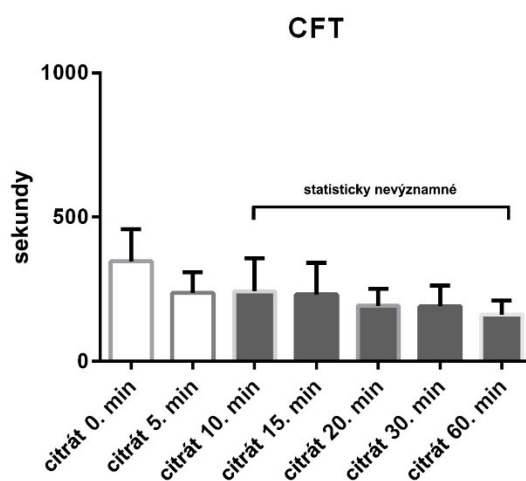
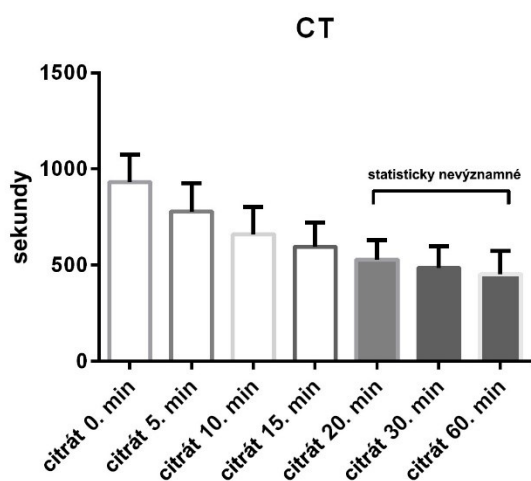
první (tmavý) sloupec ve všech grafech znázorňuje koagulační stav kontrolního vzorku pro příslušný parametr ROTEM, druhý (světlejší) sloupec reprezentuje změny parametrů ROTEM po přidání želatinu

5.3. Výsledky studie „Vliv času na stabilitu krevního vzorku s využitím metody ROTEM“

Všechny parametry NATEM prokázaly od okamžiku odběru do 60. minuty po odběru vzorku postupující prokoagulační trend. Parametr CT se od 20. minuty od odběru vzorku statisticky významně neměnil (v hodnotách odebraných v 20., 30. a 60. minutě nebyl statisticky významný rozdíl; $p > 0.05$), navíc ve střední hodnotě parametru CT byly zaznamenány minimální rozdíly mezi 30. a 60. minutou od odběru. Hodnoty úhlu α se statisticky významně nelišily ($p > 0.05$) mezi 10, 15, 20, 30, a 60. minutou. Hodnoty parametru CFT a MCF se statisticky významně nezměnily ($p > 0.05$) mezi 15, 20, 30, a 60. minutou. Hodnoty parametrů v čase jsou uvedeny v následujících grafech (Grafy NATEM).

Závěr studie „Vliv času na stabilitu krevního vzorku s využitím metody ROTEM“:

Dle nejsensitivnějšího parametru CT se krevní vzorek stává stabilním ve 20. minutě od odběru vzorku, mezi 30. a 60. minutou je nejstabilnější, a to je i nejideálnější časové okno pro analýzu krevního vzorku.



Grafy NATEM. Parametry testu NATEM ovlivněné uplynutým časem od odběru krevního vzorku

6. Diskuse

Dle výsledků obou našich studií, ve kterých jsme se věnovali vlivu infuzních roztoků na krevní srážlivost, má nejmenší koagulopatický efekt balancovaný krystaloid.

6.1. Vliv infuzních roztoků na krevní srážlivost

- vliv infuzních roztoků na parametry ROTEM

Existuje mnoho dalších autorů, kteří též zkoumali vliv krystaloidních a koloidních roztoků na parametry ROTEM.

Například ovlivnění testů EXTEM a FIBTEM bylo hodnoceno ve studii autora Schlimp a kol., jak po podání 0,9 % roztoku chloridu sodného, tak po diluci koloidními roztoky (5% albumin, 4% želatina, 130/0,4 6% HES). 30% diluce krystaloidním roztokem ovlivnila parametr EXTEM CT ve smyslu hyperkoagulace, parametr EXTEM CFT nebyl ovlivněn, hodnota EXTEM MCF byla snížena, ale v mezích referenčního limitu. Co se týče koloidních roztoků, všechny prodloužily čas pro vznik koagula (EXTEM CFT) a oslabily maximální sílu koagula (EXTEM MCF a FIBTEM MCF) [45].

Weiss a kol. použil ve své práci 0,9% roztok chloridu sodného a 6% HES. Posuzoval ovlivnění koagulačních parametrů při 30%, 40%, 50%, 60%, 70% a 80% diluci krevních vzorků in vitro. Samozřejmě byl analyzován i referenční krevní vzorek bez diluce, jenž měl všechny sledované koagulační parametry v normě. Parametr EXTEM CT byl statisticky významně prodloužen při 70 % diluci 0,9% roztokem chloridu sodného a při 50% diluci hydroxyethyl škrobem. Parametr INTEM CT byl statisticky významně ovlivněn 0,9% roztokem chloridu sodného při stejné diluci jako parametr EXTEM CT, v případě hydroxyethyl škrobu bylo narušení tohoto parametru způsobeno již 50% dilucí. Parametr EXTEM MCF a INTEM MCF byl u 0,9% chloridu sodného významně snížen při 50 % diluci, v případě hydroxyethyl škrobu při 40% diluci. FIBTEM MCF byl statisticky významně snížen při testování 0,9% roztoku chloridu sodného až při 80% diluci, naopak v případě hydroxyethyl škrobu byl tento parametr snížen 40% dilucí [46].

Shin se svými spolupracovníky hodnotil ovlivnění koagulací po podání 130/0,4 6% hydroxyethyl škrobu (6% Volulyte) během náhrady kyčelního kloubu, kdy perioperační krevní ztráta byla 1000-1500 ml. Na rozdíl od většiny studií, kde byly roztoky podávány při

euvolemii, tito autoři v úvodu operace navodili akutní normovolemickou hemodiluci. Pacientům odebrali přípustné množství krve dle výpočtu podle Grossova vzorce a poté podali HES o stejném objemu, který odpovídal odebrané krvi, následně peroperačně provedli retransfuzi. Po provedené akutní normovolemické hemodiluci všechny parametry ROTEM prokázali hypokoagulační stav, stejné výsledky byly zaznamenány po retransfuzi. Při posuzování výsledků je třeba brát v potaz, že pacienti zařazení do této studie byli během výkonu ve spinální anestezii. Kontrolní vzorek byl sice odebrán před navozením akutní normovolemické hemodiluce, ale v době, kdy již vaskulární systém mohl být ovlivněn vasodilatací po spinální anestezii [47].

Mauch a kol. se ve své studii zabýval tím, zda rychle podaný bolus tekutin ovlivňuje hemostázu okamžitě či je nutný čas pro shift mezi kompartmenty. Studii prováděli na prasatech. Dle výsledků ROTEM, rychle podaný bolus koloidních roztoků (4% želatina, 5% albumin, 6% HES 130/0,4) vedl k okamžitému prodloužení tvorby koagula (EXTEM CFT a EXTEM úhel α) a ke snížení maximální síly koagula (EXTEM MCF). Tento parametr byl narušen i po bolusu 0,9% roztoku chloridu sodného. Při vzájemném porovnávání koloidních roztoků, nejmenší hypokoagulační vliv na tvorbu koagula a na maximální sílu koagula byl zaznamenán u albuminu. Polymerizaci fibrinu (FIBTEM MCF) nejvíce narušil 6% HES [2].

Ponschab a kol. ve své práci podával krystaloidní roztok (ELO MEL-balancovaný roztok s acetátem), poté co anestezovaným prasatům způsobil 50% krevní ztrátu z celkového objemu krve. Prasata dostala buď množství krystaloidu odpovídající krevní ztrátě nebo trojnásobné množství krystaloidního roztoku s ohledem na ztrátu krve. U skupiny s nižším podaným objemem byl signifikantně snížen parametr EXTEM MCF i FIBTEM MCF. U skupiny s trojnásobným podaným objemem vůči krevní ztrátě byla negativně ovlivněna i propagační fáze, tedy parametr EXTEM CFT. Z těchto výsledků vyplývá, že při hodnocení vlivu krystaloidních roztoků stran koagulopatie nezáleží jen na typu roztoku, ale i na množství podaného roztoku [48].

Li a kol. porovnával diluční efekt 6% HES (130/0,42) a 5% albuminu na parametry ROTEM během plánovaných neurochirurgických resekcí na mozkové tkáni. Při krvácení nad 200 ml nebo při nutnosti hemodynamické stabilizace byl podán jeden z výše uvedených koloidů. Množství koloidů bylo omezeno na 1000 ml HESu a 500 ml albuminu během operačního výkonu. Krevní vzorky byly odebrány před chirurgickou incizí, po 500 ml HESu nebo po 250 ml albuminu, v případě podávání další dávky koloidu byl odebrán i 3. vzorek po 1000 ml infundovaného HESu nebo 500 ml albuminu, poslední vzorek byl odebrán na konci operace. Výsledky peroperačních odběrů byly srovnávány s výchozími hodnotami,

kteře byly naměřeny z odběru před podáním HESu nebo albuminu. 500 ml HESu statisticky významně prodloužilo parametr EXTEM CFT, parametr EXTEM α úhel a EXTEM MCF byl statisticky významně snížen, parametr FIBTEM MCF nebyl tímto množstvím ovlivněn. Po podání 1000 ml HESu byl navíc statisticky významně prodloužen parametr EXTEM CT a parametr FIBTEM MCF. Na konci operace byly stále statisticky významně ovlivněny parametry EXTEM CFT, EXTEM α úhel a FIBTEM MCF. 250 ml albuminu statisticky významně ovlivnilo pouze parametr FIBTEM MCF. 500 ml albuminu mělo již ale větší koagulopatický efekt, statisticky významně byly ovlivněny parametry EXTEM CFT, EXTEM α úhel, EXTEM MCF a FIBTEM MCF. Tyto výsledky byly stejné jako výsledky z odběru na konci operačního výkonu. Ovlivnění parametrů ROTEM po podání HES nebo albuminu může být v této studii ovlivněno i tím, že pro udržovací perioperační infuzní terapii byl podáván 0,9% roztok chloridu sodného, který mohl též narušovat krevní srážlivost [49].

Kam a kol. navodil in vitro 5%, 10% a 15% diluce 0,9% roztokem chloridu sodného a dextrans 40 (s molekulovou hmotností 40 kDA). Parametry ROTEM byly hodnoceny v krevním vzorku bez diluce a ve vzorcích s navozenou dilucí. Navození dilucí 0,9% roztokem chloridu sodného nemělo v této studii žádný vliv na parametry ROTEM. V případě dextransu, parametr EXTEM CT byl signifikantně významně prodloužen 10% a 15% dilucí dextransem, stejně tak parametr EXTEM CFT. α úhel byl statisticky významně ovlivněn 5%, 10% i 15% dilucí. Parametr EXTEM MCF byl statisticky významně snížen 10% a 15% dilucí, FIBTEM MCF byl snížen pouze při 15% diluci [50].

Kind a kol. provedl testy EXTEM, INTEM a APTTEM metodou ROTEM u krevního vzorku odebraného od 12 dobrovolníků a u stejného krevního vzorku, ve kterém ale in vitro byla navozena 60% diluce koloidními roztoky. Z koloidů pracovali s 6% HES (130/0,42), s 4% želatinou a s 4% balancovanou želatinou. Po navození 60% diluce byly v testech EXTEM a APTTEM všemi koloidními roztoky statisticky významně ovlivněny parametry CT, CFT, α úhel a MCF ve smyslu hypokoagulace. V testu INTEM byl parametr CT a CFT statisticky významně prodloužen pouze při diluci hydroxyethyl škrobem, parametr α úhel a MCF byl statisticky významně snížen všemi koloidními roztoky [51].

Sigurjonsson a kol. porovnával koagulopatický vliv 6% dextransu 70 a 5% albuminu během gynekologických operací u pacientek s karcinomem ovarií. Koloidy byly indikovány při krevní ztrátě s hladinou hemoglobinu pod 90 g/l, průměrně bylo podáno kolem 980 ml dextransu a 820 ml albuminu, v případě nutnosti byly podávány i erytrocytární koncentráty. K tzv. „udržovací“ tekutinové terapii perioperačně byla podávána 2,5% glukóza a Ringer acetát. Krevní vzorky byly odebrány před operačním výkonem, ihned po výkonu, třetí vzorek

byl odebrán první pooperační den. Dextran prodloužil parametr EXTEM CFT, hodnoty úhlu α a maximální síla koagula (EXTEM MCF) byly tímto roztokem sníženy. Albumin též prodloužil parametr EXTEM CFT a snížil sílu vznikajícího koagula (EXTEM A10). Při vzájemném porovnání dextransu a albuminu na parametry EXTEM nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Stejně tak nebyl statisticky významný rozdíl mezi těmito dvěma roztoky při hodnocení parametru FIBTEM MCF, po podání jak albuminu, tak dextransu došlo ke snížení tohoto parametru. Při posuzování uvedených výsledků bychom neměli opomíjet, že se jedná o skupinu pacientek s nádorovým onemocněním, kvůli kterému jsou primárně ve stavu hyperkoagulace [52].

Boyd a kol. provedl se svým týmem zajímavou experimentální studii, do které byli zařazeni chrti. Studie byla schválena australskou etickou komisí. Chrtům v celkové anestezii způsobili hemoragický šok. Bylo odebíráno takové množství krve, které vedlo k poklesu středního arteriálního tlaku na 50mmHg, poté byla krev během jedné hodiny postupně vracena k udržení MAP kolem 50-60 mmHg. Po této první šokové fázi dostali chrti během 20 minut buď plnou čerstvou krev nebo 6% Volulyte nebo 4% Gelofusine nebo Plasmalyte. Krev a koloidní roztoky byly podávány v dávce 20ml/kg, krystaloid v dávce 80 ml/kg. ROTEM analýza byla provedena před navozením hemoragického šoku, v první hodině šokového stavu (výsledky v tomto čase byly ovlivněny šokem, nikoli infuzními roztoky, proto zde nebudou uvedeny), dále ve druhé hodině (resp. po 40 minutách od podání plné krve nebo infuzních roztoků, tedy „T60“), poslední odběry byly hodnoceny čtyři hodiny po zahájení experimentu (resp. po 180 minutách od podání plné krve nebo infuzních roztoků, tedy „T180“). Parametry ROTEM prokázaly hypokoagulační účinek hydroxyethyl škrobu. Výsledky byly statisticky zpracovány metodou mnohočetného porovnávání. Parametr INTEM MCF ve skupině s hydroxyethyl škrobem byl statisticky významně snížen vůči plné krvi, jak v čase „T60“, tak v čase „T180“. Parametr EXTEM CT v čase „T60“ ve skupině s hydroxyethyl škrobem byl statisticky významně prodloužen vůči všem ostatním infuzním roztokům a plné krvi, EXTEM MCF u hydroxyethyl škrobu v čase „T60“ byl statisticky významně snížen vůči plné krvi. U ostatních parametrů ROTEM nebyl přítomen statisticky významný rozdíl při vzájemném porovnávání plné krve a uvedených roztoků. Jedná se o náročnou studii s mnoha proměnnými, koagulopatický efekt podaných roztoků mohl být ovlivněn experimentálně navozeným hemoragickým šokem. Zajímavostí je i fakt, že ačkoli se jedná o poměrně nedávno publikovanou studii, autoři k resuscitaci hemoragického šoku použili 4x vyšší množství krystaloidu než koloidních roztoků. V teoretické části této práce bylo uvedeno, proč je poměr 4 : 1, krystaloid versus koloid, přežitý [53].

Poslední studii, kterou bych zde ráda zmínila, je práce od autora Reuteler a jeho kolektivu. Jedná se opět o animální studii, která měla ale poměrně jednoduchý design, tudíž výsledky vlivu infuzních roztoků na krevní srážlivost nejsou zkresleny ostatními proměnnými. Autoři do své studie zahrnuli 40 psů, kteří museli podstoupit celkovou anestezii kvůli artroskopii nebo zobrazovací metodě. 30 psů dostalo balancovaný 6% HES (130/0,42), 30 psů nebalancovaný 6% HES (130/0,42). Balancovaný nebo nebalancovaný HES byl podáván během 30-40 minut v množství 15ml/kg. Deseti psům, kteří tvořili kontrolní skupinu, bylo infundováno 15ml/kg Ringerova roztoku s acetátovým a malátovým pufrem. Kontrolní krevní vzorek byl odebrán po úvodu do anestezie před podáním infuzního roztoku (T0), poté 3 minuty po dokapání roztoku (T1) a poslední krevní vzorek byl odebrán 3 hodiny po skončení infuze uvedených roztoků (T2). Metodou ROTEM hodnotili testy INTEM, EXTEM a FIBTEM, z běžně hodnocených parametrů nebyl sledován α úhel. U hodnocených parametrů testů EXTEM, INTEM a FIBTEM, vyjma parametru INTEM CT, nebyl v čase T2 statisticky významný rozdíl mezi podávanými roztoky. Parametr INTEM CT v čase T2 byl statisticky významně prodloužen vůči kontrolnímu vzorku (pufrovaný Ringerův roztok) po podání balancovaného i nebalancovaného HES. Avšak při vzájemném porovnání škrobových roztoků nebyl v čase T2 pro parametr INTEM CT patrný statisticky významný rozdíl. Parametry EXTEM CFT, EXTEM MCF, INTEM CFT a FIBTEM MCF byly v čase T1 statisticky významně změněny ve smyslu hypokoagulace při porovnání balancovaného HES a kontrolní vzorku. Dále v T1 parametry INTEM CFT a FIBTEM MCF byly statisticky významně změněny (hypokoagulačně) při porovnání nebalancovaného HES a kontrolního vzorku, přičemž mezi balancovaným a nebalancovaným škrobem nebyl statisticky významný rozdíl. Index lýzy (LI30) nebyl podáním infuzních roztoků ovlivněn [54].

- **vliv infuzních roztoků na standardní koagulační testy**

Autoři Schlimp a kol., Weiss a kol. a Shin a kol. ve svých pracích posuzovali vedle parametrů ROTEM i standardní laboratorní testy. V Schlimpově a kol. studii při 33 % diluci krystaloidním roztokem (0,9% roztok chloridu sodného) byly prodlouženy oba časy standardních koagulačních testů, tedy PT i APTT. Naproti tomu Weiss a kol. při 30% diluci 0,9% roztokem chloridu sodného nezaznamenal prodloužení PT a APTT, v jeho studii byl parametr PT významně narušen až 50% dilucí a APTT při 70% diluci. Weiss a kol. testoval i HES standardními laboratorními testy. Parametr PT byl tímto roztokem významně ovlivněn 60% dilucí, APTT byl statisticky významně prodloužen stejně jako u 0,9% chloridu sodného až při 70% diluci [45-47].

Sawhney a kol. zahrnuli do své studie pacienty s traumatem, kteří podstoupili elektivní operační výkony. Traumatický stav je často doprovázen diluční koagulopatií v důsledku velké krevní ztráty, konzumpce koagulačních faktorů a krevních destiček a vlivem tekutinové resuscitace. Do této studie byli zařazeni pacienti s různými diagnózami, ale bez výrazného rozdílu při vzájemném porovnání vstupních hodnot krevního obrazu a standardních koagulačních testů, krevní ztráta u většiny výkonů byla obdobná. Po úvodu do celkové nebo spinální anestezie, bylo pacientům dle randomizace podáno 1 l krystaloidního (0,9% chlorid sodný, Ringer-laktát) nebo koloidního roztoku (starší typ 4% želatiny – Gelofusine, 130/0,4 6% HES Voluven). Preload krystaloidními roztoky neovlivnil PT ani APTT. U všech pacientů s preloadem hydroxyethyl škrobem nebo želatinou byl prodloužen PT. APTT nebyl po podání 1 l koloidního roztoku ovlivněn. Při vzájemném porovnání HESu a želatiny, HES prodloužil PT významněji než želatina [55].

Sigurjonsson a kol. u pacientek s karcinomem ovaria podstupující adnexektomii, hysterektomii a lymfadenektomii hodnotil vliv 6 % dextranu 70 a 5 % albuminu i na konvenční koagulační testy. V případě dextranu bylo výchozí INR 1,0, pooperační hodnota 1,2 a první pooperační den byla hodnota INR 1,3. APTT bylo po podání dextranu též prodlouženo, z 25 s na 31 s během operačního výkonu, následující den byla hodnota APTT 30s. Albumin prodloužil výchozí hodnotu INR 1,0 na hodnotu 1,3 po operačním výkonu, první den po výkonu bylo INR 1,4. APTT bylo po podání albuminu prodlouženo z 27s na 29s, první pooperační den mělo APTT hodnotu 33 s. Výsledky mohou být ovlivněny i současně podávanými krystaloidními roztoky a hyperkoagulací doprovázející nádorové onemocnění [52].

V experimentální zvířecí studii od Boyd a kol. byl koagulopatický efekt infuzních roztoků a plné krve sledován i pomocí parametrů PT a APTT. Všechny infuzní roztoky prokázaly hypokoagulační vliv, avšak nejvíce hypokoagulačně se choval hydroxyethyl škrob. Při statistickém zhodnocení byl parametr PT v čase T60 i T180 statisticky významně kratší po podání plné krve než po podání krystaloidu a koloidních roztoků. Při vzájemném porovnání PT želatiny a PT hydroxyethyl škrobu, byl tento parametr v čase T60 statisticky významně kratší u želatiny. Parametr APTT byl v čase T60 statisticky významně kratší u plné krve než po podání infuzních roztoků, v čase T180 bylo APTT statisticky významně kratší u skupiny s plnou krví než u skupiny s hydroxyethyl škrobem. Dále při vzájemném porovnání koloidních roztoků byl parametr APTT v čase T60 statisticky významně kratší u želatiny než u hydroxyethyl škrobu. Standardní koagulační testy byly ale zajisté značně ovlivněny hemoragickým šokem, pro který byly infuzní roztoky a plná krev následně aplikovány [53].

- **vliv infuzních roztoků na primární hemostázu hodnocenou PFA a Multiplate**

Li a kol. ve své studii s 6% HES (130/0,42) a 5% albuminem během plánovaných neurochirurgických resekcí výkonů na mozkové tkáni hodnotil krevní srážlivost i agregometrem Multiplate, prováděl testy ADP a TRAP. Statisticky významně byl ovlivněn pouze test ADP po podání 500ml albuminu [49].

Kam a kol. hodnotil ve své in vitro studii i funkci krevních destiček pomocí přístroje Multiplate. Se svou pracovní skupinou provedl testy ADP, TRAP, COL a RISTO. Ani u jednoho z testů nezaznamenali statisticky významné změny mezi krevním vzorkem bez diluce a mezi krevními vzorky s 5%, 10% a 15% dilucí, ať v případě diluce 0, 9% roztokem chloridu sodného nebo dextransu 40 [50].

Kind a kol. porovnávali testy Multiplate u krevního vzorku odebraného od 12 dobrovolníků a u stejného krevního vzorku, ve kterém ale in vitro byla navozena 60 % diluce koloidními roztoky. Z koloidů pracovali s 6% HES (130/0,42), s 4% želatinou a s 4% balancovanou želatinou. Všechny provedené testy (ADP, ASPI, COL, TRAP) byly 60 % dilucí statisticky významně narušeny, a to všemi koloidními roztoky. Při vzájemném porovnávání koloidů měla největší negativní vliv na funkci destiček nebalancovaná želatina, následovaná hydroxyethyl škrobem. Nejméně poškodila funkci destiček 4 % balancovaná želatina [51].

Sigurjonsson a kol. ve své studii s 6% dextransem a 5% albuminem u gynekologických operacích hodnotil vedle testů ROTEM a standardních koagulačních testů i ovlivnění primární hemostázy. Využil agregometrii Multiplate, pracoval s testy ADP, COL a TRAP. U žádného z testů nezaznamenal statisticky významný rozdíl mezi dextransem a albuminem [52].

Boyd se svým týmem u experimentální zvířecí studie, ve které chrtům navodil hemoragický šok, a poté se šokový stav snažil zvrátit buď podáním plné krve nebo koloidními roztoky (6% Tetrapsan, 4% Gelofusine) nebo krystaloidem (Plasmalyte), hodnotil i funkci destiček pomocí přístroje PFA 100 s cartridge COL/ADP. „Čas uzavření“ (CT) byl nejvíce prodloužen u želatiny. Autoři provedli statistickou analýzu metodou mnohočetného porovnávání, navzájem tedy porovnávali krev, hydroxyethyl škrob, želatinu a krystaloid. V první hodině od podání krve nebo infuzních roztoků byl parametr „CT“ statisticky významně prodloužen u želatiny ve srovnání s „CT“ čerstvé krve a krystaloidu. Ve 180. minutě od podání krve nebo infuzních roztoků byl parametr „CT“ želatiny statisticky významně prodloužen vůči všem infuzním roztokům i vůči plné krvi. Již u metody ROTEM a u

standardních laboratorních testů bylo zmíněno, že uvedené výsledky mohou být zásadně ovlivněny hemoragickým šokem. V první fázi šoku byla nejdříve po dobu jedné hodiny retransfundována původní odebraná krev. Koloidní roztoky nebo krystaloid nebo plná krev byly podávány až v druhé hodině šokového stavu [53].

McBride se svými spoluautory provedl animální studii s chrtu. V 60. minutě od úvodu do celkové anestezie chrtům způsobili hemoragický šok odebíráním krve v množství 48 ml/kg po dobu 30 minut. Šok byl resuscitován 20 ml/kg roztokem HES 130/0,4 (koncentrace není ve studii uvedena) a 80 ml/kg 0,9% roztokem chloridu sodného během 20 minut. K udržovací tekutinové terapii byl infundován Hartmannův roztok v dávce 10 ml/kg, který byl během podávání HES nebo 0,9% roztoku chloridu sodného při resuscitaci šoku pozastavený. K měření funkce destiček využili přístroj PFA-100 s cartridge COL/ADP. Krevní vzorky, u nichž byl hodnocen vliv infuzních roztoků na „čas uzavření“ („CT“) byly získávány v čase „T1“, ve kterém již byl kompletně navozen hemoragický šok a v čase „T2“, což bylo 40 minut po dokapání roztoku HES nebo roztoku 0,9% chloridu sodného (tedy v 60. minutě od zahájení podávání těchto infuzních roztoků). Jak HES 130/0,4, tak 0,9% roztok chloridu sodného statisticky významně prodloužily „CT“. Při vzájemném porovnávání podávaných roztoků byl parametr „CT“ statisticky významně více prodloužen u 0,9% roztoku chloridu sodného. Významnější negativní ovlivnění krevních destiček krystaloidním roztokem může být dáno i tím, že krystaloidu bylo k resuscitaci šoku podáváno čtyřikrát více než koloidu, navíc před navozením hemoragického šoku byl též podáván krystaloidní Hartmannův roztok [56].

Reuteler a kol. ve své studii, při které podával anestezovaným psům krystaloidní roztok (Ringer s acetátem a malátem, tedy tzv. kontrolní vzorek) nebo balancovaný nebo nebalancovaný HES zhodnotil i funkci krevních destiček přístrojem PFA 100. V čase tři hodiny po dokapání (T2) zkoumaného roztoku nebyl mezi pufovaným Ringerovým roztokem a oběma roztoky škrobu statisticky významný rozdíl. V čase tři minuty po dokapání infuze (T1) byl parametr „CT“ (čas uzavření) statisticky významně prodloužen u obou skupin škrobů vůči kontrolnímu vzorku, mezi škroby navzájem nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl [54].

- vliv infuzních roztoků na parametry TEG

Sawhney a kol. ve své práci u pacientů s traumatem použil i TEG k hodnocení koagulace po podání infuzních roztoků. Preload 1 l krystaloidního nebo koloidního roztoku neovlivnil

žádný z parametrů TEG. Při vzájemném porovnání HESu a želatiny, HES významněji ovlivnil iniciační fázi srážení hodnocenou parametrem R [55].

Golpavar se svými spolupracovníky využili dosavadních poznatků o škodlivosti HESu na krevní srážlivost. Tento infuzní roztok podávali pacientům s mozkovým nádorem, kteří mají sklon k hyperkogulačnímu stavu. Ve své studii, ale neuvádí kolika procentní HES použili. Jejich cílem bylo posoudit hypokoagulační vliv škrobového roztoku ve vztahu ke snížení tromboembolických komplikací u těchto pacientů. U všech nemocných byla zpomalena tvorba koagula po podání 10 ml/kg HESu (prodloužení parametrů R a K), ale ve srovnání s krystaloidním roztokem (0,9% roztok chloridu sodného) nebyla zaznamenána vyšší krevní ztráta během neurochirurgického výkonu. Autoři potvrdili protektivní efekt HESu u pacientů s hyperkoagulačním stavem, u nichž pokles koagulability podáním škrobového roztoku může snížit riziko tromboembolických komplikací [57].

V některých případech mohou být více průkazné rozsáhlé metaanalýzy studií než práce jednotlivých autorů. Za zmínku určitě stojí metaanalýza od Rasmussen a kol., která hodnotila perioperační infuzní terapii ve vztahu ke koagulopatii. Do své práce zahrnul celkem 31 klinických studií, které byly provedeny během let 2000–2015 u pacientů podstupující chirurgický zákrok. Krevní srážlivost ve všech zařazených studiích byla měřena TEGem. Rasmussen se zaměřil na parametr maximální amplitudy (MA). Snížená síla koagula byla nejvíce zaznamenána u pacientů, kteří dostali HES. Zajímavým výsledkem je zjištění, že nebyl významný rozdíl mezi škroby různých generací. V porovnání s albuminem měli i moderní škroby větší hypokoagulační účinek. Navíc Rasmussen a kol. zhodnotil i četnost reoperací. Nejčastěji podstoupili reoperaci právě ti pacienti, kteří peroperačně dostávali HES. S největší pravděpodobností to souviselo s vyšším výskytem perioperačního krvácení při podávání tohoto koloidního roztoku. Studie se želatinou nebyly do tohoto systematického přehledu zahrnuty. Limitem této rozsáhlé metaanalýzy mohou být roztoky, které již opustily denní klinickou praxi (např. dextransy) a absence studií zabývajících se vlivem želatiny na krevní srážlivost [3].

6.2. Porovnání výsledků studií

Výsledky studií se navzájem mírně liší. S velkou pravděpodobností je to na vrub různých metodik studií, použitých roztoků, svou roli může hrát i typ anestezie. Dalším nesporným faktem je, že výsledky hodnocení koagulopatického vlivu různých typů infuzních roztoků

pomocí běžných testů PT/APTT se liší od výsledků viskoelastických metod. Stěžejní závěry uvedených studií jsou ale podobné a korelují s výsledky našich dvou prací.

Dle studií zabývajících se krystaloidním roztokem, včetně rozsáhlé metaanalýzy od autora Rasmussen a kol., je podání krystaloidu spojeno s nejmenším ovlivněním krevní srážlivosti. Avšak při hodnocení krystaloidních roztoků literatura dominantně srovnává fyziologický roztok oproti balancovaným roztokům. V mnoha studiích navíc pracovali i s Ringer-laktátem, který není vhodný u pacientů s vyšší hodnotou laktátu [3]. Ta ale zpravidla doprovází právě větší krvácení v důsledku hypoperfúze orgánů, kdy objemové náhrady jsou na místě. Chybí data, která by balancované roztoky porovnávala mezi sebou. V našich studiích jsme se zaměřili pouze na balancované roztoky.

Na rozdíl od krystaloidů všechny koloidní roztoky interferují s fyziologickými mechanismy hemostázy. Největší negativní vliv na koagulační systém mají dle dostupných dat koloidní roztoky s vysokou molekulární hmotností, které se v současnosti ale prakticky nepoužívají. Moderní balancované škroby (130/0,4) jsou dle některých dostupných výsledků spojeny s nižší krevní ztrátou než škroby starších generací [3,52]. Nicméně ve srovnání s želatínou, albuminem a krystaloidy je jejich podání stále spojeno s největším ovlivněním krevní srážlivosti ve smyslu hypokoagulace. Dle některých studií je, při nutnosti užití koloidního roztoku, nejlepší volbou 5% albumin [2,3]. V naší klinické praxi je však tento roztok pro objemovou resuscitaci s ohledem na cenu využíván jen ve výjimečných případech, častěji se používá v pediatrické anestezii. Moderní želatina ve srovnání s třetí generací hydroxyethyl škrobu vykazuje mírnější prokoagulační efekt než HES.

6.3. Infuzní roztok versus hemostáza

- nepřímý a přímý vliv navozené diluce

Ovlivnění krevní srážlivosti hemodilucí záleží vždy na množství a typu podané tekutiny. Za nepřímý vliv považujeme diluci koagulačních faktorů způsobenou podáním infuzního roztoku např. v rámci volumoterapie při krevní ztrátě. Navíc při krvácení je pokles koagulačních faktorů zhoršen samotnou ztrátou těchto faktorů mimo krevní oběh [9].

Jedna z možných hypotéz, proč má krystaloid pouze minimální vliv na krevní srážlivost, může být vysvětlena jeho rychlým přesunem po podání do extravaskulárního prostoru. Tím je diluční efekt krystaloidního roztoku menší než efekt koloidního roztoku. Schlimp a kol. ve své studii popisuje po navození 20–30% akutní hemodiluce krystaloidním roztokem

hyperkoagulační stav [45]. Tento fenomén může být zapříčiněn poklesem inhibičních faktorů koagulace v důsledku diluce a tím dojde ke snížení prahové hodnoty pro pozitivní zpětnou vazbu, která je součástí koagulační kaskády. Stejně tak „chybějící“ anémie, tedy navození diluce bez krevní ztráty v rámci studií, může být příčinou těchto výsledků. Fyziologický počet erytrocytů je samozřejmě nezbytný pro správně fungující hemostázu. Na krevním srážení se podílí jednak mechanicky, marginují trombocyty ke stěně cév, a dále biologicky uvolněním adenosindifosfátu a fosfátového aniontu, které pak podporují aktivaci krevních destiček a vznik trombinu [9].

Pod pojem specifický vliv patří přímé ovlivnění koagulačních faktorů, fibrinolýzy a funkce krevních destiček [9]. I přes četné studie nejsou mechanismy ovlivnění koagulace po podání infuzních roztoků zcela vyjasněny.

- **hemostatický stav pacienta**

Při hodnocení vlivu infuzních roztoků na krevní srážlivost nesmíme opomíjet aktuální hemostatický stav pacienta. Studie se nejčastěji provádějí na zdravých dobrovolnících s normálními laboratorními hodnotami. Obvykle se do studií nezařazují ani kuřáci s ohledem na možnou polycytémii při chronické hypoxii, ženy s hormonální antikoncepcí a samozřejmě pacienti s anamnézou krvácivých projevů, s poruchou krevní srážlivosti a pacienti užívající antikoagulační a antiagregační léky.

Narušení krevní srážlivosti infuzními roztoky se právě u „skutečných“ nemocných může lišit. Většina pacientů právě užívá antiagregancia nebo antikoagulancia, někteří mohou mít vrozené nebo získané poruchy krevní srážlivosti, již předoperačně nižší hematokrit, méně krevních destiček či jiné laboratorní patologie.

Zásadně nesmíme opomenout klinickou situaci, která mění normální hemostatický stav pacienta. Mezi důležité klinické aspekty patří typ chirurgického výkonu a také to, zdali je během něj přítomno nízké či vysoké riziko krvácení. Akutní krevní ztráta vede k hypotenzii s hypoperfuzí. Při přetrvávajícím krvácení dochází k acidóze tkání, podávání masivních tekutinových náhrad přispívá k hypotermii. Nastává circulus vitiosus, neboť acidóza a hypotermie vedou k dalšímu zhoršování koagulace. V rámci závažných pooperačních komplikací může dojít k rozvoji septického stavu, který též alteruje hemostázu a při dramatickém průběhu může vyústit v diseminovanou intravaskulární koagulopatii.

- podmínky „in vitro“ versus podmínky „in vivo“

Velké množství studií bylo prováděno za podmínek „in vitro“. Pokud jsou tyto výsledky implementovány do klinické praxe, neměli bychom zapomínat, že za podmínek „in vivo“ setrvává v intravaskulárním kompartmentu menší množství infuzního roztoku, než jaké bylo podané, a tedy podmínky in vitro a in vivo nejsou totožné [1, 7, 8, 45]. Dalším limitem studií in vitro je absence endotelu, pufrovacích kompenzačních systémů, dále nedostatek elektrolytů a nemožnost metabolické degradace [57]. Navzdory všem těmto limitům u in vitro studií se výsledky většinou shodují se studii prováděnými in vivo.

6.4. Limity disertační práce

S výhodou by bylo zajisté také vyšetření 5 % albuminu, i přesto, že v literatuře existuje dostatek dat týkající se vlivu albuminu na krevní srážlivost. Tento roztok je totiž v současné době stále častěji používán pro perioperační tekutinovou terapii. Do našich studií nebyl albumin zahrnut pro technické nemožnosti jeho použití, proto jsme se soustředili na běžně používané roztoky.

7. Závěr

Výsledky obou našich studií, jak in vitro, tak in vivo jsou prakticky shodné ve vlivu balancovaného krystaloidu (Plasmalyte), balancovaných škrobů (6% Tetraspan ve studii in vitro/6% Volulyte ve studii in vivo) a balancované želatiny (4% Gelaspan) na iniciační a propagační fázi tvorby koagula. Iniciační fáze je charakterizována parametrem EXTEM CT, propagační fáze tvorby koagula je hodnocena parametry EXTEM CFT a EXTEM α úhel. Iniciační fáze nebyla po podání uvedených roztoků změněna, proti tomu propagační fáze byla podáním těchto roztoků ovlivněna ve smyslu hypokogaulace. Maximální síla koagula charakterizovaná parametrem EXTEM MCF byla in vitro snížena po přidání jak balancovaných krystaloidních roztoků, tak balancovaných koloidních roztoků, in vivo byl tento parametr snížen pouze přidáním hydroxyethyl škrobu. Parametr FIBTEM MCF, hodnotící hladinu funkčního fibrinogenu, byl in vitro snížen pouze po přidání hydroxyethyl škrobu, ale in vivo byl tento parametr ovlivněn jak hydroxyethyl škrobem, tak i krystaloidním

roztokem. Lze tedy říci, že použití většiny balancovaných roztoků do určité míry negativně ovlivňuje propagační fázi tvorby koagula, rovněž i jeho sílu. V tomto smyslu vykazují tedy zkoumané roztoky hypokoagulační efekt.

Dle výsledků našich prací se roztokem s minimálním negativním vlivem na krevní srážlivost plné krve hodnocenou metodou ROTEM jeví použití balancovaného krystaloidu. Naopak nejvíce hypokoagulační efekt vykazuje hydroxyetyl škrob (6% Tetraspan, 6 % Volulyte), který prodlužuje propagační fázi, zároveň snižuje i sílu koagula. Želatina ve srovnání s hydroxyethyl škrobem vykazuje mírnější antikoagulační efekt. Vliv albuminu na krevní srážlivost jsme v našich studiích nehodnotili, ale na základě dostupných literárních zdrojů, tento roztok vykazuje z veškerých koloidních roztoků nejmenší hypokoagulační efekt.

Balancované krystaloidy a 5% albumin lze tedy doporučit jako nejvhodnější roztoky k perioperační tekutinové terapii pro jejich minimální hypokoagulační účinek.

8. Literatura

1. Myburgh J.A., Mythen M.G. (2013). Resuscitation Fluids. *The New England journal of medicine*, 2013, roč. 369, č. 13, s. 1243–1251.
2. Mauch J., Madjdpour C., Kutter APN., Spielmann S, Bettschart-Wolfensberger R., Weiss M., Haas T., Anderson B. (2013). Effect of rapid fluid resuscitation using crystalloids or colloids on hemostasis in piglets. *Pediatric Anesthesia*, 2013, roč. 23, č. 3, s. 258-264.
3. Rasmussen K.C., Secher N.H., Pedersen T. (2016). Effect of perioperative crystalloid or colloid fluid therapy on hemorrhage, coagulation competence, and outcome: A systematic review and stratified meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2016, roč. 31, eCollection.
4. Mohd Y.N., Bellomo R., Hegarty C. (2012). Association between a chloride-liberal vs. chloride-restrictive intravenous fluid administration strategy and kidney injury in critically ill adults. *JAMA*, 2012, roč. 308, č. 15, s. 1566–1572.
5. Kuca T., Butler M.B., Erdogan M., Green R.S. (2016). A comparison of balanced and unbalanced crystalloid solutions in surgery patient outcomes. *Anaesthesia, critical care&pain medicine*, 2016, roč. 36, č. 6, s. 371-376.
6. Allen S.J. Fluid Therapy and Outcome: Balance Is Best. (2014). *The Journal of extracorporeal Technology*. 2014, roč. 46, č. 1, s. 28–32.
7. Hartog C.S., Kohl M., Reinhart K. A Systematic Review of Third-Generation Hydroxyethyl Starch (HES 130/0.4) in Resuscitation. (2011). *Anesthesia&Analgesia*. 2011, roč. 112, č.3, s. 635–645.
8. Doherty M., Buggy D.J. Intraoperative fluids: how much is too much? (2012). *British Journal of Anaesthesia*, 2012, roč. 109, č. 1, s. 69–79.
9. Van der Linden P., Ickx B.E. (2006). The effects of colloid solutions on hemostasis. *Canadian Journal of Anaesthesia*, 2006, roč. 53, č. 6, s. 30-39.
10. Lobo D.N., Stanga Z., Aloysius M.M., Wicks C., Nunes Q.M., Ingram K.L., Risch L., Allison S.P. (2010). Effect of volume loading with 1 liter intravenous infusions of 0.9% saline, 4% succinylated gelatine (Gelofusine) and 6% hydroxyethyl starch (Voluven) on blood volume and endocrine responses: a randomized, three-way crossover study in healthy volunteers. *Critical care medicine*, 2010, roč. 38, č. 2, s. 464–470.

11. Thomas-Rueddel D.O., Vlasakov V., Reinhart K., Jaeschke R., Rueddel H., Hutagalung R., Stacke A., Hartog C.S. (2012). Safety of gelatin for volume resuscitation a systematic review and meta-analysis. *Intensive care medicine*, 2012, roč. 38, č. 7, s. 1134–1142.
12. Hung M.H., Zou C., Lin F.S., Chan K.C., Chen Y. (2014). New 6 % hydroxyethyl starch 130/0,4 does not increase blood loss during major abdominal surgery. A randomized, controlled trial. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2014, roč. 113, č. 7., s. 429–435.
13. Halset J.H., Hanssen W.S., Espinosa A., Klepstad P. (2015). Tromboelastography: variability and relation to conventional coagulation test in non-bleeding intensive care unit patients. *BMC anesthesiology*, 2015, roč. 15, eCollection.
14. Durila M. (2014). Tromboelastografie a tromboelastometrie. In: Ševčík P., *Intenzivní medicína*, 2014, 3. doplněné vydání Praha: Galén, s. 197-200. ISBN 978-80-7492-066-0.
15. Benes J., Zatloukal J., Kletecka J. (2015). Viscoelastic Methods of Blood Clotting Assessment – A Multidisciplinary Review. *Frontiers in medicine (Lausanne)*, 2015, roč. 2:62, eCollection.
16. Chappell D., Jacob M. (2014). Role of the glycocalyx in fluid management: Small things matter. Best practice & research. *Clinical anaesthesiology*, 2014, roč. 28, č. 3, str. 227-34.
17. Astapenko D., Pouska J., Černý V., Beneš J. (2017). Endoteliální glykokalyx a tekutinová terapie v intenzivní a perioperační medicíně, *Anesteziologie & Intenzivní medicína*, roč. 28, č. 5, s. 289-296.
18. B. Braun (2013). Gelaspan 4% - ověřena bezpečnost a účinnost, *Braunoviny*, 2013
19. Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/> Souhrn údajů o přípravku
20. Máca J., Kula R, Chýlek V. (2009). Ovlivnění hemostázy při terapii náhradními roztoky, *Vnitřní lékařství*, roč. 55, č. 1, s.27-36.
21. European medicines agency, Science medicines health (2018). Hydroxyethyl starch (HES) containing medicinal products. Dostupné z: www.ema.europa.eu
22. Transfusion Medicine and Hemotherapy (2009). 5 Human Albumin, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2009, roč. 36, č. 6, s. 399-407
23. Self W.H., Semler M.W., Wanderer J.P., Ehrenfeld J.M., Byrne D.W., Wang Li, Atchinson L., Felbinger M., Jones I.D., Russ S., Shaw A., Bernard G.R., Rice T.W.

- (2017). Saline versus balanced crystalloids for intravenous fluid therapy in the emergency department: study protocol for a cluster-randomized, multiple-crossover trial. *Trials, BioMed Central*, 2017, roč. 18, eCollection.
24. Lin T., Smith T., Pinnock C. (2017). *Fundamentals of anaesthesia*, Fourth edition. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 2017. ISBN 978-1-107-61238-9.
25. Pevans P.A., Glenn J.R., Heptinstall S., Madira W. (1998), Effects of gelatin-based resuscitation fluids on platelet aggregation, *British Journal of Anaesthesia*, 1998, roč. 81, č. 2, s. 198–202.
26. Ganong W. F. (2005). *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vydání. Galén, 2005. ISBN 80-7262-311-7.
27. Pecka M. (2004). *Laboratorní hematologie v přehledu, Fyziologie a patologie hemostázy*, Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN 80-86682-03-X.
28. Šlechtová J. (2007). Hemostáza-jak ji možná neznáme, *Klinická biochemie a metabolismus*, 2007, roč. 15, č. 2, s. 97-101.
29. Vojáček J.F. (2015). Hemokoagulace – nové pohledy na starou kaskádu, *Vnitřní lékařství*, roč. 61, č. 5, s. 475-479.
30. Mc.Michael M. (2012). New models of hemostasis, *Topics in companion animal medicine*, 2012, roč. 27, č. 2, s. 40-45.
31. Ferreira C.N., Sousa M.O., Dusse L.M.A., Carvalho M.G. (2010). A cell-based model of coagulation and its implications, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2010, roč. 32, č. 5., s. 416-421.
32. Charvát J., Hrachovinová I., Pecka M (2012). Doporučení ČHS ČSL JEP ke stabilitě a k transportu primárních vzorků biologického materiálu do hematologické laboratoře, *Česká hematologická společnost ČLS JEP*, 2012. Dostupné z: www.hematology.cz
33. Durila M., Sevcikova S., Vymazal T. (2016). Stability of Non-Activated Rotational Thromboelastometry Assay in Time of Citrated Blood (Appropriate Time Interval for Analysis). *Clinical Laboratory*, 2016, roč. 62, č. 11, s. 2145-2148.
34. Spahn D.R., Bouillon B., Cerny V., Duranteau J., Filipescu D., Hunt B.J., Komadina R., Maegele M., Nardi G., Riddez L., Samama C.M., Vincent J.L., Rossaint R. (2019). The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition (2019), *Critical care (London, England)*, roč. 23, č. 1, eCollection.

35. Kozek-Langenecker S.A., Ahmed A.B., Afshari A., Albaladejo P., Aldecoa C., Barauskas G., Robertis E., Faraoni D., Filipescu D.C., Fries D., Haas T., Jacob M., Lancé M.D., Pitarch J.V.L., Mallett S., Meier J., Molnar Z.L., Rahe-Meyer N., Samama C.M., Stensballe J., Van der Linden P.J.F., Wikkelsø A.J., Wouters P., Wyffels P., Zacharowski K. (2017). Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European Society of Anaesthesiology: First update 2016. *European journal of anaesthesiology*, 2017, roč. 34, č. 6, s. 332-395.
36. Vymazal T., Astraverkhava M., Durila M. (2018), Rotational Thromboelastometry Helps to Reduce Blood Product Consumption in Critically Ill Patients during Small Surgical Procedures at the Intensive Care Unit - a Retrospective Clinical Analysis and Literature Search. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2018, roč. 45, č.6, s. 385-387.
37. Lukas P., Durila M., Jonas J., Vymazal T. (2018). Evaluation of Thromboelastometry in Sepsis in Correlation With Bleeding During Invasive Procedures. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2018, roč. 24, č. 6, s. 993-997.
38. Durila M., Lukáš P., Astraverkhava M., Beroušek J., Zábrodský M., Vymazal T. Tracheostomy in intensive care unit patients can be performed without bleeding complications in case of normal thromboelastometry results (EXTEM CT) despite increased PT-INR: a prospective pilot study. *BMC Anesthesiology*, 2015, roč. 89, č. 6, eCollection.
39. Adler M., Ivic S., Bodmer N.S., Ten Cate H., Bachmann L.M., Wuillemin W.A., Nagler M. (2017). Thromboelastometry and Thrombelastography Analysis under Normal Physiological Conditions – Systematic Review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2017, roč. 44, č. 2, s. 78-83.
40. Veigas P.V., Callum J., Rizoli S., Nascimento B., da Luz L.T. (2016). A systematic review on the rotational thrombelastometry (ROTEM®) values for the diagnosis of coagulopathy, prediction and guidance of blood transfusion and prediction of mortality in trauma patients. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*, 2016, roč. 24, eCollection.
41. Durila M. (2016). Nonactivated thromboelastometry able to detect fibrinolysis in contrast to activated methods (EXTEM, INTEM) in a bleeding patient. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2016, roč. 27, č.7, s. 828-830.
42. Durila M., Pavlicek P., Hadacova I., Nahlovsky J., Janeckova D. (2016). Endogenous Heparinoids May Cause Bleeding in Mucor Infection and can be Detected by

- Nonactivated Thromboelastometry and Treated by Recombinant Activated Factor VII: A Case Report. *Medicine Baltimore*, 2016, roč. 95, č. 8, eCollection.
43. Nguyen A., Dasgupta A., Wahed A. (2016). Coagulation-Based Tests and Their Interpretation, 2016. Dostupné z: www.sciencedirect.com
44. Haemoview diagnostics (2018), *Multiplate*, 2018, Brisbane Australia. Dostupné z: www.haemoview.com.au
45. Schlimp CJ., Cadamuro J., Solomon C., Redl H., Schöchl H. (2013). The effect of fibrinogen concentrate and factor XIII on thromboelastometry in 33% diluted blood with albumin, gelatine, hydroxyethyl starch or saline in vitro. *Blood Transfusion*, 2013, roč. 11, č. 4, s. 510-517.
46. Weiss G, Lison S, Spannagl M, Heindl B (2010). Expressiveness of global coagulation parameters in dilutional coagulopathy. *British Journal of Anaesthesia*, 2010, roč. 105, č. 4, s. 429–436.
47. Shin H. J., Na H. S. and Do S. H. (2015). The effects of acute normovolaemic haemodilution on peri-operative coagulation in total hip arthroplasty. *Anaesthesia*, 2015, roč. 70, č. 3, s. 304–309.
48. Ponschab M., Schöchl H., Keibl C., Fischer H., Redl H., Schlimp CJ. (2015). Preferential effects of low volume versus high volume replacement with crystalloid fluid in a hemorrhagic shock model in pigs. *BMC Anesthesiology*, 2015, roč. 15, č. 10, eCollection.
49. Li N., Statkevicius S., Asgeirsson B., Schött U. (2015). Effects of different colloid infusions on ROTEM and Multiplate during elective brain tumour neurosurgery. *Perioperative Medicine (London)*, 2015, roč. 4, č. 9.
50. Kam P., Liou J., Yang K. In vitro evaluation of the effect of haemodilution with dextran 40 on coagulation profile as measured by thromboelastometry and multiple electrode aggregometry. *Anaesthesia and Intensive Care*, 2017, roč. 45, č.5, s. 562-568.
51. Kind S.L., Spahn-Nett G.H, Emmert M.Y, Eismon J., Seifert B., Spahn D.R., Theusinger O.M. (2013). Is dilutional coagulopathy induced by different colloids reversible by replacement of fibrinogen and factor XIII concentrates? *Anesthesia&Analgesia*, 2013, roč. 117, č. 5, s. 1063-1071
52. Sigurjonsson J, Hedman D, Bansch P, Schött U. (2018). Comparison of dextran and albumin on blood coagulation in patients undergoing major gynaecological surgery. *Perioperative Medicine (London)*, 2018, roč. 7, č. 9, eCollection.

53. Boyd C.J., Claus M.A., Rasis A.L., Hosgood G., Sharp C.R., Smart L. (2018) Hypocoagulability and Platelet Dysfunction Are Exacerbated by Synthetic Colloids in a Canine Hemorrhagic Shock Model. *Frontiers in veterinary science*, 2018, roč. 13, č. 5, eCollection.
54. Reuteler A., Axiak-Flammer S., Howard J., Adamik K.N. (2017). Comparison of the effects of a balanced crystalloid-based and a saline-based tetrastarch solution on canine whole blood coagulation and platelet function. *Journal of veterinary emergency and critical care*, 2017, roč. 27, č. 1, s. 23-24.
55. Sawhney Ch., Subramanian A., Kaur M., Anjum A., Albert V., Soni K.D., Kumar A. Assessment of hemostatic changes after crystalloid and colloid fluid preloading in trauma patients using standard coagulation parameters and thromboelastography. *Saudi Journal of Anaesthesia*, 2013, roč. 7, č. 1, s. 48-56.
56. McBride D., Hosgood G., Rasis A., Smart L. (2016). Platelet closure time in anesthetized Greyhounds with hemorrhagic shock treated with hydroxyethyl starch 130/0.4 or 0.9% sodium chloride infusions. *Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio)*, 2016, roč. 26, č. 4, s. 509-515.
57. Golparvar M., Saghaei M., Hamidi H., Sajedi P., Kashefi P., Aghadavoudi O., Abbasi S. (2014). Comparative evaluation of the effects of hydroxyethyl starch on coagulation state of patients during brain tumor surgeries in comparison to crystalloids by thromboelastography. *Journal of research in medical sciences, the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 2014, roč. 19, č. 1, s. 8-12.

ORIGINAL ARTICLE

Stability of Non-Activated Rotational Thromboelastometry Assay in Time of Citrated Blood (Appropriate Time Interval for Analysis)

Miroslav Durila, Silvie Ševčíková, Tomáš Vymazal

Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

SUMMARY

Background: Activated methods of thromboelastometry such as EXTEM and INTEM are routinely used in management of severe bleeding. However, sometimes the patient is bleeding despite the normal values of EXTEM/INTEM. Non-activated thromboelastometry (NATEM) is the most sensitive to coagulopathy and shows pathologic results in such cases. However, it is necessary to find an appropriate time interval between blood sampling and NATEM analysis as the results are strongly influenced by time.

Methods: In 18 healthy volunteers we performed NATEM analyses of citrated blood samples at 0, 5, 10, 15, 20, 30, and 60 minutes after sampling.

Results: All NATEM parameters showed a procoagulation trend with the time elapsing from blood sample collection with coagulation time (CT) being the most sensitive parameter. After 20 minutes this parameter became relatively stable as the difference among CT at 20th, 30th, and 60th minute was not statistically significant ($p > 0.05$). The least differences of CT values with maximum time window were found between 30 and 60 minutes.

Conclusions: Citrated blood sample becomes stable after 20 minutes of storage but the time window between 30 and 60 minutes seems to be more suitable for NATEM analysis in clinical practice.

(Clin. Lab. 2016;62:2145-2148. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2016.160328)

Correspondence:

Miroslav Durila
Department of Anaesthesiology and
Intensive Care Medicine
Second Faculty of Medicine
Charles University in Prague
Motol University Hospital
V Uvalu 84
15006, Prague
Czech Republic
Phone: +42 224435401
Fax: +42 224435420
Email: durila4@gmail.com

KEY WORDS

Citrate, NATEM, non-activated, ROTEM, rotational thromboelastometry, storage

INTRODUCTION

Activated methods of thromboelastometry such as EXTEM and INTEM are routinely used in management of severe bleeding. However, sometimes the patient is bleeding despite the normal values of EXTEM/INTEM. Activators are useful in emergency situations when information about blood coagulation is needed as soon as possible but it has to be taken into consideration that kaolin can produce artifacts [1] and non-activated thromboelastometry (NATEM) can uncover coagulation disorders which are not detectable by activated methods as we described in our recently published papers [2,3]. For practical reasons citrate anticoagulation is used for transportation of blood sample to the laboratory for

analysis. However, the stability of citrated blood sample is influenced by time [4]. The aim of the study was to determine the most appropriate time point for NATEM analysis of citrated blood samples which would yield the most reliable results.

MATERIALS AND METHODS

This prospective study was approved by the Ethics Committee for Multi-Centric Clinical Trials of the University Hospital Motol. Informed consent was obtained from healthy volunteers prior to blood sampling. Twenty milliliters of blood was obtained by syringe and needle method using tourniquet and the blood was divided into four tubes (to prevent repeated pipette contact with blood which would occur if we had only one tube) containing 0.105 M sodium citrate with citrate concentration of 3.2%. NATEM (ROTEM, TEM International, Munich, Germany) was performed after 0, 5, 10, 15, 20, 30, and 60 minutes elapsed from sampling (after recalcification with 20 μ l of 0.2 M CaCl_2 Startem reagent (ROTEM, TEM international, Munich, Germany). Each tube was inverted 10x to mix blood sufficiently and used for blood sampling with automatic pipette maximally twice (to prevent bias caused by repeated contact with blood during pipetting) and the tube was prewarmed for 5 minutes in the ROTEM device before analysis. NATEM variable coagulation time (CT), clot formation time (CFT), α angle, and maximum clot firmness (MCF) were evaluated in the blood samples stored for 0, 5, 10, 15, 20, 30, and 60 minutes.

Statistical analysis

For data analysis GraphPad Prism 6.0 statistics program was used. Data were analyzed by repeated measures ANOVA, and Tukey's test was used for multiple comparison. Continuous data are represented as mean \pm SD. Statistical significance was described as p-value $<$ 0.05.

RESULTS

Blood samples were obtained from 18 healthy volunteers (aged 31 ± 5 years, 50% male and 50% female, weight 65 ± 15 kg, height 169 ± 15 cm). All NATEM parameters showed a procoagulation trend with time elapsing from blood sampling after 0, 5, 10, 15, 20, 30, and 60 minutes of storage (Figure 1). However, the CT parameter did not change significantly after 20 minutes of storage and values obtained after 20, 30, and 60 minutes did not differ significantly ($p >$ 0.05). The minimal difference between mean CT with maximal time span was found between values of 30 and 60 minutes, only 34 seconds (Table 1). Values of α angle did not differ significantly among 10, 15, 20, 30, and 60 minutes. Parameters CFT and MCF did not change significantly after 15, 20, 30, and 60 minutes. Mean \pm SD values of measured parameters are summarized in Table 1.

DISCUSSION

All NATEM parameters changed in procoagulation depending on storage time of citrated blood samples. However, after 20 minutes of storage all parameters were stable and did not differ significantly among 20, 30, and 60 minutes. This time period is sufficient to transport the blood sample from the patient to central laboratory and therefore it is very practical to use this time window in NATEM standardization process for clinical practice. Our finding is very similar to findings of other authors who found that native citrated thromboelastography (TEG) analysis should be carried out between 30 and 90 minutes, when the sample is stable [5, 6]. We also published a study recently where time suitable for native TEG analysis was between 15 to 30 minutes [7]. However, those studies were done on TEG but not on ROTEM. It is known that these two devices are not interchangeable [8,9], therefore studies on ROTEM are needed, as well. Meesters et al. recommend to use a standardized time point for NATEM analysis after blood withdrawal [4] - so do we, but more precisely, we recommend a time between 30 - 60 minutes (not immediate analysis after blood withdrawal) because the blood sample is the most stable in this time window, as the difference between mean CT values of 30 and 60 minutes is only 34 seconds (Table 1). Moreover, this time window could be used in other studies to set up a new scale of normal NATEM values. The reason why we obtained shorter values of CT and CFT in our study may be explained by different storage of the samples. Other authors such as Meesters, Vig, and Bowbrick stored samples at room temperature for the whole time before analysis. We kept the samples at room temperature as well, but we warmed them up to 37°C before initiation of the measurement by putting them into the ROTEM heater for 5 minutes. Thus, blood coagulation measurement started from 37°C blood temperature instead of room temperature. This could explain approximately 300 seconds difference between our results of CT and other authors' results. We do not know which approach is better but the aim of this study was to find out which time window is the most appropriate for clinical practice. In this point we are in accordance with other authors that 30 minutes waiting period seems to be the best for analysis of sample. A study for establishing a reference range after 30 minutes is necessary for NATEM.

Non-activated thromboelastometry is very useful in a clinical scenario when the patient is bleeding despite normal results of activated methods of ROTEM such as EXTEM, INTEM, or APTEM.

It is more sensitive to detection of fibrinolysis or detection of endogenous heparinoids present in mucor infection as we recently published [2,3]. Also Prakash et al. show that INTEM was not reliable in detecting hypocoagulation induced by heparin [10]. They observed that in 50% of cases INTEM CT was within normal range despite therapeutic dose of unfractionated heparin. On

Stability of NATEM of Citrated Blood in Time

Table 1. ROTEM parameters of citrated blood depending on time elapsed from sampling.

ROTEM parameters (mean ± SD)				
Time elapsed in minutes	CT (seconds)	CFT (seconds)	α angle (°)	MCF (mm)
0 citrate	932 ± 142	346 ± 110	43 ± 5	48 ± 4
5 citrate	779 ± 148	236 ± 71	51 ± 6	51 ± 4
10 citrate	660 ± 141	241 ± 116	55 ± 6	53 ± 4
15 citrate	595 ± 126	232 ± 109	56 ± 10	53 ± 4
20 citrate	529 ± 99	191 ± 60	58 ± 8	53 ± 5
30 citrate	486 ± 113	190 ± 71	59 ± 9	53 ± 5
60 citrate	452 ± 123	160 ± 48	61 ± 6	53 ± 5

CT - coagulation time, time from the start of the sample run to the first detectable clot formation (amplitude = 2 mm), CFT - clot formation time, time from CT to the clot amplitude of 20 mm (to specify the kinetics of the clot development), α angle - angle between the trace and the x-axis, MCF - maximum clot firmness.

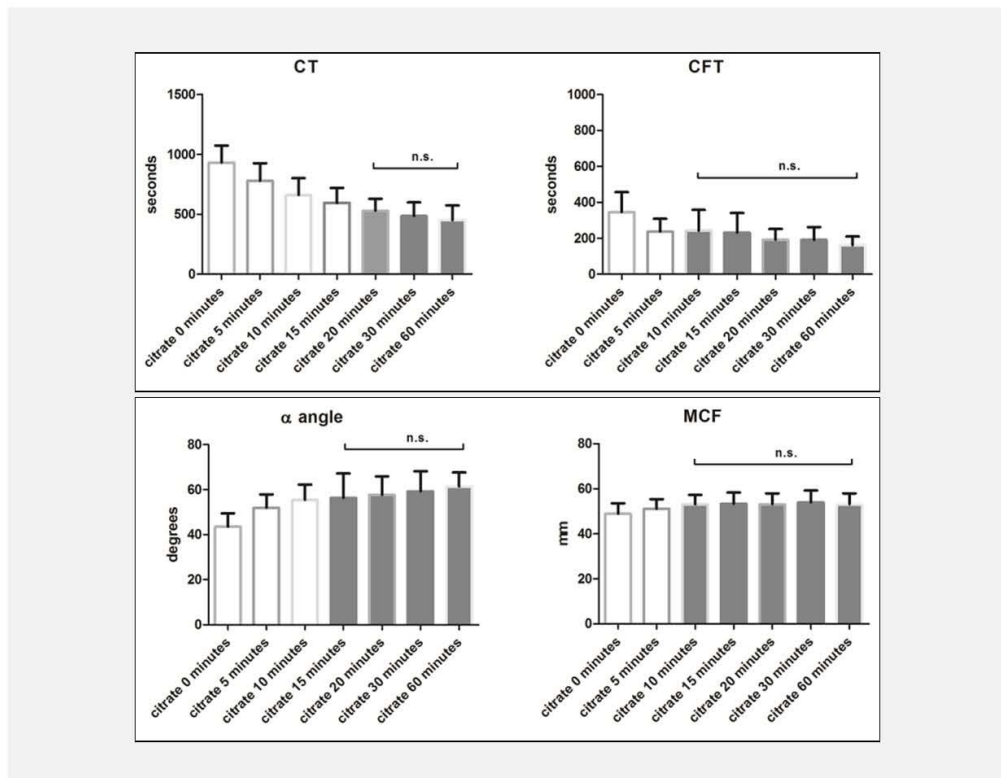


Figure 1. ROTEM citrate parameters influenced by time elapsed from blood sampling.

Parameters obtained by analyzing blood after 0, 5, 10, 15, 20, 30, and 60 minutes from sampling. Data represent mean ± standard deviation. n.s. = non-significant differences of values among all time points ($p > 0.05$) for each parameter. CT - coagulation time, time from the start of the sample run to the first detectable clot formation (amplitude = 2 mm), CFT - clot formation time, time from CT to the clot amplitude of 20 mm (to specify the kinetics of the clot development), α angle - angle between the trace and the x-axis, MCF - maximum clot firmness.

ORIGINAL ARTICLE

Effect of Balanced Crystalloid, Gelatin and Hydroxyethyl Starch on Coagulation Detected by Rotational Thromboelastometry *In Vitro*

Silvie Sevcikova, Tomas Vymazal, Miroslav Durila

Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Second Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

SUMMARY

Background: Fluid resuscitation with crystalloid and colloid solutions is a common treatment in perioperative medicine. However, a variety of unbalanced or balanced solutions are used in clinical practice and there is still vivid debate going on regarding selection of optimal fluid with minimal negative effect on coagulation to minimize bleeding and blood transfusion requirements. The aim of the study was to investigate adverse effects of balanced crystalloids and colloids on coagulation measured by thromboelastometry *in vitro*.

Methods: Blood samples were obtained from healthy volunteers undergoing knee arthroscopy. Adverse effects of balanced crystalloid, hydroxyethyl starch, and gelatin were evaluated by thromboelastometry after 20% dilution of blood with the solution *in vitro*. Parameters of EXTEM and FIBTEM test were evaluated.

Results: Clotting time of EXTEM was not significantly influenced by any of the investigated solutions ($p > 0.05$). However, significant impairment of clot formation time of EXTEM was detected in hydroxyethyl starch and gelatin groups in comparison with controls ($p < 0.05$), while crystalloid did not affect this parameter significantly ($p > 0.05$). Similar results were found in α angle although significant coagulopathy effect was found only in hydroxyethyl starch samples ($p < 0.05$). Maximum clot firmness of EXTEM and FIBTEM tests was significantly affected by both hydroxyethyl starch and gelatin ($p < 0.05$) but not by crystalloid.

Conclusions: Balanced crystalloid solution does not seem to have a negative influence on the coagulation process as measured by thromboelastometry. On the other hand, balanced colloids may impair propagation phase of coagulation, strength of coagulum, and level of functional fibrinogen. Hydroxyethyl starch seems to have a stronger anticoagulant effect compared to gelatin.

(Clin. Lab. 2017;63:1691-1700. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2017.170505)

Correspondence:

Miroslav Durila
Department of Anaesthesiology and
Intensive Care Medicine
Second Faculty of Medicine
Charles University and Motol University Hospital
V Úvalu 84
15006 Prague
Czech Republic
Phone: +420 224435401
Fax: +420 224435420
Email: miroslav.durila@fmotol.cz

KEY WORDS

balanced, coagulopathy, colloids, crystalloids, ROTEM, rotational thromboelastometry

INTRODUCTION

Fluid resuscitation with crystalloid and colloid solutions is a common treatment in perioperative medicine. A variety of crystalloid solutions such as 0.9% sodium chloride, Ringer's lactate and Plasma-Lyte, and colloid solutions such as hydroxyethyl starches (HES), gelatin or, rarely, albumin solutions are used in clinical practice [1]. However, there is vivid debate going on regarding selection of the optimal fluid when it comes to their ad-

verse effects on coagulation to prevent bleeding and minimise blood transfusion requirements. This is extremely important during management of life-threatening bleeding and, therefore, many clinicians are trying to look for the best fluid solution with minimal adverse effects on blood coagulation [2-4]. Nine percent sodium chloride (normal saline) is hypertonic with respect to sodium and chlorides, and balanced solutions are preferred for fluid resuscitation [5]. Sodium chloride at lower dilutions (10%) has a procoagulant effect while at higher dilutions it has an anticoagulant effect explained by impairment of thrombin formation and fibrin polymerisation [6-9]. Roche et al. also found increased r-time (reaction time, corresponding to an early clot formation) and reduced α -angle (indicating rate of clot formation) in thromboelastography (TEG) at higher dilutions (40 - 60%) [10]. This corresponds with a hypocoagulable state. Colloid solutions such as gelatins and modern starches also have great importance for perioperative and intensive care medicine. Based on their molecular structure, gelatins reach comparable volume effects with modern starches. Similarly, these solutions produce a hypocoagulation status when dilution of blood exceeds 40% although there are some minor differences between Gelofusine and 6% Voluven which can be detected by prolongation of r-time and reduction of α -angle and maximal amplitude of TEG [11-15]. Succinylated gelatin compared to other colloid solutions seems to be safe towards coagulation functions, but there is hardly enough available data [16,17].

Rotational thromboelastometry (ROTEM) is a method for assessment of the coagulation profile of the whole blood. It is a bed-side test which has been incorporated in recent European guidelines for management of perioperative and trauma bleeding management [18,19]. As it gives rapid information about the coagulation profile of whole blood it seems to be a more appropriate tool for assessment of adverse effects of crystalloids and colloids compared to standard coagulation tests such prothrombin time/activated partial thromboplastin time in perioperative setting.

Because balanced solutions of crystalloids and colloids are preferred in perioperative setting to unbalanced solutions, we decided to assess the adverse effects of Plasma-Lyte (crystalloid), Gelaspan (gelatin), and Tetraspan (hydroxyethyl starch) on coagulation detected by ROTEM *in vitro*. The aim of the study was to find the solution with minimal adverse effects on coagulation.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee for Multi-Centric Clinical Trials of the University Motol Hospital. Written informed consent was obtained from all participants.

Blood samples were obtained from 20 healthy volunteers undergoing knee arthroscopy (aged 34 ± 6 years, body mass index 18 - 25, 50% male and 50% female).

All patients were non-smokers, with no bleeding tendency in history, and no laboratory coagulopathy. None of the patients was on any anticoagulant or antiplatelet therapy, or contraceptive drugs.

Before induction of general anaesthesia, 8 mL venous blood samples were obtained from patients using needle and syringe method. Subsequently, blood samples were divided into four 2 mL tubes containing 0.105 M of sodium citrate with citrate concentration of 3.2% (to prevent otherwise repeated pipetting leading to clotting activation). The standard amount of blood for ROTEM assessment is 300 μ L. In order to achieve a 20% dilution of the sample, 60 μ L of crystalloid or colloid solution was added to the sample (we decided to make 20% dilutions of blood samples to mimic the *in vivo* conditions, as usually 1000 mL of fluid solution is administered to the patient during the procedure. Assuming that an adult has 5 L of blood, then administering of 1000 mL of fluid is expected to produce 20% dilution of blood). Three kinds of fluid solutions were tested for their anticoagulant effect: crystalloid (Plasma-Lyte, isotonic, BAXTER, USA), gelatin (Gelaspan[®] 4%, isotonic, B BRAUN, Germany) and hydroxyethyl starch (Tetraspan 6%, 130/0.42, isotonic, B BRAUN, Germany). Thromboelastometry tests EXTEM and FIBTEM were performed (EXTEM for investigating the extrinsic pathway of coagulation, as it plays a critical role in coagulation according to cell-based models of coagulation, and FIBTEM to investigate the functional fibrinogen level). The first two channels were used for analysis of control samples (without added solution) and the other 6 channels were used for the analysis of the effects of the chosen solutions on coagulation). Therefore two ROTEM devices were used simultaneously in this study. The following thromboelastometry parameters were measured and analysed: clotting time (CT, time to first detectable fibrin formation), α -angle and clot formation time (CFT, representing kinetics of clot formation), maximum clot firmness (MCF, maximal strength of agulum). Thromboelastometry tests were performed 30 minutes from obtaining blood samples as this time period is necessary to ensure stability of citrated sample [20].

Statistical analysis

GraphPad Prism 6.0 statistics program was used for data analysis. Data were analysed by Paired-T test and statistical significance was described as $p < 0.05$.

RESULTS

We did not find statistically significant adverse effects of any investigated solution on the EXTEM CT parameter compared to controls ($p > 0.05$) (Figure 1-3). Moreover, crystalloid had a procoagulant effect as CT was shortened comparing to controls ($p < 0.05$). On the other hand, a statistically significant hypocoagulable effect was found in the EXTEM CFT parameter after addition

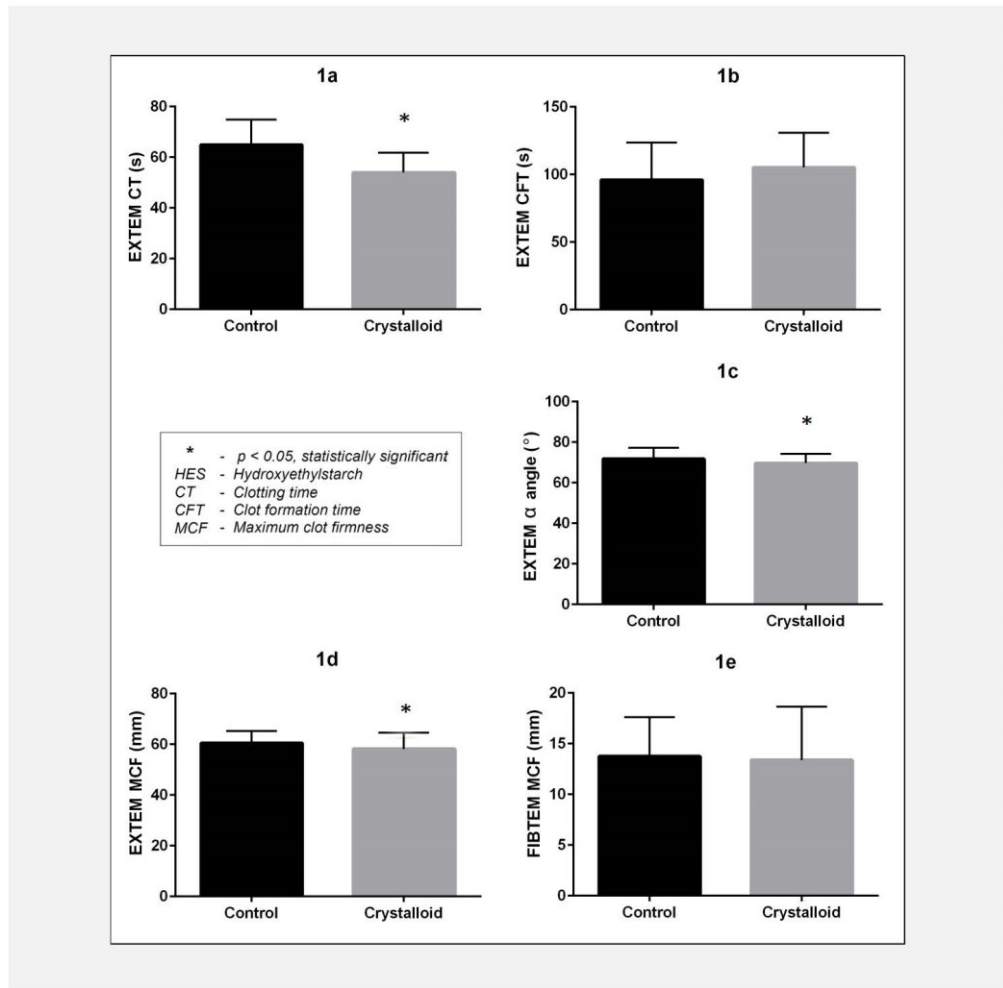


Figure 1. Effect of crystalloid on coagulation measured by thromboelastometry.

1a - 1e, in all graphs the first column (black) shows the coagulation state of ROTEM parameter of native blood-control. The second column represents changes in coagulation after adding crystalloid to the native blood in respective ROTEM-EXTEM parameters: CT - clotting time, CFT - clot formation time, angle α , MCF - maximum clot firmness, and changes in ROTEM-FIBTEM parameters: MCF - maximum clot firmness.

of hydroxyethyl starch and gelatin in comparison with controls ($p < 0.05$), while crystalloid did not affect CFT parameter significantly ($p > 0.05$) (Figure 1 - 3). In α angle parameter's significant coagulopathy effect was found after adding all solutions ($p < 0.05$) (Figure 1 - 3). Similarly, the parameter EXTEM MCF was significantly diminished after all solution ($p < 0.05$) (Figure 1

- 3). However, FIBTEM MCF was significantly affected only by hydroxyethyl starch ($p < 0.05$) (Figure 2). The coagulopathy effect of hydroxyethyl starch compared to crystalloids was significantly higher ($p < 0.05$) in all parameters (Figure 4), while adverse effects of gelatin were detected only in the parameter CFT and EXTEM MCF (Figure 5). Also, coagulopathy effects of

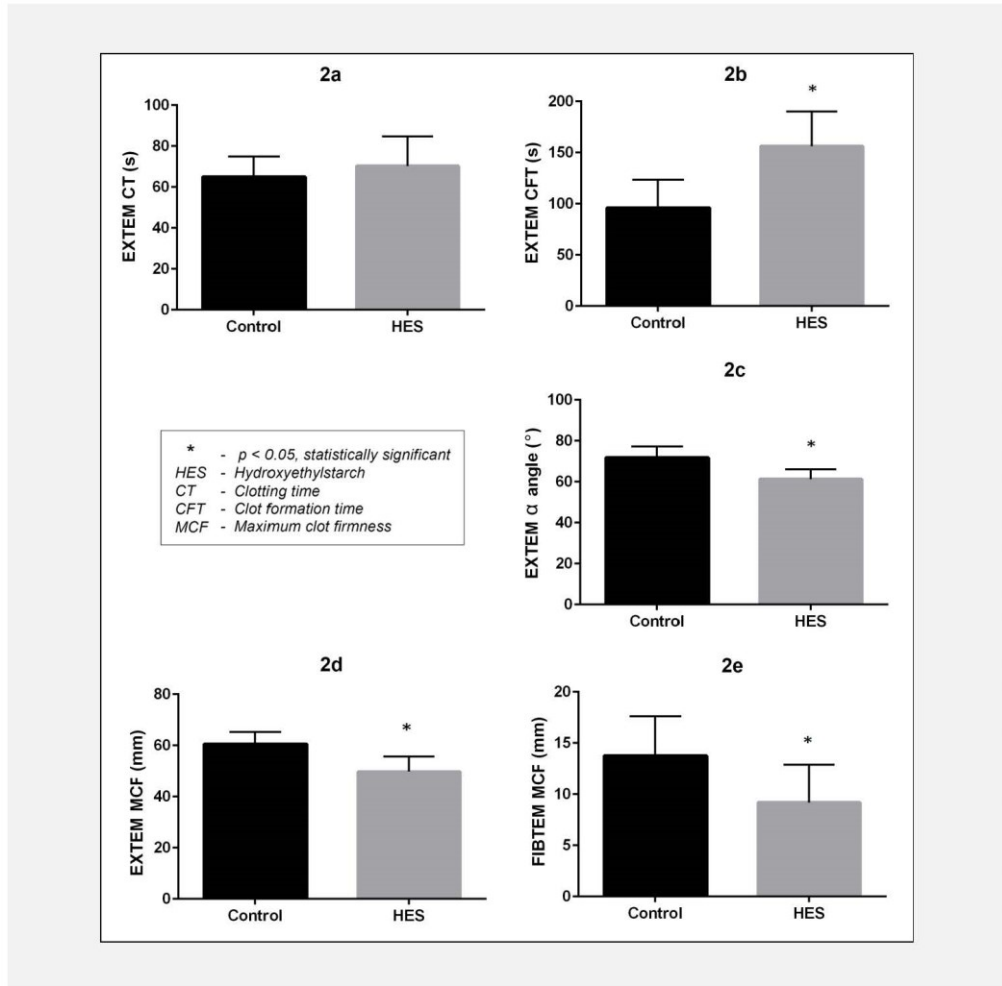


Figure 2. Effect of hydroxyethyl starch on coagulation measured by thromboelastometry.

2a - 2e, in all graphs the first column (black) shows the coagulation state of ROTEM parameter of native blood-control. The second column represents changes in coagulation after adding hydroxyethyl starch to the native blood in respective ROTEM-EXTM parameters: CT - clotting time, CFT - clot formation time, angle α, MCF - maximum clot firmness, and changes in ROTEM-FIBTEM parameters: MCF - maximum clot firmness.

hydroxyethyl starch were significantly higher in all parameters except EXTEM MCF compared to gelatin ($p < 0.05$) (Figure 6).

DISCUSSION

According to the results of our study crystalloid solution (Plasma-Lyte) seems to have a minimal effect on coagulation comparing to colloids. We studied changes of ROTEM parameters produced by a 20% dilution of blood samples because this dilution mimics the most

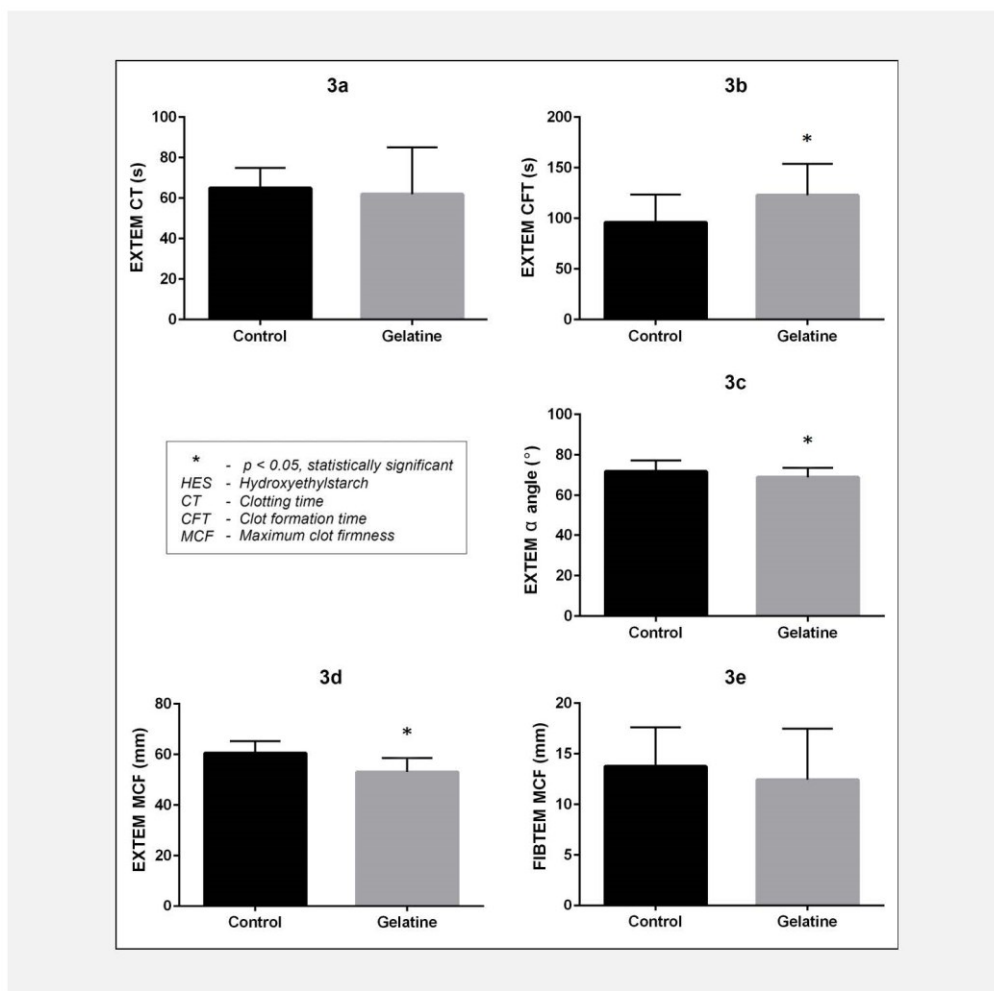


Figure 3. Effect of gelatine on coagulation measured by thromboelastometry.

3a - 3e, in all graphs the first column (black) shows the coagulation state of ROTEM parameter of native blood-control. The second column represents changes in coagulation after adding hydroxyethyl starch to the native blood in respective ROTEM-EXTEM parameters: CT - clotting time, CFT - clot formation time, angle α , MCF - maximum clot firmness, and changes in ROTEM-FIBTEM parameters: MCF - maximum clot firmness.

common daily situation in the perioperative setting in the operation theatre. The amount of 1000 mL of fluid solution is infused perioperatively to most of the patients during any surgical procedure. Assuming that an adult has 5 L of blood, then administering of 1000 mL of fluid is expected to produce 20% dilution in this patient. Therefore, we believe that 20% dilution is the

most practical to study coagulopathy effects of fluids on coagulation.

In our study, a crystalloid solution disturbed coagulation negatively (hypocoagulation) only in the parameter EXTEM MCF but positively (hypercoagulation) in the parameter CT and α -angle. Other authors such as Ponschab et al. used crystalloids for fluid resuscitation in

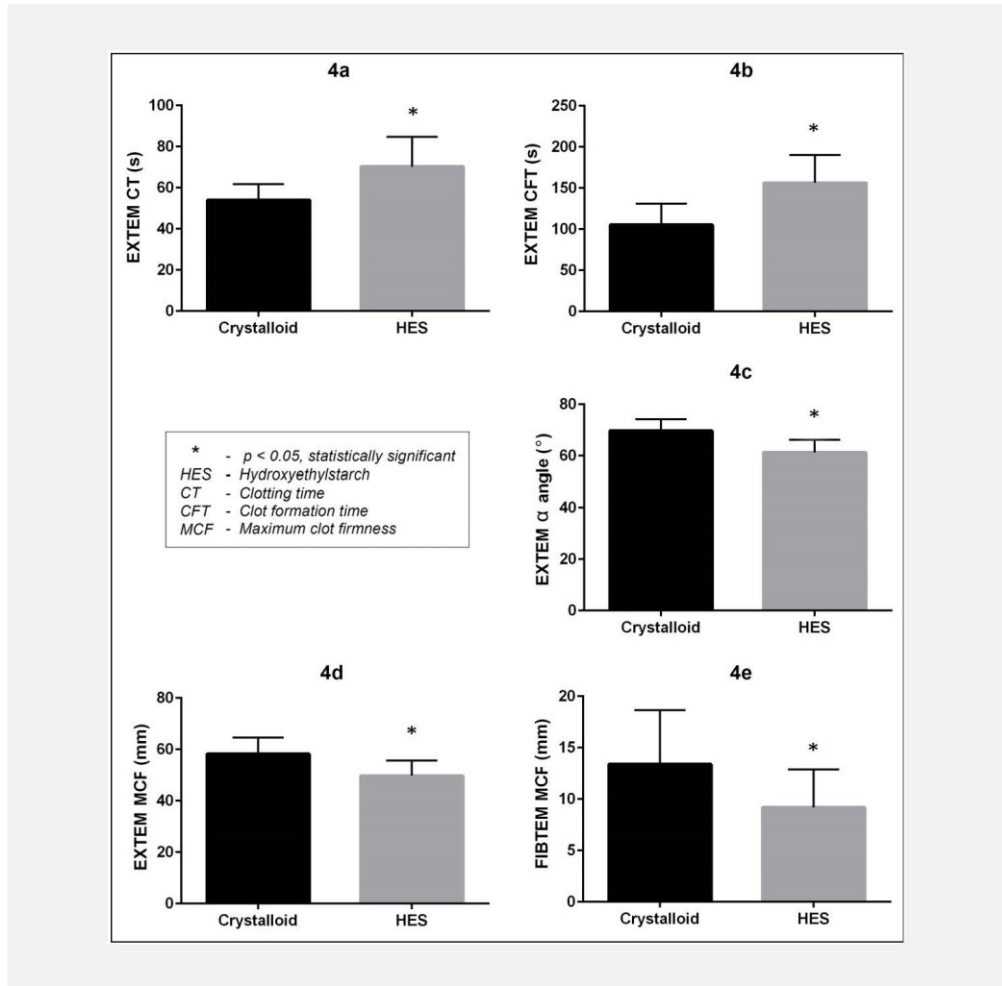


Figure 4. Comparison of coagulopathy effect of crystalloid versus hydroxyethyl starch on coagulation measured by thromboelastometry.

4a - 4e, in all graphs the first column (black) shows the coagulation state of ROTEM parameter of native blood-control. The second column represents changes in coagulation after adding hydroxyethyl starch to the native blood in respective ROTEM-EXTEM parameters: CT - clotting time, CFT - clot formation time, angle α , MCF - maximum clot firmness, and changes in ROTEM-FIBTEM parameters: MCF - maximum clot firmness.

hemorrhagic shock on pigs and describe impairment of coagulation evaluated by thromboelastometric measurement, however, the dilution was over 32% which is higher than ours [21]. On the other hand, Sawhney et al. described a hypercoagulation effect of crystalloid detected by thromboelastography method (decrease of K

parameter and increase of MA parameter) after loading the trauma patient with 1 L of Ringer's lactate and normal saline [22].

Their result may be different from ours because we used a balanced crystalloid solution which seems to have less influence on the coagulation process. Moreover, Ring-

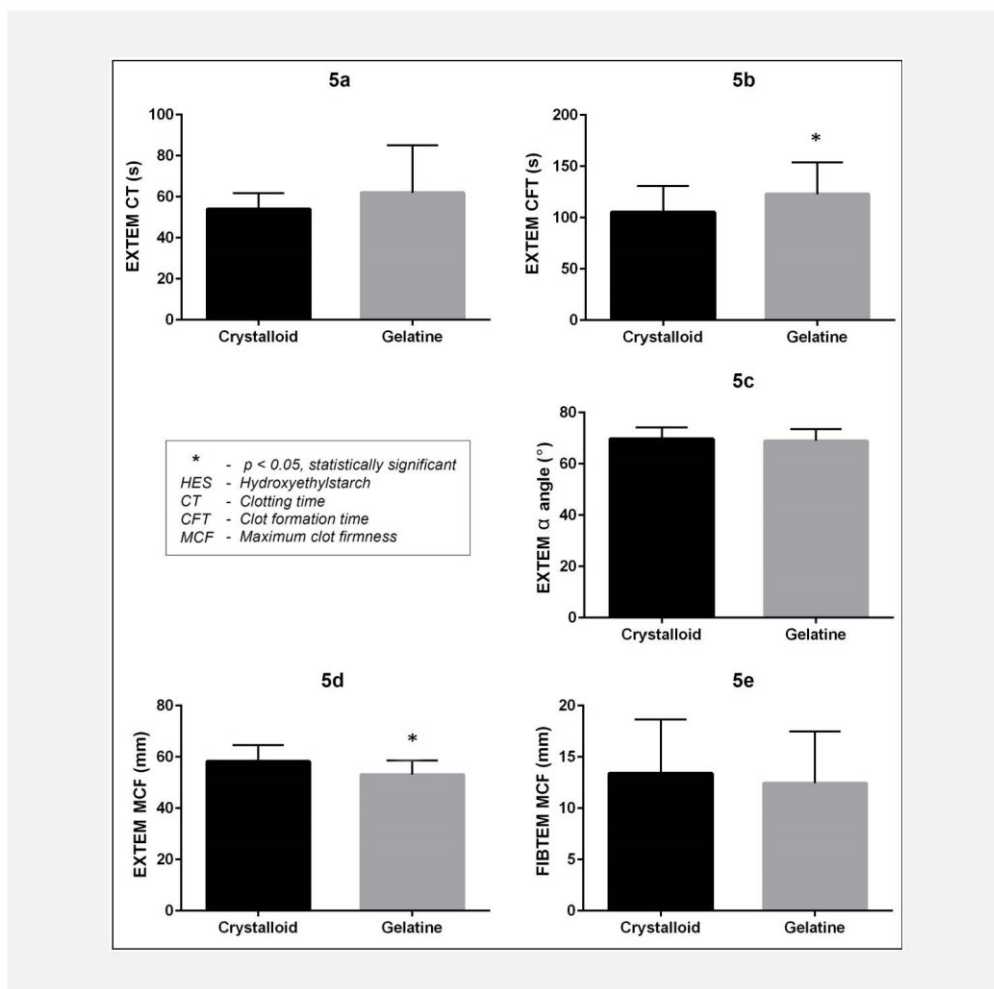


Figure 5. Comparison of coagulopathy effect of crystalloid versus gelatine on coagulation measured by thromboelastometry.

5a - 5e, in all graphs the first column (black) shows the coagulation state of ROTEM parameter of native blood-control. The second column represents changes in coagulation after adding hydroxyethyl starch to the native blood in respective ROTEM-EXTEM parameters: CT - clotting time, CFT - clot formation time, angle α , MCF - maximum clot firmness, and changes in ROTEM-FIBTEM parameters: MCF - maximum clot firmness.

er's lactate is not an appropriate solution in patients with a high level of lactate, and in bleeding patients there is always tissue hypoperfusion accompanied by hyperlactatemia. Therefore, we did not test this solution and in clinical practice we prefer balanced solutions. The situation regarding colloids seems to be more complicated than crystalloids. Dilution of blood samples by

HES (Tetraspan 6%) and gelatin (Gelaspan 4%) produces hypocoagulation in many ROTEM parameters. We observed significant impairment of the propagation phase of coagulation represented by EXTEM CFT and α -angle parameters produced by both HES and gelatin. Both types of colloid significantly impaired the firmness of the coagulum represented by the EXTEM MCF

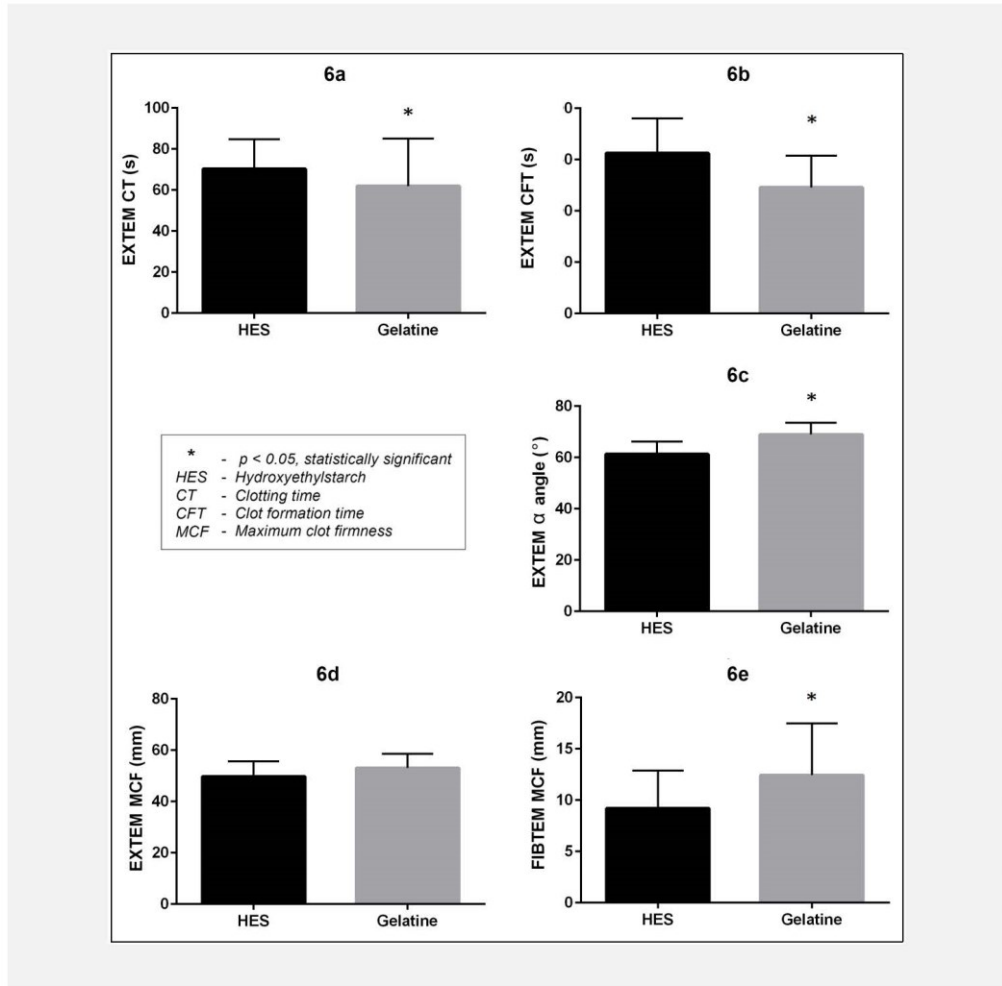


Figure 6. Comparison of coagulopathy effect of hydroxyethyl starch versus gelatine on coagulation measured by thromboelastometry.

6a - 6e, in all graphs the first column (black) shows the coagulation state of ROTEM parameter of native blood-control. The second column represents changes in coagulation after adding hydroxyethyl starch to the native blood in respective ROTEM-EXTEM parameters: CT - clotting time, CFT - clot formation time, angle α , MCF - maximum clot firmness, and changes in ROTEM-FIBTEM parameters: MCF - maximum clot firmness.

parameter, and HES also decreased the level of functional fibrinogen represented by the parameter FIBTEM MCF. The initiation phase of coagulation represented by EXTEM CT was not significantly affected by any colloid solution. Our results are in accordance with Sawhney et al. who also found that administering 1 L of

HES to trauma patients affects both conventional tests and thromboelastography more than gelatin [22]. Many other authors describe hypocoagulation effects of colloids on coagulation measured by thromboelastometry or prothrombin time [2,4,23-25]. Rasmussen et al. in his systematic review even describes that using HES in

noncardiovascular surgery is accompanied with increased blood loss compared to crystalloids [26]. On the other hand, Kaczynski et al., in a literature review, refer to the fact that crystalloids such as 0.9% Isotonic Saline and Ringer's lactate can cause either a hypercoagulable or hypocoagulable status depending on the percentage of dilution [27]. All those authors studied effects of solutions which have recently seen a decreased use in practice with more balanced crystalloid (Plasma-Lyte, isotonic) and colloid (Gelaspan® 4%, isotonic, Tetraspan 6%, 130/0,42, isotonic) solutions preferred nowadays. Kaczynski studied the effects of thrombelastography (TEG) which is a slightly different method than ROTEM, and the results of both methods might diverge. Despite the many studies done so far, current evidence of an ideal fluid with minimal influence on coagulation is still missing and therefore studies investigating effects of balanced crystalloids and colloids on coagulation are needed. Because of the above mentioned reasons, we believe that this paper brings new information to this topic.

The limitation of the study is an emerging question whether coagulopathy detected in our study is a result of a direct effect of the solutions used on coagulation or indirect - diluting effects caused by the dilution itself. We believe that 20% dilution of blood does not produce dilution of coagulation factors because we found that the samples in the crystalloid group did not differ from control samples.

CONCLUSION

According to our results, the balanced crystalloid solution seems to have minimal adverse effects on coagulation as measured by ROTEM. On the other hand, colloids may impair the propagation phase of coagulation and strength of coagulum and negatively influence the level of functional fibrinogen. Hydroxyethyl starch seems to have a stronger anticoagulant effect compared to gelatin.

Acknowledgement:

This study was supported by projects of Ministry of Health for conceptual development Research organization (No. 00064203) Motol Hospital.

Financial Support:

The study was supported by the Ministry of Health, Czech Republic - Conceptual Development of Research Organization, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic 00064203.

Declaration of Interest:

The authors proclaim that they do not have any conflict of interest.

References:

1. Myburgh JA, Mythen MG. Resuscitation fluids. *N Engl J Med* 2013;369(25):2462-3 (PMID: 24350966).
2. Shin HJ, Na HS, Do SH. The effects of acute normovolaemic hemodilution on peri-operative coagulation in total hip arthroplasty. *Anaesthesia* 2015;70(3):304-9 (PMID: 25266198).
3. Marx G, Schuerholz T. Fluid-induced coagulopathy: does the type of fluid make a difference? *Crit Care* 2010;14(1):118 (PMID: 20236489).
4. Schlimp CJ, Cadamuro J, Solomon C, Redl H, Schochl H. The effect of fibrinogen concentrate and factor XIII on thromboelastometry in 33% diluted blood with albumin, gelatine, hydroxyethyl starch or saline *in vitro*. *Blood Transfus* 2013;11(4):510-7 (PMID: 23245725).
5. Kuca T, Butler MB, Erdogan M, Green RS. A comparison of balanced and unbalanced crystalloid solutions in surgery patient outcomes. *Anaesth Crit Care Pain Med* 2016 (PMID: 27856390).
6. Coats TJ, Brazil E, Heron M. The effects of commonly used resuscitation fluids on whole blood coagulation. *Emerg Med J* 2006;23(7):546-9 (PMID: 16794099).
7. Ruttman TG, James MF, Wells KF. Effect of 20% *in vitro* hemodilution with warmed buffered salt solution and cerebrospinal fluid on coagulation. *Br J Anaesth* 1999;82(1):110-1 (PMID: 10325846).
8. Brazil EV, Coats TJ. Sonoclot coagulation analysis of *in vitro* hemodilution with resuscitation solutions. *J R Soc Med* 2000;93(10):507-10 (PMID: 11064686).
9. Sorensen B, Fries D. Emerging treatment strategies for trauma-induced coagulopathy. *Br J Surg* 2012;99 Suppl 1:40-50 (PMID: 22441854).
10. Roche AM, James MF, Bennett-Guerrero E, Mythen MG. A head-to-head comparison of the *in vitro* coagulation effects of saline-based and balanced electrolyte crystalloid and colloid intravenous fluids. *Anesth Analg* 2006;102(4):1274-9 (PMID: 16551936).
11. Doran C. Hydroxyethyl starch for resuscitation of trauma patients. *J R Army Med Corps* 2007;153(3):154-9 (PMID: 18200907).
12. Coats TJ, Brazil E, Heron M, MacCallum PK. Impairment of coagulation by commonly used resuscitation fluids in human volunteers. *Emerg Med J* 2006;23(11):846-9 (PMID: 17057135).
13. Ogilvie MP, Pereira BM, McKenney MG, et al. First report on safety and efficacy of hetastarch solution for initial fluid resuscitation at a level I trauma center. *J Am Coll Surg* 2010;210(5):870-80, 880-2 (PMID: 20421069).
14. Ogilvie MP, Ryan ML, Proctor KG. Hetastarch during initial resuscitation from trauma. *J Trauma* 2011;70 (5 Suppl):S19-21 (PMID: 21841562).
15. Ekseth K, Abildgaard L, Vegfors M, Berg-Johnsen J, Engdahl O. The *in vitro* effects of crystalloids and colloids on coagulation. *Anaesthesia* 2002;57(11):1102-8 (PMID: 12428635).
16. Lobo DN, Stanga Z, Aloysius MM, et al. Effect of volume loading with 1 liter intravenous infusions of 0.9% saline, 4% succinylated gelatine (Gelifusine) and 6% hydroxyethyl starch (Voluven) on blood volume and endocrine responses: a randomized, three-way crossover study in healthy volunteers. *Crit Care Med* 2010;38(2):464-70 (PMID: 19789444).

17. Thomas-Rueddel DO, Vlasakov V, Reinhart K, et al. Safety of gelatin for volume resuscitation-a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 2012;38(7):1134-42 (PMID: 22527076).
18. Kozek-Langenecker SA, Ahmed AB, Afshari A, et al. Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European Society of Anaesthesiology: First update 2016. *Eur J Anaesthesiol* 2017 Jun;34(6):332-95 (PMID: 28459785).
19. Rossaint R, Bouillon B, Cerny V, et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. *Crit Care* 2016;20:100 (PMID: 27072503).
20. Bowbrick VA, Mikhailidis DP, Stansby G. The use of citrated whole blood in thromboelastography. *Anesth Analg* 2000;90(5):1086-8 (PMID: 10781457).
21. Ponschab M, Schochl H, Keibl C, Fischer H, Redl H, Schlimp CJ. Preferential effects of low volume versus high volume replacement with crystalloid fluid in a hemorrhagic shock model in pigs. *BMC Anesthesiol* 2015;15:133 (PMID: 26445090).
22. Sawhney C, Subramanian A, Kaur M, et al. Assessment of hemostatic changes after crystalloid and colloid fluid preloading in trauma patients using standard coagulation parameters and thromboelastography. *Saudi J Anaesth* 2013;7(1):48-56 (PMID: 23717233).
23. Mauch J, Madjdpour C, Kutter AP, et al. Effect of rapid fluid resuscitation using crystalloids or colloids on hemostasis in piglets. *Paediatr Anaesth* 2013;23(3):258-64 (PMID: 23279083).
24. Liang H, Yang CX, Li H, Liu HZ, Wang HB. [Effects of preoperative acute hypervolemic hemodilution on hypercoagulability of patients with colon cancer]. *Ai Zheng* 2006;25(10):1256-60 (PMID: 17059771).
25. Golparvar M, Saghaei M, Hamidi H, et al. Comparative evaluation of the effects of hydroxyethyl starch on coagulation state of patients during brain tumor surgeries in comparison to crystalloids by thromboelastography. *J Res Med Sci* 2014;19(1):8-12 (PMID: 24672558).
26. Rasmussen KC, Secher NH, Pedersen T. Effect of perioperative crystalloid or colloid fluid therapy on hemorrhage, coagulation competence, and outcome. A systematic review and stratified meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(31):e4498 (PMID: 27495098).
27. Kaczynski J, Wilczynska M, Hilton J, Fligelstone L. Impact of crystalloids and colloids on coagulation cascade during trauma resuscitation - a literature review. *Emergency Medicine and Health Care* 2013;1(1) <http://www.hoajonline.com/emergmedhealthcare/2052-6229/1/1>



REVISTA
BRASILEIRA DE
ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



SCIENTIFIC ARTICLE

Rotational thromboelastometry assessment of
balanced crystalloid, hydroxyethyl starch and gelatin
effects on coagulation: a randomized trial

Silvie Sevcikova, Miroslav Durila ¹*, Tomas Vymazal

Charles University and Motol University Hospital, Second Faculty of Medicine, Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Prague, Czech Republic

Received 19 October 2018; accepted 17 March 2019

KEYWORDS

Arthroscopy;
Coagulopathy;
Crystalloids;
Gelatin;
Hydroxyethyl starch;
Rotational
thromboelastometry

Abstract

Background and objectives: Modern crystalloid and colloid solutions are balanced solutions which are increasingly used in perioperative period. However, studies investigating their negative effect on whole blood coagulation are missing, and vivid debate is going on about which solution has the minimal coagulopathy effect. The aim of our study was to assess the effect of modern fluid solutions on whole blood coagulation using rotational thromboelastometry.

Methods: Blood samples were obtained from 30 patients during knee arthroscopy before and after administration of 500 mL of crystalloid, Hydroxyethyl Starch and gelatin according to the randomization. Rotational thromboelastometry (EXTEM, INTEM and FIBTEM tests) was used to assess negative effect of fluid solutions on whole blood coagulation.

Results: In EXTEM test, the initiation phase of fibrin clot formation represented by CT parameter was not influenced by any fluid solution ($p > 0.05$). The speed of clot formation represented by CFT and α angle was impaired by Hydroxyethyl Starch and gelatin but not by crystalloids ($p < 0.05$). The strength of formatted coagulum represented by MCF parameter was impaired both in EXTEM and FIBTEM test by HES and in FIBTEM also by crystalloids ($p < 0.05$). INTEM test was not negatively influenced by any crystalloid or colloid solution in any parameter ($p > 0.05$).
Conclusion: EXTEM test appears to be sensitive to coagulopathy effect of modern colloids and crystalloids. Hydroxyethyl starch has the most obvious negative effect on clot formation followed by gelatin and finally by crystalloids. INTEM test seems to be insensitive to adverse effect of modern colloids and crystalloids.

© 2019 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Anestesiologia. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author.
E-mail: miroslav.durila@fnmotol.cz (M. Durila).

<https://doi.org/10.1016/j.bjane.2019.04.007>

0104-0014/© 2019 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Anestesiologia. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article in press as: Sevcikova S, et al. Rotational thromboelastometry assessment of balanced crystalloid, hydroxyethyl starch and gelatin effects on coagulation: a randomized trial. Rev Bras Anesthesiol. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2019.04.007>

PALAVRAS-CHAVE

Artroscopia;
Coagulopatia;
Cristaloides;
Gelatina;
Hidroxiethylamido;
Tromboelastometria
rotacional

Tromboelastometria rotacional na avaliação dos efeitos de cristaloides balanceados, hidroxietilamido e gelatina na coagulação: estudo randômico

Resumo

Justificativa e objetivos: Os cristaloides e coloides modernos são soluções balanceadas e cada vez mais utilizadas no período perioperatório. No entanto, não há estudos avaliando seu efeito negativo na coagulação do sangue total e o intenso debate sobre a solução que cause um efeito mínimo na coagulopatia permanece. O objetivo de nosso estudo foi avaliar o efeito das soluções líquidas modernas na coagulação do sangue total usando a tromboelastometria rotacional.

Métodos: De acordo com a randomização, amostras de sangue foram colhidas de 30 pacientes durante a artroscopia de joelho, antes e após a administração de 500 mL de cristaloides, hidroxietilamido e gelatina. A tromboelastometria rotacional (testes EXTEM, INTEM e FIBTEM) foi utilizada para avaliar o efeito negativo das soluções líquidas na coagulação do sangue total.

Resultados: No teste EXTEM, a fase de iniciação da formação de coágulos de fibrina representada pelo parâmetro CT não foi influenciada por nenhuma solução líquida ($p > 0,05$). A velocidade da formação de coágulos representada pelo CFT e pelo ângulo α foi prejudicada pelo hidroxietilamido e pela gelatina, mas não pelos cristaloides ($p < 0,05$). A força do coágulo formatado representado pelo parâmetro MCF foi prejudicada tanto no teste EXTEM quanto no teste FIBTEM pelo HES e no teste FIBTEM também pelos cristaloides ($p < 0,05$). O teste INTEM não foi influenciado negativamente por nenhuma solução cristalóide ou colóide em nenhum parâmetro ($p > 0,05$).

Conclusão: O teste EXTEM parece ser sensível ao efeito de coagulopatia dos coloides e cristaloides modernos. O hidroxietilamido apresentou o efeito negativo mais óbvio na formação do coágulo, seguido pela gelatina e finalmente pelos cristaloides. O teste INTEM parece ser insensível ao efeito adverso dos coloides e cristaloides modernos.

© 2019 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Crystalloid and colloid solutions are used to maintain adequate tissue perfusion during perioperative period as well as during treatment of any kind of shock in critically ill patients. A variety of crystalloids and colloids are used in clinical practice. Basic saline solution has been used for over 50 years in a multitude of clinical situations despite its unphysiological properties^{1,2} and from unbalanced colloids Hydroxyethyl Starch (HES) and gelatin are used very often. Recently, modern crystalloid and colloid solutions called balanced (more physiologic) solutions with a chemical composition that approximates extracellular space, are increasingly used in clinical practice and according to published studies they seem to be more beneficial for majority of patients comparing to unbalanced fluid solutions.²⁻⁴ They contain high molecular weight substances and under optimal condition, especially when the glycocalyx is intact, they remain in circulation for longer time than crystalloids.¹⁻⁵ According to previous studies, unbalanced colloids HES and gelatin alter haemostasis to some degree but data on balanced colloids are missing.⁶⁻⁹ As it is still frequently discussed which type of solution should be preferred in the perioperative care and life threatening bleeding, the study investigating coagulopathy effect of balanced fluid solutions is needed.

Rotational Thromboelastometry (ROTEM) is a bed-side whole blood coagulation test which evaluates viscoelastic

properties of formed coagulum during all phases of coagulation such as initiation, propagation (the speed of clot formation), strength of coagulum and stability of the clot represented by fibrinolysis.¹⁰ Comparing to plasma coagulation tests such as Prothrombin Time (PT) and Activated Thromboplastin Time (aPTT), ROTEM provides results within 10 min from initiation of the test, which is critical in situations of life threatening bleeding in operating room or in trauma patients. ROTEM has been included in recent European guidelines for perioperative and trauma bleeding management by the European Society of Anaesthesiologists.^{11,12}

In our study we decided to investigate the coagulopathy effect of modern balanced crystalloid and colloid solutions using ROTEM *in vivo*. The aim of this study was to find the fluid solution with minimal negative effect on whole blood coagulation assessed by ROTEM.

Methods

The project was approved by the Ethics Committee for Multi-Centric Clinical Trials of the University Hospital Motol and informed consent was obtained from all participants. As in human studies it is very challenging to investigate large number of patients we decided to enrol to study and obtain blood samples from 30 healthy patients who were undergoing knee arthroscopy (aged 44 ± 7 years; body mass index 25 ± 2.5 ; 15 males, 15 females; no comorbidities; ASA 1 – according to classification of American Society of Anaesthesiologists).

Please cite this article in press as: Sevcikova S, et al. Rotational thromboelastometry assessment of balanced crystalloid, hydroxyethyl starch and gelatin effects on coagulation: a randomized trial. Rev Bras Anestesiol. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2019.04.007>

All patients were non-smokers, not taking any drugs influencing coagulation (contraceptive, anticoagulant or antiplatelet therapy) and without history of any coagulopathy disorder. Before the induction of general anaesthesia, 2 mL of venous blood were obtained from patients into 2 mL tube containing 0.105 M of sodium citrate with citrate concentration of 3.2%. This sample was used as a control and following thromboelastometry tests were performed: EXTEM for analysing extrinsic pathway of coagulation (contains activator of extrinsic pathway of coagulation), INTEM for analysing intrinsic pathway of coagulation (contains activator of intrinsic pathway of coagulation), FIBTEM for assessment of functional fibrinogen level (contains antiplatelet substance). The following ROTEM parameters were evaluated: CT – clotting time, representing initiation phase of coagulation (time to first detectable fibrin formation), α angle and CFT – clot formation time, both representing propagation phase of coagulation, MCF – maximum clot firmness. To evaluate platelet function, according to the authors Solomon et al., the difference between values of EXTEM MCF (depends on level of fibrinogen and platelet function) and FIBTEM MCF (depends on fibrinogen level) was calculated and derived as parameter MCE (maximum clot elasticity attributable to platelets, parameter representing platelets function and their component in EXTEM MCF).¹³

In clinical practice the drop of blood pressure after induction of general anaesthesia is usually treated by administering some fluid solution depending on preferences of the anaesthetist. In our study the type of fluid was chosen according to randomization of patients into three equal groups using generator of random numbers in spread sheet. The first group of patients was infused 500 mL of balanced crystalloid Plasma-Lyte (isotonic, BAXTER, USA). The second group was infused 500 mL of balanced colloid Volulyte 6% representing hydroxyethyl starch (130/0.4, isotonic, FRESENIUS KABI, Germany) and the third group was infused 500 mL of balanced colloid Gelaspan 4% representing gelatin solution (isotonic, B BRAUN, Germany). Described volume of 500 mL was chosen as it is routinely used in daily practice to treat arterial hypotension induced by anaesthetic drugs. Fifteen minutes after the solution was completely infused into the patient another blood sample was obtained and thromboelastometry basic tests EXTEM, INTEM and FIBTEM were performed again to identify presence of any coagulation changes as compared to the control samples.

To rule out potential bias caused by different dilution effect of different types of solution on coagulation (as it is generally believed that colloids stay longer in blood vessels comparing to crystalloids), haemoglobin level was measured before and after infusion simultaneously with blood sampling for ROTEM.

Statistical analysis

For data analysis the GraphPad Prism 6.0 statistics program was used. Nonparametric Wilcoxon matched-pairs signet rank test was used for analyses of ROTEM parameters. For haemoglobin measurement comparing decrease in haemoglobin in percentage after fluid administration among all three types of fluid solution nonparametric

Kruskal–Wallis test of one-way ANOVA was used. Statistical significance was described as two-tailed p -value <0.05 .

Results

When investigating extrinsic pathway of coagulation using EXTEM test, no statistically significant adverse effect of crystalloids or HES/gelatin on initiation phase of fibrin clot formation represented by CT parameter was observed ($p > 0.05$) (Fig. 1A–C). However, kinetics represented by CFT and α angle was negatively influenced by HES and gelatin ($p < 0.05$) but not by crystalloids (Fig. 1D–I). Strength of formatted coagulum represented by MCF parameter was significantly influenced only by HES ($p > 0.05$) (Fig. 2A–C).

Functional fibrinogen level represented by MCF FIBTEM was significantly decreased by crystalloids and HES ($p < 0.05$) but not by gelatin (Fig. 2D–F). Parameter MCE representing platelet function was not significantly influenced by any fluid solution (Fig. 2G–I).

Intrinsic pathway of coagulation assessed by INTEM was not negatively influenced either by crystalloids or HES/Gelatin in any parameter ($p > 0.05$) (Table 1).

There was no statistically significant difference in decrease of haemoglobin level after infusion of all types of fluids ($p < 0.05$) (Fig. 3).

Discussion

The type of fluid solution used during perioperative period is still widely discussed, especially its potential coagulopathy effect. In our study we investigated effect of modern balanced fluids on whole blood coagulation assessed by ROTEM, as they are more frequently used in clinical practice nowadays and there are missing data about their effect on coagulation. According to our results, initiation phase of clot formation in extrinsic and intrinsic pathway is not influenced by any type of administered fluid. However, propagation phase was negatively influenced by both HES and gelatin, while strength of coagulum was impaired only by HES. Authors Rasmussen et al. in their extensive meta-analysis of perioperative fluid therapy concerning coagulopathy similarly describe that administration of HES is followed by weakening of coagulum indicated by decreasing parameter of Maximal Amplitude (MA) measured by thrombelastography.¹⁴ Our findings also partially correspond with study of Sawhney et al. who described that infusion of 1 L of HES to traumatic patients impairs coagulation more than gelatine.¹⁵ Schlimp with Cadamuro describe that HES as well as gelatin decreased maximum clot firmness of both EXTEM and FIBTEM.⁷ However, we did not see a similar coagulopathy effect of gelatin when using only 500 mL volume – this volume did probably not produce dilutional effect on coagulation. The phenomenon can be explained by using modern balanced solution of gelatin (more physiologic) in our study, using smaller volume and by performing this study *in vivo*, not *in vitro* as the other authors did. Again, authors Mauch and Madjdpour et al. described that HES and gelatin impair blood coagulation although they did not notice significant difference between HES and gelatin, but again they used unbalanced fluids and the study was performed on piglets.¹⁶ On the other hand, we have recently published an

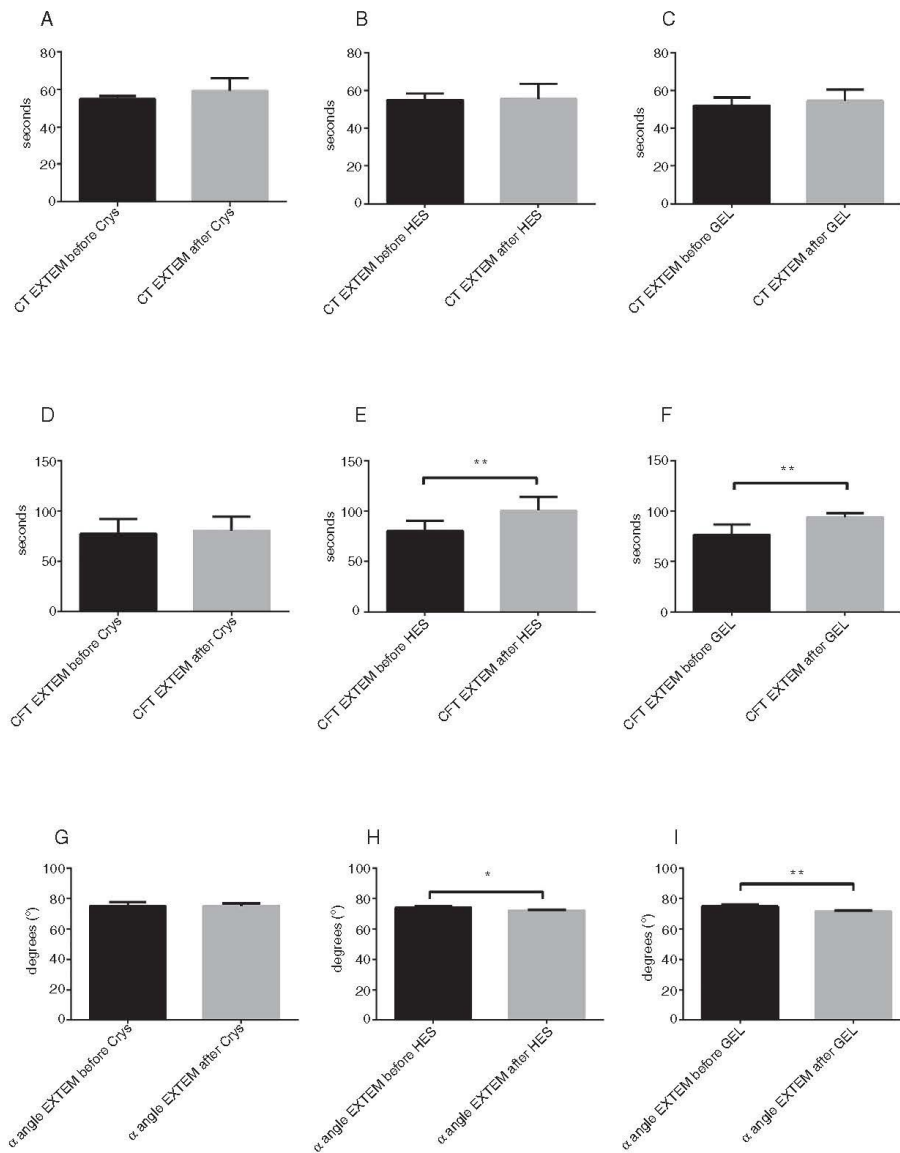


Figure 1 EXTEM parameters describing initiation and propagation of clot formation before and after fluid infusion (medians with interquartile range). (A) CT, Clotting Time (representing initiation of clot formation) in Crystalloid Group (Crys); (B) CT in Hydroxyethyl Starch Group (HES); (C) CT in Gelatin Group (GEL); (D) CFT, Clot Formation Time (representing propagation – speed of clot formation) in Crystalloid Group (Crys); (E) CFT in Hydroxyethyl Starch Group (HES); (F) CFT in Gelatin Group (GEL); (G) α angle (representing propagation – speed of clot formation) in Crystalloid Group (Crys); (H) α angle in Hydroxyethyl Starch Group (HES); (I) α angle in Gelatin Group (GEL).

* Means significant difference $p < 0.05$.

** Means significant difference $p < 0.01$.

Please cite this article in press as: Sevcikova S, et al. Rotational thromboelastometry assessment of balanced crystalloid, hydroxyethyl starch and gelatin effects on coagulation: a randomized trial. Rev Bras Anesthesiol. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2019.04.007>

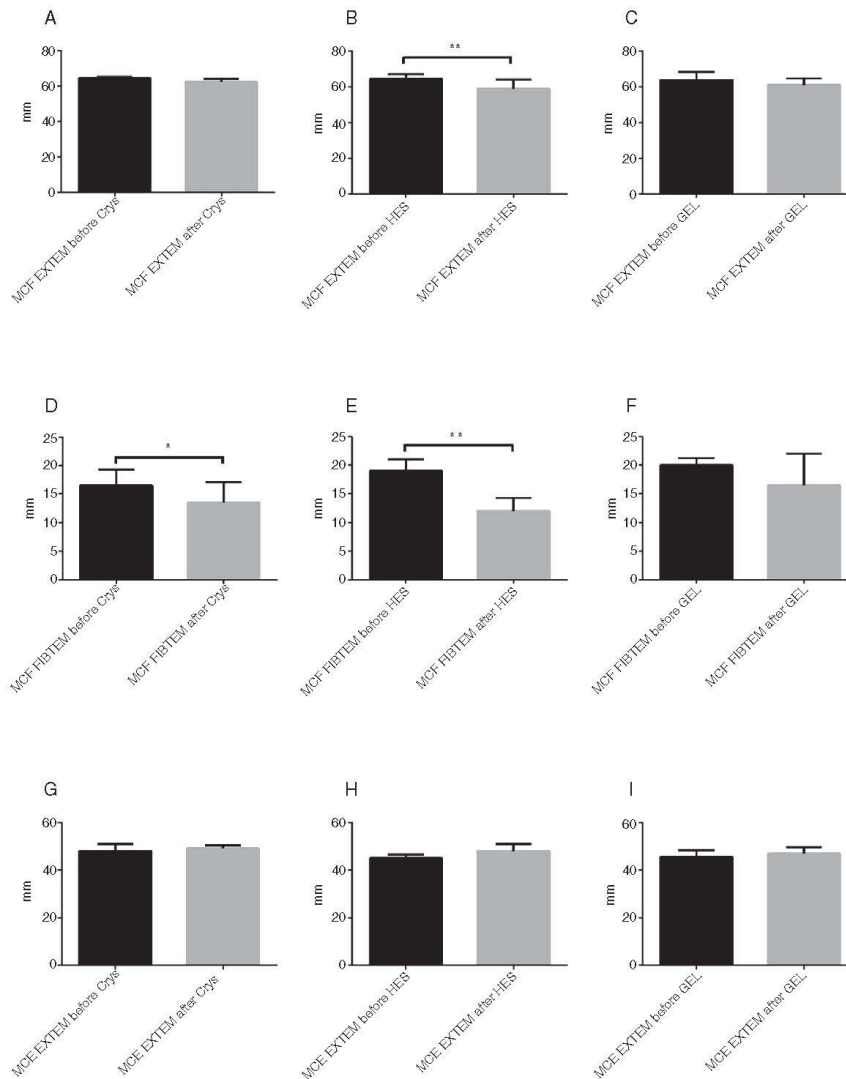


Figure 2 EXTEM and FIBTEM parameters describing maximal clot strength and platelets function before and after fluid infusion (medians with interquartile range). (A) MCF EXTEM, maximum clot firmness (representing maximal clot strength) in Crystalloid Group (Crys); (B) MCF EXTEM in Hydroxyethyl Starch Group (HES); (C) MCF EXTEM in Gelatin Group (GEL); (D) MCF FIBTEM (representing maximal clot strength of coagulum after blocking platelet function, functional fibrinogen level) in Crystalloid Group (Crys); (E) MCF FIBTEM in Hydroxyethyl Starch Group (HES); (F) MCF FIBTEM in Gelatin Group (GEL); (G) MCE EXTEM, maximum clot elasticity of EXTEM (difference between MCF EXTEM and MCF FIBTEM, represents platelet function) in Crystalloid Group (Crys); (H) MCE EXTEM in Hydroxyethyl Starch Group (HES); (I) MCE EXTEM in Gelatin Group (GEL).

* Means significant difference $p < 0.05$.

** Means significant difference $p < 0.01$.

Please cite this article in press as: Sevcikova S, et al. Rotational thromboelastometry assessment of balanced crystalloid, hydroxyethyl starch and gelatin effects on coagulation: a randomized trial. Rev Bras Anesthesiol. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2019.04.007>

Table 1 Non-significant differences of mean \pm SD of INTEM parameters obtained before and after fluid infusion.

INTEM	CT (s)		CFT (s)		α angle ($^{\circ}$)		MCF (mm)	
	Mean \pm SD before	Mean \pm SD after	Mean \pm SD before	Mean \pm SD after	Mean \pm SD before	Mean \pm SD after	Mean \pm SD before	Mean \pm SD after
Crystalloid	169 \pm 16	159 \pm 28	84 \pm 23	80 \pm 24	73 \pm 4	74 \pm 5	60 \pm 3	60 \pm 4
HES	165 \pm 13	152 \pm 12	83 \pm 29	86 \pm 16	74 \pm 4	74 \pm 2	58 \pm 6	56 \pm 5
GEL	171 \pm 27	142 \pm 34	73 \pm 13	78 \pm 13	75 \pm 3	74 \pm 3	60 \pm 4	60 \pm 5

CT, Clotting Time (representing initiation of clot formation); CFT, Clot Formation Time; α angle, representing propagation – speed of clot formation; MCF, Maximum Clot Firmness (representing maximal clot strength); HES, Hydroxyethyl Starch; GEL, Gelatin; SD, standard deviation; INTEM, intrinsic pathway of coagulation.

in vitro study where the negative effect of HES and gelatin on coagulation was also found, but dilution of blood sample was higher of about 20%.¹⁷ We may assume that when the higher fluid volume is used, the higher disturbance of coagulation may be present.

The crystalloid solution did not cause hypocoagulation in any of EXTEM and INTEM parameters despite decrease of FIBTEM MCF parameter. Neither authors Schlimp and Cadamuro found hypocoagulation effect of crystalloids, moreover they described reduced clotting time.⁷ Similarly, Sawhney et al. describe hypercoagulation effect of crystalloid after infusion of 1 L in trauma patients.¹⁵ Ponschab et al. describe impaired blood coagulation measured by ROTEM in pigs, represented by worsened propagation phase of fibrin formation and strength of coagulum, when high volume of either 1 L or 3 L was infused.¹⁸ Therefore, it seems that the crystalloid effect on coagulation depends on infusion volume and type of solutions.

It would be ideal to use power analysis for calculation of appropriate number of investigations needed to predict significant differences in results; however, it was not possible to do it for our study because similar studies are missing. Moreover, in human studies it is very challenging to investigate large numbers of patients. We decided to include 30 patients (10 in each group) and use nonparametric Wilcoxon matched-pairs signet rank test for analyses of ROTEM parameters. Statistically significant results were found in results described by two-tailed p -value <0.05 . After finding significant differences in our study using the described method and p -value, the results can be assessed as reliable despite relatively low number of samples investigated. Therefore, power analysis is not needed anymore.

The last but not the least thing that has to be discussed, is the question whether coagulopathy effect of fluids observed in our study was not caused by a simple dilutional effect of volume infused to the patient. Therefore, haemoglobin level was measured before and again after infusion. Interestingly, all types of fluid solutions decreased haemoglobin level in similar way and there was no statistically significant difference among percentage decrease in its level among all three groups. This means that all three types of fluid solution have produced dilution of similar degree and thus, similar degree of dilutional coagulopathy would be expected in all investigated groups. As our results do not seem to show that, we can consider findings of our study reliable.

The limitation of this study may seem to be the fact that we evaluated blood coagulation in patients undergoing

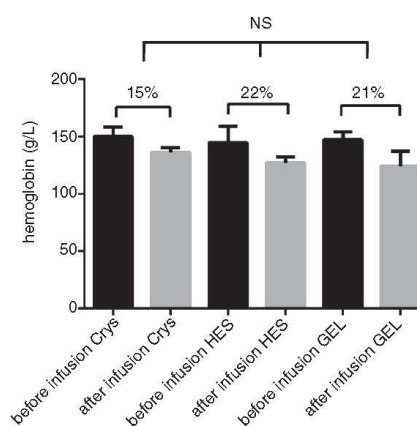


Figure 3 Haemoglobin levels before and after infusion of different type of fluid (medians with interquartile range). Haemoglobin level before and after infusion of Crystalloid (Crys), Hydroxyethyl Starch (HES) and Gelatin (GEL); %, describes decrease of haemoglobin before and after infusion of fluid solution in percentage; NS, Non-Significant difference among decrease of haemoglobin level ($p > 0.05$).

relatively small surgical procedure which is not usually accompanied with great blood loss. However, we believe that in low risk bleeding procedures of this type we can assess the direct coagulopathy effect of crystalloids and colloids more reliably comparing to high risk bleeding procedures. On the other hand, in a situation of huge blood loss, it can be expected that simple volume replacement would cause dilution of coagulation factors leading to coagulopathy, regardless of the type of administered solution. In addition, different types of fluid solutions might aggravate already induced coagulopathy.

Summary

To conclude, EXTEM test representing the extrinsic pathway of coagulation seems to be more sensitive to coagulopathy effect of modern balanced colloids and crystalloids. In our study hydroxyethyl starch had the most obvious negative effect on clot formation followed by gelatin and finally by

Please cite this article in press as: Sevcikova S, et al. Rotational thromboelastometry assessment of balanced crystalloid, hydroxyethyl starch and gelatin effects on coagulation: a randomized trial. Rev Bras Anesthesiol. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2019.04.007>

crystalloids. INTEM test representing the intrinsic pathway of coagulation was not negatively influenced by any colloid or crystalloid solution.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by projects of Ministry of Health for conceptual development Research organization (no. 00064203) Motol Hospital.

References

1. Myburgh JA, Mythen MG. Resuscitation fluids. *N Engl J Med.* 2013;369:2462–3.
2. Allen SJ. Fluid therapy and outcome: balance is best. *J Extra Corpor Technol.* 2014;46:28–32.
3. Kuca T, Butler MB, Erdogan M, et al. A comparison of balanced and unbalanced crystalloid solutions in surgery patient outcomes. *Anaesth Crit Care Pain Med.* 2017;36:371–6.
4. Self WH, Semler MW, Wanderer JP, et al. Saline versus balanced crystalloids for intravenous fluid therapy in the emergency department: study protocol for a cluster-randomized, multiple-crossover trial. *Trials.* 2017;18:178.
5. Marx G, Schuerholz T. Fluid-induced coagulopathy: does the type of fluid make a difference? *Crit Care.* 2010;14:118.
6. Shin HJ, Na HS, Do SH. The effects of acute normovolaemic haemodilution on peri-operative coagulation in total hip arthroplasty. *Anaesthesia.* 2015;70:304–9.
7. Schlimp CJ, Cadamuro J, Solomon C, et al. The effect of fibrinogen concentrate and factor XIII on thromboelastometry in 33% diluted blood with albumin, gelatine, hydroxyethyl starch or saline in vitro. *Blood Transfus.* 2013;11:510–7.
8. Lobo DN, Stanga Z, Aloysius MM, et al. Effect of volume loading with 1 liter intravenous infusions of 0.9% saline, 4% succinylated gelatine (Gelofusine) and 6% hydroxyethyl starch (Voluven) on blood volume and endocrine responses: a randomized, three-way crossover study in healthy volunteers. *Crit Care Med.* 2010;38:464–70.
9. Thomas-Rueddel DO, Vlasakov V, Reinhart K, et al. Safety of gelatin for volume resuscitation – a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 2012;38:1134–42.
10. Veigas PV, Callum J, Rizoli S, et al. A systematic review on the rotational thromboelastometry (ROTEM(R)) values for the diagnosis of coagulopathy, prediction and guidance of blood transfusion and prediction of mortality in trauma patients. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2016;24:114.
11. Kozek-Langenecker SA, Ahmed AB, Afshari A, et al. Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European Society of Anaesthesiology: first update 2016. *Eur J Anaesthesiol.* 2017;34:332–95.
12. Rossaint R, Bouillon B, Cemy V, et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. *Crit Care.* 2016;20:100.
13. Solomon C, Ranucci M, Hochleitner G, et al. Assessing the methodology for calculating platelet contribution to clot strength (platelet component) in thromboelastometry and thromboelastography. *Anesth Analg.* 2015;121:868–78.
14. Rasmussen KC, Secher NH, Pedersen T. Effect of perioperative crystalloid or colloid fluid therapy on hemorrhage, coagulation competence, and outcome: a systematic review and stratified meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016;95:e4498.
15. Sawhney C, Subramanian A, Kaur M, et al. Assessment of hemostatic changes after crystalloid and colloid fluid preloading in trauma patients using standard coagulation parameters and thromboelastography. *Saudi J Anaesth.* 2013;7:48–56.
16. Mauch J, Madjdpour C, Kutter AP, et al. Effect of rapid fluid resuscitation using crystalloids or colloids on hemostasis in piglets. *Paediatr Anaesth.* 2013;23:258–64.
17. Sevcikova S, Vymazal T, Durila M. Effect of balanced crystalloid, gelatin and hydroxyethyl starch on coagulation detected by rotational thromboelastometry in vitro. *Clin Lab.* 2017;63:1691–700.
18. Ponschab M, Schochl H, Keibl C, et al. Preferential effects of low volume versus high volume replacement with crystalloid fluid in a hemorrhagic shock model in pigs. *BMC Anesthesiol.* 2015;15:133.

Please cite this article in press as: Sevcikova S, et al. Rotational thromboelastometry assessment of balanced crystalloid, hydroxyethyl starch and gelatin effects on coagulation: a randomized trial. *Rev Bras Anesthesiol.* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2019.04.007>

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Vliv infuzních roztoků na krevní srážlivost

Ševčíková S., Durila M., Vymazal T.

Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Fakultní nemocnice v Motole

Anest intenziv Med. 2018;29:xxx-xxx

SOUHRN

Krystaloidy a koloidy jsou běžně používané jak perioperačně, tak v intenzivní medicíně. V současnosti je hodně diskutované téma, jaký typ roztoků by měl být preferován s ohledem na jejich negativní účinek na koagulaci. Následující článek shrnuje dosavadní poznatky o vlivu infuzních roztoků na krevní srážlivost měřenou pomocí standardních laboratorních testů PT a APTT, ale i metodou tromboelastografie a metodou rotační tromboelastometrie. Cílem je dle dostupných dat určit infuzní roztok, který nejméně ovlivňuje krevní srážlivost.

KLÍČOVÁ SLOVA

Izotonické roztoky – krevní srážlivost – tromboelastometrie

ABSTRACT

Ševčíková S., Durila M., Vymazal T.: Effects of infusion solution on blood coagulation

Crystalloids and colloids are ubiquitous in perioperative and intensive care medicine. However, there is still a vivid debate about which solution has the minimal negative effect on coagulation. The following article summarizes the existing knowledge about the influence of infusion solutions on blood coagulation measured by standard coagulation tests such as PT and APTT, and also using tromboelastography and rotational thromboelastometry. The goal was to determine which infusion solution has the least negative effect on blood coagulation in the published literature.

KEYWORDS

Isotonic solution – blood coagulation – thromboelastometry

ÚVOD

Tekutinová terapie patří mezi základní pilíře léčby nemocných, jak na jednotkách intenzivní péče, tak na operačních sálech. Při volbě tekutiny je nutné zohlednit charakteristiky jednotlivých roztoků a vždy ji přizpůsobit dané klinické situaci. Cílem tekutinové resuscitace může být náhrada cirkulujícího objemu, udržení orgánové perfuze nebo obnovení rovnováhy mezi potřebou a dodávkou kyslíku tkáním. K těmto indikacím máme dnes k dispozici krystaloidní a koloidní roztoky [1–3].

Roztoky, které jsou rozpuštěny v 0,9 % roztoku chloridu sodného, označujeme jako nebalancované infuzní roztoky a ty, které odpovídají svým iontovým složením plazmě a jsou vybaveny komponentou s pufrovací schopností, nazýváme balancované roztoky.

Dle dostupných údajů naprostá většina nemocných profituje z podávání balancovaných roztoků [4–6].

Z krystaloidů se v klinické praxi nejčastěji používají balancované roztoky a tzv. fyziologický roztok, což je 0,9% roztok chloridu sodného. Vzhledem k plazmě je izotonický, jinak je ale jeho složení zásadně odlišné od plazmy vzhledem k vysoké koncentraci chloridů a natria a chybění jiných podstatných elektrolytů. Proto by fyziologický roztok až na určité klinické situace neměl být používán. Takovou výjimkou může být těžká hypochloremická alkalóza v důsledku zvracení, případně pacienti s kranio-cerebrálním poraněním [1, 7].

Z balancovaných krystaloidních roztoků jsou v České republice dostupné Hartmannův roztok, Ringer, Ringerfundin, Isolyte a Plasmalyte, dále je na trhu Ringer-laktát a Ringer-acetát, ELO-MEL. Koloidy jsou heterogenní skupinou, které mohou být přirozeně se vyskytující, např. albumin, nebo syntetické, kam řadíme hydroxyethyl škrob a želatínové přípravky [1].

Albumin je jeden z proteinů krevní plazmy, pro klinické použití se získává z plazmy dárců.

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

V současnosti je dostupný lidský albumin ve dvou koncentracích, 5% albumin s 50 g/l albuminu, vůči plazmě izotonický, a 20% albumin s 200 g/l albuminu, který má naopak hyperonkotický účinek [1, 8, 9].

Ze škrobových roztoků se používá nejčastěji jejich třetí generace balancovaných roztoků, a to zejména roztoky, které mají molekulární hmotnost 130 kDa a molární substituci 0,4, např. Voluven, Volulyte, 6% a 10% Tetraspan [1, 8–10]. Další skupinou koloidních roztoků jsou roztoky želatiny. Dnes používaná balancovaná sukcinylovaná želatina, např. 4% Gelaspan, dosahuje objemového efektu srovnatelného s moderními škroby díky speciální molekulární struktuře a představuje roztok plně plazmě adaptovaný. Obsahuje stejnou želatinu jako její předchůdce, přípravek Gelofusine [9, 11, 12].

Koloidní roztoky jsou tvořeny makromolekulami, které jen obtížně procházejí přes neporušený endotel. Je obecně známo, že k dosažení stejného hemodynamického efektu se podává 3–4krát vyšší objem krystaloidů než koloidů [1, 13]. Dle některých studií může být ale tento názor zastaralý. Existují data, kde poměr krystaloid versus koloid je nižší, a to < 2 : 1 [14].

Další důležitou součástí péče o nemocné jak perioperačně, tak i u pacientů v intenzivní péči patří monitorování hemokoagulace. Tradičně je k hodnocení využíván protrombinový čas (PT, Quick) a aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), ačkoli tyto testy byly původně zavedeny pro monitoraci účinnosti léčby dikumariny (PT) a heparinem (APTT). Protrombinový čas poskytuje informaci o zevní cestě koagulační kaskády. Exponenciální poměr naměřeného času pacienta a času naměřeného v normální plazmě se udává jako INR, tedy International Normalized Ratio. APTT informuje o vnitřní cestě koagulační kaskády, udává se též jako exponenciální poměr dvou časů, tedy APTT-R (ratio). Nevýhodou těchto testů je, že měří čas tvorby fibrinového vlákna z plazmy po odstranění pevných složek krve (trombocyty, erytrocyty atd.) [15]. Proto se v současnosti zdá vhodnější vyšetřování srážení plné krve, a to zejména u lůžka pacienta. K tomu se používají tzv. point-of-care (POC) testy, které měří viskoelastické vlastnosti plné krve, např. metoda tromboelastografie (TEG) a rotační tromboelastometrie (ROTEM). Tyto metody jsou schopny hodnotit vzájemnou interakci srážecích faktorů, trombocytů, erytrocytů a fibrinogenu. Umožňují dynamické vyšetření krve, a tím získání informací o funkčním stavu koagula v průběhu jeho tvorby, tedy během iniciační a propagační fáze srážení, dále poskytují informace o maximální síle koagula a intenzita fibrinolýzy je odrazem stability koagula. Obě vyšetření je možné provést přímo u lůžka nemocného na JIP

či na operačním sále a informace o stavu koagula jsou k dispozici již do 10 minut [16–18].

ROTEM je dnes již široce rozšířenou bedside metodou, oproti TEC má výhodu automatické pipety, čímž se práce s touto technologií usnadnila. Přístroj ROTEM má čtyři kanály a umožňuje provést vyšetření celého procesu sekundární hemostázy přidáním specifických reagensů pro každý z testů EXTEM, INTEM, FIBTEM a APTM. EXTEM test hodnotí vnější cestu sekundární hemostázy, pro vyšetření vnitřní cesty hemokoagulace se používá INTEM test, pomocí FIBTEM testu můžeme zhodnotit hladinu funkčního fibrinogenu a k potvrzení skutečné fibrinolýzy se využívá APTM test. Při jednotlivých testech se popisují následující parametry: CT (clotting time, iniciační fáze srážení), úhel α a CFT (clot formation time, propagační fáze srážení), parametr MCF (maximum clot firmness, maximální síla koagula), k dalším běžně hodnoceným parametrům patří parametry fibrinolýzy (LI 30, LI 60) [16–19]. U vyšetření TEC se hodnotí parametr R (reakční čas) popisující iniciační fázi, parametr K (kinetika srážení) a úhel α pro propagační fázi, MA (maximal amplitude) maximální síla koagula, dále parametry fibrinolýzy v čase 30 a 60 minut od dosažení maximální síly koagula (LY 30, LY 60). TEC má možnost nastavení různé teploty na jednotlivých kanálech, což je s výhodou používáno u hypotermického pacienta k vyloučení hypotermické koagulopatie [15–19]. Metoda rotační tromboelastometrie je zahrnuta i do nejnovějších Evropských doporučených postupů pro management perioperačního krvácení a u traumat. Limitem obou metod je, že nedokáží hodnotit poruchy primární hemostázy, tedy adhezi a agregaci trombocytů vedoucí ke vzniku primárního destičkového trombu [20, 21].

V současnosti je hodně diskutované a aktuální téma používání infuzních roztoků v perioperačním období. Navzdory tomu není k dispozici dostatek článků pojednávajících o koagulopatickém vlivu balancovaných roztoků na krevní srážlivost perioperačně, a to s ohledem na jejich vliv na tvorbu koagula měřenou pomocí testů PT/APTT, ale zejména metodou TEC a ROTEM. V tomto článku se snažíme přinést čtenáři informace, které bude moci použít ve své denní anesteziologické či intenzivistické praxi.

KRYSTALOIDY A KOAGULACE

Existuje mnoho autorů, kteří zkoumali vliv krystaloidních roztoků na hemokoagulaci. Schlomp a kol. ve své studii navodili 33% diluci *in vitro* 0,9% roztokem chloridu sodného. Při této diluci byly prodlouženy oba časy standardních koagulačních testů PT a APTT [22]. Naproti tomu

Weiss a kol. při stejné diluci tímž roztokem nezaznamenal prodloužení APTT [23]. Schlímp se svým kolektivem dále hodnotil parametry metody ROTEM. Parametr EXTEM CT byl zkrácen pod referenční hodnotu, iniciační fáze proběhla tedy rychleji, 0,9% roztok chloridu sodného měl na tento parametr tedy hyperkoagulační vliv. Parametr EXTEM CFT nebyl ovlivněn, hodnota EXTEM MCF byla snížena, ale v mezích referenčního limitu [22].

Sawhney a kol. zahrnuli do své studie pacienty s traumatem, kteří podstoupili elektivní operační výkony. Traumatický stav je často doprovázen diluční koagulopatií v důsledku velké krevní ztráty, konzumpce koagulačních faktorů a krevních destiček a dále následné tekutinové resuscitace. Do této studie byli zařazeni pacienti s různými diagnózami, ale bez výrazného rozdílu při vzájemném porovnání vstupních hodnot krevního obrazu a standardních testů, krevní ztráta u většiny výkonů byla obdobná. Po úvodu do celkové nebo spinální anestezie bylo pacientům dle randomizace podán 1 l 0,9% chloridu sodného nebo Ringer-laktátu. Autoři k hodnocení krevní srážlivosti využili konvenční laboratorní testy a TEC. Bolus tekutiny uvedený krystaloidními roztoky neovlivnil žádný ze sledovaných parametrů koagulace [24].

Mauch a kol. se ve své studii zabývali tím, zda rychle podaný bolus tekutin ovlivňuje hemostázu okamžitě či je nutný čas pro přesun mezi kompartmenty intra- a extravaskulárního prostoru. Studii prováděli na prasatech, koagulaci hodnotili metodou ROTEM. Dle výsledků rychle podaný bolus 0,9% roztoku chloridu sodného snížil maximální sílu koagula, tedy parametr EXTEM MCF [2].

Ponschab a kol. ve své práci podávali ELO MEL, balancovaný roztok s acétem, poté co anestetizovaným prasatům způsobili 50% krevní ztrátu z celkového objemu krve. K hodnocení ovlivnění koagulací využil ROTEM. Prasata dostala buď množství krystaloidu odpovídající krevní ztrátě, nebo trojnásobné množství krystaloidního roztoku s ohledem na ztrátu krve. U skupiny s nižším podaným objemem byl snížen parametr MCF v obou testech, EXTEM i FIBTEM. U skupiny s trojnásobným podaným objemem vůči krevní ztrátě byla negativně ovlivněna i propagační fáze, tedy parametr EXTEM CFT [25].

Z těchto výsledků vyplývá, že hodnocení vlivu krystaloidních roztoků na krevní srážlivost nezáleží jen na typu roztoku, ale i na množství podaného roztoku.

Na naší klinice jsme v loňském roce realizovali studii, kde jsme navodili *in vitro* 20% diluci Plasmalytem. Tato mírná diluce dle našeho názoru nejlépe odráží *in vivo* podmínky, jelikož peroperačně je většinou podáváno 1 000 ml infuzního roztoku u nekomplikovaných chirurgických zá-

kroků. V případě, že dospělý pacient má 5 l krve, podání 1 000 ml roztoku navodí 20% diluci krve. Koagulopatií jsme hodnotili metodou ROTEM. Plasmalyte zkrátil parametr EXTEM CT, na iniciační fázi působil tedy hyperkoagulačně. Z propagační fáze parametr CFT sice nebyl ovlivněn, ale úhel α byl snížen, což svědčí pro hypokoagulační vliv Plasmalytu na tento parametr. Ve smyslu hypokoagulace byla ovlivněna i hladina funkčního fibrinogenu a i parametr EXTEM MCF byl snížen [26].

Metaanalýza od Rasmussen a kol., která hodnotila perioperační infuzní terapii ve vztahu ke koagulopatií, popisuje 32 klinických studií, které byly provedeny během let 2000–2015 u pacientů podstupujících chirurgický zákrok. Ve studiích byly hodnoceny Ringer-laktát, Ringer-acetát, Hartmannův roztok, 0,9% a 7,5% roztok chloridu sodného. Pro hodnocení koagulační kompetence se zaměřili na parametr maximální síly koagula, tedy TEC-MA.

Krystaloidní roztoky neměly na tento parametr v zahrnutých studiích vliv, dle většiny studií neovlivnily perioperační krevní ztrátu, výjimku tvoří pět studií s Ringer-laktátem, kde po jeho podání byla vyšší tendence ke krvácení [3].

Dle studií zabývajících se krystaloidním roztokem, včetně rozsáhlé metaanalýzy od autora Rasmussen a kol., je jeho podání spojeno s nejmenším ovlivněním krevní srážlivosti. Použití krystaloidního roztoku je doporučeno i v nejnovějších evropských doporučeních managementu krvácení a koagulopatie, krevní ztrátu do 1500 ml je doporučeno hradit pouze krystaloidním roztokem, vyšší krevní ztrátu krevními deriváty spolu s krystaloidy [21].

KOLOIDY A KOAGULACE

HYDROXYETYL ŠKROB (HES) A KOAGULACE

Navození 30% diluce roztokem Volulytu ve studii Schlímpe a kol. vedlo k prodloužení parametru EXTEM CFT a ke snížení parametrů EXTEM MCF a FIBTEM MCF [22]. To znamená, že diluce tímto koloidním roztokem měla významný negativní efekt, zhoršila rychlost tvorby pevného koagula a snížila jeho sílu.

Shin se svými spolupracovníky hodnotil ovlivnění koagulací po podání Volulytu během náhrady kyčelního kloubu, kdy perioperační krevní ztráta byla 1 000–1 500 ml. Na rozdíl od většiny studií, kde byly roztoky podávány při euvolemii, tuto autoři v úvodu operace navodili akutní normovolemickou hemodilucí. Pacientům odebrali přípustné množství krve a poté podali HES o stejném objemu, který odpovídal odebrané krvi, a následně peroperačně provedli retransfuzi. Po provedené akutní normovolemické hemodiluci všechny parametry ROTEM

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

prokázaly hypokoagulační stav, stejné výsledky byly zaznamenány po retransfuzi. Co se týče standardních koagulačních testů, ty byly hodnoceny až po retransfuzi. PT-INR a APTT byly prodlouženy, i když pouze PT-INR byl statisticky významně prodloužen [27]. Pacienti zařazení do této studie byli během výkonu ve spinální anestezii. Kontrolní vzorek byl sice odebrán před navozením akutní normovolemické hemodiluce, ale v době, kdy již vaskulární systém mohl být ovlivněn vazodilatací po spinální anestezii.

Bolus 1 l roztoku Voluven ve studii Sawhney a kol. u pacientů s traumatem ovlivnil oba standardní koagulační testy, byly prodlouženy časy PT-INR i APTT. Parametry TEC nebyly podáním tohoto koloidního roztoku ovlivněny, ale při vzájemném porovnání se želatinou Voluven významněji ovlivnil iniciační fázi srážení hodnocenou parametrem R, též na parametr PT-INR měl tento koloidní roztok větší negativní vliv než želatina [24].

Rychlý bolus roztoku Voluven v Mauchově a kol. studii vedl k okamžitému prodloužení tvorby koagula, byly prodlouženy parametry EXTEM CFT a úhel α , dále ke snížení maximální síly koagula, tedy k poklesu parametru EXTEM MCF. Voluven jako jediný z koloidních roztoků narušil i parametr FIBTEM MCF [2].

Golpavar a kol. ve své studii využili dosavadních poznatků o škodlivém vlivu HES na krevní srážlivost. Tento infuzní roztok podávali pacientům s mozkovým nádorem, kteří mají sklon k hyperkoagulačnímu stavu. Ve své studii ale neuvádějí, kolikaprocentní HES použili. Jejich cílem bylo posoudit protektivní vliv škrobového roztoku ve vztahu ke snížení tromboembolických komplikací u těchto pacientů. K hodnocení krevní srážlivosti využili TEC. Podání HES prodloužilo jak reakční čas, parametr R, tak i parametr K, čas nutný pro vznik silného koagula. Na druhou stranu, ve srovnání s 0,9% roztokem chloridu sodného nebyla zaznamenána vyšší krevní ztráta během neurochirurgického výkonu. Pokles v koagulabilitě podáním 10 ml/kg HES dle jeho názoru může u pacientů s hyperkoagulačním stavem snížit riziko tromboembolických komplikací [28].

V naší studii při 20% diluci *in vitro* měl největší negativní vliv na krevní srážlivost 6% Tetraspan. Pouze iniciační fáze nebyla podáním tohoto roztoku ovlivněna. Propagační fáze byla ovlivněna ve smyslu hypokoagulace, byl prodloužen parametr EXTEM CFT a snížen úhel α , byly sníženy i oba parametry popisující kvalitu fibrinogenu, tedy EXTEM MCF a FIBTEM MCF [26].

Rasmussen se při zpracování studií zaměřil na parametr TEC-MA. Do této metaanalýzy byly zařazeny studie s různými škrobovými roztoky, byly srovnávány HES 6% 130/0,4, HES 130/0,7, HES

6% 200/0,5 bez blíže určených komerčních názvů, dále Volulyte, dextran 70 a HES 140 (Hespan). Snížená síla koagula byla ve všech studiích nejvíce zaznamenána po podání škrobových roztoků. V porovnání s albuminem měly i moderní škroby větší hypokoagulační účinek. Navíc Rasmussen a kol. zhodnotili i četnost reoperací. Nejčastěji podstoupili reoperaci právě ti pacienti, kteří peroperačně dostávali škrobový roztok. S největší pravděpodobností to souviselo s vyšším výskytem perioperačního krvácení při podávání tohoto koloidního roztoku. Limitem této rozsáhlé metaanalýzy je fakt, že zahrnuje roztoky, které již opustily denní klinickou praxi v našich podmínkách (např. dextransy), a absence studií zabývajících se vlivem želatiny na krevní srážlivost [3].

ŽELATINA A KOAGULACE

Přidání 4% roztoku Celofusin k navození *in vitro* 33% diluce v Schlimpově a kol. studii vedlo ke stejnému negativnímu účinku na koagulaci jako přidání škrobového roztoku. Byl prodloužen čas pro vznik koagula, parametr EXTEM CFT a oslabena maximální síla koagula [22].

Ve studii Sawhney a kol. byly prodlouženy standardní laboratorní testy, INR a APTT po podání 1 l 4% roztoku Celofusin. Parametry TEC nebyly tímto bolusem želatiny ovlivněny. Ale jak již bylo uvedeno výše, při vzájemném srovnání se škrobovým roztokem měl Celofusin na krevní srážlivost menší negativní vliv [24].

Mauch a kol. použili balancovaný 4% Physiogel, který se od 4% Gelaspanu liší pouze názvem. Rychlý bolus tohoto roztoku negativně ovlivnil propagační fázi vzniku koagula, prodloužil parametr EXTEM CFT a snížil EXTEM úhel α . Též byla narušena po podání tohoto roztoku maximální síla koagula, parametr EXTEM MCF [2].

V naší studii po navození 20% diluce *in vitro* 4% Gelaspanem došlo k prodloužení propagační fáze, parametr EXTEM CFT byl prodloužen, EXTEM α úhel byl zkrácen. Diluce tímto roztokem snížila i maximální sílu koagula reprezentovanou parametrem EXTEM MCF [26]. Při vzájemném porovnávání s hydroxyethyl škrobem však byl koagulopatický efekt vlivem želatiny méně významný než negativní vliv při diluci škrobovým roztokem.

ALBUMIN A KOAGULACE

In vitro navozená diluce 5% lidským albuminem ve studii Schlímpe a kol. měla na parametry ROTEM stejný vliv jako oba předchozí koloidní roztoky. Diluce tímto roztokem prodloužila propagační fázi, parametr EXTEM CFT a oslabila maximální sílu koagula hodnocenou parametry EXTEM MCF a FIBTEM MCF [22].

Ve studii Mauch a kol. rychle podaný bolus 5% lidského albuminu negativně ovlivnil tvorbu koagula, prodloužil parametr EXTEM CFT a zkrátil EXTEM úhel α , dále snížil parametr EXTEM MCF, tedy maximální sílu koagula. Při vzájemném porovnávání koloidních roztoků měl nejmenší hypokoagulační vliv na tvorbu a maximální sílu koagula právě 5% lidský albumin [2].

V přehledové práci Rasmussen a kol. byly zahrnuty studie, které pracovaly jak s 5% albuminem, tak s 4% albuminem. K dispozici jsou výsledky vzájemného porovnání albuminu a škrobového roztoku. Dle těchto dat je použití humánního albuminu výhodnější. Po jeho podání je méně snížena koagulabilita než po podání škrobu. Též perioperační krevní ztráta a četnost reoperací byly napříč studiemi nižší při použití albuminu [3].

Zdá se, že při nutnosti použít koloidní roztok je nejlepší volbou dle dostupných dat 5% albumin. Moderní želatina ve srovnání s třetí generací hydroxyethyl škrobu vykazuje mírnější antikoagulační efekt, který ale není zanedbatelný. V nejnovějších evropských doporučeních managementu krváčení a koagulopatie nejsou koloidní roztoky vůbec zmiňovány [21].

INFUZNÍ ROZTOK VERSUS HEMOSTÁZA

Je třeba poukázat na fakt, že výsledky hodnocení koagulopatického vlivu různých typů infuzních roztoků pomocí běžných testů PT/APTT se liší od výsledků viskoelastických metod. Jsou potřebné další studie, které přinesou odpověď na otázku, jaké testy jsou důvěryhodnější a lépe korelují s klinickým výsledkem u pacienta v perioperačním období.

Interferenci infuzních roztoků s hemostázou pacienta bychom mohli rozdělit na dva mechanismy účinku – nespecifické, resp. nepřímé, a specifické, resp. přímé. V prvním případě je popisována diluce koagulačních faktorů podaným infuzním roztokem. Je důležité si uvědomit, že při krvácení je diluční pokles koagulačních faktorů zhoršen další absolutní ztrátou koagulačních faktorů mimo krevní oběh [9].

Dvaceti až třicetiprocentní akutní hemodiluce navozená krystaloidním roztokem vede podle některých studií k hyperkoagulačnímu stavu [22, 26]. Tento fenomén může být zapříčiněn poklesem inhibičních faktorů koagulace a snížením prahové hodnoty pro pozitivní zpětnou vazbu, která je součástí koagulační kaskády. Stejně tak „chybějící“ anémie může být příčinou těchto výsledků. Erytrocyty přispívají k hemostáze jednak mechanicky, marginují trombocyty ke stěně cév, a dále biologicky uvolněním adenosindifosfátu a fosfátového aniontu, které pak podporují aktivaci krevních

destiček a vznik trombinu [9]. V každém případě ovlivnění krevní srážlivosti hemodilucí záleží na množství a typu podané tekutiny. Jedna z možných hypotéz, proč má krystaloid pouze minimální vliv na krevní srážlivost, může být vysvětlena jeho rychlým přesunem po podání do extravaskulárního prostoru. Tím je diluční efekt krystaloidního roztoku menší než efekt koloidního roztoku [2, 22]. Pod pojem specifický vliv patří přímé ovlivnění koagulačních faktorů, fibrinolýzy a funkce krevních destiček [9]. I přes četné studie nejsou mechanismy ovlivnění koagulace po podání infuzních roztoků zcela vyjasněny.

Při hodnocení vlivu infuzních roztoků na koagulaci také záleží na hemostatickém stavu pacienta [9]. Ze studií byli většinou vyřazeni kuřáci, pacienti s anamnézou krvácivých projevů, s poruchou krevní srážlivosti, dále pacienti užívající antikoagulační a antiagregační léky a ženy s hormonální antikoncepcí. Narušení krevní srážlivosti infuzními roztoky se právě u „skutečných“ pacientů může lišit. Většina nemocných, ať už pacienti před elektivním chirurgickým zákrokem či nemocní přijatí na lůžko intenzivní péče, užívají antiagregancia nebo antikoagulancia, někteří mohou mít vrozené či získané poruchy krevní srážlivosti, již předoperačně nižší hematokrit a méně krevních destiček. Zásadně nesmíme opomenout klinickou situaci, která mění normální koagulační stav pacienta. Mezi důležité klinické kofaktory patří typ chirurgického výkonu, zda je přítomno nízké či vysoké riziko krvácení, akutní krevní ztráta doprovázená hypotenzí a hypoperfuzí tkání vedoucí k acidóze, hypotermií a pooperačním rozvojem septického stavu, který též narušuje krevní srážlivost [9].

Velké množství studií bylo prováděno za podmínek *in vitro*. Pokud jsou tyto výsledky implementovány do klinické praxe, neměli bychom dále zapomínat, že za podmínek *in vivo* setrvává v intravaskulárním kompartmentu menší množství infuzního roztoku, než jaké bylo podané, a tedy podmínky *in vitro* a *in vivo* nejsou totožné [1, 13, 14, 22]. Dalším limitem studií *in vitro* je absence endotelu, pufrovacích kompenzačních systémů, dále nedostatek elektrolytů a nemožnost metabolické degradace [28]. Navzdory všem těmto limitům u *in vitro* studií se výsledky většinou shodují se studiemi prováděnými *in vivo*.

ZÁVĚR

Při rozhodování, který roztok použít, ať perioperačně či během krvácení, se můžeme opřít o výše uvedené výsledky. Dle dosud publikovaných studií se nejvhodnějším roztokem s minimálním negativním vlivem na krevní srážlivost jeví použití balancovaného krystaloidu. Z koloidních roztoků

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

má nejmenší koagulopatický efekt 5% albumin. Moderní želatina prokazuje významnější antikoagulační efekt, ale největší negativní vliv na hemostatický stav pacienta má hydroxyethyl škrob.

Seznam uváděných infuzních roztoků:

ELO-MEL, Fresenius Kabi Austria GmbH, Rakousko
Gelaspan, B. Braun Melsungen Ag, Rakousko
Gelofusine, B. Braun Melsungen Ag, Rakousko
Hartmannův roztok, B. Braun Melsungen Ag, Rakousko
Isolyte, Fresenius Kabi Austria GmbH, Rakousko
Plasmalyte, Baxter International Inc.
Ringer-acetát, B. Braun Melsungen Ag, Rakousko
Ringerfundin, B. Braun Melsungen Ag, Rakousko
Ringer-laktát, Baxter International Inc.
Ringerův roztok, B. Braun Melsungen Ag, Rakousko
Tetraspan, B. Braun Melsungen Ag, Rakousko
Volulyte, Fresenius Kabi Austria GmbH, Rakousko
Voluven, Fresenius Kabi Austria GmbH, Rakousko

LITERATURA

1. Myburgh JA, Mythen MG. Resuscitation Fluids. *N Engl J Med*. 2013;369:1243-1251.
2. Mauch J, Madjdpour C, Kutter AP, et al. Effect of rapid fluid resuscitation using crystalloids or colloids on hemostasis in piglets. *Paediatr Anaesth*. 2013;23:258-64.
3. Rasmussen KC, Secher NH, Pedersen T. Effect of perioperative crystalloid or colloid fluid therapy on hemorrhage, coagulation competence, and outcome: A systematic review and stratified meta-analysis. Casey K, ed. *Medicine*. 2016;95:e4498.
4. Mohd Yunus N, Bellomo R, Hegarty C. Association between a chloride-liberal vs. chloride-restrictive intravenous fluid administration strategy and kidney injury in critically ill adults. *JAMA*. 2012;308:1566-1572.
5. Kuca T, Butler MB, Erdogan M, Green RS. A comparison of balanced and unbalanced crystalloid solutions in surgery patient outcomes. *Anaesth Crit Care Pain Med*. 2016.
6. Allen SJ. Fluid Therapy and Outcome: Balance Is Best. *The Journal of Extra-corporeal Technology*. 2014;46:28-32.
7. Self WH, Semler MW, Wanderer JP, et al. Saline versus balanced crystalloids for intravenous fluid therapy in the emergency department: study protocol for a cluster-randomized, multiple-crossover trial. *Trials*. 2017;18:178.
8. Rasmussen KC. Effect of perioperative crystalloid or colloid fluid therapy on hemorrhage, coagulation competence, and outcome. *Danish Medical Journal*. 2016;63.
9. Van der Linden P, Ickx BE. The effects of colloid solutions on hemostasis. *Canadian Journal of Anaesthesia*. 2006;53(6 Suppl):S30-9.
10. Hung MH, Zou C, Lin FS, et al. New 6 % hydroxyethyl starch 130/0,4 does not increase blood loss during major abdominal surgery: A randomized, controlled trial. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2014;113:429-435.
11. Lobo DN, Stanga Z, Aloisius MM, et al. Effect of volume loading with 1 liter intravenous infusions of 0.9% saline, 4% succinylated gelatine (Gelofusine) and 6% hydroxyethyl starch (Voluven) on blood volume and endocrine responses: a randomized, three-way crossover study in healthy volunteers. *Crit Care Med*. 2010;38:464-70.
12. Thomas-Rueddel DO, Vlasakov V, Reinhart K, et al. Safety of gelatin for volume resuscitation--a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2012;38:1134-1142.
13. Hartog CS, Kohl M, Reinhart K. A Systematic Review of Third-Generation Hydroxyethyl Starch (HES 130/0,4) in Resuscitation. *Anesthesia & Analgesia*. 2011;112:635-645.
14. Doherty M, Buggy DJ. Intraoperative fluids: how much is too much? *British Journal of Anaesthesia*. 2012;109:69-79.
15. Halset JH, Hanssen WS, Espinosa A, Klepstad P. Tromboelastography: variability and relation to conventional coagulation test in non-bleeding intensive care unit patients. *BMC Anesthesiology*. 2015;15:28.
16. Veigas PV, Callum J, Rizoli S, et al. A systematic review on the rotational thrombelastometry (ROTEM®) values for the diagnosis of coagulopathy, prediction and guidance of blood transfusion and prediction of mortality in trauma patients. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. 2016;24:114.
17. Durila M. Tromboelastografie a tromboelastometrie. In: Ševčík P. *Intenzivní medicína*. 3. dopl. vyd. Galén. 2014:197-200.
18. Benes J, Zatloukal J, Kletecka J. Viscoelastic Methods of Blood Clotting Assessment - A Multidisciplinary Review. *Frontiers in Medicine*. 2015;2:62.
19. Adler M, Ivic S, Bodmer NS, et al. Thromboelastometry and Thrombelastography Analysis under Normal Physiological Conditions - Systematic Review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2017;44:78-83.
20. Kozek-Langenecker SA, Ahmed AB, Afshari A, et al. Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European Society of Anaesthesiology: First update 2016. *Eur J Anaesthesiol*. 2017;34:332-395.
21. Rossaint R, Bouillon B, Cerny V, et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. *Critical Care*. 2016;20:100.
22. Schlimp CJ, Cadamuro J, Solomon C, et al. The effect of fibrinogen concentrate and factor XIII on thromboelastometry in 33% diluted blood with albumin, gelatine, hydroxyethyl starch or saline in vitro. *Blood Transfusion*. 2013;11:510-517.
23. Weiss G, Lison S, Spannagl M, Heindl B. Expressiveness of global coagulation parameters in dilutional coagulopathy. *British Journal of Anaesthesia*. 2010;105:429-436.
24. Sawhney C, Subramanian A, Kaur M, et al. Assessment of hemostatic changes after crystalloid and colloid fluid preloading in trauma patients using standard coagulation parameters and thromboelastography. *Saudi J Anaesth*. 2013;7:48-56.
25. Ponschab M, Schöchl H, Keibl C, et al. Preferential effects of low volume versus high volume replacement with crystalloid fluid in a hemorrhagic shock model in pigs. *BMC Anesthesiology*. 2015;15:133.
26. Sevcikova S, Vymazal T, Durila M. Effect of Balanced Crystalloid, Gelatin and Hydroxyethyl Starch on Coagulation