

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, datum

Magda Vítková (roz.Sudrová)

Podpis

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM:

VÍTKOVÁ, Magda. *Trombofilie v těhotenství [Thrombophilia in pregnancy]*, Praha 2012, 124 s. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce: prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.

ABSTRAKT

Úvod: Tromboembolická nemoc je v civilizovaných zemích jedna z nejčastějších příčin nemocnosti a úmrtnosti u těhotných žen. V graviditě se často poprvé projeví vrozená, nebo získaná trombofilie. Pacientky s trombofilií mají i zvýšené riziko těhotenských komplikací. Optimální antikoagulační profylaxe pomáhá těmto komplikacím předcházet.

Metody: Práce je zaměřena na sledování koagulačních parametrů, krevního obrazu a proteinů akutní fáze u gravidních žen (N=68) s trombofilií, léčených v průběhu gravidity enoxaparinem, a na kontrolu účinnosti antikoagulační léčby v těhotenství pomocí anti-FXa aktivity, stanovení závislosti inhibice FXa na hmotnosti, koagulačních parametrech a proteinech akutní fáze. V první a druhé části studie není, z etických důvodů, kontrolní skupina těhotných pacientek se závažnou trombofilií, ale bez antikoagulační léčby. Ve třetí části práce jsme pomocí dotazníků zkoumali nežádoucí účinky enoxaparinu v místě vpichu injekce. A v závěrečné čtvrté části jsme hodnotili vliv enoxaparinu na markery kostní remodelace v porovnání s kontrolní skupinou gravidních žen bez antikoagulační léčby.

Výsledky: U pacientek dochází k četným změnám v parametrech hemostázy, krevního obrazu i proteinů akutní fáze. Koncentrace anti FXa klesala se stoupajícím týdnem gravidity a už v 15. týdnu bylo 10,29 % pacientek pod doporučeným profylaktickým rozmezím. Byla zjištěna statisticky významná negativní korelace mezi BMI, hmotností, fibrinogenem, D-dimery a inhibicí FXa. Nežádoucí účinky v místě vpichu injekce enoxaparinu jsou relativně časté. Žádná pacientka neprodělala závažné krvácení. V markerech kostní přestavby nebyl zjištěn významný rozdíl mezi skupinou těhotných pacientek s léčbou a bez léčby.

Závěr: Těhotenství je hyperkoagulační stav. Účinnost enoxaparinu hodnocená metodou inhibice FXa je v těhotenství ovlivněna mnoha faktory, proto jí doporučujeme pravidelně monitorovat.

KLÍČOVÁ SLOVA

trombofilie, těhotenství, Enoxaparin, FXa, Osteoprotegerin, RANKL

ABSTRACT

Background: Thromboembolic disease is one of the most common causes of pregnant women morbidity and mortality. The pregnancy period is often the first time, when the apparent congenital or acquired thrombophilia is identified. Patients with thrombophilia have an increased risk of pregnancy complications. The optimal anticoagulant prophylaxis helps to prevent these complications.

Methods: The presented work is focused on monitoring of coagulation parameters, blood counts and acute phase proteins in pregnant women (N = 68) with thrombophilia treated with enoxaparin during pregnancy and it is also concerned with evaluation of effectiveness of anticoagulant therapy during pregnancy using anti FXa activity determination based on inhibition of FXa weight, coagulation parameters and acute phase proteins. In the first and the second part of the study, there is no control group of pregnant patients with severe thrombophilia, but no anticoagulation – this is justified by ethical reasons. In the third part, we examined by questionnaire our patients for enoxaparin adverse reactions at the injection site. Finally, the last part is focused on evaluation of enoxaparin effects on bone remodelling markers, compared with a group of pregnant women without anticoagulation.

Results: During the pregnancy, the patients are undergoing numerous changes in coagulation parameters, blood counts and acute phase proteins. The concentration of FXa was decreasing with the increasing weeks' gestation. As early as in the 15th week there were 10.29% of patients below the recommended prophylactic range. We found statistically significant negative correlation between BMI, weight, fibrinogen, D-dimers and inhibition of anti-FXa. Adverse reactions at the injection of enoxaparin were reported to be relatively frequent. No patient went through severe bleeding. Regarding the markers of bone remodelling, there was not found any significant difference between the groups of treated pregnant patients and the control untreated group.

Conclusion: Pregnancy is a hypercoagulable state. The efficiency of enoxaparin assessed by inhibition of FXa is influenced by many factors during pregnancy, therefore we recommend regular monitoring.

KEYWORDS

Thrombophilia, Pregnancy, Enoxaparin, FXa, Osteoprotegerin, RANKL

PODĚKOVÁNÍ

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli profesoru MUDr. Janu Kvasničkoví, DrSc. za skvělé vedení během mého studia, za cenné rady, připomínky a komentáře k mé práci.

Děkuji všem svým milým spolupracovníkům z Trombotického centra a Centrálních hematologických laboratoří. Jmenovitě bych chtěla poděkovat MUDr. Z. Kudrnové, MUDr. Z. Zenáhlíkové a MUDr. R. Brzežkové za pomoc, podporu, rady i zastoupení v práci. Dále děkuji i našim sestřičkám, hlavně Martině Vrbové, za pomoc se sběrem dotazníků. Za spolupráci a konzultace ohledně laboratorních metod děkuji Mgr. I. Malíkové a Ing. J. Hájkové. Doc. L. Pecenovi CSc. děkuji za návrh a zhodnocení statistických metod.

V neposlední řadě děkuji své rodině a manželovi za jejich podporu a trpělivost při mých studiích, bez nich by tato práce nemohla vzniknout.

Tato práce byla provedena s podporou výzkumného záměru MZ0VFN2005.

OBSAH

1	ÚVOD	12
1.1	EPIDEMIOLOGIE TROMBOEMBOLICKÝCH PŘÍHOD V TĚHOTENSTVÍ A ŠESTINEDEŘÍ.....	12
1.2	RIZIKOVÉ FAKTORY TROMBOEMBOLICKÉ NEMOCI V TĚHOTENSTVÍ A ŠESTINEDEŘÍ.....	13
1.3	TĚHOTENSTVÍ JAKO HYPERKOAGULAČNÍ STAV	14
1.3.1	Koagulační faktory	14
1.3.2	Inhibitory koagulace	16
1.3.3	Fibrinolýza.....	17
1.3.4	Trombocyty	18
1.3.5	Endotel.....	18
1.3.6	Hemodynamické změny	19
1.4	TROMBOFILIE V TĚHOTENSTVÍ	19
1.4.1	Dědičné a získané trombofilní stavy	20
1.4.1.1	Deficit antitrombinu.....	20
1.4.1.2	Deficit proteinu C	20
1.4.1.3	Deficit proteinu S	21
1.4.1.4	Mutace FV-Leiden.....	21
1.4.1.5	Mutace F II – protrombinu	21
1.4.1.6	Hyperhomocysteiémie	21
1.4.1.7	Zvýšení koncentrace FVIII.....	22
1.4.1.8	Antifosfolipidový syndrom	22
1.5	TĚHOTENSKÉ KOMPLIKACE U PACIENTEK S TROMBOFILIÍ	22
1.5.1	Opakované potraty	23
1.5.2	Preeklampsie	24
1.5.3	Intrauterinní růstová retardace plodu (IUGR).....	24
1.5.4	Abrupce placenty.....	25
1.5.5	Patogeneze těhotenských patologií u žen s trombofilními stavy	25
1.6	ANTIKOAGULAČNÍ LÉČBA V TĚHOTENSTVÍ.....	25

1.6.1	Antagonisti vitamínu K (VKA)	26
1.6.2	Aspirin	27
1.6.3	Danaparoid sodný	28
1.6.4	Nefrakcionovaný heparin (UFH)	28
1.6.5	Nízkomolekulární hepariny (LMWH)	29
1.6.5.1	Mechanismus účinku	30
1.6.5.2	Jiné potenciální role nízkomolekulárních heparinů	31
1.6.5.3	Nežádoucí účinky:	33
1.6.5.3.1	Osteoporóza indukovaná dlouhodobým podáváním nízkomolekulárních heparinů ..	33
1.6.5.3.2	Kazuistiky z literatury	34
1.6.5.3.3	Souhrnné studie	35
1.6.5.3.4	Retrospektivní studie	36
1.6.5.3.5	Randomizované studie	37
1.6.5.3.6	Vliv heparinů na kostní metabolismus	37
2	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	38
2.1	SLEDOVÁNÍ PARAMETRŮ KOAGULACE	38
2.2	VYHODNOCENÍ ÚČINNOSTI LÉČBY	38
2.3	DOTAZNÍKOVÁ STUDIE NA NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY	38
2.4	ZHODNOCENÍ VLIVU HEPARINŮ NA KOSTNÍ METABOLISMUS	38
3	SOUBOR A METODY	39
3.1	SOUBOR	40
3.1.1	Soubor A (pro část výsledků 4.1, 4.2, 4.3, 4.4)	41
3.1.1.1	Pacienti	41
3.1.1.2	Terapeutický postup	41
3.1.2	Soubor B (pro část výsledků 4.5)	42
3.1.2.1	Pacientky	42
3.1.2.2	Terapeutický postup	43
3.2	METODY	43
3.2.1	Metody A (pro část výsledků 4.1, 4.2, 4.3)	43
3.2.2	Metody B (pro část výsledků 4.4)	46
3.2.3	Metody C (pro část výsledků 4.5)	47

3.3	STATISTICKÁ ANALÝZA:	47
4	VLASTNÍ VÝSLEDKY	49
4.1	CHARAKTERISTIKA SOUBORU	49
4.2	ZMĚNY KOAGULAČNÍCH PARAMETRŮ, PARAMETRŮ KREVNÍHO OBRAZU A PROTEINŮ AKUTNÍ FÁZE U TĚHOTNÝCH ŽEN S TROMBOFILÍÍ UŽÍVAJÍCÍCH CLEXANE 0,4 ML S.C. 1 X DENNĚ	53
4.2.1	Parametry krevního obrazu	55
4.2.2	Koagulační parametry	61
4.2.3	Proteiny akutní fáze:.....	71
4.3	SLEDOVÁNÍ ÚČINNOSTI ANTIKOAGULAČNÍ LÉČBY V TĚHOTENSTVÍ, MONITORACE POMOCÍ ANTI FXA AKTIVITY	78
4.3.1	Výsledky anti FXa.....	78
4.4	DOTAZNÍKOVÁ STUDIE – ZHODNOCENÍ NEŽÁDOUCÍCH ÚČINKŮ LMWH V MÍSTĚ VPICHU	84
4.5	ZHODNOCENÍ Vlivu ENOXAPARINU NA MARKERY KOSTNÍ REMODELACE....	91
4.5.1	Markery kostní formace	91
4.5.2	OPG/RANKL systém.....	91
5	DISKUZE	101
5.1	DISKUZE K PRVNÍ ČÁSTI DIZERTAČNÍ PRÁCE	101
5.2	DISKUZE K DRUHÉ ČÁSTI DIZERTAČNÍ PRÁCE	102
5.3	DISKUZE KE TŘETÍ ČÁSTI DIZERTAČNÍ PRÁCE	103
5.4	DISKUZE KE ČTVRTÉ ČÁSTI DIZERTAČNÍ PRÁCE	105
6	ZÁVĚR.....	109
7	LITERATURA.....	112

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A1AT	alfa1-antitrypsin
ACCP doporučení	doporučení komory amerických hrudních lékařů, z angl. American College of Chest Physicians Evidence-Based Guidelines
APA	antifosfolipidové protilátky
APC	aktivovaný protein C
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
ATIII	antitrombin
BMD	kostní denzita, z angl. bone mass density
BMI	body mass index
CBS	cystationin beta-syntáza
CMP	cévní mozková příhoda
COX	cyklooxygenáza
CRP	C-reaktivní protein
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
Fbg	fibrinogen
FII, FV, FVI, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIII, FXa	faktor II, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, aktivovaný faktor X
HAK	hormonální antikoncepce
HELLP	pozdní gestóza, z angl. hemolysis, liver enzymes, low platelet count
HŽT	hluboká žilní trombóza
IL	interleukin
INR	mezinárodní normalizovaný poměr protrombinového času, z angl. international normalized ratio
IUGR	intrauteriní růstová retardace plodu, z angl. intrauterine growth retardation
LA	lupus antikoagulans

LMWH	nízkomolekulární heparin, z angl. low molecular weight heparin
MP	mikropartikule
MTHFR	metylentetrahydrofolátreduktáza
OPG	osteoprotegerin
ORM	orosomukoid
PAI -1,2	inhibitor aktivátoru plazminogenu I, II
PC	protein C
PE	plicní embolie
PREA	prealbumin
PS	protein S
RANK, RANKL	receptor aktivátor nukleárního faktoru kappa B - ligand
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase z angl. realtime-polymerase chain reaction
TEN	tromboembolická nemoc
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor cesty tkáňového faktoru
TM	trombomodulin
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TRF	transferin
TT	trombinový čas
TXA2	tromboxan A2
UFH	nefrakcionovaný heparin, z angl. unfractionated heparin
UPT	umělé přerušení těhotenství
VKA	antagonisti vitamínu K
vWF	von Willebrandův faktor
WHO	Světová zdravotnická organizace, z angl. World Health Organisation

1 ÚVOD

Tromboembolické příhody patří mezi nejobávanější komplikace v těhotenství a jsou stále na předních místech mateřské nemoci a úmrtnosti v civilizovaných zemích. V graviditě se často manifestují také dědičné a získané trombofilie. Přítomnost trombofilie několikanásobně zvyšuje riziko tromboembolické nemoci, ale podle mnoha studií se u žen s hyperkoagulačním stavem setkáváme ve větší míře i s časnými opakovanými potraty, odumřením plodu in utero, růstovou retardací plodu a pozdními těhotenskými komplikacemi (preeklampsie, abrupce placenty).

1.1 EPIDEMIOLOGIE TROMBOEMBOLICKÝCH PŘÍHOD V TĚHOTENSTVÍ A ŠESTINEDĚLÍ

V rozvinutých zemích je až 23,4 % úmrtí v těhotenství a šestinedělí způsobeno tromboembolickou nemocí (1). Česká republika nebyla výjimkou, tromboembolická nemoc zde byla hlavní příčinou mateřské mortality, až do doby zavedení miniheparinizace v roce 1993 (2). Incidence tromboembolické nemoci v těhotenství je asi 85/100.000 těhotenství (3).

Riziko tromboembolické nemoci je 5x vyšší v šestinedělí než v těhotenství. Hluboká žilní trombóza je v těhotenství 3x častější než plicní embolie (4). Přibližně 50 % trombotických příhod v těhotenství a šestinedělí má souvislost s dědičným nebo získaným trombofilním stavem (5).

Podle nové studie „MEGA“ bylo zjištěno, že riziko hluboké žilní trombózy je asi 5x vyšší v graviditě a 60x vyšší během prvních 3 měsíců po porodu ve srovnání s netěhotnými ženami. U gravidních žen, nositelek trombofilní mutace FV-Leiden bylo riziko trombózy 52x vyšší. U žen s trombofilní mutací FII-protrombin bylo riziko 31x vyšší, než u netěhotných žen bez trombofilních mutací (6). Důležité je i to, že až u 16 % neléčených trombóz dochází v těhotenství k plicní embolii, která je zatížena vysokou mortalitou (6). Nejčastější příčinou úmrtí rodiček v USA během 90-tých let 20. století byla plicní embolie na podkladě tromboembolické nemoci a z toho ve 20 % případů šlo o úmrtí spojená přímo s porodem.

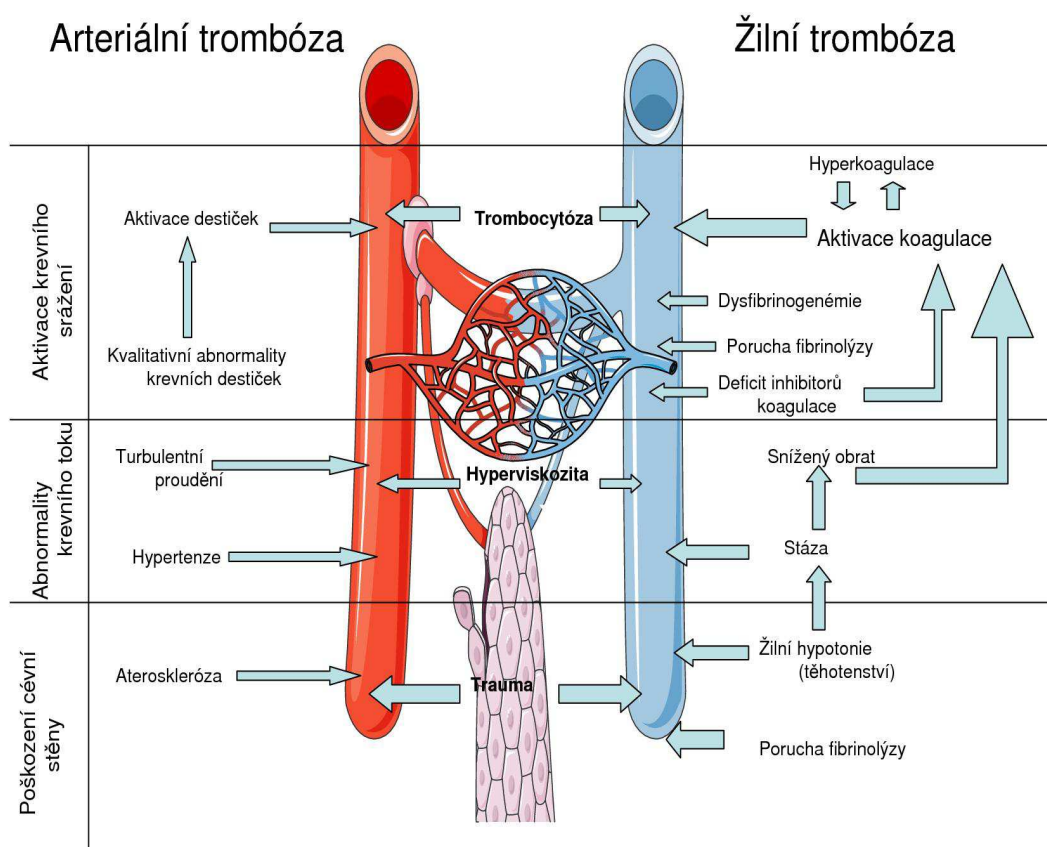
1.2 RIZIKOVÉ FAKTORY TROMBOEMBOLICKÉ NEMOCI

V TĚHOTENSTVÍ A ŠESTINEDĚLÍ

U těhotných žen jsou fyziologicky přítomny dva ze tří faktorů Virchovy trias (hyperkoagulační stav a žilní městnání). Zdravá těhotná žena má v porovnání se zdravou netěhotnou ženou 5x vyšší riziko vzniku tromboembolické nemoci (7). K další rizikovým faktorům patří vyšší věk (> 35 let), obezita (BMI > 30), multiparita, osobní nebo rodinná anamnéza tromboembolické nemoci, trombofilie, klid na lůžku, imobilita (> 4 dny), hyperemesis, dehydratace, interní onemocnění (např. závažná infekce, městnavé srdeční selhání, nefrotický syndrom), preklampsie, varixy, operační zákrok (sectio cesarea) a trauma (8). Operační porod císařským řezem významně zvyšuje riziko tromboembolické nemoci v porovnání s fyziologickým vaginálním porodem (9). Přehled rizikových faktorů je uveden v Tab. 1 a na Obr. 1 je schematicky znázorněn princip vzniku trombózy podle Virchowa.

Tab. 1. Rizikové faktory žilní trombózy a plicní embolie v těhotenství a šestinedělí (9)

Existující rizikové faktory	Nově vzniklé rizikové faktory
Tromboembolická nemoc v anamnéze	Hyperstimulační syndrom
Dědičné trombofilie (trombofilní mutace)	Hyperemesis
Získané trombofilie (např. antifosfolipidový syndrom)	Dehydratace
Obezita	Preeklampsie, HELLP
Masivní varixy	Imobilita po porodu
Myeloproliferativní onemocnění	Krevní ztráta
Chronické zánětlivé, nebo autoimunitní onemocnění	Chirurgický zákrok (např. sectio cesarea)



Obr. 1. Virchowova trias.

Na obrázku jsou schématicky znázorněny základní složky Virchowovy triády v arteriálním a žilním systému.

1.3 TĚHOTENSTVÍ JAKO HYPERKOAGULAČNÍ STAV

Fyziologické těhotenství je asociováno s patrnými laboratorními změnami ve všech součástech hemostázy, zahrnujícími vzestup koncentrace většiny koagulačních faktorů, pokles koncentrace některých inhibitorů koagulace a ztlumení fibrinolytické aktivity, což vede k hyperkoagulačnímu stavu. I když tyto změny, které jsou způsobeny hormonálními vlivy, chrání těhotnou ženu před závažným krvácením při porodu, jsou zároveň jednou z příčin zvýšené incidence tromboembolické nemoci v graviditě a šestinedělí.

1.3.1 Koagulační faktory

Přirozený proces hemostázy je dynamická a choulostivá rovnováha mezi koagulačním a fibrinolytickým systémem. Faktor XIII (fibrin stabilizující

faktor) stoupá v časném stádiu těhotenství, ve druhém trimestru začíná klesat a na běžnou koncentraci se dostává ve třetím trimestru. Koncentrace faktorů XII, X a IX stoupají v průběhu celé gravidity (10). V kontrastu k tomu faktor XI v průběhu těhotenství klesá. Tato změna byla dávana do souvislosti s vyšší spotřebou faktoru XI. Ačkoliv je aktivace faktoru XI jedním z klíčových kroků v generaci trombinu, jsou jeho koncentrace v graviditě nižší jako protipól stoupající aktivity ostatních koagulačních faktorů (10).

Koagulační aktivita faktoru FVIII, dále koncentrace von Willebrandova faktoru (vWF), který slouží jako nosič faktoru FVIII a hraje roli v adhezi destiček, stoupají progresivně v průběhu těhotenství až na 200-300 % (11). Faktor VII se také postupně zvyšuje během gravidity až na 300 % své aktivity. Vzestup koncentrace FV v časném těhotenství je následován poklesem a stabilizací, i přesto koagulační aktivita postupně v průběhu těhotenství stoupá. Studie změn koncentrace protrombinu (FII) poskytují nejednoznačné závěry, pravděpodobně se koncentrace nemění (10). Fibrinogen stejnoměrně postupně stoupá až k trojnásobným hodnotám ve třetím trimestru (10). Koagulační kaskáda je iniciována tkáňovým faktorem (TF), který vytváří proteolyticky aktivní komplex s faktorem VII. TF je transmembránový glykoprotein, který je exprimován na mimo-cévních buňkách, v menší míře také na monocytech a endoteliálních buňkách (exprese TF je mimo jiné indukována prozánětlivými cytokiny, endotoxinem, C-reaktivním proteinem, homocysteinem).

Některé protizánětlivé cytokiny např. interleukin 10 (IL 10) inhibují expresi TF (12). Koncentrace rozpustného tkáňového faktoru se v průběhu gravidity nemění, ale jeho exprese na monocytech je nižší než u netěhotných žen (12). Hodnoty TF klesají v druhém trimestru a navracejí se do normálu 3 dny po porodu. Tkáňový faktor je iniciátor koagulace in vivo, jeho nižší exprese a aktivita na cirkulujících monocytech může hrát důležitou protektivní roli. Protizánětlivý cytokin IL 10 inhibuje monocytární expresi TF.

Koncentrace IL 10 v průběhu normální gravidity stoupají a hrají tak důležitou roli v nízké expresi TF na monocytech. Naopak nízké koncentrace IL 10 jsou asociovány s těhotenskými patologiemi, jako například častějšími aborty, preeklampsií a pravděpodobně je nízká exprese IL 10 asociována i s častějším

výskytem trombózy v těhotenství (12). Expresi tkáňového faktoru na monocytech in vitro indukuje také homocystein. Plazmatický homocystein je nižší v těhotenství, s nejnižšími hodnotami ve 2. a 3. trimestru, a po 2-3 dnech po porodu má opět normální koncentrace, téměř symetricky s monocytárním TF (13). Je možné, že snížení homocysteinu hraje roli v down-regulaci monocytárního tkáňového faktoru.

K výrazným koagulačním změnám dochází bezprostředně po porodu, kdy dramaticky klesají hladiny faktoru XII, prekalikrein a vysokomolekulárního kininogenu a výrazně stoupají markery koagulační a trombocytární aktivace (14). V průběhu prvních hodin po porodu dochází k normalizaci fibrinolytické aktivity, pravděpodobně v důsledku snížené produkce PAI 2 po odloučení placenty. K návratu koncentrací koagulačních faktorů do normálu dochází během několika týdnů po porodu.

1.3.2 Inhibitory koagulace

Inhibitory koagulace zajišťují, že generace trombinu zůstane lokalizovaná a limitovaná. Změny koagulačních faktorů v těhotenství jsou doprovázeny i průběžnými změnami inhibitorů hemostázy. Antitrombin III (ATIII), heparin kofaktor II, alfa1-antitrypsin (A1AT) a inhibitor cesty tkáňového faktoru (TFPI) jsou serinové proteázy, jež inhibují koagulační kaskádu, trombin, FXa, TF:VIIa. Koncentrace ATIII je stabilní, přičemž koncentrace heparinového kofaktoru II a alfa1-antitrypsinu stoupají. Je známo velice málo o funkci TFPI v graviditě, přesto byla zjištěna jeho nižší koncentrace v průběhu porodu než u netěhotných kontrol (10). Protein C (PC), trombomodulin (TM), protein S (PS), C4b vazebný protein a APC inhibitor jsou komponenty systému proteinu C. Aktivace tohoto systému se spouští v okamžiku vazby trombinu na trombomodulin a rapidně snižuje vazbu faktoru VIIIa a Va na fosfolipidové povrchy. Tato degradace se 10x až 20x násobí při kombinaci PC a jeho kofaktoru PS (11). Koncentrace TM stoupají v průběhu těhotenství a koncentrace proteinu S postupně klesá až na 30-50 % aktivity. Koncentrace proteinu C jsou konstantní, nicméně získaná APC rezistence se v graviditě zvyšuje o 50 % (11). Vzestup APC rezistence koreluje se vzestupem FVIII a

poklesem proteinu S (11). Všeobecně je těhotenství asociováno s poklesem inhibitorů koagulace, ačkoliv jsou také prokázány obousměrné změny v koncentraci i aktivitě koagulačních inhibitorů a je zřejmé, že tyto změny se významnou měrou podílejí na křehké rovnováze koagulace a fibrinolýzy v graviditě (15).

Anexiny patří do skupiny proteinů vázajících negativně nabitých fosfolipidy. Mají antikoagulační aktivitu *in vitro* a výrazně prodlužují fosfolipid-dependentní koagulační reakce. Antikoagulační efekt spočívá ve vytěsnění koagulačních proteinů z fosfolipidového povrchu buněk (16). V graviditě je výrazně zvýšená plazmatická koncentrace anexinu IV a dále výrazně stoupá i po porodu. Anexin IV je exprimován na bazálním a anexin V na apikálním povrchu buněk syncytiotrofoblastu. Anexin IV, který se po porodu vyplaví do krevního oběhu matky, může hrát roli v prevenci diseminované intravaskulární koagulace (DIC) a anexin V se podílí na prevenci trombotických komplikací v placentě (16). Nízká exprese anexinů na placentárním trofoblastu u preeklampsie a antifosfolipidového syndromu souvisí s četným výskytem tromboembolických příhod a placentárních infarktů u těchto stavů (16). Hyperkoagulační stav v těhotenství se dá zjistit pomocí markerů aktivace koagulace (protrombinové fragmenty F1+2), které jsou odštěpeny od protrombinu při jeho aktivaci faktorem Xa a během gravidity progresivně stoupají (10).

1.3.3 Fibrinolýza

Fibrinolýza je složitý regulační systém, jehož hlavní náplní je, aby fibrinová depozita byla ideálně definována místem a časem. Tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA) mění plazminogen na plazmin a ten štěpí fibrinová vlákna, ale podílí se i na štěpení fibrinogenu, fibronektinu a dalších koagulačních faktorů. Alfa-2 antiplazmin, inhibitor plazminu a inhibitor aktivátoru plazminogenu typ 1 a nově i 2 (PAI-1, PAI-2) kontrolují degradaci fibrinu plazminem. PAI-1 (produkovaný endotelem) stoupá až v posledním trimestru zejména těsně před porodem, ale vzestup PAI-2 (produkovaný převážně placentou) je detekovatelný již od 8. týdne těhotenství a stoupá až do 33. týdne (17). Paradoxně jsou koncentrace PAI-2 nižší u preeklampsie,

pravděpodobně z důvodu placentární insuficience. Koncentrace tPA je v počátku těhotenství stejná jako u netěhotných, ale je tam postupná tendence zvyšování se jeho koncentrace v průběhu gravidity (17). Tyto změny vedou k vzestupu D-dimerů a fibrin degradačních produktů (14). V tabulce číslo 2 je souhrnný přehled změn hemostázy v těhotenství.

Tab. 2. Změny hemostázy v těhotenství (10)

	Stoupá	Klesá	Nemění se
Koagulační faktory	I, V, VII, VIII, IX, X	XI	II
Inhibitory koagulace	trombomodulin	PS	PC
Adhezivní proteiny	vWF		
Fibrinolýza	PAI-1, PAI-2	t-PA	TAFI
Mikropartikule a antifosfolipidové protilátky	MP		APLA
Lokální změny v placentárním oběhu	TF	TFPI	

1.3.4 Trombocyty

Mírná trombocytopenie v těhotenství je poměrně častým nálezem. Podle Bremme, et al. (14) je počet destiček ve 24. týdnu těhotenství signifikantně nižší než ve 12. týdnu. Navíc je zde důkaz o aktivaci destiček in vivo v pozdním těhotenství – dokumentován vyšší koncentrací tromboglobulinu v II. a III. trimestru oproti I. trimestru a netěhotným kontrolám. Jiné agregační agens, tromboxan A2 (TXA2), jež je účinný vasokonstriktor, stoupne již v časně graviditě a zůstává zvýšený (18).

1.3.5 Endotel

K aktivaci endotelu dochází při působení cytokinů (interleukinů 1b a 6), uvolňuje se TF a dále následuje exprese tzv. adhezivních molekul – selektinů a integrinů a poté dochází k zachycení leukocytů, aktivaci trombocytů a rozvoji zánětlivé a koagulační reakce. V těhotenství je koagulační rovnováha velmi křehká a rozvoj neinhibované koagulační reakce (např. diseminovaná

intravaskulární koagulace, trombóza) relativně snadný, proto je endotel těhotných žen před aktivací zánětlivými cytokiny chráněn. Je to mimo jiné způsobeno i postupným zvýšením hladiny těhotenských estrogenů, které v endotelu potlačují syntézu adhezivních molekul typu E-selektinu, P-selektinu a ICAM-1 (19).

1.3.6 Hemodynamické změny

Gravidní ženy mají zvýšený celkový plazmatický objem i srdeční výdej. Vlivem progesteronu dochází k relaxaci hladké svaloviny, tedy i svaloviny cévní stěny, čímž se snižuje žilní návrat z dolních končetin a těhotná děloha působí jako mechanická překážka. Asi 90 % HŽT v graviditě vzniká na levé dolní končetině, protože se útlakem dělohy zdůrazní komprese levé v. iliaca ilickou arterií (20).

1.4 TROMBOFILIE V TĚHOTENSTVÍ

Trombofilie jsou dědičné nebo získané poruchy, při kterých je zvýšená tendence ke vzniku krevních sraženin. Je známo, že až 15 % populace má nějaký trombofilní stav (21). Mezi nejčastější dědičné trombofilie patří mutace genů kódujících koagulační faktory: faktor V (Leidenská mutace), faktor II (protrombin), homozygotní mutace genu pro methylenetetrahydrofolatreduktázu C677T, deficit antitrombinu, deficit proteinu C a deficit proteinu S. Mezi nejčastější získané trombofilní stavy patří antifosfolipidový syndrom, hyperhomocystémie a elevace faktoru VIII (22).

Bylo publikováno mnoho studií, které prokázaly asociaci mezi trombofilii a tromboembolickou příhodou v graviditě nebo šestinedělí (6, 23, 24). V retrospektivních studiích, kdy byly vyšetřovány pacientky, které prodělaly TEN v souvislosti s graviditou, bylo zjištěno, že až 50 % má trombofilii (5). V tabulce číslo 3 je přehledně uvedena prevalence trombofilních stavů v populaci.

Tab. 3. Trombofilní stavy (25)

Trombofilie	Výskyt v populaci (%)	Výskyt mezi pacienty s první epizodou TEN (%)
Faktor V Leiden	3 až 7**	20
Protrombin G20210A	1 až 3	6
Deficit proteinu C	0,2 až 0,4	3
Deficit proteinu S	není známo	1 až 2
Deficit antitrombinu	0,02	1
Mírná hyperhomocysteinémie	5 až 10	10 až 25
Elevace FVIII	11	25
Lupus antikoagulans	0 až 3	5 až 15
Elevace antifosfolipidových protilátek	2 až 7	14
** prevalence v severní Evropě je až 15 %		

1.4.1 Dědičné a získané trombofilní stavy

1.4.1.1 Deficit antitrombinu

Antitrombin je inhibitor serinových proteáz, který reguluje koagulaci inkaktivací trombinu a dalších koagulačních faktorů: Xa, IXa, XI a, XIIa (26). Deficit antitrombinu je autozomálně dominantně dědičné onemocnění. Klinicky se projevuje opakovanými epizodami žilního tromboembolismu, relativní riziko výskytu žilního tromboembolismu je asi 40x vyšší (27). Výskyt trombóz je často v neobvyklých lokalizacích a vznikají bez vyvolávajícího faktoru. Koncentrace antitrombinu se snižuje sekundárně při DIC, preeklampsii, při onemocněních jater a nefrotickém syndromu (28).

1.4.1.2 Deficit proteinu C

Protein C je K-dependentní plazmatický protein, který je aktivován komplexem trombin-trombomodulin a v koagulační kaskádě inhibuje faktor Va a VIIIa (29). Deficit proteinu C má tři významné klinické projevy: TEN u

dospělých heterozygotů, purpura fulminans u novorozenců homozygotů a warfariem indukovaná nekróza kůže u dospělých heterozygotů (30).

1.4.1.3 Deficit proteinu S

Protein S je K-dependentní protein, který je kofaktorem proteinu C a zesiluje inhibiční efekt proteinu C na aktivovaný faktor V a VIII. Ke klinickým projevům deficitu proteinu S patří kromě žilního tromboembolismu, také tepenné trombózy včetně cévních mozkových příhod i častější výskyt opakovaných potratů (31).

1.4.1.4 Mutace FV-Leiden

Aktivovaný protein C inhibuje v koagulační kaskádě FVa a FVIIIa. Při mutaci faktoru V Arg506Gln (Leiden) je faktor V k této inhibici méně citlivý a inaktivuje se 10x pomaleji (32). Mutace FV-Leiden je v naší populaci nejčastější trombofilií (viz Tabulka č.3). U gravidních žen, nositelek trombofilní mutace FV-Leiden je riziko trombózy 52x vyšší, než u zdravých netěhotných žen (6).

1.4.1.5 Mutace F II – protrombinu

Podkladem trombofilie je bodová mutace G20210A genu pro protrombin. Výskyt v populaci je 2 – 3 %. Mutace významně zvyšuje riziko trombózy a je zjištěn i signifikantně vyšší výskyt trombóz v neobvyklých lokalizacích např. trombózy mozkových splavů (23).

1.4.1.6 Hyperhomocysteiémie

Homocystein je neesenciální jednoduchá aminokyselina, tvořící se během přeměny methioninu na cystein. Hyperhomocysteinémie byla identifikována jako nezávislý rizikový faktor pro mozkovou mrtvici, infarkt myokardu, ischemickou chorobu periferních artérií a žilní trombotické onemocnění. Aminokyselina homocystein je za normálních podmínek metabolizována pomocí enzymu cystathionin- β -syntáza (CBS), který požaduje, vitamin B6 jako kofaktor a dále přes dráhu enzymu methylenetetrahydrofolátreduktázy

(MTHFR), což je folát-dependentní enzym, dále a methioninsyntázu, která vyžaduje vitamin B12 jako kofaktoru.

Dědičné hyperhomocystémie jsou způsobeny mutacemi těchto enzymů. Získané hyperhomocysteinémie mohou být způsobeny nedostatkem kyseliny listové, vitaminu B6 a B12 např. při renální nedostatečnosti, hypotyreóze, diabetu, perniciozní anémii, při onemocnění střev atd.(33).

1.4.1.7 Zvýšení koncentrace FVIII

Zvýšení koncentrace FVIII nad 150 % představuje 3x vyšší riziko pro vznik trombózy. FVIII je reaktant akutní fáze, zvyšuje se při všech zánětlivých onemocněních. A může být také ovlivněn dalšími faktory jako například těhotenstvím, krevní skupinou, koncentrací vW faktoru (34).

1.4.1.8 Antifosfolipidový syndrom

Je získaný trombofilní stav definovaný jednak klinicky a jednak laboratorně. Klinická kritéria zahrnují opakované epizody žilní nebo arteriální trombózy, opakované těhotenské komplikace (aborty, intrauterinní růstová retardace plodu a jiné), trombocytopenii a vzácně i neurologické a kožní abnormality. Laboratorně musí být opakovaně prokázány antifosfolipidové protilátky buď koagulační metodou (lupus antikoagulans), nebo ELISA testem (7).

1.5 TĚHOTENSKÉ KOMPLIKACE U PACIENTEK S TROMBOFILÍ

Rostoucí množství důkazů získaných v průběhu posledních několika let naznačuje významnou roli trombofilií při rozvoji těhotenských komplikací. Mnohé studie prokázaly vyšší výskyt opakovaných potratů, porodů mrtvého plodu, intrauterinní růstové retardace plodu (IUGR), abrupce placenty a preeklampsie u žen s trombofilií. Placentární nedostatečnost je způsobená trombózou cév a ukládáním fibrinových depozit. Úspěšný výsledek těhotenství závisí na vývoji a udržení přiměřené placentární cirkulace. Abnormality placentárních cév mohou vést k řadě patologií.

1.5.1 Opakované potraty

Přibližně 20 % žen prodělá v životě potrat (35). Opakované potracení (2x a více) postihuje celosvětově asi 5 % žen v reprodukčním věku (35). I když je opakované potracení způsobeno mnohými příčinami (chromosomální translokace a inverze, anatomické změny dělohy, endokrinologické a autoimunitní onemocnění), stále zůstává mnoho důvodů neobjasněných. Od roku 1989, kdy byla objevena významná souvislost mezi opakovanými potraty a antifosfolipidovým syndromem, vzniklo mnoho studií, které se snaží prokázat vliv trombofilií na různé těhotenské komplikace. Přestože nashromážděných dat o daném tématu je hodně, jejich výsledky jsou protichůdné.

V těchto studiích jsou definovány potraty v I. trimestru (do 13. týdne těhotenství) jako časný, potraty ve II. trimestru (od 13. do 24. týdne těhotenství) jako pozdní a předčasný porod (od 24. do 38 týdne). V mnohých studiích byla prokázána statisticky významná souvislost trombofilní mutace FV-Leiden s časnými i pozdními potraty (36, 37).

V jiné studii, která zkoumala souvislost deficitu antitrombinu, proteinu C a proteinu S s potraty, autoři prokázali, že 42 z celkem 188 těhotenství (22%) u žen s trombofilií skončilo potratem. Kontrolní skupině došlo k potratu u 23/202 (11%), (OR 2,0; 95 % CI 1,2–3.) (38). Do systematického přezkoumání z roku 2006 bylo zahrnuto 35 studií (celkem 7167 pacientek s časnými potraty) a 15 studií (celkem 4038 pacientek s pozdními potraty) (39). Obě tyto klinické jednotky vykazovaly statisticky významnou souvislost s trombofilií. Z analýzy vyplývá, že existuje významná souvislost mutace FV-Leiden jak v homozygotní tak v heterozygotní formě s časnými potraty (OR 2,71; 95 % CI 1,32 do 5,58) a (OR 1,68; 95 % CI 1,09 - 2,58) a s pozdními potraty s mutací FV-Leiden v heterozygotní konstituci (OR 2,06; 95 % CI 1,10-3,86). U mutace F II protrombin byla nalezena souvislost s časnými potraty (OR 2,49; 95 % CI 1,24-5,00) a pozdními potraty s (OR 2,66, 95 % CI 1,28 -5,53). Nejvýznamnější souvislost byla prokázána u antifosfolipidových protilátek u časných potratů (OR 3,40, 95 % CI 1,33-8,68) a pozdních potratů (OR 3,30, 95 % CI 1,62-6,70). Časný potraty jsou spojeny i s hyperhomocysteinémií (OR 6,25; 95 % CI 1,37-

28.42) a získanou rezistencí k aktivovanému proteinu C (OR 4,04; 95 % CI 1,67 - 9.76).

Statistická významnost byla zjištěna mezi deficitem proteinu S a pozdními potraty s (OR 20,09, 95 % CI 3,70 - 109,15) (39). Oproti tomu existují i studie, ve kterých nebyla nalezena významná souvislost mezi dědičnými trombofilními mutacemi a časnými potraty (40, 41).

1.5.2 Preeklampsie

Preeklampsie je charakterizována triádou příznaků – hypertenze, proteinurie a otoky. Vyskytuje se pouze v těhotenství a incidence se pohybuje mezi 5-10 %. V publikované meta-analýze 25 studií s celkovým počtem 11183 těhotných pacientek byla, zjištěna statisticky významná souvislost mezi některými druhy trombofilií a preeklampií. Souvislost byla zřejmá s faktorem V Leiden v heterozygotní konstituci (OR 2,19; 95 % CI 1.46 do 3,27), s mutací F II protrombinu v heterozygotní konstituci (OR 2,54; 95 % CI 1,52 až 4.23), s mutací MTHFR v homozygotní konstituci (OR 1,37; 95 % CI 1.07 - 1.76), s hyperhomocysteinémií (OR 3,49; 95 % CI 1.21-10.11) a s antikardiolipinovými protilátkami (OR 2,73; 95 % CI 1,65-4,51) (39).

V jiné meta-analýze studií (celkem 10 studií) bylo zjištěno, že absolutní riziko vzniku preeklampsie u žen s mutací FV-Leiden je 3,8 % a u žen bez této mutace 3,2 %. U žen s mutací protrombinu bylo absolutní riziko vzniku preeklampsie 3,5 % a u žen bez této mutace 3 %. Autoři tyto změny vyhodnotili jako statisticky nevýznamné (42).

1.5.3 Intrauterinní růstová retardace plodu (IUGR)

Výsledky studií zkoumající souvislost trombofilie s IUGR jsou také nejednoznačné. Existují studie, kde je souvislost prokázána: Trombofilie nalezena u 60 %- 70 % procent žen s IUGR, oproti 13 % - 18 % procent žen bez IUGR v anamnéze (43). Ale je známo i mnoho velkých studií, kde nebyla prokázána významná souvislost (44).

1.5.4 Abrupce placenty

Jedná se o předčasné odloučení placenty od děložní stěny před porodem plodu a postihuje asi 0.5 – 3.5 % těhotných žen. Nejvíce jsou ohroženy ženy s hypertenzí, preeklampsií, diabetem, ženy užívající drogy a kuřačky. V dnešní době je častou příčinou trauma při dopravní nehodě nebo sportu. V posledních letech se obrací pozornost i ke zjišťování souvislostí mezi trombofilií a abrupcí placenty. Výsledky jsou opět nejednoznačné (40).

1.5.5 Patogeneze těhotenských patologií u žen s trombofilními stavy

Souvislost trombofilií s těhotenskými patologiemi přivedla vědce k myšlence, že na patogenезi se významně podílí uteroplacentární nedostatečnost a trombóza. I když existuje velice málo studií, které se tímto tématem zabývají (45).

Infarkty placenty byly nalezeny u 72 %-89 % žen s trombofilní mutací a pozdní těhotenskou ztrátou ve srovnání s 28 %-39 % u žen s pozdní těhotenskou ztrátou ovšem bez trombofilní mutace (46). Nicméně v jiných studiích byly placentární infarkty nalezeny stejně často u žen s trombofilií a bez trombofilie, které prodělaly pozdní těhotenskou ztrátu (44).

Patogeneze časných potratů u žen s trombofilií je ještě méně probádána, uvažuje se o možnosti poruchy implantace zárodku a i o možnosti poruchy vývoje uteroplacentární cirkulace. Vztah paternální nebo fetální trombofilie také není dobře prozkoumán a definován (45). Ale předpokládá se, že problém je spíše na straně matky a tento fakt potvrzují i studie, které dokazují jednoznačně pozitivní vliv aplikace nízkomolekulárních heparinů na úspěšné těhotenství. A nízkomolekulární hepariny neprocházejí placentární bariérou a nedostávají se do oběhu plodu. Navzdory silné asociaci mezi trombofilií a opakovanými potraty je pravděpodobnost úspěšně donošeného těhotenství vysoká (20).

1.6 ANTIKOAGULAČNÍ LÉČBA V TĚHOTENSTVÍ

Antikoagulační léčba v těhotenství je indikována k léčbě a prevenci venózního tromboembolismu, k prevenci a léčbě systémového tromboembolismu u

pacientek s mechanickou srdeční chlopní a k prevenci opakovaných potratů, nebo těhotenských komplikací. Použití antikoagulační léčby k prevenci těhotenských komplikací se v praxi za posledních několik let používá stále častěji. Použití antikoagulační léčby v těhotenství má své specifika vzhledem k rizikům pro plod i matku.

K antitrombotické léčbě a prevenci obecně lze použít heparinové přípravky (nefrakcionovaný heparin, nízkomolekulární hepariny a pentasacharidy), dále kumarinové deriváty (warfarin), přímé inhibitory trombinu a antiagregační léky s obsahem kyseliny acetylsalicylové.

1.6.1 Antagonisti vitamínu K (VKA)

Warfarin je perorální antikoagulační léčivo, které inhibuje tvorbu koagulačních faktorů II, VII, IX, X a proteinu C a S v játrech. Antagonisti vitamínu K prostupují placentou, jsou teratogenní a mohou způsobit potrat a krvácení (47). U žen s mechanickou srdeční chlopní, které užívaly po dobu těhotenství warfarin bylo zjištěno, že 35 (6,4 %) z 549 živě narozených dětí mělo vývojovou anomálii (47). Nejčastěji vídaná anomálie byla kumarinová embryopatie, která se projevuje jako nasální hypoplazie nebo tečkovaní epifýz. Končetinová hypoplazie byla nalezena u 1/3 případů embryopatie (48). Výsledky nově publikované multicentrické studie, kde bylo sledováno 666 žen dokázaly, že pokud se na období od 6 týdne do 12 týdne těhotenství nahradí kumarinové preparáty heparinem, je riziko embryopatie nízké (49).

Užívání antagonistů vitamínu K je rizikové také z hlediska abnormalit centrálního nervového systému ve všech trimestrech. Tyto komplikace jsou extrémně vzácné (47). Warfarin může způsobit i krvácivé komplikace u plodu, protože játra plodu jsou nezralé a koncentrace koagulačních faktorů závislých na vitamínu K jsou i u fyziologického plodu velmi nízké. Tento fakt se stává velmi závažným zejména při porodu (47). Riziko krvácení u plodu se výrazně snižuje, pokud je warfarin vysazen 3 týdny před plánovaným porodem a nahrazen heparinem (47). V dnešní době se podává warfarin v graviditě pouze ve výjimečných indikacích (umělá srdeční chlopeň) a řídí se doporučeními 7.

ACCP (7. American College of Chest Physicians Evidence-Based Guidelines) (20).

U žen užívajících dlouhodobě VKA, které otěhotní, se doporučuje změnit léčbu na UFH nebo LMWH (1A) (20). U žen s mechanickou srdeční chlopní, které otěhotní, se navrhuje buď adjustovaná dávka LMWH 2x denně nebo UFH po dobu celého těhotenství, nebo adjustovaná dávka LMWH 2x denně nebo UFH do 13. týdne těhotenství, následně převedení na VKA a před porodem opět převedení na LMWH nebo UFH. U těhotných žen s vysoce rizikovou mechanickou chlopní (spíše starší generace chlopní v mitrální pozici nebo pacientky s anamnézou ŽTE) se navrhuje použití spíše VKA, než heparin (2C) (20).

U žen užívajících dlouhodobě VKA, které se pokoušejí otěhotnět a není kontraindikace k převedení na LMWH nebo UFH, se navrhuje často provádět těhotenské testy a převést na LMWH nebo UFH hned při potvrzení gravidity (2C) (20).

U kojících žen užívajících warfarin, nebo UFH se doporučuje pokračovat v terapii (1A) (20).

1.6.2 Aspirin

Kyselina acetylsalicylová je antitrombotikum blokující shlukování krevních destiček tím, že inhibuje enzym cyklooxygenázu (COX), který je odpovědný za tvorbu prostaglandinů a tromboxanu. Studie na zvířatech prokázaly, že užívání aspirinu v těhotenství zvyšuje riziko vrozených vad u plodu. Největší meta-analýza zahrnující 14 randomizovaných studií s celkem 12416 žen prokázala, že užívání aspirinu během II. a III. trimestru je bezpečné pro matku i plod (50). Další meta-analýza zkoumala riziko během užívání v I. trimestru a nebyla zjištěna zvýšená četnost vrozených vývojových vad. Riziko vzniku vrozených vývojových vad během I. trimestru je podle studií velmi nízké (51). Aspirin se podle ACCP doporučuje v těchto indikacích:

U žen s antifosfolipidovými protilátkami a s opakovanými časnými potraty (3x nebo více) nebo nevysvětleným pozdním potratem, které ale neprodělaly žilní nebo arteriální trombózu, se navrhuje antepartálně podávání profylaktické

nebo střední dávky UFH nebo profylaktické podávání LMWH + aspirin (1B) (20).

U žen s předpokládaným vysokým rizikem preeklampsie doporučujeme nízké dávky aspirinu v průběhu těhotenství (1B) (20).

U všech těhotných žen s protetickou chlopní s vysokým rizikem tromboembolismu se doporučují dále také nízké dávky aspirinu 75 -100 mg/d (2C) (20).

1.6.3 Danaparoid sodný

Je antikoagulans, které obsahuje nízkomolekulární heparinoid. Je získáván ze střevní sliznice prasat a jeho aktivní složky jsou heparan-, dermatan- a chondroitin-sulfát. Podobně jako LMWH je kofaktorem antitrombinu a inhibuje aktivitu faktoru Xa. Jeho hlavní odlišovací parametr od LMWH je, že neobsahuje heparin a heparinové fragmenty. V těhotenství je bezpečný, neprochází přes placentární bariéru. V praxi má využití u pacientek s heparinem-indukovanou trombocytopenií (52).

1.6.4 Nefrakcionovaný heparin (UFH)

Standardní nefrakcionovaný heparin je antikoagulans, které se váže na antitrombin a tím inhibuje faktor IIa a Xa. Je to směs mukopolysacharidových řetězců, jejichž molekulární hmotnost kolísá mezi 3000 až 40 000 Daltony. Antitrombotický účinek je dán vazbou na antitrombin a inhibicí aktivovaného faktoru X a trombinu. Poměr inhibice je 1/1. Vazby na antitrombin jsou ovšem schopny pouze řetězce, které obsahují pentasacharidovou sekvenci, což je pouze 1/3 směsi, 2/3 směsi nemá antikoagulační efekt. Po podání se UFH váže i na endotelie, proteiny akutní fáze, makrofágy a proto je biologický poločas velmi krátký a antikoagulační efekt těžko předvídatelný (zejména u pacientů s elevací proteinů akutní fáze). Proto nevýhodou podávání UFH zůstává i nutnost kontinuálního podávání a pravidelného monitorování (53).

UFH neprochází přes placentární bariéru, takže nemá teratogenní potenciál a nezpůsobuje krvácení u plodu (54)(55). UFH lze během těhotenství použít k prevenci i léčbě tromboembolismu. Profylaktický UFH je podáván

subkutánně 2x -3x denně, buď ve fixních dávkách anebo adjustován pomocí anti FXa. Z léčebné indikace je podáván buď v kontinuální intravenózní infúzi, kdy se dávka upravuje podle cílového APTT, nebo subkutánně 2x denně (v dávce, která dostatečně prodlouží APTT měřené 6 hodin po vpichu) (20). V průběhu těhotenství je účinnost heparinu omezována vysokou fyziologickou koncentrací heparin-vázajících proteinů (fibrinogen, FVIII a jiné) v plazmě. Proto k dosažení cílového APTT je často nutné použít vyšší dávky heparinu než u netěhotných pacientek. Subkutánní dávkování UFH může způsobit perzistentní antikoagulační efekt, kdy i po 28 hodinách po poslední injekci, stále přetrvává prodloužené APTT. To může zkomplikovat porod krvácením (55).

Přibližně 3 % pacientů užívajících UFH prodělá imunitní trombocytopenii zprostředkovanou IgG protilátkami. Heparinem indukovaná trombocytopenie může vést k rozšíření stávající trombózy i ke vzniku nové arteriální nebo žilní trombózy (56). Ohledně výskytu těchto závažných nežádoucích účinků v těhotenství nejsou publikovány žádné studie. U těhotných žen, které prodělaly HIT je (podle ACCP) doporučeno podávání danaparoidu sodného (57).

Dlouhodobé podávání UFH způsobuje osteoporózu u lidí i laboratorních zvířat (58, 59, 60). Úbytek kostní hmoty u laboratorních zvířat byl závislý na dávce heparinu a délce podávání a projevoval se zvýšenou osteoresorbci spongiózní kosti a sníženou kostní novotvorbou. Heparinem indukovaná osteoporóza se klinicky projevuje vertebrálními frakturami u 2-3 % osob, ale významné snížení kostní denzity se zjistilo u 30 % osob (60). V jedné malé studii (n = 40) bylo prokázáno ještě vyšší procento fraktur (15 %), při délce užívání 3-6 měsíců a dávce 10 000 j. 2x denně subkutánně (61).

1.6.5 Nízkomolekulární hepariny (LMWH)

Jsou základní, nejbezpečnější a nejčastěji používané antikoagulační léky v těhotenství. Používají se k léčbě a prevenci žilního tromboembolismu a k prevenci opakovaných potratů nebo těhotenských komplikací.

1.6.5.1 Mechanismus účinku

Mají nízkou molekulární hmotnost (< 6000 Daltonů) a s tím související nízkou afinitu k endoteliím a plazmatickým bílkovinám. Tím se udržuje jejich vysoká plazmatická hladina i při bolusovém podání LMWH a pokles není závislý na velikosti dávky heparinu. Tato skutečnost je podkladem pro výrazně lepší biologickou dostupnost nízkomolekulárních heparinů a umožňuje tím lépe určit jejich antikoagulační působení (53).

Mechanismus antikoagulačního účinku je dán vazbou k antitrombinu. Afinita nízkomolekulárního heparinu k antitrombinu je 4x vyšší než je afinita nefrakcionovaného heparinu a LMWH se vyznačují vysokým poměrem anti FXa aktivity k anti FIIa aktivitě (62). Antitrombotický účinek nízkomolekulárních heparinů je ovšem způsoben i ovlivněním fibrinolýzy – dochází k uvolňování tPA a inhibici PAI (63).

LMWH i významně ovlivňují i funkci endotelu tím, že dochází k uvolňování TFPI. TFPI má dvojnásobný inhibiční efekt, za prvé inhibuje FXa vazbou na jeho aktivní část a za druhé inhibuje TF, který se uvolňuje z tkání při jejich poškození (64).

Velkou předností LMWH zůstává i významně lepší biologická dostupnost a delší poločas eliminace. To je dáno nižší tendencí k vazbě na plazmatické bílkoviny, endotelie a makrofágy. Z těchto důvodů není monitorování účinku ve většinu případů nutné (výjimkou jsou těhotné ženy, obézní pacienti a pacienti s poruchou renálních funkcí) (65, 66).

Laboratorní kontrola účinku nízkomolekulárních heparinů se provádí stanovením anti FXa aktivity chromogenním substrátem (67).

Fyziologické těhotenské změny jako je zvýšení hmotnosti, zvýšená renální clearance a distribuční objem a zvýšená koncentrace některých heparin-vázajících proteinů (FVIII, fibrinogen) může snížit biologickou dostupnost LMWH v porovnání s netěhotnými. V praxi mají lékaři tendenci používat dávkování, které je indikované pro netěhotné pacienty. Americká gynekologicko-porodnická asociace doporučuje, vzhledem k nedostatku údajů o adekvátní dávce LMWH v těhotenství, pravidelné monitorování účinnosti aktivity faktoru Xa (68). Několik studií prokázalo, že kontrolní plazmatické

koncentrace faktoru Xa byly nižší, než se předpokládalo a že část pacientek byla poddávkována (69). Ale většina těchto studií obsahuje pouze malý počet pacientek a často nejsou k dispozici důležitá data jako je hmotnost a BMI index. Některé studie zase doporučují navyšování dávky nízkomolekulárního heparinu pouze na základě hmotnosti pacientky, jiné zase preferují pravidelné monitorování aktivity anti FXa (70).

1.6.5.2 Jiné potenciální role nízkomolekulárních heparinů

Hepariny mohou modifikovat mnoho procesů účastnících se adherence a implantace blastocytu a také trofoblastovou diferenciaci a invazi. Jedním z důvodů je podobnost struktury s heparan sulfátem. Hepariny mají potenciál zlepšit pravděpodobnost úspěšně donošeného těhotenství (71).

Mnohé studie prokázaly, že LMWH má také antikomplementovou aktivitu, která může součástí příznivého efektu v prevenci potratů u žen s antifosfolipidovým syndromem (72).

Některé studie prokázaly nevysvětlitelné snížení mortality na nádorová onemocnění u nemocných užívajících LMWH jako prevenci. Dochází ke snížení mortality na nádorová onemocnění u skupiny pacientů s LMWH oproti skupině léčené UFH. Není prokázán vysloveně protinádorový účinek LMWH, ale studie prováděné na zvířatech prokazují, že po léčbě LMWH dochází k snížení počtu metastáz a angioneogeneze (73).

V Tab. 4 je v přehledové formě rozebrán výtah z doporučení 7.ACCP pro profylaktické použití LMWH a UFH v těhotenství (20, 74).

Tab. 4. Doporučení 7.ACCP pro profylaktické použití LMWH a UFH v těhotenství (20):

Anamnéza	Doporučení	Stupeň
----------	------------	--------

Anamnéza		Doporučení	Stupeň
deficit antitrombinu nebo trvalá pozitivita antifosfolipidových protilátek nebo heterozygotní mutace FV- Leiden a zároveň protrombinu G20210A nebo homozygotní mutace FV- Leiden nebo homozygotní mutace F II protrombin a předchozí HŽT, PE v anamnéze		profylaktické, nebo střední dávky LMWH nebo UFH v těhotenství + antikoagulace v šestinedělí	2C
pacienti s trombofilií a bez předchozí HŽT, PE	A.deficit antitrombinu	A. profylaktické dávky LMWH, nebo nízké dávky UFH + antikoagulace v šestinedělí	2C
	B.mutace FV-Leiden hom. i het., mutace F II protrombin hom. I het. a další	B. sledování nebo profylaktické dávky LMWH, nebo mini-dávky UFH +antikoagulace v šestinedělí	2C
1 epizoda HŽT, PE indukovaná přechodnými rizikovými faktory		sledování antepartálně + antikoagulace v šestinedělí	1C
1 epizoda HŽT, PE indukovaná estrogeny, těhotenstvím eventuálně v kombinaci s dalšími rizikovými faktory (např. obezitou)		sledování nebo profylaktické dávky LMWH, nebo nízké dávky UFH v graviditě + antikoagulace v šestinedělí	2C
1 epizoda idiopatické HŽT, PE		sledování + antikoagulace v šestinedělí	2C
		profylaxe LMWH, nebo UFH + antikoagulace v šestinedělí	2C
1 epizoda HŽT, PE + trombofilie (laboratorně potvrzená)		profylaktické nebo střední dávky LMWH, nízké nebo střední dávky UFH + antikoagulace v šestinedělí	1C
vícečetné HŽT, PE a/nebo dlouhodobá antikoagulace		adjustované dávky UFH nebo LMWH + antikoagulace v šestinedělí	2C
všechny ženy s dřívější HŽT		kompresivní punčochy v těhotenství a šestinedělí	2C

1.6.5.3 Nežádoucí účinky:

Možné nežádoucí účinky jsou krvácení, vznik heparinem indukované trombocytopenie snížení kostní denzity až vznik osteoporózy. Za nevýhodu LMWH se dá také považovat injekční aplikace a s ní spojené nežádoucí komplikace v místě vpichu (hematomy, pálení, svědění).

Při použití nízkomolekulárních heparinů je mnohem nižší riziko krvácení než při UFH. Je to způsobeno lepším poměrem blokády anti FXa/anti FIIa.

V ortopedii a chirurgii je heparinem indukovaná trombocytopenie častější po terapii nefrakcionovaným heparinem (3 %) a méně častá po léčbě LMWH (0,1-1%) (75).

1.6.5.3.1 Osteoporóza indukovaná dlouhodobým podáváním nízkomolekulárních heparinů

Osteoporóza indukovaná podáváním nefrakcionovaného heparinu byla poprvé popsána v roce 1965 (60). Trvání léčby déle než 8 měsíců a dávka vyšší než 15.000 IU denně je důležitým rizikovým faktorem (76). Typické klinické projevy heparinem indukované osteoporózy jsou fraktury žeber a obratlů (77). V poslední době se od UFH přechází v praxi spíše k LMWH, u kterých je prokázána jejich bezpečnost a účinnost. Jak UFH tak LMWH mohou způsobit osteoporózu, ale při použití LMWH je pravděpodobnost nižší (78).

Těhotenství je jednou z mála situací, kdy je UFH nebo LMWH podáván dlouhodobě. Kromě těhotenství může být dlouhodobě podáván i u osob s alergií nebo nízkou snášenlivostí nebo se závažným krvácením při použití perorálních antikoagulancií a dále u špatně spolupracujících pacientů.

Osteoporóza je systémové kostní onemocnění charakterizované sníženou kostní hmotou a změnami v mikroarchitektuře kostí, která vede ke zvýšené fragilitě kostí a zvýšenému riziku zlomenin. WHO klasifikuje osteoporózu podle měření BMD (bone mineral density) (79).

Tab. 5. Kritéria WHO pro klasifikaci denzity kostního minerálu (BMD) (79)

Kategorie	Kritéria

Kategorie	Kritéria
Normální	BMD ± 1 SD pod referenčním rozsahem mladých dospělých žen
Osteopenie	BMD $- 1$ s až $- 2,5$ SD pod referenčním rozsahem mladých dospělých žen
Osteoporóza	BMD $< - 2,5$ SD pod referenčním rozsahem mladých dospělých žen
Manifestovaná osteoporóza	BMD $< - 2,5$ SD pod referenčním rozsahem u mladých dospělých žen a zlomenina

Standardní metodou kvantitativního hodnocení kostní denzity bývá dvouenergieová rentgenová absorpciometrie (DXA) kyčle případně bederní páteře (79).

Těhotenství je jedinou situací, při které bylo stanovováno riziko osteoporózy indukované užíváním LMWH. Ale výzkumníci mají stále mnoho pochyb i v poměrně zásadních otázkách. Existuje vůbec LMWH-indukovaná osteoporóza? Pokud ano, zvyšuje těhotenství riziko jejího vzniku? Je riziko spojeno s délkou podávání, dávkou a typem nízkomolekulárních heparinů? Lze stanovit skutečnou incidenci LMWH indukované osteoporózy? A jakým mechanismem LMWH-indukovaná osteoporóza vzniká? Na toto téma se v literatuře nachází poměrně málo studií. A většinou se jedná o případové studie nebo systematické review.

1.6.5.3.2 Kazuistiky z literatury

V literatuře je popsáno pouze 11 případů osteoporotické zlomeniny indukované užíváním LMWH, 8 z nich vzniklo v těhotenství (78).

34 - letá žena, léčená 36 týdnů dalteparinem (15,000 jednotek denně) a aspirinem (75 mg denně) pro anamnézu opakovaných abortů a hluboké žilní trombózy. Nekuřačka, cvičitelka aerobiku, normální BMI. 2 měsíce po porodu prodělala osteoporotickou frakturu 2 obratlů (80).

Další studie demonstruje 4 případy osteoporotických zlomenin u žen užívajících terapeutické dávky tinzaparinu v průběhu těhotenství. Ve 2 případech vznikla fraktura obratlů po porodu. Ve třetím případě vznikla ve III. trimestru. A u poslední ženy vznikla fraktura obratlů po porodu, ale předtím žena trpěla zhoršujícími se bolestmi zad a ztrátou 4 cm výšky a zlomeninou sternu (81).

Dále je znám případ 19 - leté obézní dívky s deficitem proteinu C, která byla v průběhu těhotenství léčená neznámým typem a dávkou LMWH. A po porodu prodělala frakturu os sacrum (82). Breuil a kolektiv popisují hair-line frakturu os sacrum u 24 - leté těhotné kuřačky se známým deficitem vitamínu D, která užívala nadroparin po celou dobu těhotenství (83). A dva případy popisují vznik fraktury mimo těhotenství (29 - letá žena a 67- letá žena, které prodělaly zlomeninu obratlů po 3 měsících užívání dalteparinu). V žádném případě nebyla provedena denzitometrie před nasazením nízkomolekulárního heparinu (84).

1.6.5.3.3 Souhrnné studie

Největší systematické review o použití LMWH v průběhu těhotenství sdružuje 64 studií, které popisují celkem 2777 těhotenství. Zde byl popsán pouze 1 případ osteoporotické fraktury. Je to zároveň i jedná z žen popsaná výše (45, 85). V jiné systematické review studii, kde bylo popsáno 728 těhotenství z celkem 40 studií, prodělaly 2 ženy osteoporotickou frakturu. Ale opět se jedná o 2 případy popsané výše (86).

Dále existuje několik studií popisujících vliv nízkomolekulárních heparinů na kostní denzitu. Prospektivní randomizovaná studie porovnávala kostní denzitu u žen, které užívaly UFH nebo enoxaparin v průběhu těhotenství. Do studie bylo zařazeno 120 žen, 80 z nich studii dokončilo. Čtyřicetčtyři dostalo průměrně 68,4 mg enoxaparinu za dobu průměrně 27,7 týdnu 40 žen dostávalo 7500 j. UFH 2 x denně po dobu průměrně 21 týdnů. BMD byla měřena na proximálním femuru při zařazení do studie a krátce po porodu. Jedna pacientka ze skupiny LMWH měla významně nižší kostní denzitu v porovnání se žádnou ze skupiny UFH (87).

Jiná studie, ve které bylo 44 pacientek randomizováno do 2 skupin (dalteparin x UFH), porovnávala BMD v 1., 6., 16. a 51 týdnu těhotenství a pokud to bylo možné, tak 3 roky po porodu. Dále se skupiny porovnávaly s 19 zdravými netěhotnými. Průměrná BMD byla signifikantně nižší u skupiny s UFH než u kontrolní skupiny nebo skupiny s dalteparinem (88).

V další studii se porovnávala efektivita a bezpečnost UFH a dalteparinu u pacientů, u kterých bylo kontraindikováno podávání perorálních antikoagulancií. Ve studii bylo zařazeno 40 mužů a 40 žen (19-92 let) a ti užívali po dobu 3-6 měsíců buď Fragmin 5000 j. 1 x denně, nebo nefrakcionovaný heparin 10,000 1 x denně. Jedna starší žena ze skupiny užívající dalteparin prodělala zlomeninu obratle (61).

1.6.5.3.4 Retrospektivní studie

Retrospektivní studie zahrnující 624 těhotných žen užívajících enoxaparin nezjistila žádnou osteoporotickou frakturu (89).

Jiná prospektivní studie, kdy se měřila kostní denzita na proximálním femuru, zahrnovala 16 těhotných žen užívajících enoxaparin 40 mg denně po dobu průměrně 25 týdnů. Měření se provádělo 2 týdny před začátkem terapie a 6-9 týdnů po porodu a 6 měsíců po porodu. Průměrná ztráta kostní denzity byla v 6. - 9. týdnů po porodu o 1,8 % a u žádné ženy nebyla zaznamenána ztráta o více než 10 %. Šest až devět měsíců po porodu měly 2 ženy, které ale po celou dobu kojily ztrátu kostní denzity větší než 10 % (90).

Existuje několik studií porovnávajících vliv LMWH na kost s kontrolní skupinou těhotných bez léčby LMWH. Padesátpět žen s antifosfolipidovým syndromem po opakovaných abortech bylo zařazeno do studie, ve které se prováděla denzitometrie 6 měsíců před otěhotněním a 6 měsíců po porodu. Po celou dobu těhotenství užívaly LMWH v dávce 5000 jednotek 1 x denně a nízké dávky aspirinu. Tato léčba byla nasazena hned po prokázání těhotenství močovým testem. Kontrolní skupinu tvořilo 20 žen s opakovanými aborty bez antitrombotické terapie. Nebyl zjištěn rozdíl v denzitě kostí mezi skupinami před těhotenstvím. Šest měsíců po porodu byl zaznamenán pokles denzity v obou skupinách, ale nebyl zjištěn rozdíl mezi skupinami (91).

1.6.5.3.5 Randomizované studie

Randomizovaná substudie stanovující efekt LMWH na kostní denzitu také nezjistila významný rozdíl mezi těhotnými ženami užívajícími dalteparin 5000 j. 1 x denně a těhotnými ženami bez LMWH (92). Všechny tyto studie mají omezení: většinou malý počet pacientů, krátká doba sledování a použití fixních dávek heparinů.

1.6.5.3.6 Vliv heparinů na kostní metabolismus

Nepříznivé účinky obou UFH i LMWH na kostní metabolismus byly prokázány v několika experimentech na zvířatech a ve studiích in vitro na lidských osteoblastech.

V těhotenství dochází fyziologicky ke kostní přestavbě (59, 93). Kostní remodelace je vysoce koordinovaný proces zahrnující osteoblasty, osteoklasty a rozličné cytokiny včetně tzv. RANKL (ligand vázající se na receptor, který aktivuje nukleární faktor kappa B) a osteoprotegerinu. Vazba RANKL na RANK stimuluje formaci, diferenciaci a aktivaci osteoklastů a kostní resorpci. Osteoprotegerin je peptid, který se kompetitivně váže s RANKL a inhibuje tak diferenciaci a aktivaci osteoklastů (94).

Markery kostní novotvorby jsou přímé nebo nepřímé produkty osteoblastů vyjádřené v průběhu různých fází vývoje. Alkalická fosfatáza, jeden z markerů kostní formace, je enzym, který hraje roli při formování osteoidu a kalcifikaci. Mnoho zpráv podporuje tvrzení, že poměr RANKL/OPG je významným faktorem ovlivňujícím kostní hmotu. Bylo zjištěno, že vazba heparinu na OPG snižuje vazbu OPG na RANKL (95). Nedávno byla publikovaná studie, která dokazuje vyšší cévní mobilizaci OPG pozorované při léčbě v UFH než při léčbě LMWH, což naznačuje, že UFH má vyšší afinitu k OPG než LMWH (96).

Jiná studie zkoumala vliv heparinů na expresi Cbfa-1 (Runx-2) a osteokalcinu na buněčných kulturách osteoblastů. Cbfa-1 (Runx-2) a osteokalcin jsou důležité regulátory kostní formace a resorpce. Autoři prokázali, že vysoké dávky dalteparinu způsobují signifikantní inhibici obou regulátorů (97).

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

V této disertační práci byly sledovány 4 cíle, provedením několika postupných úkolů a zjištěním nových poznatků a to v následujících oblastech:

2.1 SLEDOVÁNÍ PARAMETRŮ KOAGULACE

Sledování vybraných koagulačních parametrů (aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), trombinový čas (TT), protrombinový čas (INR), koncentrace fibrinogenu (Fbg), aktivita antitrombinu (AT), koncentrace D-dimerů, koncentrace faktoru VIII (FVIII), aktivita proteinu C (PC), aktivita proteinu S (PS)), parametrů krevního obrazu a proteinů akutní fáze při profylaxi tromboembolické nemoci s enoxaparinem v průběhu těhotenství u žen s trombofilií (mutace FV-Leiden, mutace F II protrombin, mutace MTHFR 677, deficit ATIII, antifosfolipidový syndrom).

2.2 VYHODNOCENÍ ÚČINNOSTI LÉČBY

Sledování účinnosti antikoagulační léčby enoxaparinem v těhotenství, monitorace pomocí anti FXa aktivity, stanovení závislosti inhibice FXa vzhledem k fyziologickým těhotenským změnám koagulačních parametrů a růstu hmotnosti.

2.3 DOTAZNÍKOVÁ STUDIE NA NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY

Zjištění subjektivní snášenlivosti dlouhodobě podávané antikoagulační injekční terapie u těhotných žen a výskytu hemoragických komplikací při profylaxi enoxaparinem.

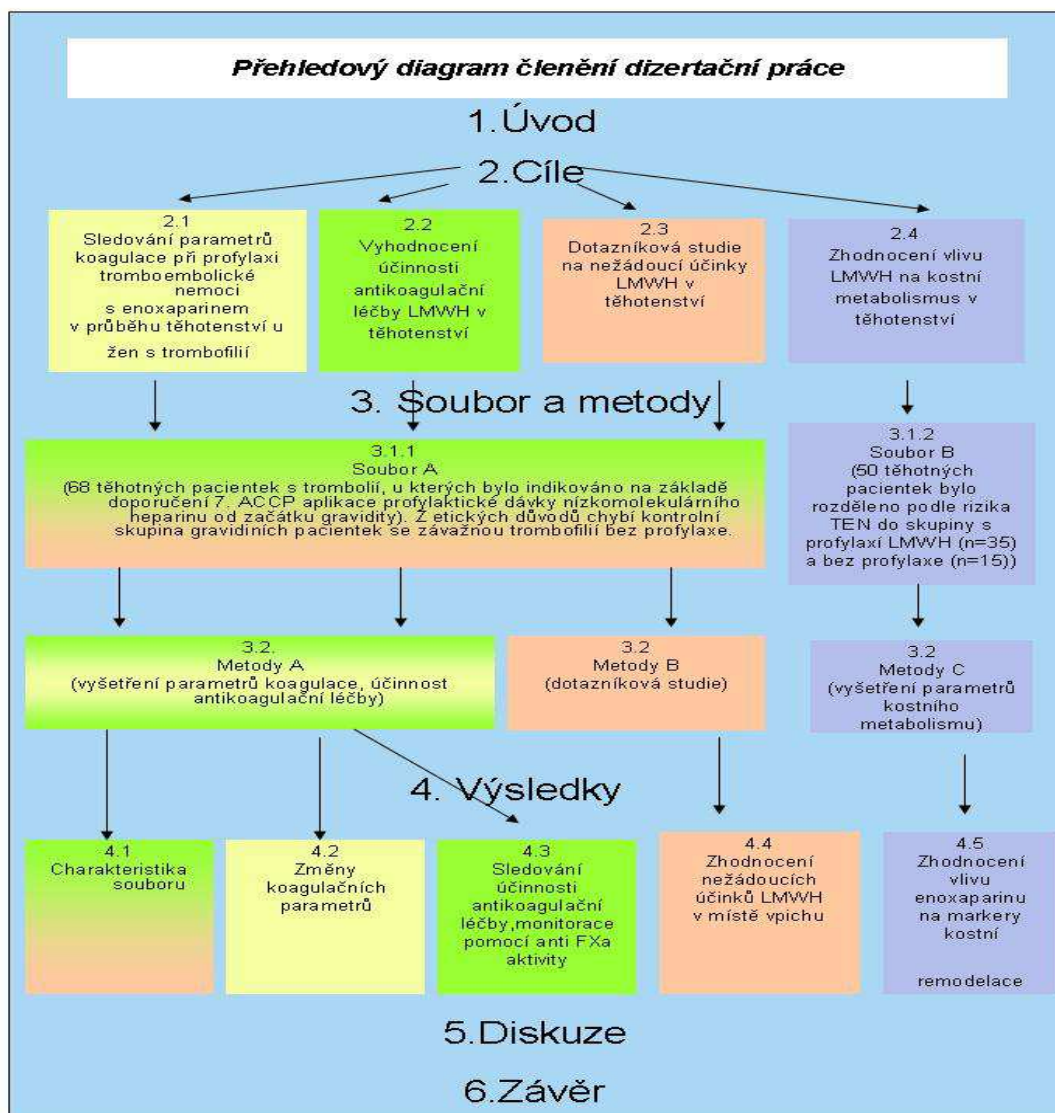
2.4 ZHODNOCENÍ VLIVU HEPARINŮ NA KOSTNÍ METABOLISMUS

Zhodnocení vlivu enoxaparínu na markery kostní remodelace. Cílem studie bylo porovnat změny markerů kostního metabolismu u těhotných žen užívajících dlouhodobě enoxaparin se skupinou těhotných žen bez léčby nízkomolekulárními hepariny.

3 SOUBOR A METODY

Podle jednotlivých sledovaných cílů disertační práce jsou následující kapitoly rozděleny do pododstavců, které odpovídají čtyřem cílům práce. Kapitola Soubor je rozdělena na Soubor A a Soubor B. Soubor A je stejný pro část výsledů 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 a je popsán pouze jednou v kapitole číslo 3.1.1. a charakterizován v sekci výsledky v kapitole 4.1. Soubor B je pro část výsledků 4.4 popsán v kapitole 3.1.2 a charakterizován v kapitole výsledků 4.5. Kapitola vlastní výsledky je rozdělena do 5 podkapitol, první kapitola je charakteristika souboru a další čtyři odpovídají čtyřem cílům disertační práce. Pro větší přehlednost jsem sestavila diagram č. 1.

Diagram č. 1 Přehledový diagram členění dizertační práce



3.1 SOUBOR

Za sledované období od 6/2006-8/2007 bylo v Trombotickém centru Všeobecné fakultní nemocnice vyšetřeno a dispenzarizováno celkem 428 gravidních pacientek. Z toho 277 bylo indikováno k podávání nízkomolekulárních heparinů podle doporučení 7. ACCP. Z toho 68 dostávalo Clexane 0,4 ml s.c. od začátku gravidity. 34 pacientek dostávalo terapeutické dávky LMWH, nebo jiné druhy LMWH (Fragmin, Fraxiparine, Zibor) v různém dávkování. 153 pacientek dostávalo LMWH až od II. nebo III. trimestru a nebo v šestinedělí, nebo přišly na první vyšetření až ve II. nebo III. trimestru. U 22 pacientek chybí

dostatečná dokumentace, chybí odběry, nesouhlasily se sledováním nebo přerušily léčbu.

3.1.1 Soubor A (pro část výsledků 4.1, 4.2, 4.3, 4.4)

Jednalo se o popisnou, observační studii zahrnující 68 těhotných žen s trombofilií. Studie byla provedena v Trombotickém centru Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Studie byla schválena etickou komisí 1. LF UK a VFN v rámci schválení projektu výzkumného záměru Ministerstva zdravotnictví MZ0VFN2005 a všechny pacientky vyjádřili se sledováním v rámci studie svůj informovaný souhlas, včetně souhlasu s aplikací nízkomolekulárního heparinu v průběhu těhotenství.

3.1.1.1 Pacienti

Do studie bylo zařazeno 68 gravidních pacientek, u kterých bylo indikováno na základě doporučení 7. ACCP aplikace profylaktické dávky nízkomolekulárního heparinu od začátku gravidity. Základní charakteristika souboru pacientek je uvedena v kapitole výsledků 4.1. Soubor A nemá z etických důvodů kontrolní skupinu těhotných pacientek se závažnou trombofilií, ale bez antikoagulační léčby.

Kritéria pro vyloučení ze studie byly: alergie na enoxaparin, krvácivé stavy či zvýšené riziko krvácení, trombocytopenie, aktivní peptický vřed, či jiné poškození související se zvýšeným rizikem krvácení, akutní infekční endokarditis, hemoragická cévní mozková příhoda.

3.1.1.2 Terapeutický postup

Léčba nízkomolekulárním heparinem byla zahájena průměrně v 7. týdnu těhotenství. Gestační týden byl stanoven podle data poslední menstruace. Enoxaparin (Clexane ®, Sanofi-Aventis, Paříž, Francie) byl podáván v počáteční dávce 4.000 IU a dávka byla později upravena na základě měření plazmatické anti FXa aktivity. Pokud byla hodnota inhibice faktoru Xa nižší než 0,2 IU/ml 4 hodiny po aplikaci injekce, byla dávka enoxaparinu zvýšena na 6000 IU/ml. U pacientek byly v průměrně v 15., 25. a 35. gestačním týdnu sledovány parametry krevního obrazu, koagulační parametry, proteiny akutní

fáze a inhibice faktoru Xa. Šedesátšest z šedesátiosmi těhotných žen, u kterých bylo v rámci prevence tromboembolické nemoci nutné podávání enoxaparinů od začátku těhotenství vyplnilo dotazníky, ve kterých měly zhodnotit, zda se u nich vyskytovala tvorba modřin v místě vpichu, svědění v místě aplikace, pálení, bolest v místě aplikace, vyrážka v místě aplikace, tuhé podkožní uzlíky a jiné komplikace, nebo psychické aspekty.

3.1.2 Soubor B (pro část výsledků 4.5)

Jednalo se o popisnou, observační studii zahrnující 50 těhotných žen s trombofilií. Studie byla provedena v Trombotickém centru Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Studie byla schválena etickou komisí 1. LF UK a VFN v rámci schválení projektu výzkumného záměru Ministerstva zdravotnictví MZ0VFN2005 a všichni pacienti vyjádřili se sledováním v rámci studie svůj informovaný souhlas, včetně souhlasu s aplikací nízkomolekulárního heparinu v průběhu těhotenství.

3.1.2.1 Pacientky

Celkem 50 těhotných pacientek s trombofilií bylo rozděleno do dvou skupin podle rizika tromboembolické nemoci a těhotenských komplikací. V kontrolní skupině (N = 15) bylo indikováno pouze sledování bez farmakologické profylaxe. V druhé skupině (N = 35) byla indikovaná farmakologická profylaxe nízkomolekulárním heparinem (enoxaparinem) podle doporučení 7.ACCP. Základní charakteristika těhotných žen s profylaxí a bez profylaxe LMWH je uvedena v kapitole 4.5.

Ve skupině nebyly ženy s vícečetným těhotenstvím. V kontrolní skupině nebyla ani jedna pacientka, která v minulosti užívala heparin, LMWH nebo warfarin. Ve skupině s enoxaparinem užívalo celkem 13 žen v minulosti warfarin (s průměrnou délkou léčby 6 měsíců). Žádná z nich neměla antikoagulační terapii na začátku těhotenství.

Kritéria pro vyloučení ze studie byly: předcházející známé onemocnění kostí (osteoporóza, osteoartróza, osteogenesis imperfecta, Pagetova choroba, mnohočetný myelom), metabolické onemocnění (hypertyreóza, hyperparatyreóza, hyperkortizolismem, diabetes mellitus), nebo užívání léků

ovlivňujících kostní metabolismus (kortikoidy, antiepileptika, agonisti nebo antagonisty luteinizačního hormonu) a kouření.

3.1.2.2 Terapeutický postup

Léčba LMWH byla zahájena 15. týden těhotenství. Gestační týden byl stanoven podle data poslední menstruace. Ve skupině léčené enoxaparinem bylo 35 žen. Enoxaparin (Clexane ®, Sanofi-Aventis, Paříž, Francie) byl podáván v počáteční dávce 4.000 IU a dávka byla později upravena na základě měření plazmatické anti FXa aktivity. Pokud anti FXa byl nižší než 0,2 IU/ml 4 hodiny po aplikaci injekce, byla dávka enoxaparinu zvýšena na 6000 IU/ml. Zvýšení dávky bylo nutné u 8 pacientek s enoxaparinem ve 35. týdnu těhotenství. Plazmatické hladiny celkové alkalické fosfatázy, kostní alkalické fosfatázy, osteoprotegerinu a RANKL byly měřeny na 15., 25. a 35. týden těhotenství. Ve skupině s enoxaparinem byly vzorky krve odebírány z kubitální žíly 4 hodiny po vpichu injekce.

3.2 METODY

Metody A jsou stejné pro část 4.1, 4.2., 4.3. výsledků a jsou popsány pouze jednou v kapitole 3.2.1. Metody B jsou pro část výsledků 4.4. popsány v kapitole 3.2.2. Metody C jsou pro část výsledků 4.5 popsány v kapitole 3.2.3. Pro větší přehlednost jsem sestavila diagram č. 1. (str.40).

3.2.1 Metody A (pro část výsledků 4.1, 4.2, 4.3)

Vzorky krve byly odebírány z kubitální žíly, 4-5 hodin po vpichu enoxaparinu. V případě odběru na koagulační vyšetření byly použity zkumavky systému Vacutainer™ (Becton Dickinson) obsahující 0,129 M citrátu sodného. Zkumavky Vacutainer™ (Becton Dickinson) s obsahem K3EDTA byly použity na vyšetření hemogramu. Na vyšetření proteinů akutní fáze a ELISA testy byly použity zkumavky Vacutainer® serum separator tubes (SST® II) obsahující thixotropic polymer gel, který vytvoří bariéru mezi sérem a koagulem odděleným odstředěním.

Po dodávce vzorků potrubní poštou do laboratoře byl vyšetřen hemogram na analyzátoru Abbott Cell-Dyn® 3700 analyzer (Abbott Laboratories, Santa

Clara, USA). Normální hodnoty laboratoře (průměr ± SD) pro leukocyty (WBC) jsou $6.2 \pm 1.4 \cdot 10^9 /l$; $4.5 \pm 0.4 \cdot 10^{12} /l$ pro erytrocyty (RBC); $141 \pm 10 \text{ g/l}$ pro hemoglobin (HGB); 0.411 ± 0.030 pro hematokrit (HCT) a $239 \pm 45 \cdot 10^9 /l$ pro trombocyty (PLT), s průměrnými hodnotami pro opakovatelnost (IAA) a reprodukovatelnost (IEA): 3.5%, 5.0% (WBC); 1.7%, 1.9% (RBC); 1.3%, 1.7% (HGB); 2.8%, 1.3% (HCT) a 2.8%, 6.7% (PLT).

Dále byly ihned vyšetřeny koagulační parametry. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), trombinový čas (TT) a protrombinový čas (INR) a koncentrace fibrinogenu (Fug), aktivita antitrombinu (AT) a D-dimerů byly měřeny v citrátové plazmě analyzátozem BCS (Dádě Behring, Marburg, SRN) pomocí komerčně vyráběných reagensů a imunodeficitní plazmy (Pathromtin SL®, Dade Behring; Fibrinogen Reagent™, Technoclone; Berichrom Antithrombin III, Dade Behring; D-dimer Plus, Dade Behring). Normální hodnoty laboratoře (průměr ± SD) jsou pro APTT $31,5 \pm 3,7 \text{ s}$, pro Fbg $3,13 \pm 0,56 \text{ g/l}$, pro AT $100,5 \pm 11,9 \%$ a $205 \pm 91 \mu\text{g/l}$ pro D-dimer, pro TT $10,8\text{-}17,5 \text{ s}$, INR $0,90\text{-}1,20$ ratio, s průměrnými hodnotami pro opakovatelnost (IAA) a reprodukovatelnost (IEA): 5.5%, 8.6% (APTT); 2.9%, 1.6% (Fbg); 4.4%, 6.2% (AT III) and 3.0%, 3.1% (D-dimer), 2.8; 2.6 (TT), INR medián 1,00.

Vyšetření inhibice FXa bylo provedeno za pomoci kitu Coamatic Heparin® (výrobce Chromogenix, Instrumentation Laboratory SpA, Milano, Itálie, s průměrnými hodnotami pro reprodukovatelnost 8,26%, norma laboratoře 0 – 0,02 IU/ml. Jako kalibrátor byl použit enoxaparin sodný a výsledky jsou vyjádřeny po odečtení z kalibrační křivky jako IU/ml. Pozitivní i negativní proteiny akutní fáze byly stanoveny nefelometrickou metodou analyzátozem BN II (Dade Behring. K měření pozitivních proteinů akutní fáze byly použity reagensy: C-reaktivní protein (CRP) CardioPhase hsCRP Reagent™, orosomukoid (ORM) a alpha1-antitrypsin (A1AT) N Antisera™ to Human α1-acid Glycoprotein, Human α1-Antitrypsin. K měření negativních proteinů akutní fáze prealbuminu a transferinu byly použity reagensy N Antisera™ to Human Prealbumin a Human Transferin. Normální hodnoty laboratoře jsou (průměr± SD) $0,20 \pm 0,18 \text{ mg/dl}$ (CRP), $0,71 \pm 0,17 \text{ g/l}$ (ORM), $1,32 \pm 0,20 \text{ g/l}$ (A1AT), $2,49 \pm 0,38 \text{ g/l}$ (TRF) and $0,27 \pm 0,05 \text{ g/l}$ (PREA) s hodnotou

opakovatelnosti (IAA) a reprodukovatelnosti (IEA): 3,1%, 2,5% (CRP), 3,1%, 1,9 % (ORM) 2,0%, 3,2% (A1AT), 2,7%, 2,3% (TRF) a 2,0%, 3,2% (PREA).

Vzorky plazmy a séra pro ELISA testy byly skladovány po dobu maximálně dvou měsíců při teplotě -80°C.

Tab. 6 Normy Centrálních hematologických laboratoří VFN a 1. LF UK

Para- metr	Výrobce rea- gencie	Normy la- boratoře	Jednot- ky	P ± SD (nebo medián!)	Plasma / Sérum
INR	Behring	0,90 - 1,20	ratio	1,00 (med.)	P
APTT	Behring	25,7 - 40,7	s	31,5 ± 3,7	P
Fbg	Behring	2,0 - 4,2	g/l	3,13 ± 0,56	P
TT	Behring	10,8 - 17,5	s	12,5 (med.)	P
AT III	Behring	75,7 - 132,5	%	100,5 ± 11,9	P
D-dimer	Behring	74 - 416	µg/l	187 (medián)	P
A1AT	Behring	0,99 - 1,80	g/l	1,32 ± 0,20	S
Trf	Behring	1,73 - 3,49	g/l	2,49 ± 0,38	S
Prea	Behring	0,17 - 0,38	g/l	0,27 ± 0,05	S
ORM	Behring	0,34 - 1,00	g/l	0,71 ± 0,17	S
CRP	Behring	0 - 0,40	mg/dl	0,20 ± 0,18	S
anti FXa	Chromogenix	0 - 0,02	IU/ml	0,013 ± 0,1	P

3.2.2 Metody B (pro část výsledků 4.4)

Dotazníková studie byla schválena etickou komisí a všechny pacientky daly vyplněním dotazníků souhlas k provedení této studie. Metodika správné aplikace injekce jim byla důkladně vysvětlena zdravotníky před započítím léčby a byly upozorněny i na možné nežádoucí účinky léku. U našich pacientek doporučujeme aplikaci do podkožní řasy na břicho a potom v pozdějších stadiích těhotenství, kdy už je kůže na břicho napjatá a nelze vytvořit kožní řasu, tak je doporučena aplikace do kožní řasy na boku. Vždy byly poučeny o tom, že není vhodné aplikovat injekci do míst, kde jsou viditelné podkožní žíly, strie, nebo nějaké kožní eflorescence. Doporučeno bylo též, místa vpichu a strany střídát a neaplikovat injekci do míst, kde se vytvořily hematomy z předchozích aplikací. Metodika správné aplikace injekce byla převzata z doporučení výrobce léku Clexane. Po vysvětlení si nadále aplikovaly enoxaparin v domácím prostředí. Po minimálně 2 měsících aplikace byly pacientky požádány o vyplnění dotazníku. Dotazník obsahoval demografické údaje (věk), základní anamnestické údaje (týden těhotenství, trombóza, nebo embolie v anamnéze,

těhotenské komplikace v anamnéze, trombofilie). A pak již následovaly otázky týkající se užívání nízkomolekulárních heparinů: druh a dávka, jak dlouho si aplikuje LMWH, místo aplikace, kdo jí aplikuje injekci.

V dotazníku měly odpovědět, zda se u nich daný příznak vyskytoval (tvorba modřin v místě vpichu, svědění v místě aplikace, pálení, bolest v místě aplikace, vyrážka v místě aplikace, tuhé podkožní uzlíky a jiné komplikace, nebo psychické aspekty). Pokud ano, měla zhodnotit jeho četnost podle stupnice ((skoro nikdy (max. 1 x měsíčně); výjimečně (2-3 x měsíčně); občas (3-10 x měsíčně); skoro vždy (10x-20x měsíčně); vždy (20 x a více měsíčně)) a v jaké míře se objevuje (velikost hematomu, trvání pálení, svědění, nebo bolesti). Kolonka další komplikace a psychické aspekty neobsahovala možnosti, ale pacientky mohly svými slovy vyjádřit problémy spojené s aplikací enoxaparínu. Na závěr měly zhodnotit užívání LMWH celkově na stupnici čísel od 1 do 5 (kdy možnost 1 znamenala: podávání LMWH mě neobtěžuje a nevadí mi, možnost 2 znamenala, je to nutné, takže snížení mého komfortu беру s nadhledem, možnost 3 znamenala je to nepříjemné, možnost 4 je to nepříjemné a obtěžuje mě to a možnost 5 znamenala: podávání LMWH je nesnesitelné).

3.2.3 Metody C (pro část výsledků 4.5)

Koncentrace celkové alkalické fosfatázy byla měřená metodou katalytické koncentrace alkalické fosfatázy v séru optimalizovanou metodou IFCC (Bio-latest[®], Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o, Praha, Česká republika). Izoformy alkalické fosfatázy byly separovány podle rozdílnosti nábojů vznikajících glykosylací pomocí komerčně dostupného setu pro elektroforézu (HydraGel, ISO-PAL[™], Sebia, Issy-les-Moulineaux, Francie) na analyzátoru Hydrasys. Koncentrace alkalické fosfatázy byla vypočtena jako násobek koncentrace celkové alkalické fosfatázy a procentuálního podílu kostní izoformy z téhož vzorku. Koncentrace osteoprotegerinu a RANKL byla měřena na analyzátoru Luminex[®] 100 pomocí kitu Human Bone Panel Milliplex Assay Kit (Millipore[®], St Charles, MO).

3.3 STATISTICKÁ ANALÝZA:

Údaje byly zpracovány pomocí databáze Microsoft Access a Excel. K analýze dat byl použit statistický program SigmaStat® pro Windows, verze 3.5 a pro grafické znázornění výsledků studie program SigmaPlot® pro Windows, verze 10.0 (SysStat, Erlangen, Germany). Kategorická data jsou prezentována jako procenta. Spojitá data jsou prezentována jako průměr a směrodatná odchylka (u dat s normálním rozložením), nebo jako medián a 25. a 75. percentil (u dat s jiným než normálním rozložením).

Jsou-li data prezentována mediánem a percentily, tak jsou dále zpracovávána neparametrickými testy. Byly stanoveny údaje deskriptivní statistiky a změny měřených parametrů v čase byly analyzovány pomocí testů pro srovnání více parametrů u opakovaných měření – Friedman RM ANOVA on Ranks (multiple comparison) s Dunn testem, nebo Tukey testem.

K zjištění vztahů mezi různými proměnnými byl proveden výpočet korelačního koeficientu za použití testu lineární regrese. Hladina statistické významnosti byla pro každý test stanovena na $p \leq 0,05$.

Pro grafické znázornění dynamiky změn koncentrace byl použit krabicový graf (box plot graf) s uvedením mediánu, 10., 25., 75. a 90. percentilu. Pro data s normálním rozložením byl použit graf scatter plot s uvedením průměru. Kategorická data jsou prezentovány i ve formě koláčového grafu.

K bibliografické citaci použitých dokumentů byla použita norma ČSN ISO 690.

4 VLASTNÍ VÝSLEDKY

4.1 CHARAKTERISTIKA SOUBORU

V hodnoceném souboru bylo zařazeno celkem 68 gravidních žen, u kterých bylo doporučeno podávání nízkomolekulárního heparinu od začátku těhotenství. Řídili jsme se doporučeními 7. ACCP. Průměrný věk zařazených pacientek byl 30,3 let (min. 22 – max. 39 let).

Pacientky vážily v 15. týdnu průměrně 68,7 kg (min. 51- max. 98 kg), ve 25. týdnu 75,2 kg (57-102 kg) a ve 35. týdnu 79 kg (60-109 kg). Průměrný váhový přírůstek byl 10,3 kg.

Pacientky měly BMI v 15. týdnu průměrně 24,13 (min. 18,69- max. 34,53), ve 25. týdnu těhotenství 26,37 (21,72-36,36) a ve 35. týdnu 27,71 (22,65-39,14). Hodnocení BMI v graviditě podle (98). Průměrná vstupní výška byla 168 cm (\pm SD 5,4 cm). Z hlediska výskytu tromboembolické nemoci v anamnéze je soubor charakterizován v tabulce č. 7. Anamnéza těhotenských komplikací je uvedena v tabulce č. 8. Zjištěné trombofilie jsou uvedeny v tabulce č. 9. V tabulce č. 10. jsou uvedeny další onemocnění.

Pacientky byly sledovány po celé těhotenství. Enoxaparin (Clexane 0,4 ml s.c. 1x denně) byl nasazen v průměrně 7. týdnu těhotenství. Odběry byly prováděny v průměrně 15. (13. - 17.), 25. (23. - 27.) a 35. (33. - 37.) týdnu těhotenství. Po celou dobu sledování neprodělala žádná z pacientek hlubokou žilní trombózu, plicní embolii, cévní mozkovou příhodu ani jiné závažné trombotické onemocnění. Žádná z pacientek neprodělala heparinem indukovanou trombocytopenii. U žádné z pacientek nebylo po dobu léčby zaznamenáno závažné krvácení. 2 pacientky měly drobné krvácení z rodidel (mezi 15. a 25. týdnem těhotenství). Gynekolog prokázal retroplacentární hematoma. Léčba enoxaparinem se u pacientek nevysazovala. Stav byl zvládnut klidem na lůžku a Ascorutinem. V tabulce č. 11. je uvedena další léčba, kterou pacientky užívaly.

Tab. 7 Charakteristika skupiny pacientek z hlediska výskytu tromboembolické nemoci v osobní anamnéze

Tromboembolismus v anamnéze	počet žen (n=68)			celkem	%
	1x	2x	3 a víc		
femoropopliteální, popliteální trombóza	8	1		9	13,24%
femoropopliteální, popliteální trombóza při HAK, nebo v předchozí graviditě	7	1		8	11,76%
PE	3			3	4,41%
PE při HAK, nebo v předchozí graviditě	1			1	1,47%
trombóza mozkových splavů	1			1	1,47%
paradoxní embolizace	1			1	1,47%
trombóza v. jugularis	1			1	1,47%
CMP	1			1	1,47%
DIC v předchozí graviditě	1			1	1,47%
tromboflebitis povrchových žil	1	2	2	5	7,35%
celkem				31	45,59%
HAK- hormonální antikoncepce, PE - plicní embolie, CMP-cévní mozková příhoda, DIC-diseminovaná intravaskulární koagulace					

Tab. 8 Charakteristika pacientek z hlediska výskytu těhotenských zrát v osobní anamnéze

Těhotenská patologie	počet žen ve skupině (n=68)				celkem	%
	1x	2x	3x	4x		
potrat do 12 týdne	6	13	10	3	32	47,06%
potrat od 13 do 24 týdne	3	2			5	7,35%
porod mrtvého plodu	4	2			6	8,82%
UPT* pro neprospívání plodu	2				2	2,94%
celkem žen					45	66,18%
* UPT- umělé přerušování těhotenství						

Tab. 9 Charakteristika pacientek z hlediska výskytu trombofilií

Trombofilie (včetně duplicit*)	počet žen	%
Celkem	68	
Mutace FV-Leiden v heterozygotní konstituci	25	36,76%
Mutace FV-Leiden v homozygotní konstituci	3	4,41%
Mutace F II protrombin v heterozygotní konstituci	12	17,65%
Mutace F II protrombin v homozygotní konstituci	3	4,41%
Antifosfolipidové protilátky, lupus antikoagulans	10	14,71%
Mutace MTHFR 677 v heterozygotní konstituci	26	38,24%
Mutace MTHFR 677 v homozygotní konstituci	11	16,18%
Deficit antitrombinu, deficit proteinu C, deficit proteinu S	0	0,00%
* pokud se u jedné pacientky vyskytují 2 a více trombofilií současně, je zařazena v každé skupině		

Tab. 10 Další onemocnění v anamnéze

Další onemocnění	N=68
Diabetes mellitus	2
Epilepsie	1
Hypertenze	2
Hypothyreóza	9
Systémový lupus erythematoses	1

Tab. 11 Další užívané léky (N=68)

Přípravky s obsahem ...	15.	25.	35.
Acidum folicum	58	34	10
Anopyrin	10	8	2
Antiepileptika	1	1	1
Ascorutin	2	1	0
Antihypertenziva	2	2	6
Hormony štítné žlázy	8	9	9
Magnesium	2	14	20
Prednison	6	4	4
Progesteron	14	0	0
Železo	1	5	23

4.2 ZMĚNY KOAGULAČNÍCH PARAMETRŮ, PARAMETRŮ KREVNÍHO OBRAZU A PROTEINŮ AKUTNÍ FÁZE U TĚHOTNÝCH ŽEN S TROMBOFILÍÍ UŽÍVAJÍCÍCH CLEXANE 0,4 ML S.C. 1 X DENNĚ

Tab. 12 Souhrnný přehled parametrů krevního obrazu, koagulačních testů a proteinů akutní fáze v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství u žen užívajících Clexane 0,4 ml s.c. 1x denně

Parametr	15. Týden			25. Týden			35. Týden		
	Průměr	±SO	Medián	Průměr	±SO	Medián	Průměr	±SO	Medián
Hmotnost (kg)	68,73	10,89	66	75,22	10,22	73	79,02	11,9	77
BMI	24,13	3,65	23,35	26,37	3,53	25,69	27,71	4,01	26,4
LEU (10*9/l)	9,39	1,93	9,13	10,12	2	9,95	10,34	2,27	10
ERY (10*12/l)	4,12	0,34	4,16	3,87	0,3	3,92	3,97	0,33	4,02
HGB (g/l)	125,28	9,19	127	118,67	8,26	118,5	120,33	9,48	122
TRO (10*9/l)	271,98	55,31	267,5	264	58,59	250	250,74	59,1	248
INR	0,94	0,08	0,9	0,92	0,072	0,9	0,9	0,07	0,9
APTT (s)	34,88	5,05	34	33,6	4,92	33,15	33,87	5,93	32,45
TT (s)	14,45	1,75	14,2	14,06	1,54	13,85	14,69	1,88	14,5
FBG (g/l)	4,06	0,68	4	4,43	0,72	4,59	4,74	0,67	4,8
AT III (%)	94,97	9,89	94	95,38	9,98	94	96,05	11,8	95,5
D-Dimer (µg/l)	228,92	192,4	202	280,4	174,7	245	411,05	323	324,5
PC (%)	105,07	17,99	103	102	18,2	100,5	105,33	21,6	101

	15. Týden			25. Týden			35. Týden		
PS (%)	64,96	12,5	65	45,37	9,12	45,5	36,22	6,99	36
FVIII (%)	119,79	32,8	104,5	137,73	29,31	130	165,33	26,6	166
A1AT (g/l)	1,86	0,35	1,86	2,11	0,26	2,09	2,19	0,28	2,18
TRF(g/l)	2,67	0,45	2,62	3,45	0,5	3,46	3,8	0,56	3,92
PREA (g/l)	0,22	0,033	0,2	0,21	0,031	0,21	0,22	0,03	0,22
ORM (g/l)	0,64	0,15	0,62	0,58	0,19	0,56	0,59	0,14	0,57
CRP (g/l)	0,53	0,37	0,32	0,74	0,88	0,35	0,51	0,34	0,32
anti FXa (IU/ml)	0,33	0,1	0,34	0,29	0,11	0,27	0,28	0,15	0,23

4.2.1 Parametry krevního obrazu

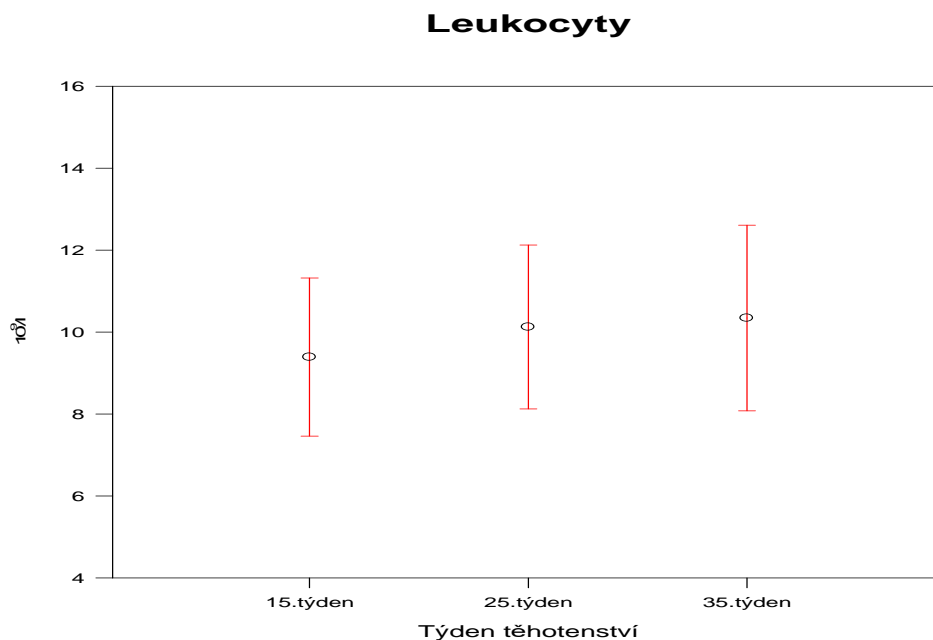
Počet leukocytů v těhotenství mírně stoupal (Graf č. 1). Změny, ale nevykazovaly statistickou významnost (Tab č. 13). Počet erytrocytů se statisticky významně snížil mezi 15. a 25. týdnem těhotenství ($P < 0,05$) z mediánové hodnoty $4,16 \cdot 10^{12}/l$ na $3,92 \cdot 10^{12}/l$ (Tab č. 15., Graf č. 2.). Koncentrace hemoglobinu byla statisticky významně nižší ve 25. a 35. týdnu než v 15. týdnu (Tab č. 17., Graf č. 3).

Sledovaný počet trombocytů se snižoval po celou dobu gravidity, ovšem nebyl statisticky významný ($P > 0,05$) (Graf č. 4). Pouze jedna pacientka ve 35. týdnu měla počet trombocytů nižší než $131 \cdot 10^9/l$ (což je dolní fyziologická mez pro zdravé netěhotné ženy). Pacientka dosáhla hodnoty $111 \cdot 10^9/l$.

Distribuční křivka trombocytů statisticky významně narůstala po celou dobu sledování ($P > 0,05$) (Tab č. 20, Graf č. 5).

Graf č. 1

Změny počtu leukocytů v 15., 25. a 35 týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (průměr a směrodatná odchylka v Tab č. 13)

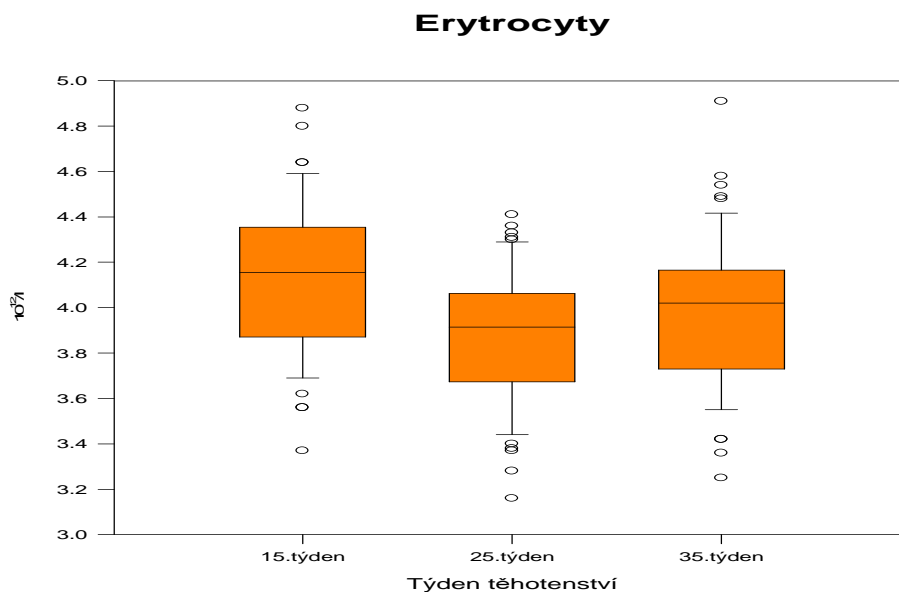


Tab. 13 Leukocyty (průměr a směrodatná odchylka)

Týden těhotenství	Průměr	SO
15.	9,39	1,93
25.	10,12	2
35.	10,34	2,27

Graf č.2.

Změny počtu erytrocytů v 15., 25. a 35 týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (medián, 25. a 75. percentil v Tab č. 14)



Tab. 14 Erytrocyty (medián a 25. a 75. percentil)

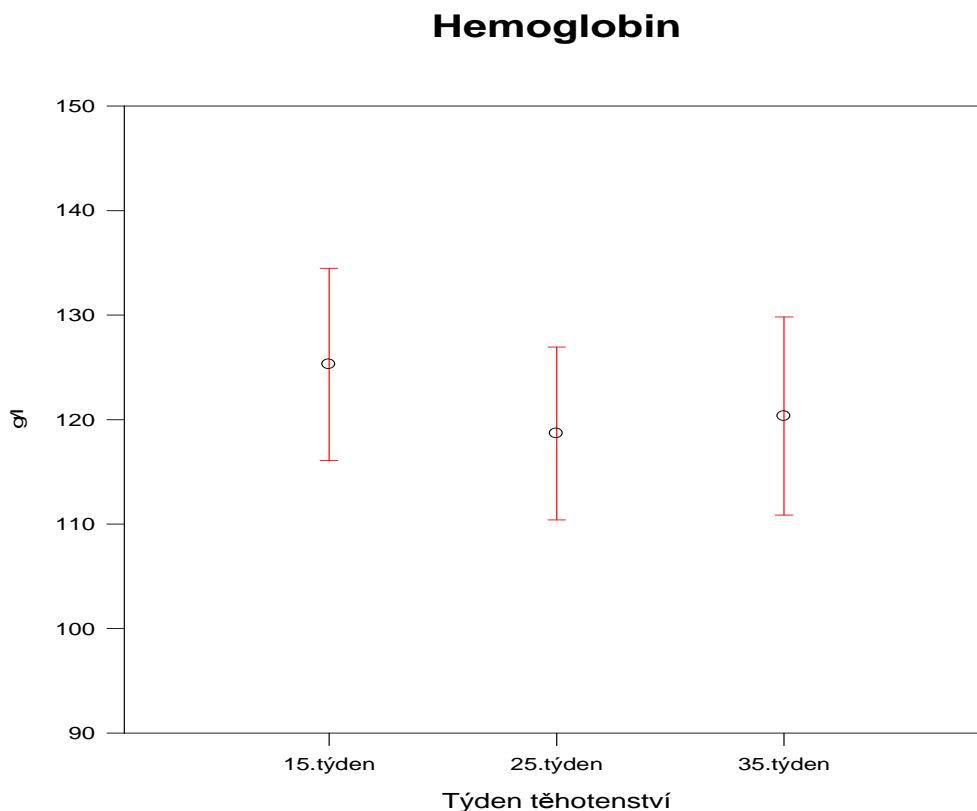
Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	4,16	3,87	4,35
25.	3,92	3,68	4,06
35.	4,02	3,73	4,15

Tab. 15 Porovnání počtu erytrocytů mezi jednotlivými týdny těhotenství: Dunn test

Porovnání	P<0,05
15t. vs 25t.	Ano
15t. vs 35t.	Ne
25t. vs 35t.	Ne

Graf č. 3

Změny koncentrace hemoglobinu v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (průměr a směrodatná odchylka v Tab č.16)



Tab. 16 Hemoglobin (průměr a směrodatná odchylka)

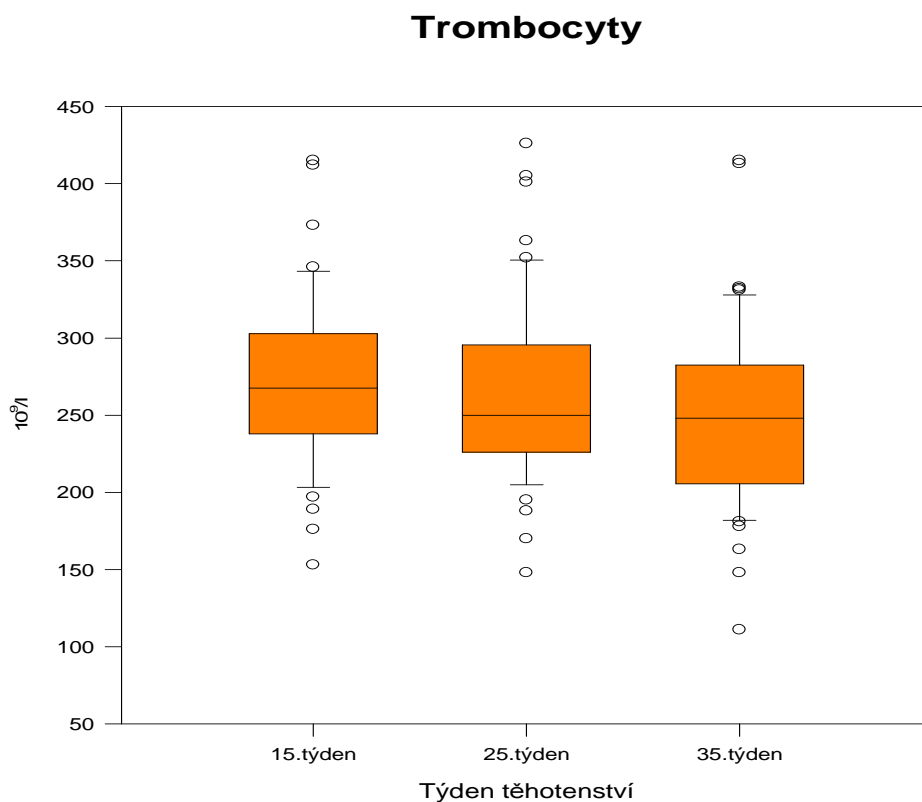
Týden těhotenství	Průměr	SO
15.	125,28	9,19
25.	118,67	8,26
35.	120,33	9,48

Tab. 17 Porovnání koncentrace hemoglobinu mezi jednotlivými týdny těhotenství: Tukey test

Porovnání	P<0,05
15t. vs 25t.	Ano
15t. vs 35t.	Ano
25t. vs 35t.	Ne

Graf č.4

Změny počtu trombocytů v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (medián, 25. a 75. percentil v Tab č. 18)

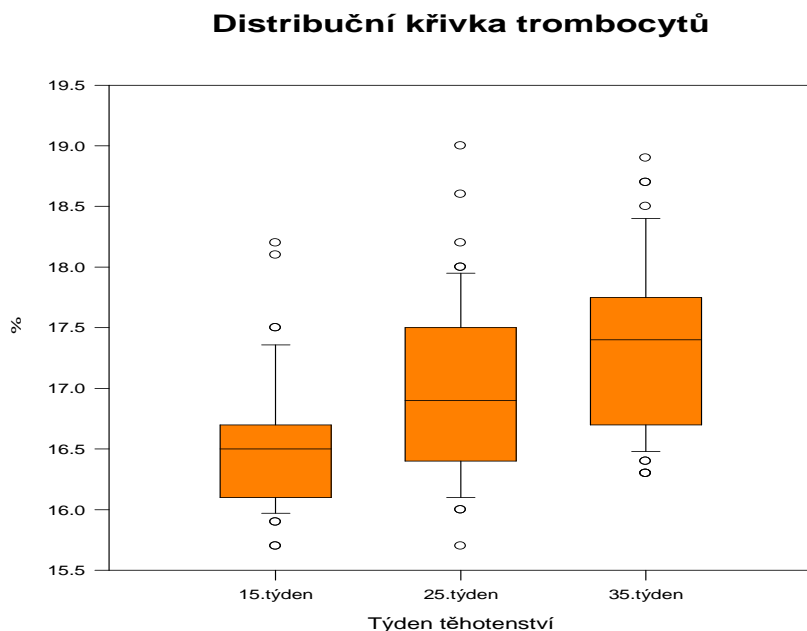


Tab. 18 Trombocyty (medián, 25. a 75. percentil)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	267,5	238	302
25.	250	226	295
35.	248	208,75	281,75

Graf č.5

Změny distribuční křivky trombocytů v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (medián, 25. a 75. percentil v Tab č. 19)



Tab. 19 Distribuční křivka trombocytů (Hodnoty mediánů a 25. a 75. percentilu)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	16,5	16,1	16,7
25.	16,9	16,4	17,5
35.	17,4	16,7	17,2

Tab. 20 Porovnání distribuční křivky trombocytů mezi jednotlivými týdny těhotenství: Dunn test.

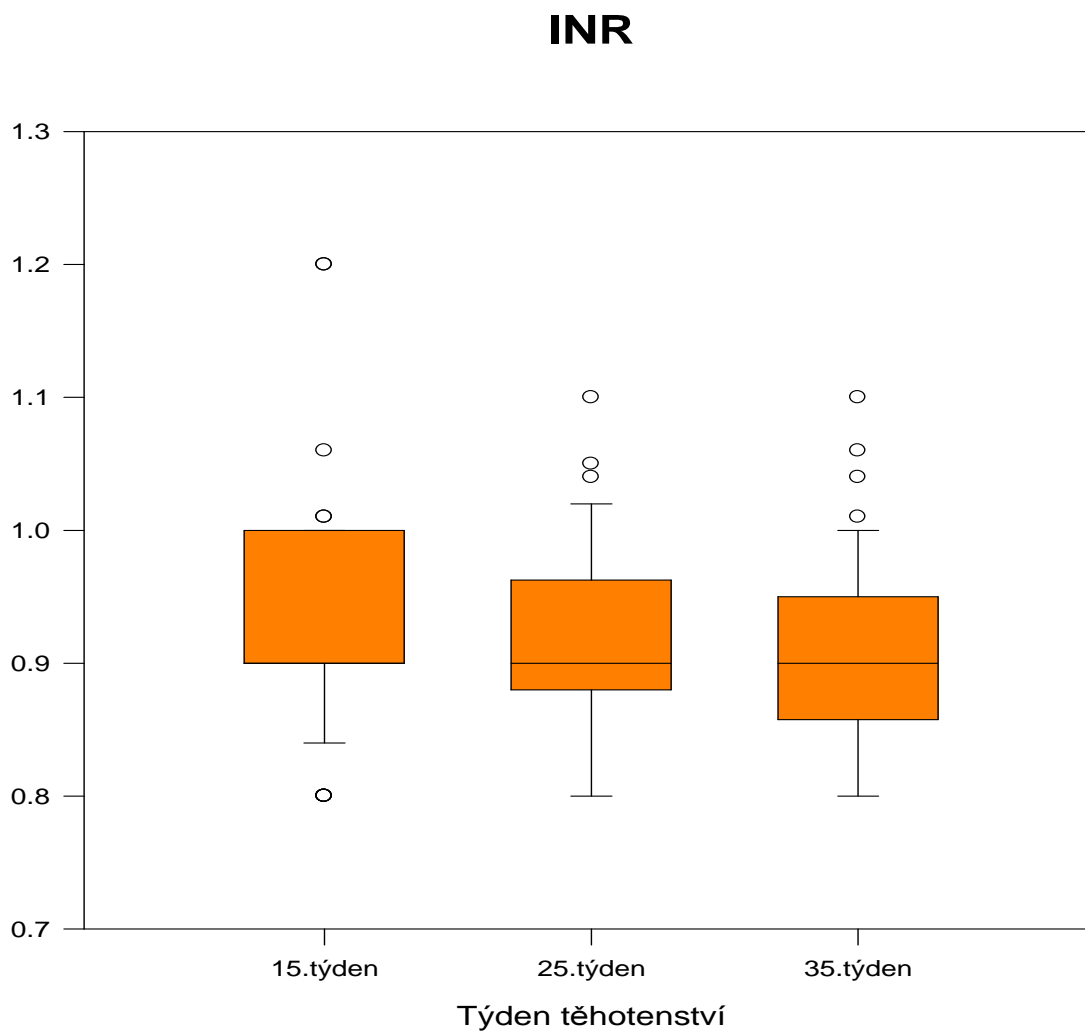
Porovnání	P<0,05
15t. vs 25t.	Ano
15t. vs 35t.	Ano
25t. vs 35t.	Ano

4.2.2 Koagulační parametry

Hodnota INR se po celou dobu sledování neměnila (Graf č. 6). Čas APTT se v průběhu sledování mírně zkracoval (z mediánové hodnoty 34 s v 15. týdnu na 32,45 s ve 35. týdnu), ovšem změny nebyly statisticky významné (Graf č. 7). Hodnoty trombinového času se neměnily (Graf č. 8). Koncentrace fibrinogenu statisticky významně stoupala mezi jednotlivými týdny ($P < 0,05$) (Tab č. 25). Ve všech odběrech byla průměrná koncentrace vyšší než 2-4 g/l (fyziologické rozmezí u netěhotných žen), (Graf č. 9). Koncentrace antitrombinu se neměnila (Graf č. 10). Koncentrace D-dimerů statisticky významně stoupala po celou dobu sledování (Tab. č. 28.). Mediánové hodnoty D-dimerů už od 15. týdne těhotenství přesahovaly fyziologické rozmezí ($< 190 \mu\text{g/l}$), (Tab č. 27). Celkem v 5 odběrech přesáhly hodnoty i 1000 $\mu\text{g/l}$ (1x už v 15. týdnu a 4x ve 35. týdnu), (Graf č. 11). Maximální dosažená koncentrace D-dimerů je 2094 $\mu\text{g/l}$. Koncentrace proteinu C se po dobu sledování neměnila (Graf č. 12). Koncentrace proteinu S statisticky významně klesala po celou dobu sledování ($P < 0,05$) (Tab č. 31). Mediánová hodnota v 15. týdnu byla 65 %, ve 25. týdnu 45 % a ve 35. týdnu 36 %. (Tab č. 30). Ve všech třech odběrech byly hodnoty nižší, než je fyziologické rozmezí pro zdravé ženy (65%-140%) (Graf č.13). Koncentrace faktoru VIII stoupala po celou dobu gravidity (Graf. č. 14). Z mediánové hodnoty 104 % ve 15. týdnu až na mediánové hodnoty 166 % ve 35. týdnu (Tab. č. 32) Elevace faktoru VIII je také statisticky významná mezi odběry (Tab. č. 33).

Graf č. 6.

Dynamika změn INR v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (medián, 25. a 75. percentil v Tab. č. 21)

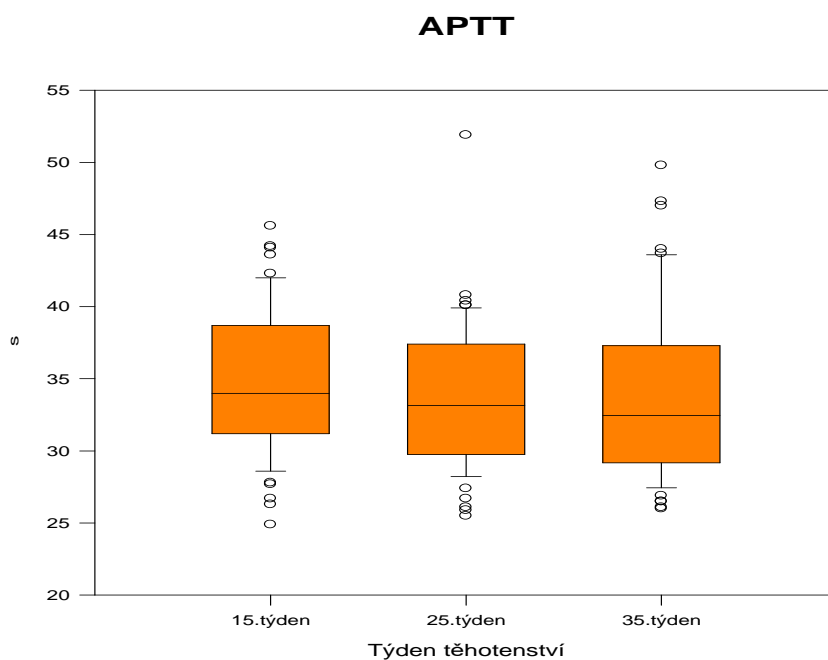


Tab. 21 INR (medián, 25. a 75. percentilu)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	0,9	0,9	1
25.	0,9	0,88	0,96
35.	0,9	0,86	0,95

Graf č.7.

Dynamika změn APTT v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (medián, 25. a 75. percentil v Tab. č. 22)



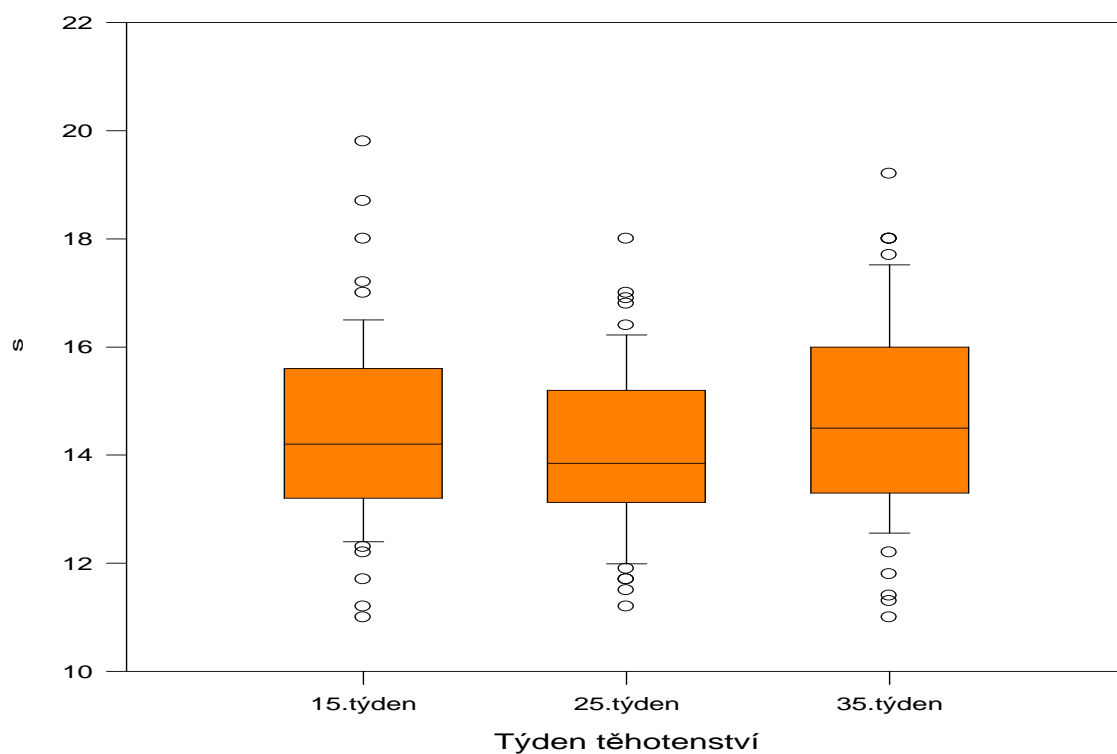
Tab. 22 APTT (medián, 25 a 75. percentil)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	34	31,2	38,68
25.	33,15	29,8	37,3
35.	32,45	29,2	37,2

Graf č. 8

Dynamika změn trombinového času v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (medián, 25. a 75. percentil v Tab. č. 23.)

Trombinový čas

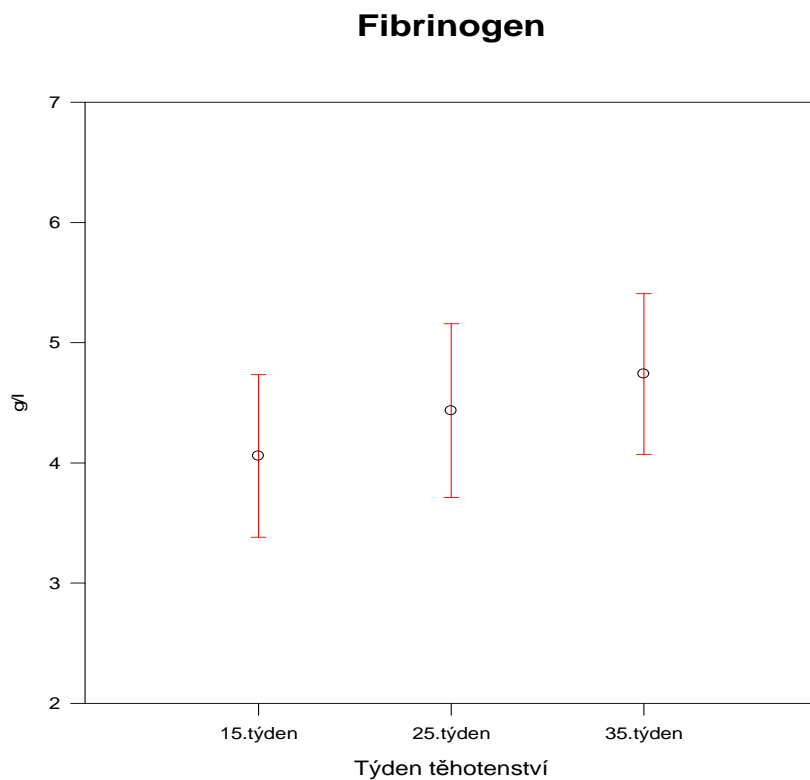


Tab. 23 Trombinový čas (medián, 25. a 75. percentil)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	14,2	13,2	15,6
25.	13,85	13,2	15,2
35.	14,5	13,3	16

Graf č. 9

Změny koncentrace fibrinogenu v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (průměr a směrodatná odchylka v Tab. č.24)



Tab. 24 Fibrinogen (průměr a směrodatná odchylka)

Týden těhotenství	Průměr	SO
15.	4,06	0,68
25.	4,43	0,72
35.	4,74	0,67

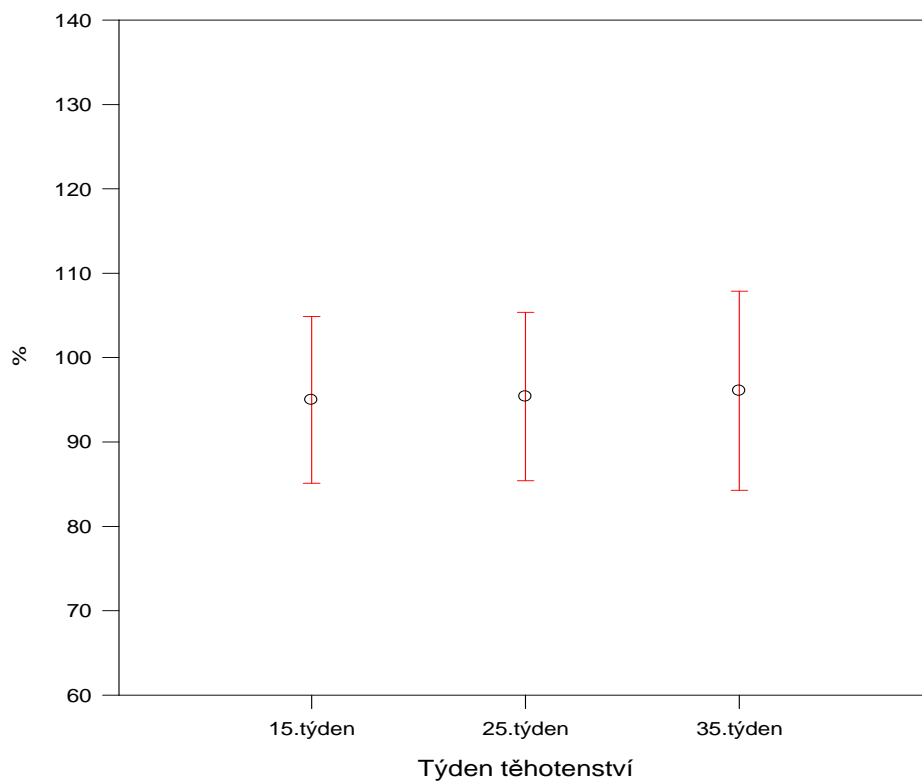
Tab. 25 Porovnání koncentrace fibrinogenu mezi jednotlivými týdny těhotenství: Tukey test

	P<0,05
15t. vs 25t.	Ano
15t. vs 35t.	Ano
25t. vs 35t.	Ano

Graf č. 10

Změny koncentrace antitrombinu v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (průměr a směrodatná odchylka v Tab č. 26)

Antitrombin

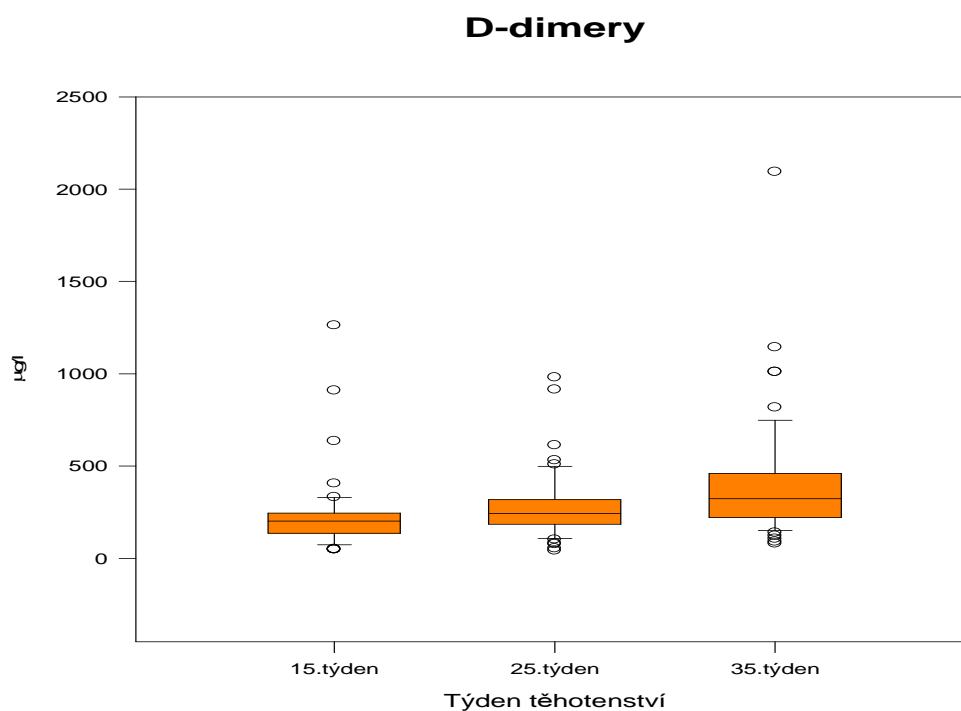


Tab. 26 Antitrombin (průměr a směrodatná odchylka)

Týden těhotenství	Průměr	SO
15.	94,97	9,89
25.	95,38	9,98
35.	96,05	11,79

Graf č. 11

Změny koncentrace D-dimerů v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem



Tab. 27 D-dimery (medián, 25. a 75. percentil)

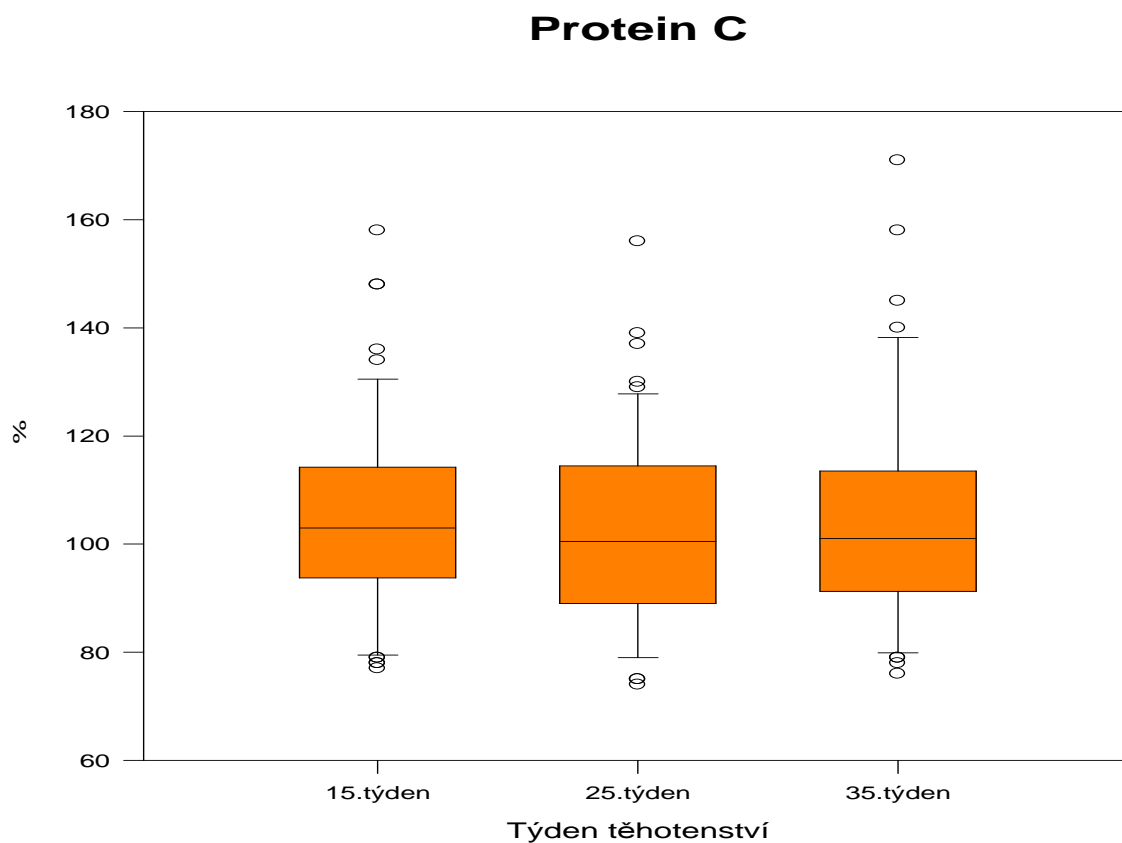
Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	202	137	245,25
25.	245	189,25	317,5
35.	324	224	461

Tab. 28 Porovnání koncentrace D-dimerů mezi jednotlivými týdny těhotenství:

Dunn test Porovnání	P<0,05
15t. vs 25t.	Ano
15t. vs 35t.	Ano
25t. vs 35t.	Ano

Graf č. 12

Hodnoty proteinu C v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (hodnoty mediánu, 25. a 75. percentilu v Tab. č.29)

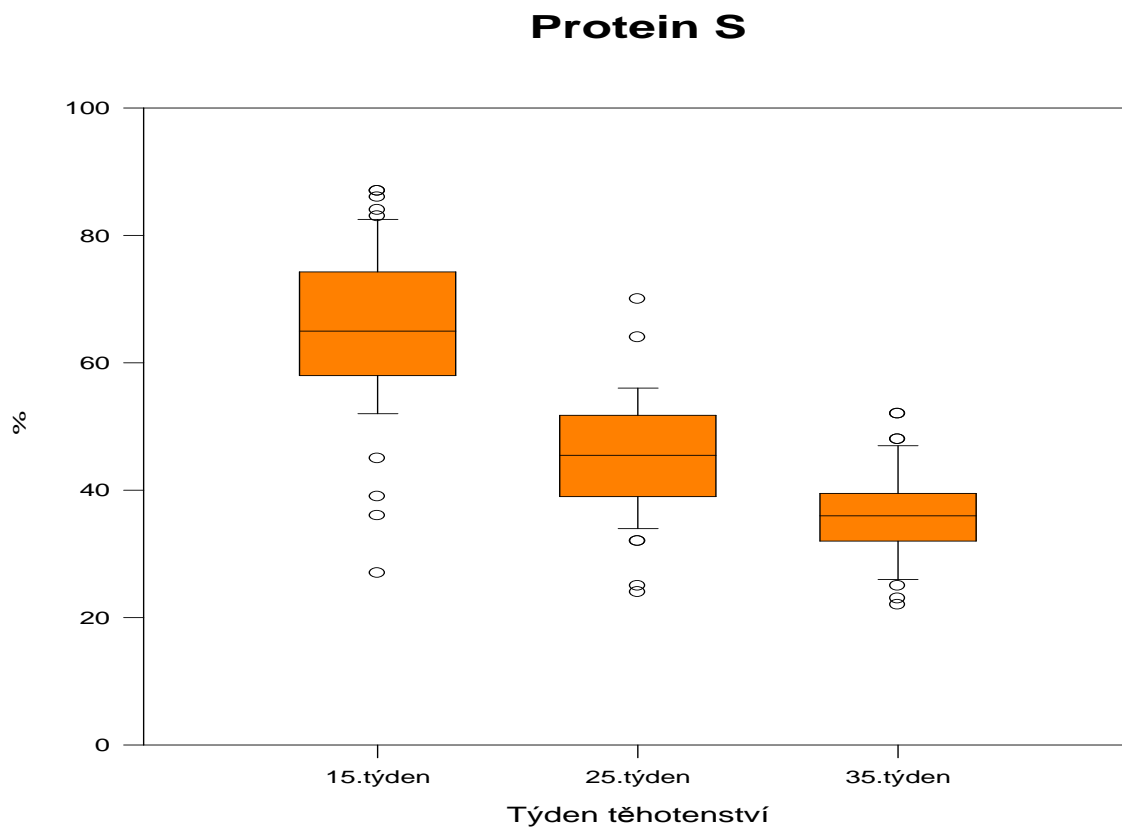


Tab. 29 Protein C (medián, 25. a 75. percentil)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	103	94	114
25.	100	89	114
35.	101	91	113

Graf č. 13

Hodnoty proteinu S v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (hodnoty mediánu, 25. a 75 percentilu Tab. 30)



Tab. 30 Protein S (medián, 25. a 75. percentil)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	65	58	74
25.	45	39	51
35.	36	32	39

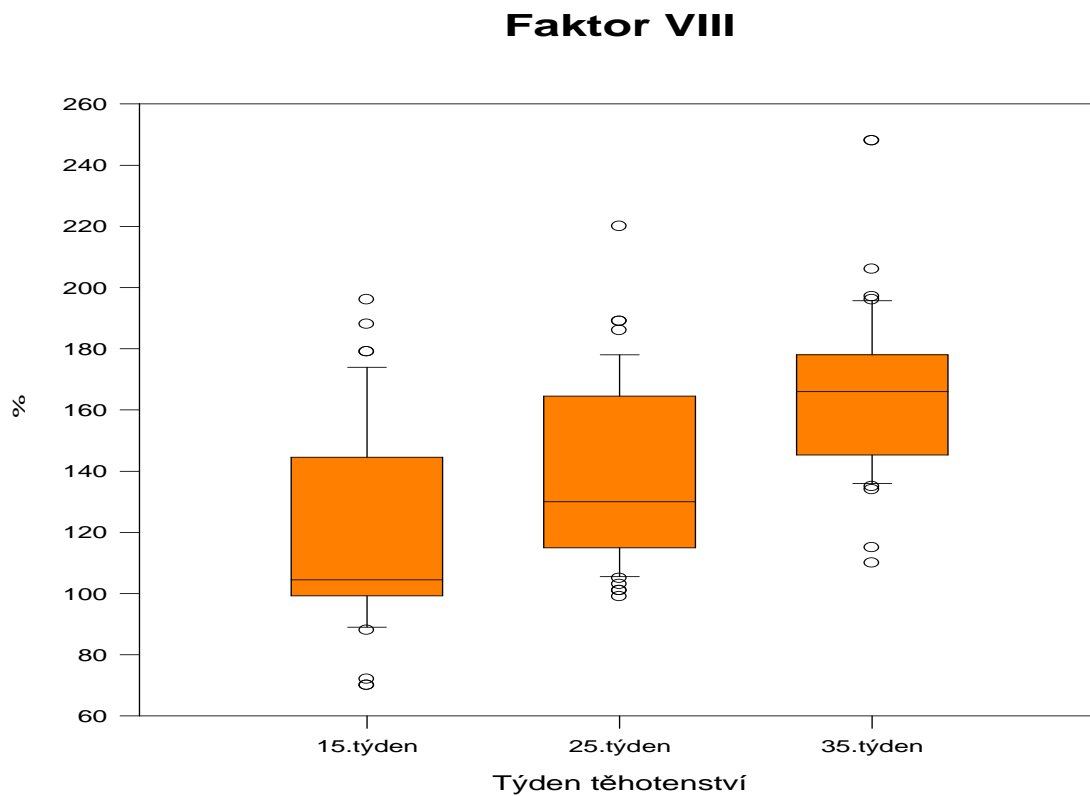
Tab. 31 Porovnání hodnot proteinu S mezi jednotlivými týdny těhotenství

Dunn test

Porovnání	P<0,05
15t. vs 25t.	Ano
15t. vs 35t.	Ano
25t. vs 35t.	Ano

Graf č. 14

Hodnoty faktoru FVIII v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (hodnoty mediánu, 25. a 35 percentilu v Tab. č. 32)



Tab. 32 Faktor VIII (medián, 25. a 75. percentil)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	104	99	144
25.	130	115	164
35.	166	145	178

Tab. 33 Porovnání hodnot faktoru VIII mezi jednotlivými týdny těhotenství:

Dunn test

Porovnání	P<0,05
15t. vs 25t.	Ano
15t. vs 35t.	Ano
25t. vs 35t.	Ano

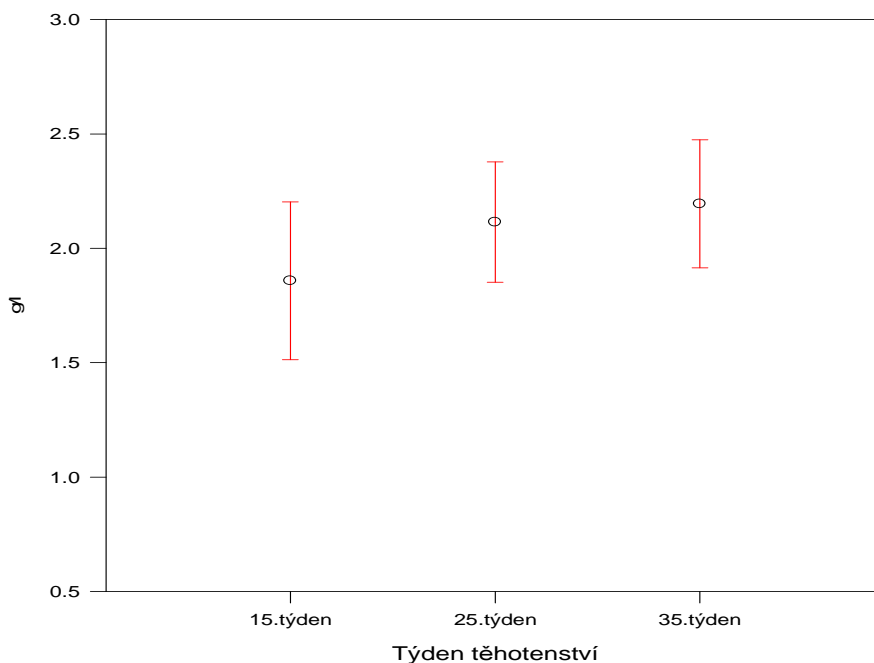
4.2.3 Proteiny akutní fáze:

U alfa1-antitrypsinu byl zjištěn signifikantní vzestup mezi 15. a 25; a 15. a 35. týdnem gravidity (Graf č. 15). Mediánové hodnoty ve 25. a 35. týdnu přesahují fyziologické rozmezí pro zdravé netěhotné pacienty (norma 0,9-2 g/l) (Tab č.34,Tab č. 35). Koncentrace transferinu po celou dobu měření signifikantně stoupala a byly zjištěny i statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými týdny odběru (Graf č.16, Tab. č.36). Koncentrace prealbuminu se neměnila (Graf č. 17). Koncentrace alfa1-glykoproteinu (orosomukoidu) statisticky významně poklesla mezi 15. a 25. týdnem a pak se již neměnila (Graf č. 18, Tab. 41). Hladina alfa2- makroglobulinu a CRP se významně nelišila (Graf č. 19, Graf č. 20.).

Graf č. 15

Hodnoty koncentrace alfa1-antitrypsinu v 15., 25. a 35 týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (průměr a směrodatná odchylka v Tab č. 34)

Alfa1 antitrypsin



Tab. 34 Alfa1-antitrypsin (průměr a směrodatná odchylka)

Týden těhotenství	Průměr	SO
15.	1,86	0,047
25.	2,11	0,036
35.	2,19	0,037

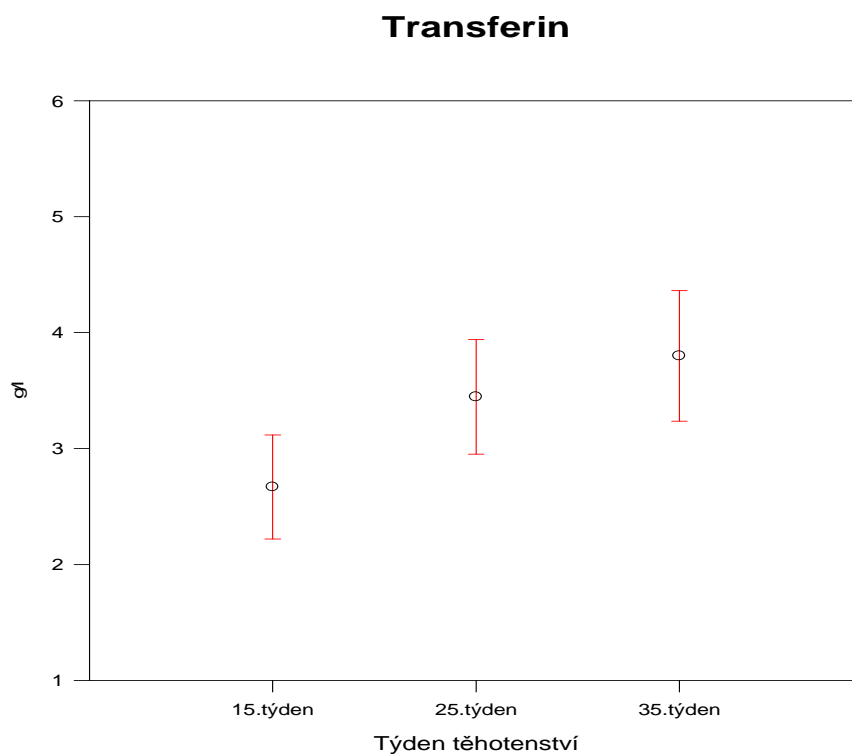
Tab. 35 Porovnání koncentrace alfa1-antitrypsinu mezi jednotlivými týdny těhotenství:

Tukey test

Porovnání	P<0,05
15t. vs 25t.	Ano
15t. vs 35t.	Ano
25t. vs 35t.	Ne

Graf č.16

Hodnoty koncentrace transferinu v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem



Tab. 36 Transferin (průměr a směrodatná odchylka)

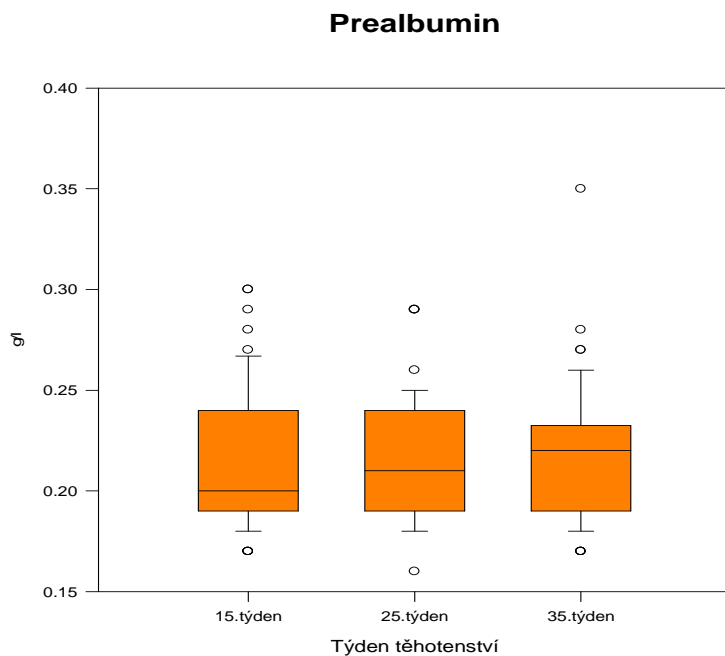
Týden těhotenství	Průměr	SO
15.	2,67	0,45
25.	3,45	0,5
35.	3,8	0,56

Tab. 37 Porovnání koncentrace transferinu mezi jednotlivými týdny těhotenství: Tukey test

Porovnání	P<0,05
15t. vs 25t.	Ano
15t. vs 35t.	Ano
25t. vs 35t.	Ano

Graf č. 17.

Hodnoty koncentrace prealbuminu v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (hodnoty mediánů, 25. a 75. percentilu v Tab č. 38)

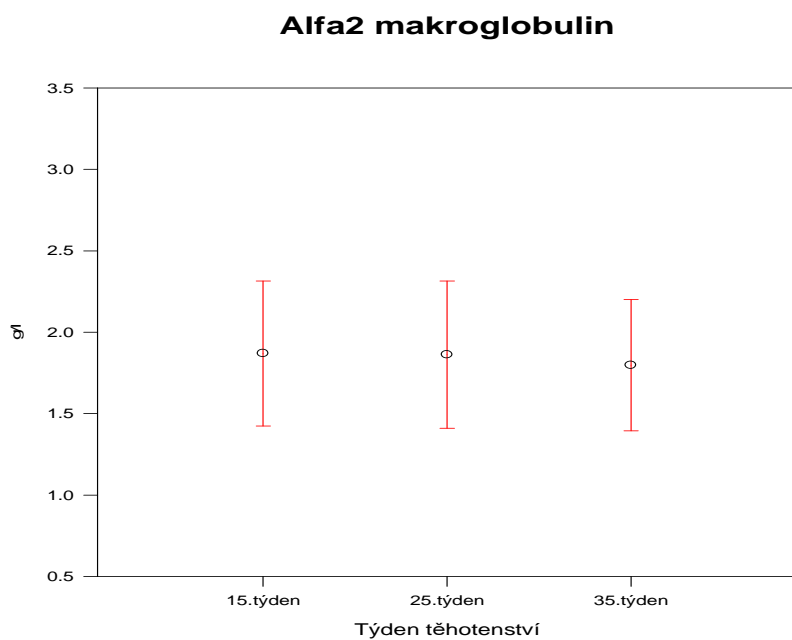


Tab. 38 Prealbumin (medián, 25. a 75. percentil)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	0,2	0,19	0,24
25.	0,21	0,19	0,24
35.	0,22	0,19	0,23

Graf č.18

Hodnoty koncentrace alfa2-makroglobulinu v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem.



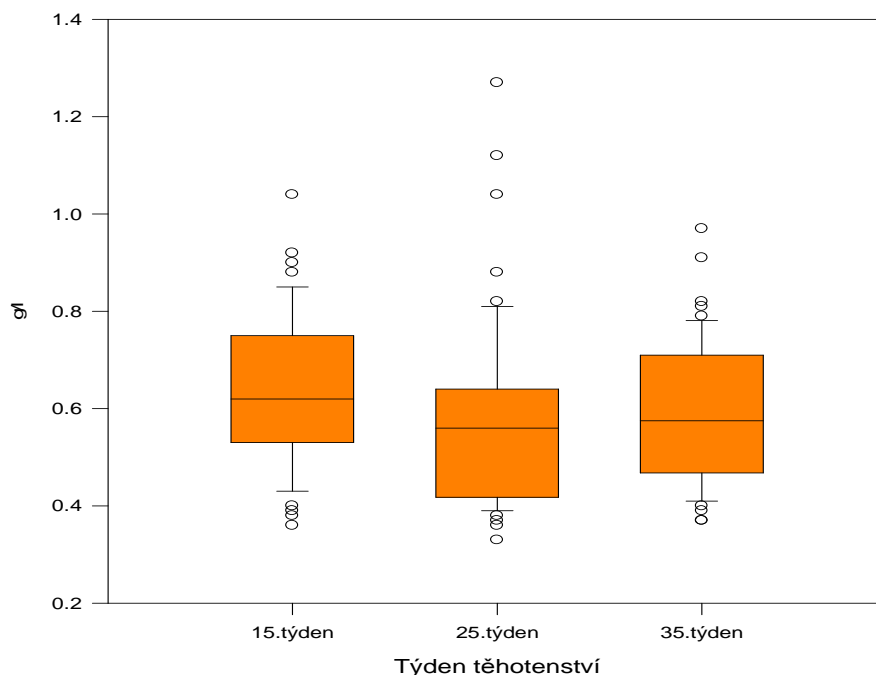
Tab. 39 Alfa2-makroglobulin (průměr a směrodatná odchylka)

Týden těhotenství	Průměr	SO
15.	1,87	0,45
25.	1,86	0,45
35.	1,8	0,4

Graf č. 19

Hodnoty koncentrace alfa1-glykoproteinu (orosomukoid) v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (hodnory mediánu 25. a 75. percentilu v Tab. č. 40).

Alfa1 glykoprotein



Tab. 40 Alfa1-glykoprotein (medián a 25. a 75. percentil)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	0,62	0,54	0,75
25.	0,56	0,42	0,64
35.	0,57	0,47	0,71

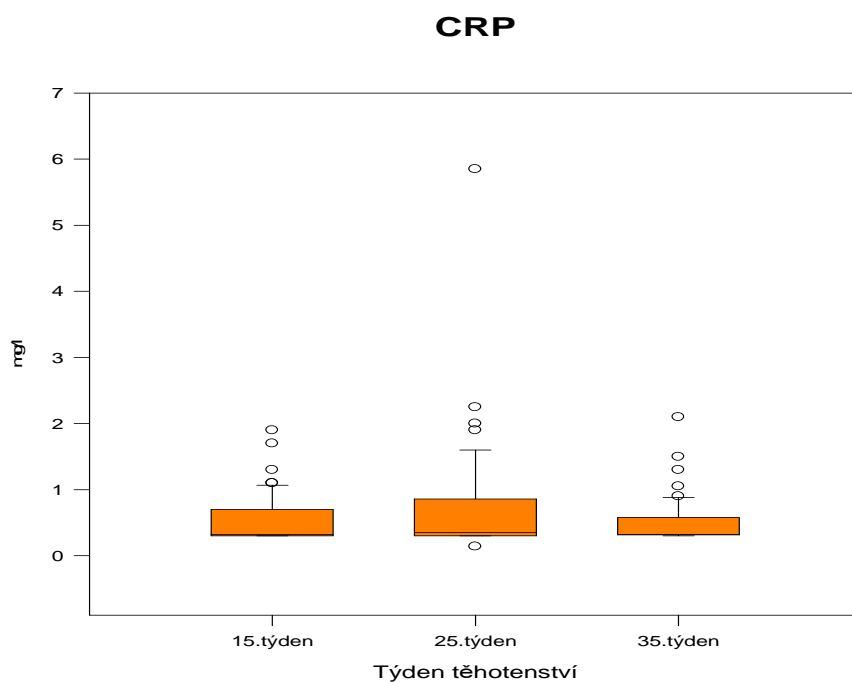
Tab. 41 Porovnání hodnot alfa1-glykoproteinu mezi jednotlivými týdny těhotenství

Dunn test

Porovnání	P<0,05
15t. vs 25t.	Ano
15t. vs 35t.	Ne
25t. vs 35t.	Ne

Graf č. 20

Hodnoty koncentrace C reaktivního proteinu (CRP) v 15., 25. a 35. týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (hodnory mediánu 25. a 75. percentilu v Tab. č. 42)



Tab. 42 CRP (medián, 25. a 75. percentil)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	0,32	0,3	0,69
25.	0,35	0,3	0,84
35.	0,32	0,32	0,57

4.3 SLEDOVÁNÍ ÚČINNOSTI ANTIKOAGULAČNÍ LÉČBY

V TĚHOTENSTVÍ, MONITORACE POMOCÍ ANTI FXa AKTIVITY

4.3.1 Výsledky anti FXa

Léčba nízkomolekulárním heparinem byla zahájena průměrně v 7. týdnu těhotenství. Gestační týden byl stanoven podle data poslední menstruace. Enoxaparin byl podáván v počáteční dávce 4.000 IU, a dávka byla později upravena na základě měření plazmatické anti FXa aktivity. Pokud byla hodnota inhibice faktoru Xa nižší než 0,2 IU/ml 4 hodiny po aplikaci injekce, byla dávka enoxaparinu zvýšena na 6000 IU.

Dynamika změn enoxaparinem navozené inhibice aktivovaného faktoru Xa je znázorněna v grafu č.21. V tomto grafu jsou zahrnuty i pacientky, u kterých bylo potřeba zvýšit dávku ze 4000 IU na 6000 IU. I přesto průměrné navozené inhibice aktivovaného faktoru Xa klesají až do 35. týdne. Rozdíl mezi 15. týdnem a 35.týdnem je statisticky významný (Tab č. 44).

Počet poddávkových pacientek je znázorněn v grafu č.22. Už v 15. týdnu (n=68) byla u 7 pacientek (10,29%) zjištěna koncentrace anti FXa nižší než 0,2 IU/ml a dávka se zvýšila na 6000 IU. Ve 25.týdnu (n=61) byla u 6 pacientek (9,83 %) zjištěna koncentrace anti FXa nižší než 0,2 IU/ml a dávka se zvýšila na 6000 IU. Ve 35. týdnu (n=55) byla u 8 pacientek (14,54 %) zjištěna koncentrace anti FXa nižší než 0,2 IU/ml a dávka se zvýšila na 6000 IU. Takže nakonec se dávka zvyšovala u celkem 21 (30,88%) pacientek z 68. V každém sledovaném týdnu těhotenství, byla většina pacientek ve správném profylaktickém rozmezí.

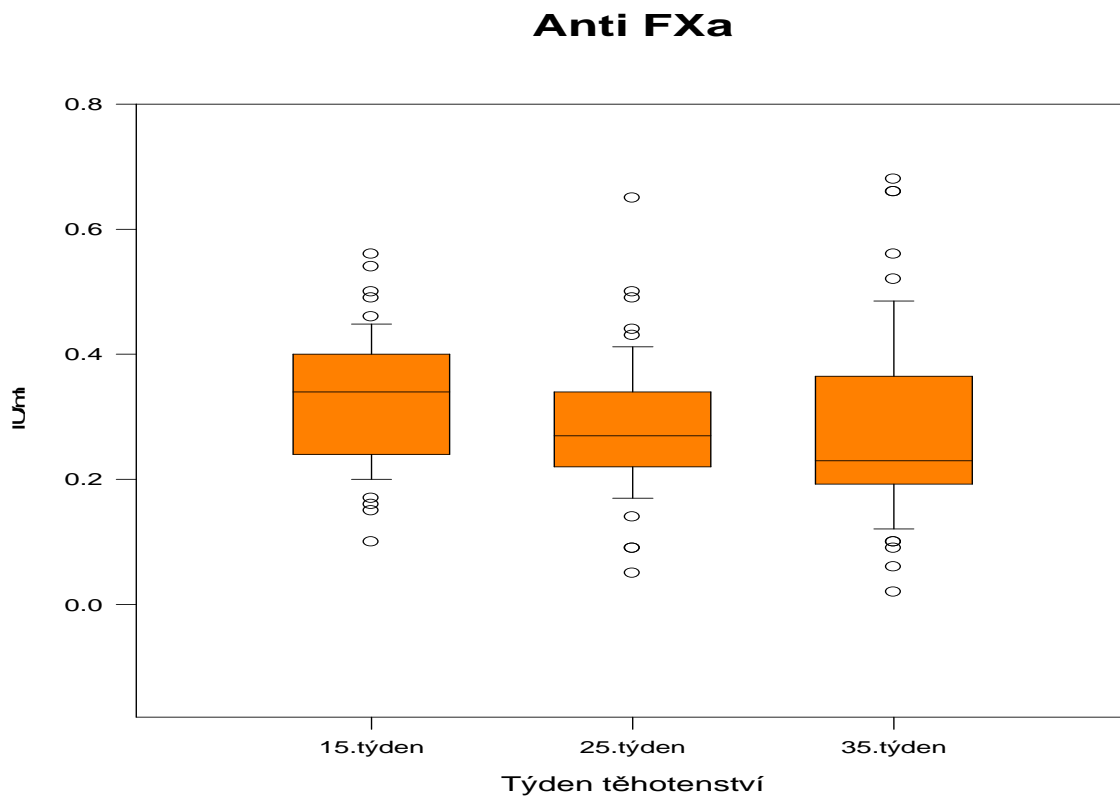
Dále jsem zkoumali souvislost snižující se koncentrace anti FXa s hmotností a BMI indexem pacientky a s koncentrací heparin vázajících proteinů.

BMI negativně koreluje s s inhibicí FXa ($p < 0,001$, $r = -0,29$) (Graf č.23). Podobně i tělesná hmotnost negativně koreluje s inhibicí FXa ($p = 0,0015$; $r = -0,27$).

Některé heparin-vázající proteiny jako například fibrinogen ($p < 0,001$, $r = -0,3$) (Graf č.24) a nebo alfa1-antitrypsin ($p = 0,023$, $r = -0,15$) (Graf č.25) negativně korelují s inhibicí FXa. Koncentrace D-dimerů statisticky významně negativně koreluje s inhibicí FXa ($p = 0,0095$, $r = -0,2$) (Graf č.26).

Graf č.21

Hodnoty inhibice aktivovaného faktoru X v 15., 25. a 35 týdnu těhotenství ve sledované skupině gravidních pacientek s enoxaparinem (hodnoty mediánu, 25. a 75. percentilu v Tab. č.43)



Tab. 43 Anti FXa (medián, 25. a 75. percentil)

Týden těhotenství	Medián	25%	75%
15.	0,34	0,24	0,4
25.	0,27	0,22	0,34
35.	0,23	0,2	0,36

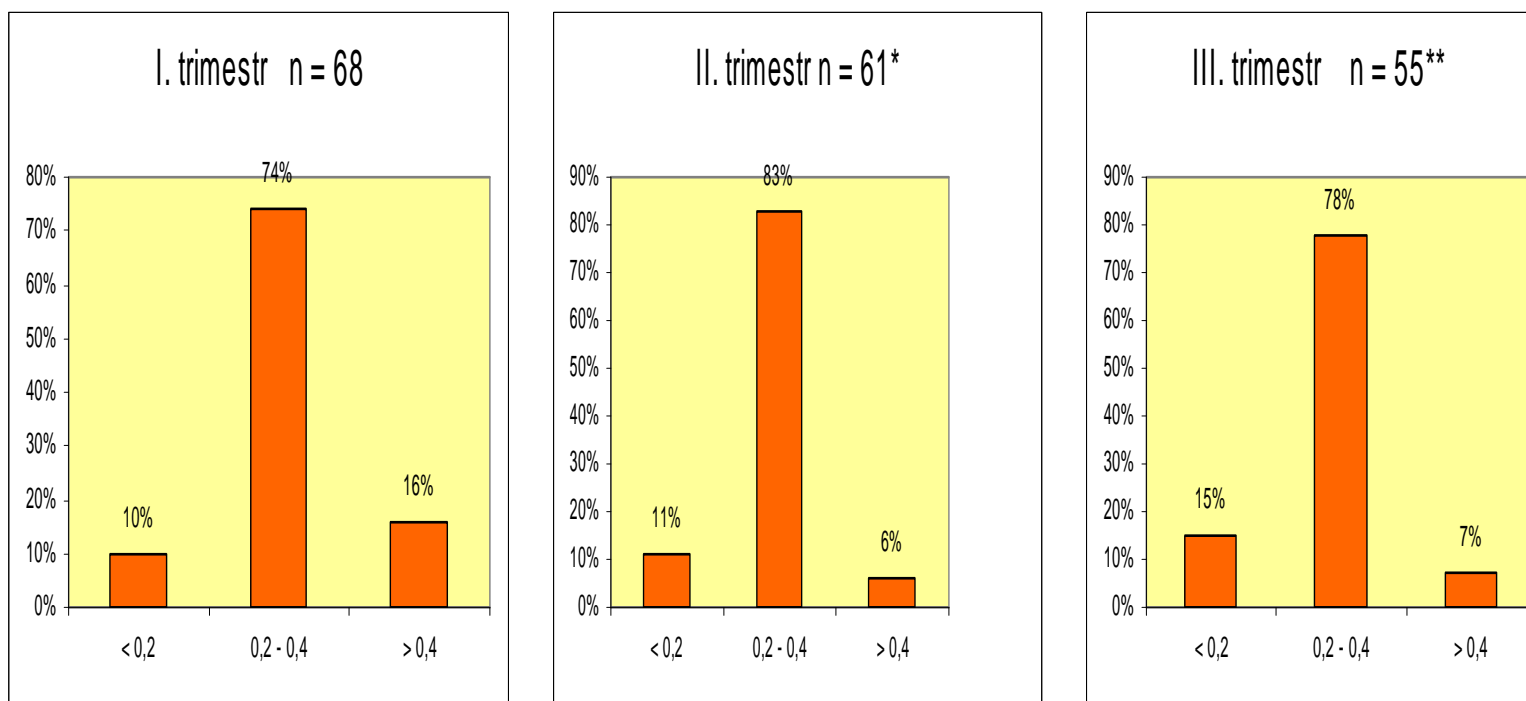
Tab. 44 Porovnání inhibice aktivovaného faktoru X mezi jednotlivými týdny těhotenství:

Dunn test

Porovnání	P<0,05
15t. vs 25t.	Ne
15t. vs 35t.	Ano
25t. vs 35t.	Ne

Graf č. 22

Rozdělení pacientek užívajících pouze Clexane 0,4 ml s.c. 1 x denně podle dosažené inhibice aktivovaného faktoru X.



Pozn. U pacientek, které nedosáhly minimální profylaktické koncentrace anti FXa 0,2 IU/ml při dávce Clexane 0,4 ml s.c. 1 x denně, bylo nutné dávku zvýšit na Clexane 0,6 ml s.c. 1 x denně. A tyto pacientky dále nebyly do grafu zahrnuty.

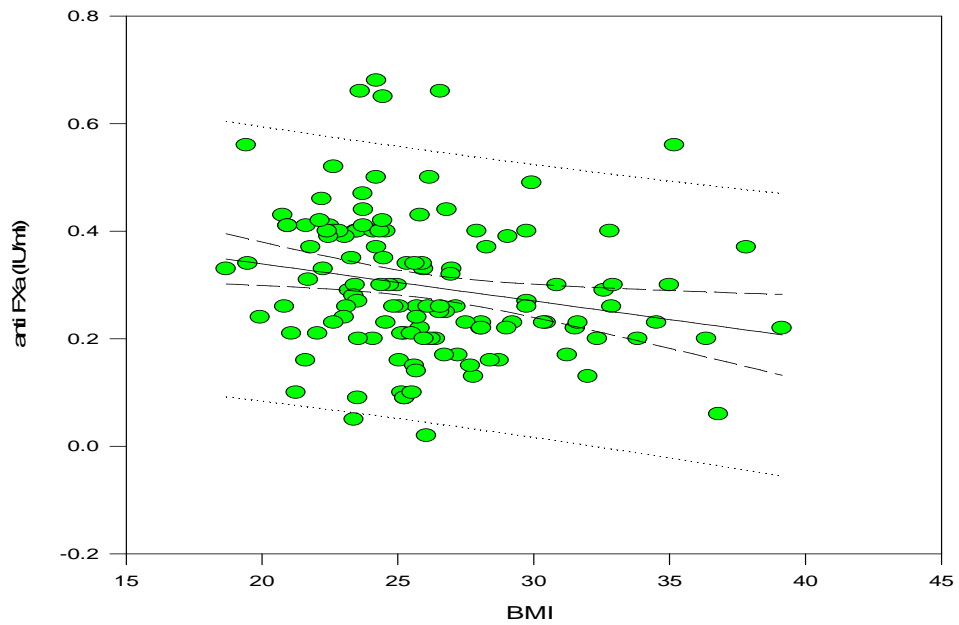
* počet měření byl oproti I. trimestru snížen o 7 měření (u těchto pacientek byla dávka zvýšena na Clexane 0,6 ml s.c. 1 x denně)

** počet měření byl snížen o 13 měření oproti I. trimestru (u těchto pacientek byla dávka zvýšena na Clexane 0,6 ml s.c. 1 x denně)

Graf č. 23

Negativní korelace mezi BMI a inhibicí aktivovaného faktoru X.

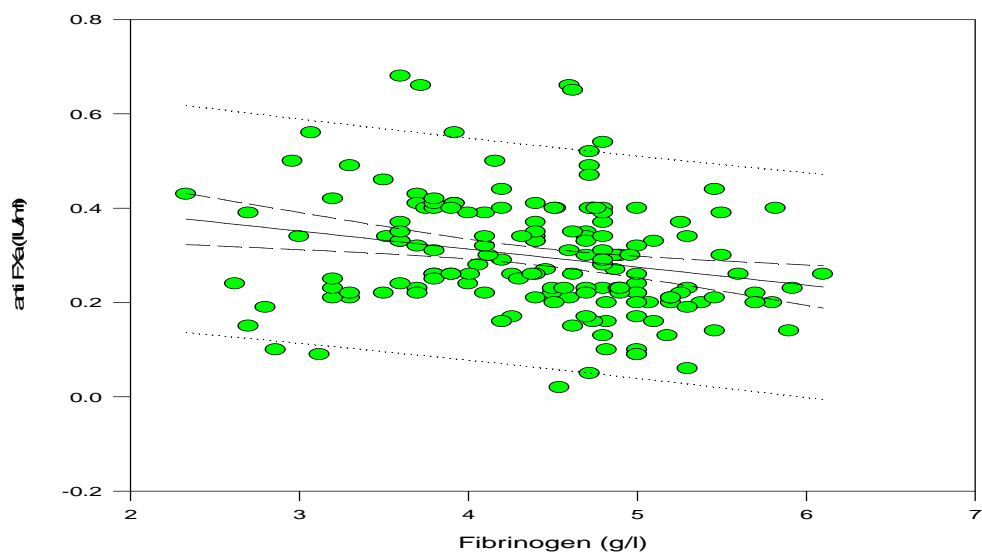
**Graf lineární regrese: BMI a inhibice FXa.
 $p < 0,001$; $r = -0,29$**



Graf č. 24

Negativní korelace mezi fibrinogenem a inhibicí aktivovaného faktoru X.

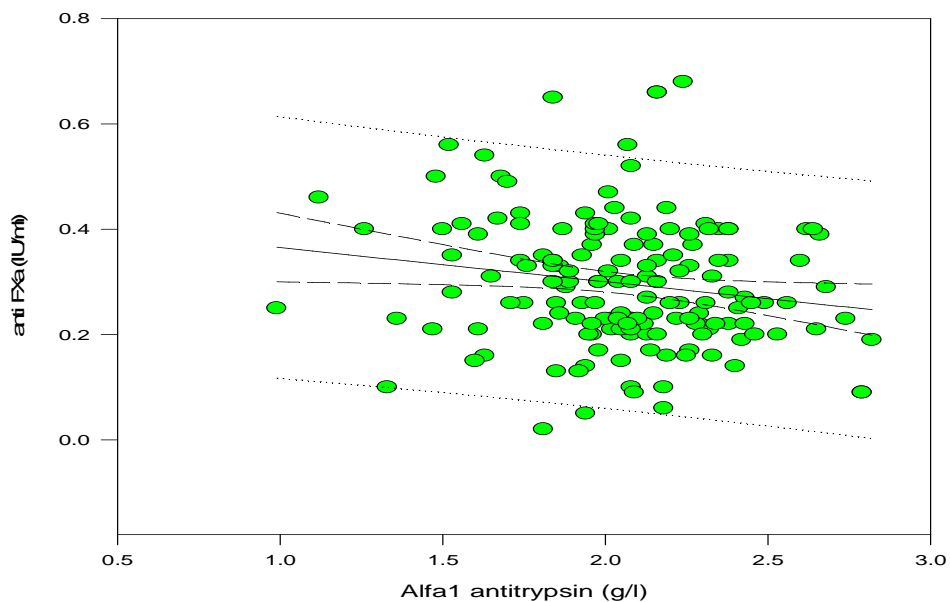
**Graf lineární regrese: Fibrinogen a inhibice FXa.
 $p < 0,001$; $r = -0,3$**



Graf č. 25

Negativní korelace mezi alfa1 antitrypsinem a inhibicí aktivovaného faktoru X.

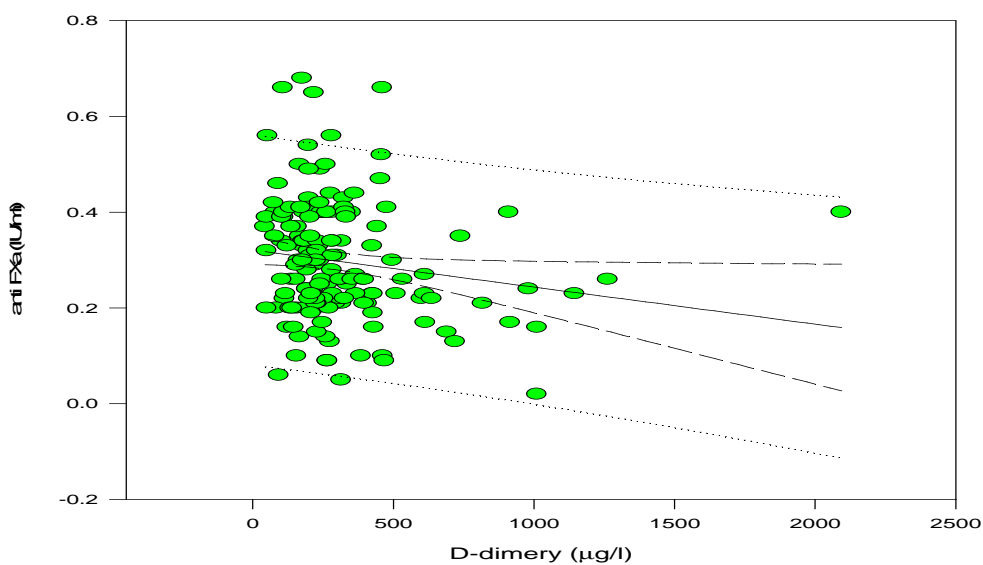
**Graf lineární regrese: Alfa1 antitrypsin a inhibice FXa.
 $p=0,023; r=-0,15$**



Graf č. 26

Negativní korelace mezi D-dimery a inhibicí aktivovaného faktoru X.

**Graf lineární regrese: D-dimery a inhibice antiXa.
 $p=0,0095; r= -0,20$**



4.4 DOTAZNÍKOVÁ STUDIE – ZHODNOCENÍ NEŽÁDOUCÍCH ÚČINKŮ LMWH V MÍSTĚ VPICHU

Dotazník vyplnilo celkem 66 pacientek, v gestačním týdnu $34,1 \pm 3,2$. Průměrná doba aplikace enoxaparínu byla $4,3 \pm 1,8$ měsíců. Základní charakteristika souboru je uvedena v kapitole 4.1.

Většina pacientek si aplikovala enoxaparín do břicha a boků 90% (60/66), pouze malá část zvolila alternativní místa aplikace stehna nebo paže 10 % (6/66). Většina pacientek si aplikovala enoxaparín sama 82 % (54/66), pouze 18 % (12/66) si nechalo aplikovat injekci od druhé osoby (manžela, přítele, matky). 78,8% (52/66) pacientek mělo drobné modřiny v místě aplikace. Z toho 5,8% (3/52) skoro vždy, 61,5% (32/52) občas, 30,8% (16/52) výjimečně a 1,9% (1/52) skoro nikdy. Z toho 44 respondentek popsalo i velikost modřiny (Graf č. 27). Nebylo však zaznamenáno žádné závažné krvácení.

Častým nepříjemným vedlejším účinkem bylo také pálení v místě aplikace 65,2 % (43/66) (Graf č.28). Z toho 34,9% (15/43) skoro vždy, 41 % (18/43) občas, 16,3% (7/43) výjimečně. U 90,7% (39/43) vzniklo pálení hned po vpichu a trvalo kratší dobu než 5 minut.

Další lokální vedlejší účinky byly méně časté. Svědění v místě vpichu udává 15,2% (10/66) (Graf č.29). Bolest v místě vpichu mělo 37,9 % (25/66) (Graf č.30). 4,5% (3/66) měly tuhé podkožní uzlíky v místě aplikace. Ani jedna respondentka neměla vyrážku v místě aplikace injekce. Podrobněji jsou tyto výsledky vyjádřeny v tabulce č. 45.

Celkem 4,5 % (3/66) se vyjádřily i v kolonce další komplikace a psychické aspekty a napsaly: „ Obtěžuje mě dlouhodobé podávání injekcí (celkem asi 8 měsíců)“; „ Zvedá se mi žaludek, musím se koukat jinam“; „ Nemůžu střídat strany, jsem pravačka a na levou stranu přes břicho nedosáhnu“.

Při závěrečném zhodnocení odpovědělo 25,8 % (17/66), že podávání Clexane jim nevádí a neobtěžuje je. 68,2 % (45/66) odpovědělo, že podávání je nutné, takže snížení komfortu beru s nadhledem. Pouze 3 % (2/66) pacientkám je to nepříjemné a obtěžuje je to. Žádná pacientka neodpověděla, že je aplikace LMWH nesnesitelná (Graf č. 31.).

U žádné pacientky nebyly klinickým sledováním zaznamenány žádné závažné krvácivé komplikace.

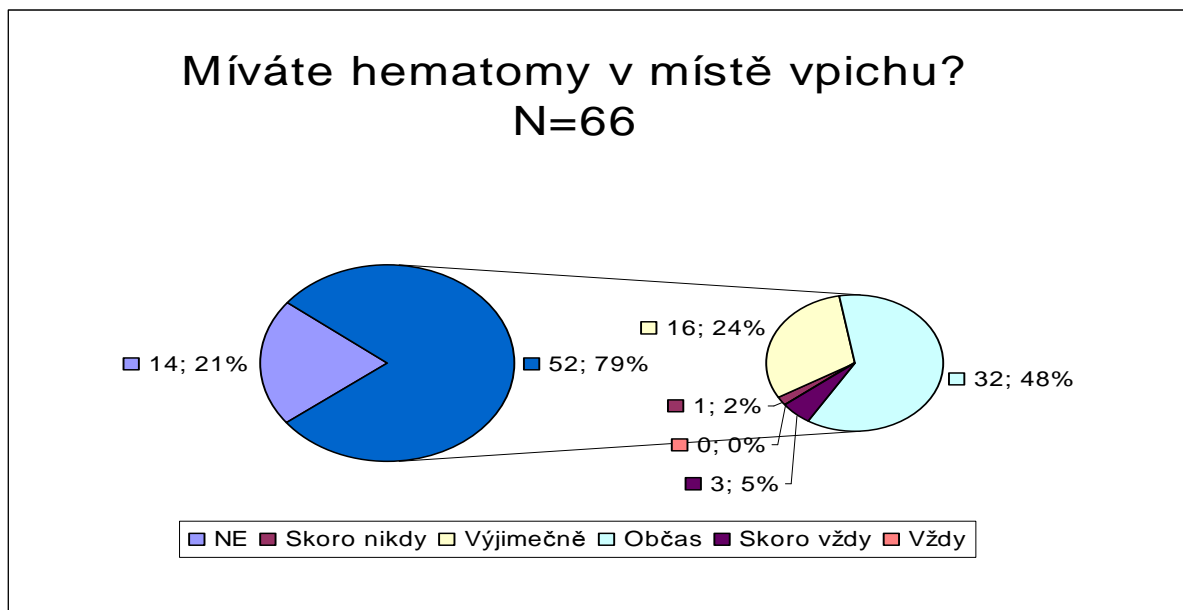
Tab. 45 Souhrný přehled lokálních nežádoucích reakcí v místě vpichu enoxaparinu

Hematomy v místě vpichu (N=66): ANO 52 (78,8%), NE 14 (21,2%)					
Pokud ano			Pokud ano		
	N	%		N	%
Jak často? (N=52)			Jak jsou obvykle velké? (N=52)		
Skoro nikdy	1	1,9%	Menší 1x1 cm	21	40,4%
Výjimečně	16	30,8%	1x1-3x3 cm	18	34,6%
Občas	32	61,5%	3x3-10x10 cm	5	9,6%
Skoro vždy	3	5,8%	Bez odpovědi	8	15,4%
Vždy	0	0,0%			
Svědění v místě aplikace (N=66): ANO 10 (15,2%), NE 56 (84,8%)					
Jan často? (N=10)			Jak dlouho to trvá? (N=10)		
Skoro nikdy	1	10,0%	Méně než 1 minutu	4	40,0%
Výjimečně	4	40,0%	Déle než 1 minutu	3	30,0%
Občas	4	40,0%	Bez odpovědi	3	30,0%
Skoro vždy	0	0,0%			
Vždy	1	10,0%			
Pálení v místě aplikace (N=66): ANO 43 (65,2%), NE 23 (34,8%)					
Jak často? (N=43)			Jak dlouho to trvá? (N=43)		
Skoro nikdy	3	7,0%	Méně než 5 minut	39	90,7%
Výjimečně	7	16,3%	Déle než 5 minut	2	4,7%
Občas	18	41,9%	Bez odpovědi	2	4,7%
Skoro vždy	15	34,9%			
Vždy	0	0,0%			
Bolest v místě aplikace (N=66): ANO 25 (37,9%), NE 41 (62,1%)					
Jak často? (N=25)			Popište druh bolesti. (N=25)		
Skoro nikdy	1	4,0%	Tlaková bolest	3	12,0%
Výjimečně	4	16,0%	Palčivá bolest	4	16,0%
Občas	11	44,0%	Jiné	2	8,0%
Skoro vždy	3	12,0%	Bez odpovědi	16	64,0%
Vždy	0	0,0%			
Bez odpovědi	6	24,0%			

Vyrážka v místě aplikace (N=66): ANO 0 (0%), NE 66 (100%)
Podkožní uzlíky v místě aplikace (N=66): ANO 3 (4,5%), NE 63 (95,5%)

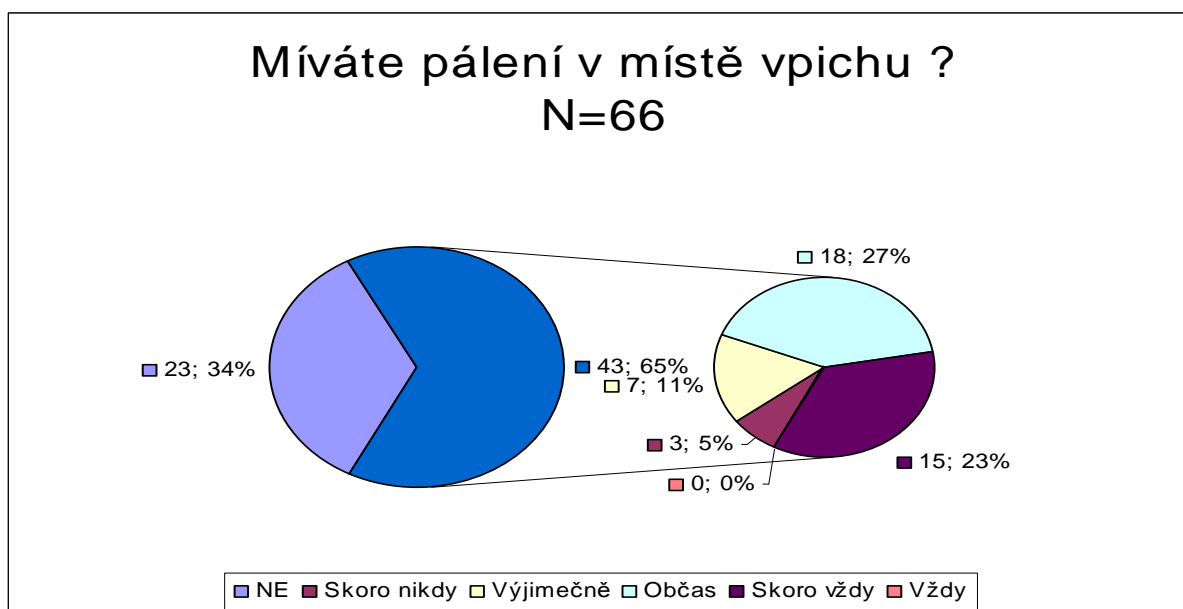
Graf č. 27

Výskyt hematomů v místě vpichu subkutánní injekce enoxaparínu



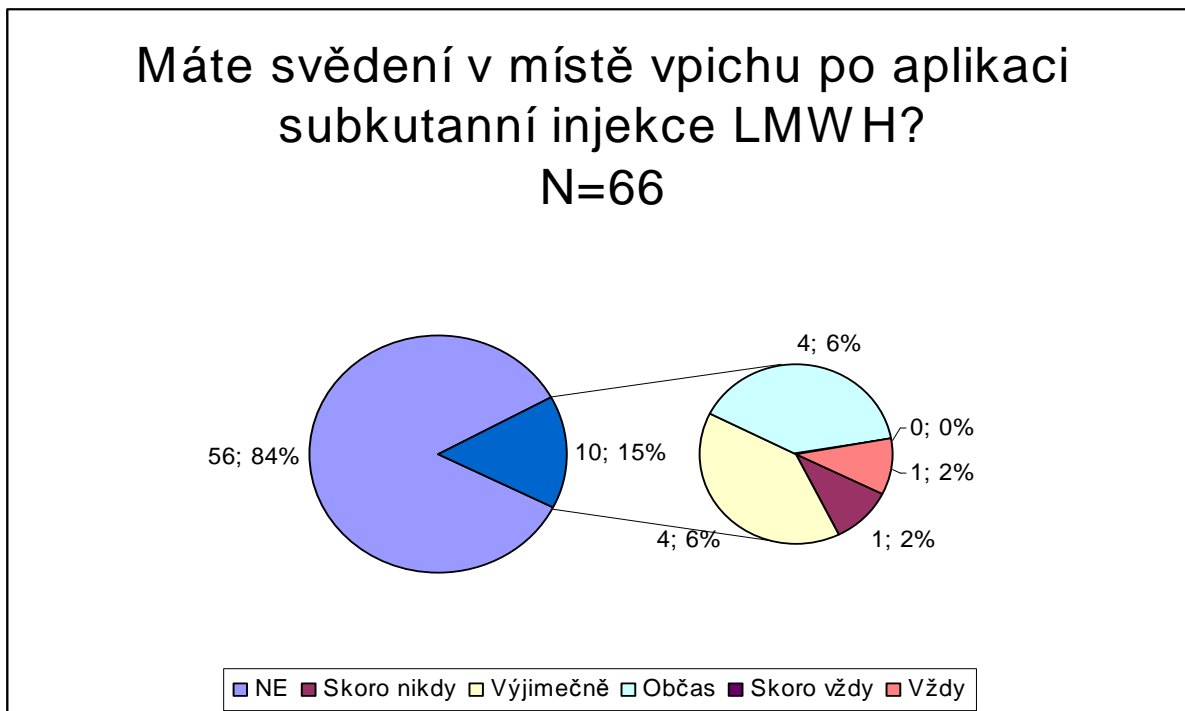
Graf č. 28

Pálení v místě vpichu subkutánní injekce enoxaparínu



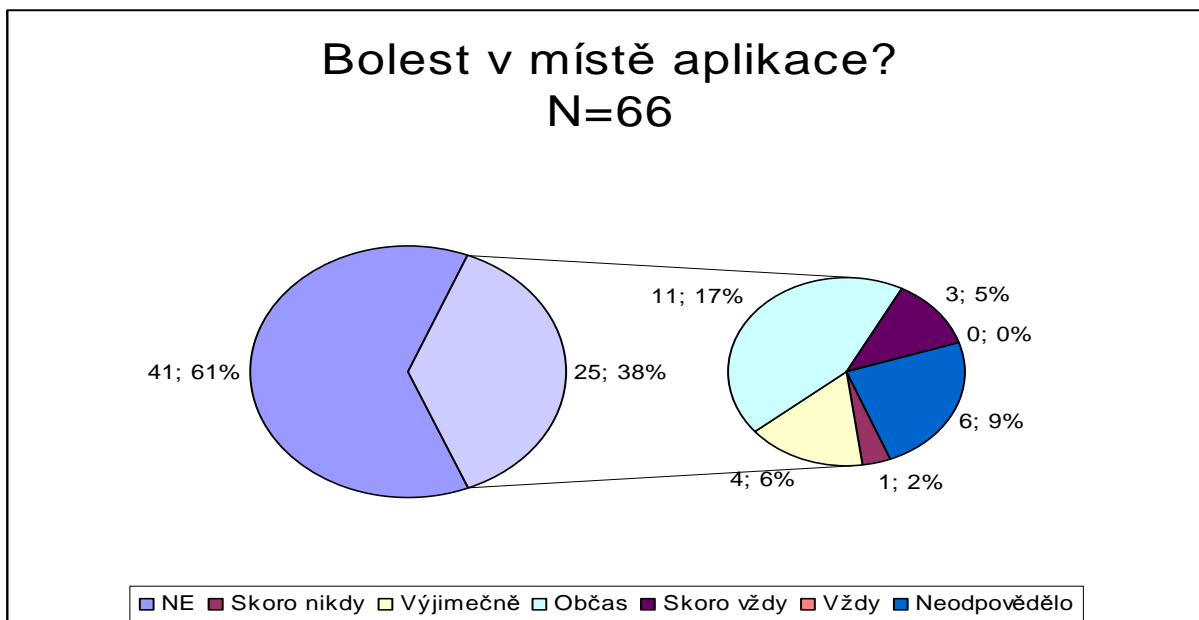
Graf č. 29

Svědění v místě vpichu subkutánní injekce enoxaparinu



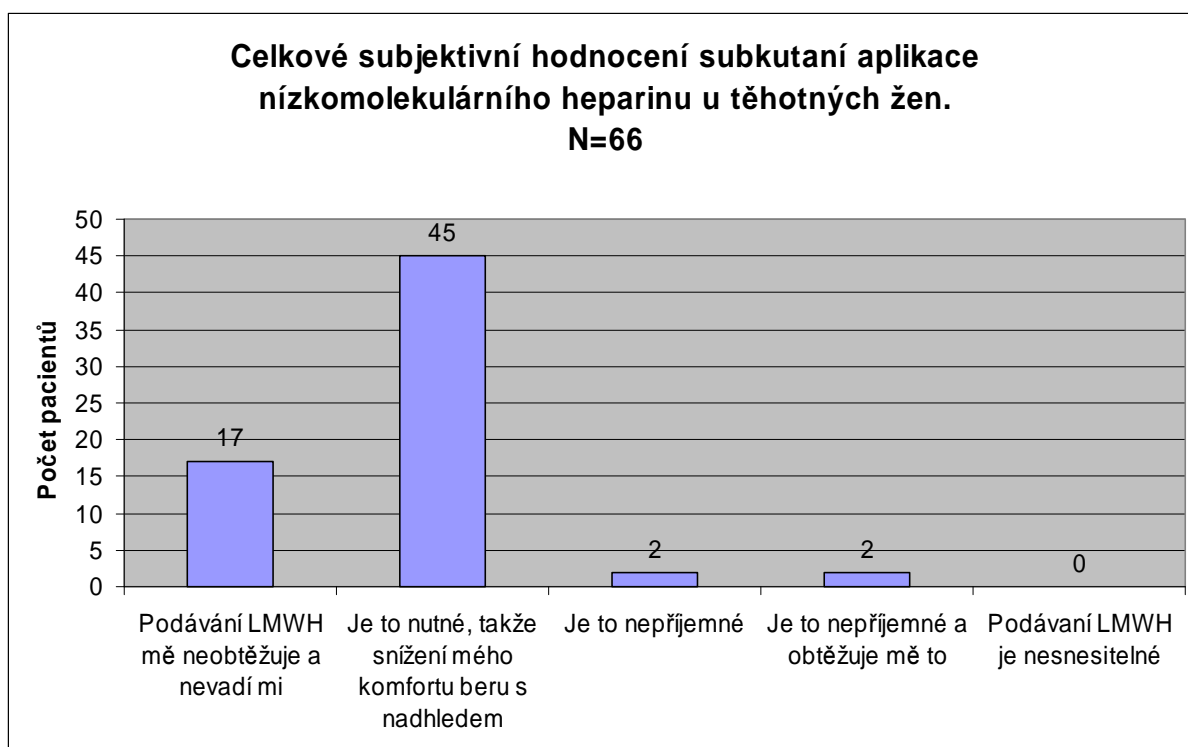
Graf č. 30

Bolest v místě vpichu subkutánní injekce enoxaparinu



Graf č. 31

Celkové subjektivní hodnocení subkutánní injekce enoxaparinu



4.5 ZHODNOCENÍ VLIVU ENOXAPARINU NA MARKERY KOSTNÍ RE-MODELACE

Základní charakteristika pacientek s léčbou a bez léčby nízkomolekulárním heparinem je uvedena v tabulce č. 46. Nebyly zaznamenány žádné závažné nežádoucí účinky při použití enoxaparinu (závažné krvácení, heparinem indukovaná trombocytopenie, osteoporotická fraktura). Výsledky popisné statistiky kostních markerů jsou uvedeny v tabulce č. 47.

Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi skupinami ve věku a tělesné výšce. U žen s enoxaparinem byla naměřena statisticky významně vyšší vstupní hmotnost ($p < 0,05$) v 15. týdnu těhotenství, ale hmotností přírůstek v obou skupinách ve 25. a 35 týdnů těhotenství byl obdobný.

4.5.1 Markery kostní formace

Změny koncentrace markerů kostní formace jsou uvedeny v tabulce č. 47. Koncentrace celkové alkalické fosfatázy se zvyšuje se stoupajícím gestačním stářím (Graf č.32). Statisticky významně stoupá i koncentrace kostní alkalické fosfatázy (Graf č.33). V těchto parametrech, ale nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi ženami s enoxaparinem a bez enoxaparinu (Tab. č.47).

Procentuální koncentrace kostní alkalické fosfatázy (procentuální alkalická fosfatáza (%)) = sérová koncentrace kostní fosfatázy ($\mu\text{kat/l}$) / koncentrace celkové alkalické fosfatázy ($\mu\text{kat/l}$) byla statisticky významně nižší ve skupině s enoxaparinem ($p < 0,05$), než v kontrolní skupině (Graf č.34, Tab.č. 47).

4.5.2 OPG/RANKL systém

Během těhotenství se koncentrace osteoprotegerinu statisticky významně zvyšovala ($P < 0,001$), ale nebyl zjištěn rozdíl v koncentraci osteoprotegerinu mezi ženami s enoxaparinem a bez enoxaparinu (Tab č.47).

Plazmatická koncentrace OPG u žen s enoxaparinem v 15. týdnu těhotenství byla $7,12 \pm 1,99$ pg / ml a nebyla výrazně vyšší než v kontrolní skupině ($6,67 \pm 3,32$ pg / ml, $P > 0,05$). Přestože koncentrace OPG stoupala (Graf č.35), koncentrace RANKL se neměnila ($P > 0,05$) (Graf č.36). Anti FXa aktivita (IU/ml) byla

měřena 4 hodiny po aplikaci 40 mg enoxaparinu. Nebyla zjištěna korelace mezi koncentrací některého kostního markeru a anti FXa ($P > 0,05$).

Tab. 46 Základní charakteristika účastníků studie porovnávající koncentrace markerů kostní přestavby u těhotných žen užívajících enoxaparin a žen bez enoxaparínu.

	Skupina s enoxaparinem			Kontrolní skupina bez enoxaparínu		
Počet	35			15		
Výška, průměr (SD)	167.5 (6.9)			166 (7.7)		
Počet předchozích porodů, průměr (SD)	0.4 (0.7)			0.6 (0.7)		
Doba uplynulá od předchozího porodu (měsíce), průměr (SD)	16.7 (3.8)			32.6 (6.5)		
Celková doba kojení (měsíce), průměr (SD)	0.4 (0.7)			0.6 (0.7)		
Týden těhotenství	15.	25.	35.	15.	25.	35.
Hmotnost, průměr (SD)	66.9 (12.5)	71.9 (11.8)	76.6 (12)	62.5 (11.6)	67.6 (11)	73 (11.4)
BMI index, průměr (SD)	23.9 (4.6)	25.6 (4.4)	27.3 (4.2)	22.7 (3.9)	24.6 (3.8)	26.5 (3.9)
Počet dnů na enoxaparinu, průměr (SD)	0	65 (17)	135(17)	0	0	0
Tromboembolická nemoc v anamnéze, n (%)	13 (37)			0 (0)		
IUGR, porod mrtvého plodu, opakované aborty v anamnéze, n (%)	14 (40)			0 (0)		
Závažná trombofilie* n (%)	31 (88)			11 (73)		
Méně závažná trombofilie** n (%)	16 (46)			8 (53)		
SD, směrodatná odchylka; IUGR, růstová retardace plodu z angl. intrauterine growth restriction; * mutace FV-Leiden, mutace F-II protrombin, deficit antitrombinu, anti-fosfolipidové protilátky; ** mutace MTHFR 677, 1298, PAI 4G/4G						

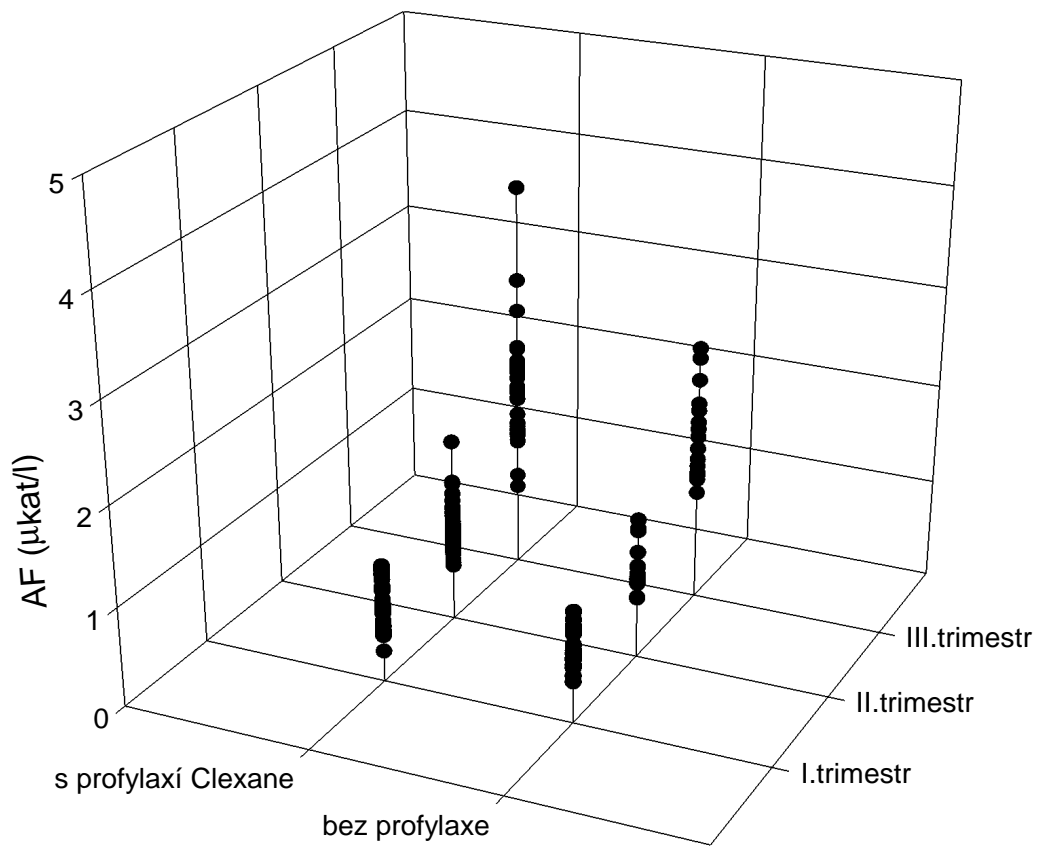
Tab. 47 Markery kostní přestavby u těhotných žen v 15. 25. a 35. gestačním týdnu porovnávací skupinu s enoxaparinem a bez enoxaparínu.

Týden těhotenství	15		25		35		P*	P†
	Skupina s enoxaparinem	Kontrolní skupina	Skupina s enoxaparinem	Kontrolní skupina	Skupina s enoxaparinem	Kontrolní skupina		
Parametr	Průměr (SD)						P*	P†
Celková AF μ kat/l	0.73 (0.21)	0.75 (0.21)	0.97 (0.27)	0.93 (0.24)	1.81 (0.57)	1.72 (0.46)	ns	< 0.001
Kostní AF μ kat/l	0.34 (0.1)	0.4 (0.13)	0.41 (0.16)	0.43 (0.18)	0.55 (0.14)	0.59 (0.21)	ns	< 0.001
Kostní AF %	46.75 (8.54)	52.73 (9.74)	44.01 (7.84)	44.79 (12.67)	31.67 (8.23)	37.16 (10.68)	< 0.05	< 0.001
OPG pg/ml	7.12 (1.99)	6.67 (3.32)	8.52 (2.56)	8.32 (3.61)	10.68 (3.42)	10.62 (4.55)	ns	< 0.001
RANKL pg/ml	42.76 (54.54)	47.82 (59.91)	36.12 (50.14)	37.2 (50.66)	40.37 (62.95)	33.73 (37.26)	ns	ns
RANKL/OPG poměr	5.95 (7.1)	8.9 (14.27)	4.4 (6.26)	4.45 (6.26)	3.72 (5.35)	3.58 (4.22)	ns	< 0,05
* rozdíl průměrných hodnot mezi skupinou s enoxaparinem a bez enoxaparínu (P stanoveno testem ANOVA pro opakovaná měření)								
† rozdíl průměrných hodnot mezi jednotlivými gestačními týdny (P stanoveno testem ANOVA pro opakovaná měření)								
SD (směrodatná odchylka), AF (alkalická fosfatáza), OPG (osteoprotegerin), RANKL (ligand vázající se na receptor, který aktivuje nukleární faktor kappa B)								

Graf č. 32

Porovnání koncentrace celkové alkalické fosfatázy u těhotných žen s profylaxí enoxaparinem a bez léčby v 15., 25. a 35. týdnu gravidity

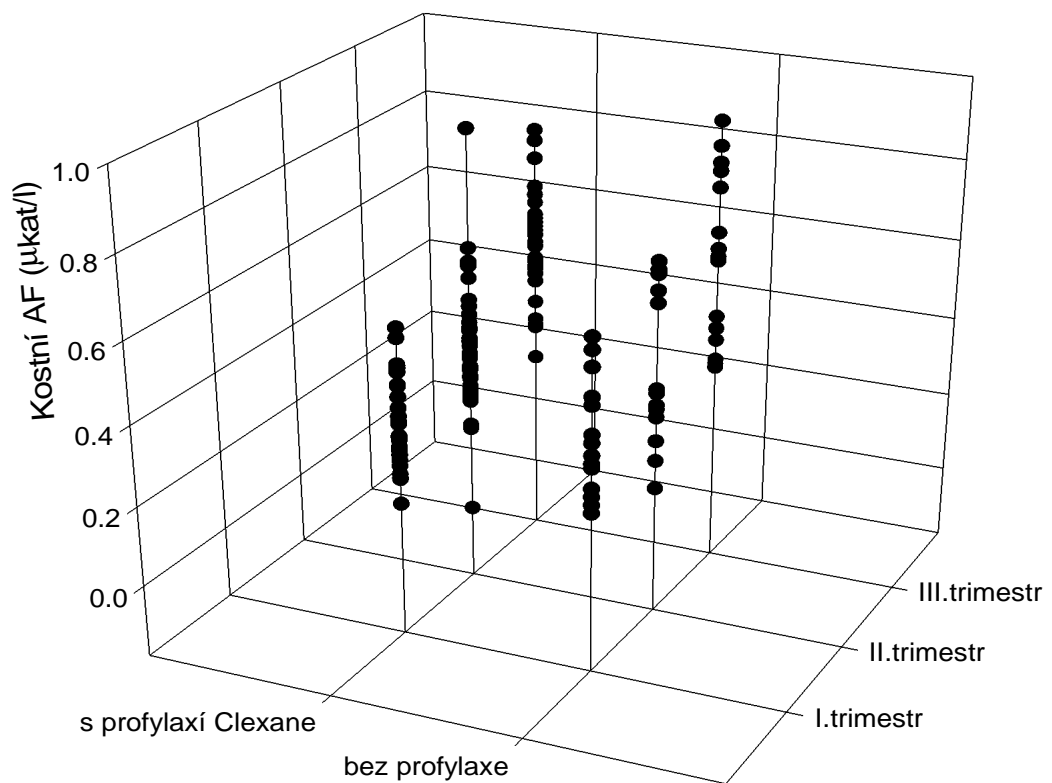
Celková alkalická fosfatáza ($\mu\text{kat/l}$)



Graf č. 33

Porovnání koncentrace kostní alkalické fosfatázy u těhotných žen s profylaxí enoxaparinem a bez léčby v 15., 25. a 35. týdnu gravidity

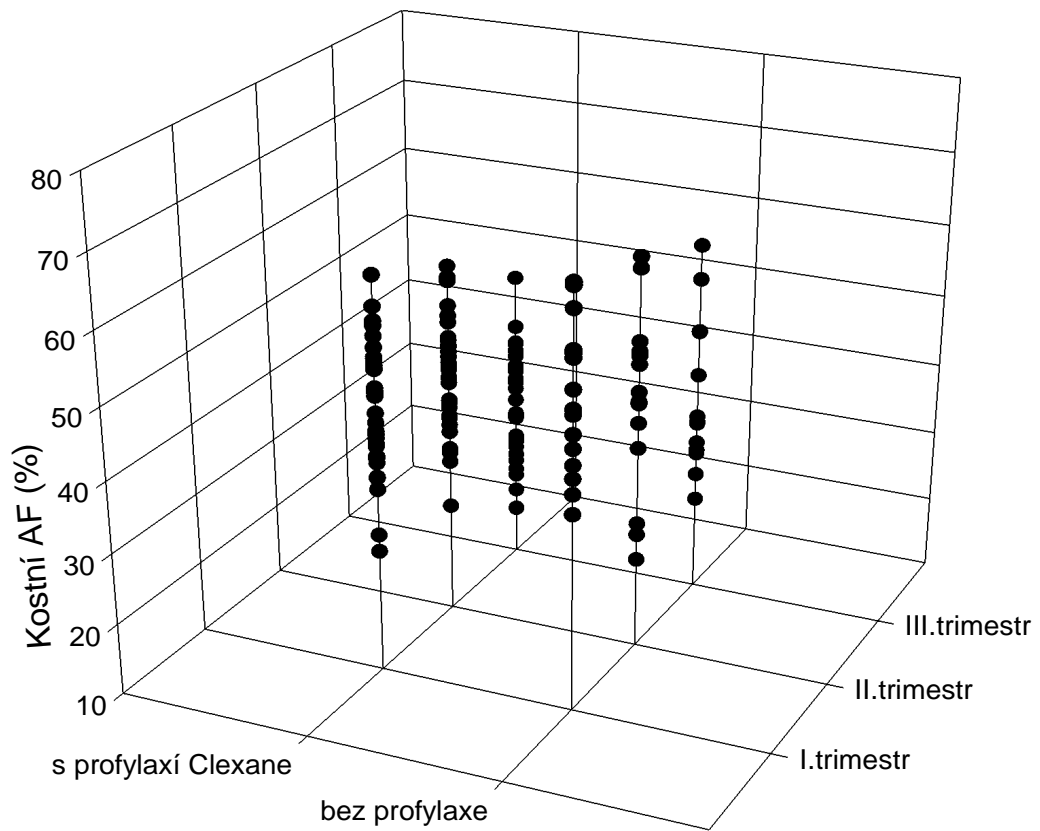
Kostní alkalická fosfatáza ($\mu\text{kat/l}$)



Graf č. 34

Porovnání procentuální koncentrace kostní alkalické fosfatázy u těhotných žen s profylaxí enoxaparinem a bez léčby v 15., 25. a 35. týdnu gravidity

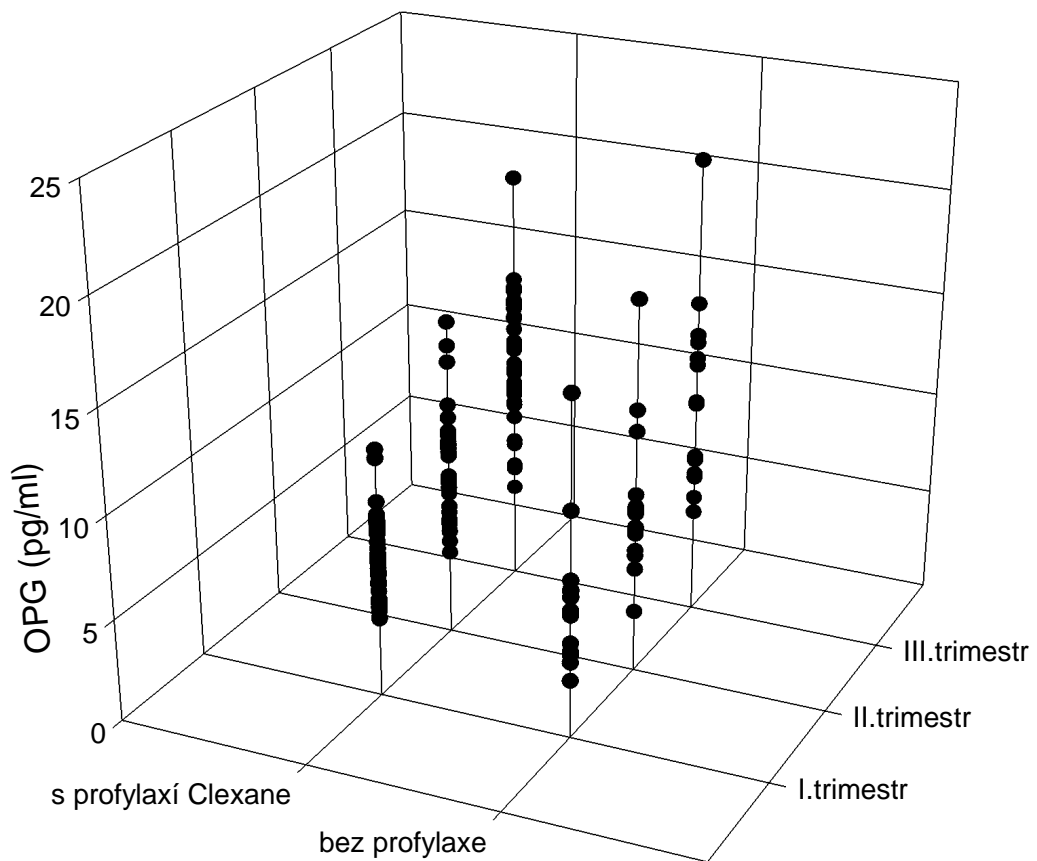
Kostní alkalická fosfatáza (%)



Graf č. 35

Porovnání koncentrace osteoprotegerinu u těhotných žen s profylaxí enoxaparinem a bez léčby v 15., 25. a 35. týdnu gravidity

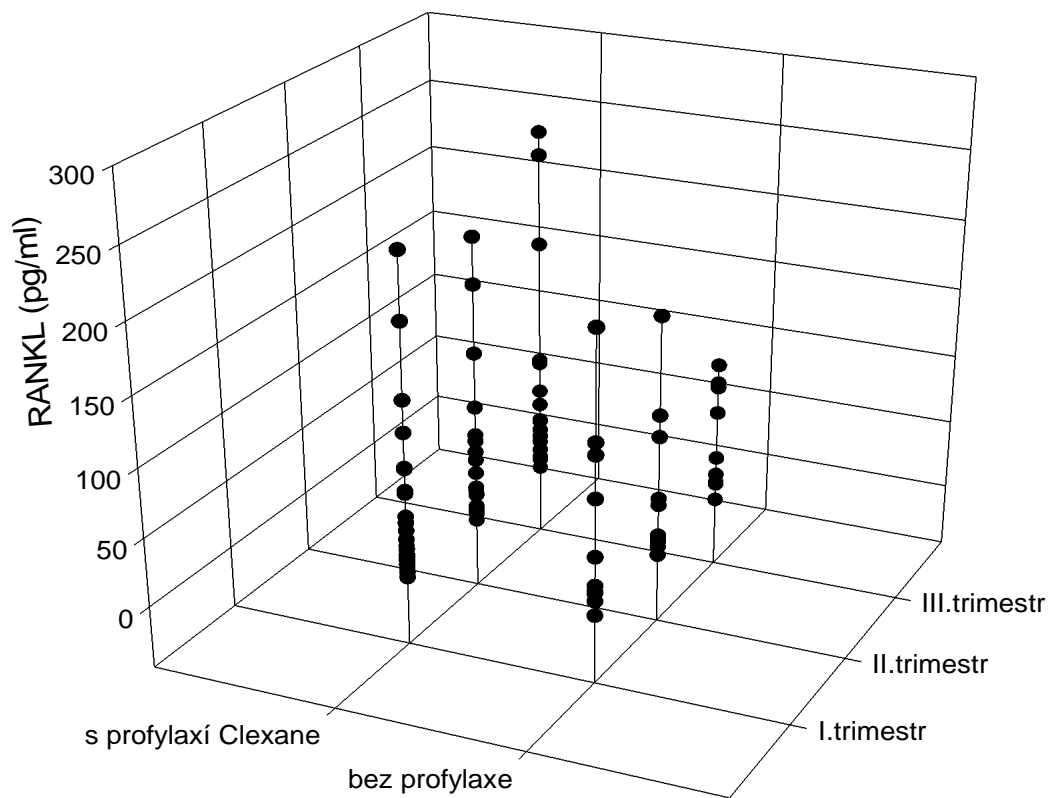
Osteoprotegerin (pg/ml)



Graf č. 36

Porovnání koncentrace RANKL u těhotných žen s profylaxí enoxaparinem a bez léčby v 15., 25. a 35. týdnu gravidity

RANKL (pg/ml)



5 DISKUZE

5.1 DISKUZE K PRVNÍ ČÁSTI DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem první části naší studie bylo sledovat změny některých parametrů krevního obrazu, základních koagulačních parametrů a proteinů akutní fáze u těhotných žen léčených enoxaparinem.

Z výsledků je zřejmé, že v těhotenství dochází k významným změnám ve všech oblastech sledování. V krevním obraze je patrný mírný vzestup počtu leukocytů z průměrné hodnoty $9,39 \pm 1,93$ ($10^9/l$) v 15. týdnu těhotenství na $10,34 \pm 1,93$ ($10^9/l$) ve 35. týdnu. Leukocytóza je způsobena hlavně zvětšováním populace polymorfonukleárních leukocytů. Koncentrace hemoglobinu poklesla o průměrně 7 g/l mezi 15. a 25. týdnem těhotenství. Je to způsobeno fyziologickým nárůstem objemu krevní plazmy. Celkový počet trombocytů mírně klesal po celou dobu gravidity. Vzestup středního objemu trombocytů nasvědčuje kompenzovanému stavu progresivní destrukce destiček. Většina výzkumníků souhlasí s faktem, že nízký stupeň chronické intravaskulární koagulace v rámci uteroplacentární cirkulace je část fyziologické odpovědi organismu na těhotenství (14). Pravidelné sledování počtu trombocytů má v těhotenství velký význam. Trombocytopenie a nadměrná aktivace destiček v těhotenství může být i projevem závažného onemocnění (preeklampsie, HELLP syndrom a dalších, vznikajících i mimo graviditu jako idiopatická trombocytopenická purpura, trombotická trombocytopenická purpura, heparinem indukovaná trombocytopenie), které je třeba spolehlivě vyloučit, zvláště pokud je pokles prudký (99).

Z měřených koagulačních parametrů vyplývá, že v těhotenství dochází k významným změnám koncentrací koagulačních faktorů a inhibitorů koagulace. Těhotenský hyperkoagulační stav je v naší studii demonstrován zvyšováním koncentrace fibrinogenu a faktoru VIII a snižováním koncentrace inhibitoru koagulace proteinu S. Změny jaterní syntézy těchto faktorů jsou indukovány výraznými hormonálními změnami, které v těhotenství probíhají.

A jsou fyziologickým adaptačním mechanismem v těhotenství přípravou na porod (10).

I proteiny akutní fáze vykazují změny v graviditě. V naší studii signifikantně stoupala koncentrace alfa1-antitrypsinu a transferinu a mezi 15. a 25. týdnem signifikantně poklesla koncentrace alfa1-glykoproteinu. Koncentrace prealbuminu, alfa2-makroglobulinu a CRP se neměnila. Koncentrace alfa1-antitrypsinu se zvyšuje pod vlivem estrogenů (100). Tvorba transferinu je v játrech regulovaná především plazmatickými zásobami železa, hyposiderémie je hlavním stimulačním signálem syntézy (101). Zvýšená koncentrace fibrinogenu a alfa1-antitrypsinu (indukovány IL-6) ve zdravých těhotenstvích není projevem infekčního zánětu, ale celkové fyziologické reakce organismu ženy s imunotolerancí plodu (hladinu ovlivňuje i jejich produkce v placentě). Zvýšení CRP a orosomukoidu (indukovány IL-1) např. u gestóz a těhotenských patologií souvisí s rizikem potratu. Proteiny akutní fáze, které jsou indukované cytokiny typu IL-1 jsou v graviditě aktivně potlačovány (102, 103).

5.2 DISKUZE K DRUHÉ ČÁSTI DIZERTAČNÍ PRÁCE

Těhotenství je jedna z mála situací, při které je indikováno dlouhodobé podávání léčebných nebo profylaktických dávek heparinu. Nefrakciniovaný heparin se už v dnešní době téměř nepoužívá. V klinické praxi se dává přednost aplikaci nízkomolekulárních heparinů, které jsou v předpřipravených injekcích. Mají mnohem lépe predikovatelnou dávku, a dále mají méně závažných nežádoucích komplikací (menší riziko heparinem indukované trombocytopenie, závažných krvácení a osteoporózy) (20).

V další části studie jsme se soustředili na měření inhibice aktivovaného faktoru Xa. Získali jsme celkem 204 měřených hodnot od 68 pacientek, vždy v 15. , 25. a 35. týdnu těhotenství. Už v 15. týdnu (n=68) byla u 7 pacientek (10,29%) zjištěna koncentrace anti-FXa nižší než 0,2 IU/ml a dávka se zvýšila na 6000 IU. Ve 25. týdnu (n=61) byla u dalších 6 pacientek (9,83 %) zjištěna koncentrace anti FXa nižší než 0,2 IU/ml a dávka se zvýšila na 6000 IU. Ve 35. týdnu (n=55) byla u dalších 8 pacientek (14,54 %) zjištěna koncentrace anti

FXa nižší než 0,2 IU/ml a dávka se zvýšila na 6000 IU. Takže nakonec se dávka zvyšovala u celkem 21 (30,88%) pacientek z 68. Ani jedna pacientka neprodělala hlubokou žilní trombózu, plicní embolii.

Studie u netěhotných osob vykazují vyšší procento osob ve správném profylaktickém rozmezí (104), (105). Již je známo i několik dalších studií, které potvrzují, že mnoho pacientek léčených LMWH je v graviditě poddávkováno a to nejen ve skupině pacientek s profylaktickou dávkou, ale i ve skupině pacientek s terapeutickou dávkou (65, 68). Což je velmi alarmující, zvláště pokud si uvědomíme, že v graviditě je vyšší riziko plicní embolie, než u netěhotných a rizikové faktory, které tromboembolickou nemoc způsobily (těhotenství, útlak žil v pánevním řečišti, varixy a další) stále přetrvávají. Ve studii (68) (106) bylo prokázáno, že až 76,9% % pacientek s léčebnou dávkou LMWH bylo poddávkových. Faktory, které ovlivňují koncentraci anti FXa u netěhotných jsou hmotnost, snížená renální clearance a vzestup koncentrace, některých plazmatických proteinů (107).

V naší studii jsme také zkoumali souvislost snižující se koncentrace anti FXa s hmotností a BMI indexem pacientky a s koncentrací heparin vázajících proteinů.

BMI negativně koreluje s inhibicí FXa ($p < 0,001$, $r = -0,29$). Podobně i tělesná hmotnost negativně koreluje s inhibicí FXa ($p = 0,0015$; $r = -0,27$).

Některé heparin-vázající proteiny jako například fibrinogen ($p < 0,001$, $r = -0,3$) a nebo alfa1-antitrypsin ($p = 0,023$, $r = -0,15$) negativně korelují s inhibicí FXa. I když byla v těchto parametrech nalezena slabá negativní korelace s inhibicí aktivovaného faktoru Xa, domníváme se na základě některých studií, že velmi významně je koncentrace anti FXa ovlivněna především hodnotou renální clearance (107).

5.3 DISKUZE KE TŘETÍ ČÁSTI DIZERTAČNÍ PRÁCE

Aplikace subkutánních injekcí je mnoha pacientkám nepříjemná a z naší dotazníkové studie vyplývá, že mnoho pacientek má lokální vedlejší účinky v místě vpichu. Nejčastěji se vyskytují hematomy v místě vpichu a pálení

v místě vpichu. Přesto při hodnocení celkového dojmu z podávání enoxaparinu v graviditě pouze 3 % odpověděly, že je aplikace nepříjemná a obtěžuje je.

Při zvažování možnosti nasazení antikoagulační léčby u těhotné ženy musíme vzít v úvahu ještě další dva důležité fakty. Za prvé rozhodnutí o antikoagulační léčbě v těhotenství, může mít důsledky nejen pro zdraví a život matky, ale také na zdraví a život plodu. Za druhé mnoho žen vidí těhotenství spíše jako přirozenou součást běžného života než jako speciální zdravotní stav. Na pozadí těchto úvah, a když započítáme i možné vedlejší účinky, druh a frekvenci podávaných léků a také frekvenci odběrů krve na kontrolu účinnosti léků, vidíme, že rozhodnutí není snadné.

V rozvíjející se strategii prevence tromboembolické nemoci v těhotenství je třeba zvážit rizika užívání heparinu oproti incidenci TEN samotné, zvláště existují-li méně nepříjemné alternativy, jako jsou kompresivní punčochy nebo elastické bandáže (108). Bohužel žádné studie nepopisují přímo vliv těchto prostředků na prevenci TEN v těhotenství, což zabraňuje vzniku definitivních doporučení. Je však nutné si uvědomit, že elastické punčochy mohou zvyšovat riziko vzniku TEN tzv. turniketovým efektem, pokud nemají správnou velikost a nejsou užívány správně (109). A kompresivní punčochy samozřejmě nezabraňují možným těhotenským komplikacím (opakované potraty, intrauterinní růstová retardace plodu, infarkty placenty, preeklampsie, abrupce placenty), které se u žen s trombofilií vyskytují častěji, než ve zdravé populaci. Stanovení optimální strategie prevence tromboembolické nemoci v průběhu těhotenství a šestinedělí vyžaduje ještě další studie, které se budou dále zabývat incidencí tromboembolické nemoci, porovnáváním jednotlivých druhů profylaxe a také porovnáním finančních nákladů.

V závěru je potřeba říci, že prevence a léčba tromboembolické nemoci v těhotenství má svá specifika, které musí zdravotníci respektovat. A i když výzkum v oblasti antitrombotik pokročil, stále nemáme perorální antitrombotika vhodná k užívání v graviditě. Vzhledem k subkutanní aplikaci enoxaparinu sebou jeho užívání přináší řadu drobných nepříjemností, zejména v místě vpichu. I přesto je většinou pacientek jejich užívání akceptovatelné a

snesitelné. A výskyt závažných nežádoucích účinků (jako heparinem indukované trombocytopenie, závažných krvácení, osteoporózy) je nízké (74).

5.4 DISKUZE KE ČTVRTÉ ČÁSTI DIZERTAČNÍ PRÁCE

V další části studie jsme hodnotili markery kostního obratu v těhotenství a porovnávali jsme skupinu žen, které užívaly enoxaparin a kontrolní skupinu zdravých těhotných žen.

Vzhledem k tomu, že k dlouhodobému podávání nízkomolekulárních heparinů dochází v praxi téměř pouze u gravidních žen, tak naprostá většina studií na heparinem- nebo LMWH-indukovanou osteoporozu se provádí v těhotenství (78).

V těhotenství je obecně u všech žen vyšší riziko vzniku osteoporózy, protože rostoucí plod čerpá všechny minerály ze zdrojů matky (110). Markery kostní resorpce a formace vykazují v graviditě fyziologické změny (markery novotvorby klesají i stoupají a markery resorpce stoupají), což svědčí o velkém kostním obratu(111). V naší studii stoupala koncentrace celkové alkalické fosfatázy v každém měření během těhotenství. Nejvíc byl vzestup vyjádřen mezi 25. a 35. týdnem těhotenství. Trojnásobný vzestup celkové alkalické fosfatázy byl způsoben vzestupem placentární a kostní alkalické fosfatázy.

Pozorovali jsme postupný nárůst kostní alkalické fosfatázy (ukat/l) až do 25. týdne v obou skupinách, ale bez statisticky významného rozdílu mezi skupinami s léčbou a bez léčby. Nicméně v procentuální koncentraci kostní alkalické fosfatázy ($\text{kostní AP \%} = \text{kostní AP (ukat/l)} / \text{celková AP (ukat/l)}$) byl nalezen statisticky významný rozdíl. Ve skupině s enoxaparinem byla koncentrace signifikantně nižší než v kontrolní skupině ($P < 0,05$). V souladu s tímto výsledkem je i studie, ve které se zkoumal vliv LMWH na lidské osteoblasty in vitro (59). Lidské osteoblasty byly inkubovány s dalteparinem a byl zjištěn pokles proliferace a snížení syntézy proteinů. Studie analyzovala i expresi některých genů, které charakterizují základní funkce osteoblastů. Metodou RT-PCR byla zjištěna snížená exprese genů pro kostní alkalickou fosfatázu (59).

Jiná studie ukazuje, že enoxaparin, dalteparin a UFH snižují mitochondriální aktivitu, syntézu proteinů a obsah kolagenu typu II v lidských osteoblastech in vitro. Studie používala koncentrace heparinů, které odpovídají terapeutickým nebo vyšším než terapeutickým dávkám(112).

Je známo, že nefrakcionovaný heparin snižuje novotvorbu kostí více než enoxaparin. Ve studii na myších osteoblastech in vitro došli k závěru, že novotvorba kostí je negativně ovlivněna, tím víc, čím větší je molekula heparinu (113).

Ale je také možné, že ženy s enoxaparinem mají lepší prokrvení placenty a vyšší koncentraci placentární alkalické fosfatázy a tím je relativně snížená procentuální koncentrace kostní alkalické fosfatázy u žen s enoxaparinem (114)(115).

Těhotenství je stav s přirozeným vysokým kostním obratem. Stoupající koncentrace markerů kostní resorpce vysvětlují ztrátu trabekulární kosti (116).

Ve studii na myších osteoklastech bylo zjištěno, že pokud jsou po dobu 9 dní vystaveny koncentraci do 0,1 IU/ml UFH , dochází k jejich formaci. Pokud je koncentrace vyšší, dochází ke snížené formaci osteoklastů (58, 117). Nízkomolekulární hepariny (nadroparin, enoxaparin, parnaparin, dalteparin) v této studii snižovaly formaci osteoklastů ve všech zkoumaných koncentracích (1-100 antiXa IU/ml) (117).

Osteoprotegerin je glykoproteinový cytokin, který hraje klíčovou roli v regulaci kostních procesů. Je součástí skupiny cytokinů podobných tumor necrosis faktoru a jeho ligandem je RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor χ B Ligand) (118). Osteoprotegerin je exprimován převážně osteoblasty, ale i jinými tkáněmi. Osteoprotegerin inhibuje osteoklastogenezi tím, že se váže na RANKL a inhibuje jeho funkci. RANKL se parakrinním efektem váže na RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor χ B) na povrchu osteoklastů a tím indukuje zrání a aktivaci osteoklastů (118). Osteoprotegerin obsahuje heparin vázající doménu (95). Mnoho studií ukazuje, že poměr OPG/RANKL je důležitým prediktorem celkové kostní masy (94). Některé studie demonstrují, že glykosamoglykany a hepariny silně interferují s vazbou OPG na RANKL a

mění komplex RANK-RANKL (95). Tím zůstává na membráně velký počet aktivních molekul RANKL a dochází ke stimulaci osteoklastů. Pokud se heparin naváže na OPG, OPG nemůže inhibovat RANKL a ten zvýšeně aktivuje osteoklasty, a to by mohlo být mechanismem heparinem indukované osteoporózy (96).

V naší studii významně stoupala koncentrace osteoprotegerinu v průběhu těhotenství. Ale nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi skupinou s enoxaparinem a bez enoxaparínu. Koncentrace RANKL nevykazovala statisticky významné změny mezi skupinami, ani mezi jednotlivými týdny těhotenství.

Irie a kolektiv prokázal, že heparin inhibuje aktivitu OPG vazbou na tento cytokin a tím stimuluje osteoklastickou resorpci. Přestože s jistotou nevíme, jestli je OPG odpovědný za heparinem indukovanou osteoporózu, ale pravděpodobně hraje tento mechanismus velmi důležitou roli.

Ve studii (96) byla nalezena vyšší vaskulární mobilizace OPG u UFH než LMWH, což značí, že UFH má větší afinitu k OPG. V jiné studii bylo nalezeno vyšší vylučování OPG, když byla použita vyšší dávka UFH. Protože bylo dokázáno, že 0,1 až 1 U/ml heparinu in vitro inhibuje OPG (95), vycházíme z toho, že heparin in vivo může také inhibovat OPG.

Dále je v literatuře i několik studií, které hodnotí pokles kostní denzity u pacientek, které užívaly LMWH dlouhodobě v graviditě(58).

Užívání LMWH vedlo k poklesu kostní denzity u pacientů s LMWH víc, než u pacientů s warfarinem (58). V jiné studii nebyl zjištěn rozdíl mezi skupinami s dalteparinem a kontrolní skupinou bez léčby LMWH. Tyhle výsledky ukazují, že dalteparin nesnižuje kostní denzitu (119). V jiné studii byla incidence významné ztráty kostní denzity (> nebo = 10%) u žen užívajících dalteparin nebo UFH v obou skupinách stejná (2-2,5% pacientek) (87).

Naše studie byla limitována mnoha faktory a je jistě potřeba dalších studií k vysvětlení mechanismu heparinem indukované osteoporózy a zjištění skutečné incidence LMWH-indukované osteoporózy. Limitace studie vyplývají z faktu, že těhotné ženy jsou v podstatě jediná skupina pacientů, kteří užívají LMWH, nebo heparin dlouhodobě. Z etického hlediska není možné měřit kostní

denzitu. Těhotné ženy nelze vystavovat radiaci. Obtížněji se hodnotily změny osteomarkerů vzhledem k fyziologickým změnám osteomarkerů v graviditě.

Dále nebylo možné provést odběr krve a stanovení koncentrace osteomarkerů před graviditou. Z těchto důvodů je obecně velmi málo klinických studií, které se zabývají výzkumem heparinem indukované osteoporózy, jsou většinou na malém počtu pacientů a výsledky jsou často ambivalentní.

Pro stanovení skutečného rizika LMWH indukované osteoporózy jsou potřeba velké klinické studie, kterou budou porovnávat kostní denzitu před a po léčbě a budou srovnávat různé dávky a druhy LMWH a různé pacienty (ne pouze gravidní ženy).

6 ZÁVĚR

K cílům disertace, které byly představeny v kapitole 2 byla postupně získána data, jejichž charakteristiky jsou popsány v kapitole 4.

Podrobnou analýzou sebraných dat se podařilo získat odpovědi na vytyčené cíle disertační práce.

Z první části vyplývá, že těhotenství je hyperkoagulační stav. Dochází k postupné elevaci koagulačních faktorů (fibrinogen, FVIII), ke snížení koncentrace inhibitoru koagulace – proteinu S. Postupně se také zvyšuje koncentrace D-dimerů, což svědčí o aktivaci koagulačních mechanismů a zvýšené fibrinolýze. I proteiny akutní fáze vykazují změny v graviditě. V naší studii signifikantně stoupala koncentrace alfa1-antitrypsinu a transferinu a mezi 15. a 25. týdnem signifikantně poklesla koncentrace alfa1-glykoproteinu. Vzestup koncentrace těchto proteinů akutní fáze není projevem zánětu, ale fyziologické reakce organismu na těhotenství.

V druhé části studie se prokázalo, že monitorování inhibice FXa u gravidních žen s nízkomolekulárním heparinem by mělo být standardním postupem. A na základě zjištěných hodnot, by se měla dávka LMWH dále upravovat.

Prokázali jsme, že průměrná koncentrace inhibice FXa se stoupajícím týdnem těhotenství klesá. A že už v 15. týdnu (N=68) byla u 10,29 % zjištěna koncentrace anti FXa nižší než 0,2 IU/ml a že tyto pacientky byly poddávkové, i když užívaly doporučenou dávku enoxaparinu. U těchto pacientek se dávka zvyšovala. Ve 25. týdnu (N=61) byla u 9,83 % a ve 35. týdnu (N=55) byla u 14,54 % zjištěna koncentrace anti FXa nižší než 0,2 IU/ml. Takže nakonec se dávka zvyšovala u celkem 21 (30,88%) pacientek z 68. Dále jsme prokázali, že BMI, hmotnost i koncentrace některých heparin-vázajících proteinů (fibrinogen, alfa1 -antitrypsin) negativně korelují s inhibicí FXa. Významnost změn těchto faktorů v těhotenství jenom podporuje vhodnost pravidelné monitorace účinnosti antikoagulační léčby nízkomolekulárními hepariny v těhotenství.

Třetím cílem bylo zhodnotit vedlejší účinky enoxaparinu v místě vpichu subkutánní injekce pomocí dotazníků. 78,8% pacientek mělo drobné hematomy

v místě aplikace. Častým nepříjemným vedlejším účinkem bylo také pálení v místě aplikace 65,2 %. Další lokální vedlejší účinky (svědění, bolest, tuhé podkožní uzlíky) byly méně časté. Žádná z pacientek neměla závažné krvácení po dobu léčby enoxaparinem.

Cílem čtvrté části disertační práce bylo porovnání vlivu enoxaparínu na markery kostního metabolismu. V naší studii statisticky významně stoupala koncentrace osteoprotegerinu v průběhu těhotenství, ale nebyl zjištěn rozdíl mezi skupinami s léčbou nízkomolekulárním heparinem a bez léčby. Studie ukázala pokles procentuální kostní alkalické fosfatázy, jako hypoteticky možnou příčinu heparinem indukované osteoporózy. Jsou ovšem nutné další studie ke zjištění patofyziologického mechanismu heparinem indukované osteoporózy.

7 LITERATURA

K citaci použitých dokumentů byla použita norma ČSN ISO 690.

1. KOONIN, L.M., et al. Pregnancy-Related Mortality Surveillance--United States, 1987-1990. *MMWR.CDC Surveillance Summaries : Morbidity and Mortality Report.CDC Surveillance Summaries / Centers for Disease Control*. 1997, vol. 46, no. 4, s. 17-36. ISSN 0892-3787.
2. SRP, B. and VELEBIL, P. Proportion of Caesarean Sections and Main Causes of Maternal Mortality during 1978-1997 in the Czech Republic. *Ceska Gynekologie*. 1999, vol. 64, no. 4, s. 219-223. ISSN 1210-7832.
3. SIMPSON, E.L., LAWRENSEN, R.A., NIGHTINGALE, A.L. and FARMER, R.D. Venous Thromboembolism in Pregnancy and the Puerperium: Incidence and Additional Risk Factors from a London Perinatal Database. *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2001, vol. 108, no. 1, s. 56-60. ISSN 1470-0328.
4. HEIT, J.A., et al. Trends in the Incidence of Venous Thromboembolism during Pregnancy Or Postpartum: A 30-Year Population-Based Study. *Annals of Internal Medicine*. 2005, vol. 143, no. 10, s. 697-706. ISSN 1539-3704.
5. GREER, I.A. Thrombosis in Pregnancy: Maternal and Fetal Issues. *Lancet*. 1999, vol. 353, no. 9160, s. 1258-1265. ISSN 0140-6736.
6. POMP, E.R., LENSELINK, A.M., ROSENDAAL, F.R. and DOGGEN, C.J. Pregnancy, the Postpartum Period and Prothrombotic Defects: Risk of Venous Thrombosis in the MEGA Study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008, vol. 6, no. 4, s. 632-637. ISSN 1538-7836.
7. BATES, S.M., GREER, I.A., HIRSH, J. and GINSBERG, J.S. Use of Antithrombotic Agents during Pregnancy: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004, vol. 126, no. 3 Suppl, s. 627S-644S. ISSN 0012-3692.
8. MCCOLL, M.D., et al. Risk Factors for Pregnancy Associated Venous Thromboembolism. *Thrombosis and Haemostasis*. 1997, vol. 78, no. 4, s. 1183-1188 ISSN 0340-6245.

9. DUHL, A.J., et al. Antithrombotic Therapy and Pregnancy: Consensus Report and Recommendations for Prevention and Treatment of Venous Thromboembolism and Adverse Pregnancy Outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2007, vol. 197, no. 5, s. 457. ISSN 1097-6868.
10. FRANCHINI, M. Haemostasis and Pregnancy. *Thrombosis and Haemostasis*. 2006, vol. 95, no. 3, s. 401-413. ISSN 0340-6245.
11. CLARK, P., et al. Activated Protein C Sensitivity, Protein C, Protein S and Coagulation in Normal Pregnancy. *Thrombosis and Haemostasis*. 1998, vol. 79, no. 6, s. 1166-1170. ISSN 0340-6245.
12. WU, M.Y., et al. Increase in the Production of Interleukin-10 Early After Implantation is Related to the Success of Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2001, vol. 46, no. 6, s. 386-392. ISSN 1046-7408.
13. KHAJURIA, A. and HOUSTON, D.S. Induction of Monocyte Tissue Factor Expression by Homocysteine: A Possible Mechanism for Thrombosis. *Blood*. 2000, vol. 96, no. 3, s. 966-972. ISSN 0006-4971.
14. BREMME, K., et al. Enhanced Thrombin Generation and Fibrinolytic Activity in Normal Pregnancy and the Puerperium. *Obstetrics and Gynecology*. 1992, vol. 80, no. 1, s. 132-137. ISSN 0029-7844.
15. HOLMES, V.A. and WALLACE, J.M. Haemostasis in Normal Pregnancy: A Balancing Act?. *Biochemical Society Transactions*. 2005, vol. 33, no. Pt 2., s. 428-432. ISSN 0300-5127.
16. MASUDA, J., et al. Levels of Annexin IV and V in the Plasma of Pregnant and Postpartum Women. *Thrombosis and Haemostasis*. 2004, vol. 91, no. 6, s. 1129-1136. ISSN 0340-6245.
17. BELLART, J., et al. Fibrinolysis Changes in Normal Pregnancy. *Journal of Perinatal Medicine*. 1997, vol. 25, no. 4, s. 368-372. ISSN 0300-5577.
18. FAY, R.A., HUGHES, A.O. and FARRON, N.T. Platelets in Pregnancy: Hyperdestruction in Pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*. 1983, vol. 61, no. 2, s. 238-240. ISSN 0029-7844.
19. KVASNICKA, J., et al. Changes in Levels of Cell Adhesion Molecules, Acute Phase Proteins, Lipids and Hemostasis in Relation to Levels of Endoge-

- nous Estrogens during Pregnancy and After Ovariectomy]. *Ceska Gynekologie*. 1997, vol. 62, no. 6, s. 332-337. ISSN 1210-7832.
20. BATES, S.M., et al. Venous Thromboembolism, Thrombophilia, Antithrombotic Therapy, and Pregnancy: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008, vol. 133, no. 6 Suppl., s. 844S-886S. ISSN 0012-3692.
21. FRIEDLINE, J.A., et al. Combined Factor V Leiden and Prothrombin Genotyping in Patients Presenting with Thromboembolic Episodes. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2001, vol. 125, no. 1, s. 105-111. ISSN 0003-9985.
22. JACOBSEN, A.F., SKJELDESTAD, F.E. and SANDSET, P.M. Ante- and Postnatal Risk Factors of Venous Thrombosis: A Hospital-Based Case-Control Study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008, vol. 6, no. 6, s. 905-912. ISSN 1538-7836.
23. GERHARDT, A., et al. Prothrombin and Factor V Mutations in Women with a History of Thrombosis during Pregnancy and the Puerperium. *The New England Journal of Medicine*. 2000, vol. 342, no. 6, s. 374-380. ISSN 0028-4793.
24. MARTINELLI, I., et al. Risk of Pregnancy-Related Venous Thrombosis in Carriers of Severe Inherited Thrombophilia. *Thrombosis and Haemostasis*. 2001, vol. 86, no. 3, s. 800-803. ISSN 0340-6245.
25. GREER, JP., FOERSTER, J., RODGERS, GM., PARASKEVAS, F., GLADER, B., ARBER, DA., MEANS, RT. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Twelfth ed. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health\Lippincott Williams and Wilkins, 2009 ISBN 13:978-0-7817-6507-7.
26. PATNAIK, M.M. and MOLL, S. Inherited Antithrombin Deficiency: A Review. *Haemophilia : The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*. 2008, vol. 14, no. 6, s. 1229-1239. ISSN 1365-2516.
27. LIJFERING, W.M., et al. Selective Testing for Thrombophilia in Patients with First Venous Thrombosis: Results from a Retrospective Family Cohort Study on Absolute Thrombotic Risk for Currently Known Thrombophilic De-

fects in 2479 Relatives. *Blood*. 2009, vol. 113, no. 21, s. 5314-5322. ISSN 1528-0020.

28. VINAZZER, H. Hereditary and Acquired Antithrombin Deficiency. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 1999, vol. 25, no. 3, s. 257-263. ISSN 0094-6176.

29. BROEKMANS, A.W., VELTKAMP, J.J. and BERTINA, R.M. Congenital Protein C Deficiency and Venous Thromboembolism. A Study of Three Dutch Families. *The New England Journal of Medicine*. 1983, vol. 309, no. 6, s. 340-344. ISSN 0028-4793.

30. GOLDENBERG, N.A. and MANCO-JOHNSON, M.J. Protein C Deficiency. *Haemophilia : The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*. 2008, vol. 14, no. 6, s. 1214-1221. ISSN 1365-2516.

31. ENGESSER, L., et al. Hereditary Protein S Deficiency: Clinical Manifestations. *Annals of Internal Medicine*. 1987, vol. 106, no. 5, s. 677-682. ISSN 0003-4819.

32. KODAIRA, H., et al. Resistance to Activated Protein C and Arg 506 Gln Factor V Mutation are Uncommon in Eastern Asian Populations. *Acta Haematologica*. 1997, vol. 98, no. 1, s. 22-25. ISSN 0001-5792.

33. DEN HEIJER, M., et al. Is Hyperhomocysteinaemia a Risk Factor for Recurrent Venous Thrombosis?. *Lancet*. 1995, vol. 345, no. 8954. pp. 882-885. ISSN 0140-6736.

34. O'DONNELL, J., MUMFORD, A.D., MANNING, R.A. and LAFFAN, M. Elevation of FVIII: C in Venous Thromboembolism is Persistent and Independent of the Acute Phase Response. *Thrombosis and Haemostasis*. 2000, vol. 83, no. 1, s. 10-13. ISSN 0340-6245.

35. BRENNER, B. Inherited Thrombophilia and Pregnancy Loss. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. 2003, vol. 16, no. 2., s. 311-320. ISSN 1521-6926.

36. FINAN, R.R., et al. Prevalence of Factor V G1691A (Factor V-Leiden) and Prothrombin G20210A Gene Mutations in a Recurrent Miscarriage Population. *American Journal of Hematology*. 2002, vol. 71, no. 4, s. 300-305. ISSN 0361-8609.

37. YOUNIS, J.S., et al. The Effect of Thrombophilia on Pregnancy Outcome in Patients with Recurrent Pregnancy Loss Associated with Factor V Leiden Mutation. *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2000, vol. 107, no. 3, s. 415-419. ISSN 1470-0328.
38. SANSON, B.J., et al. The Risk of Abortion and Stillbirth in Antithrombin-, Protein C-, and Protein S-Deficient Women. *Thrombosis and Haemostasis*. 1996, vol. 75, no. 3, s. 387-388. ISSN 0340-6245.
39. ROBERTSON, L., et al. Thrombophilia in Pregnancy: A Systematic Review. *British Journal of Haematology*. 2006, vol. 132, no. 2, s. 171-196. ISSN 0007-1048.
40. DIZON-TOWNSON, D., et al. The Relationship of the Factor V Leiden Mutation and Pregnancy Outcomes for Mother and Fetus. *Obstetrics and Gynecology*. 2005, vol. 106, no. 3, s. 517-524. ISSN 0029-7844.
41. LINDQVIST, P.G., SVENSSON, P. and DAHLBACK, B. Activated Protein C Resistance -- in the Absence of Factor V Leiden -- and Pregnancy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006, vol. 4, no. 2, s. 361-366. ISSN 1538-7933.
42. RODGER, M.A., et al. The Association of Factor V Leiden and Prothrombin Gene Mutation and Placenta-Mediated Pregnancy Complications: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *PLoS Medicine*. 2010, vol. 7, no. 6, s. e1000292. ISSN 1549-1676.
43. KUJOVICH, J.L. Thrombophilia and Pregnancy Complications. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004, vol. 191, no. 2, s. 412-424. ISSN 0002-9378.
44. INFANTE-RIVARD, C., et al. Absence of Association of Thrombophilia Polymorphisms with Intrauterine Growth Restriction. *The New England Journal of Medicine*. 2002, vol. 347, no. 1, s. 19-25. ISSN 1533-4406.
45. NELSON, S.M. and GREER, I.A. The Potential Role of Heparin in Assisted Conception. *Human Reproduction Update*. 2008, vol. 14, no. 6, s. 623-645. ISSN 1460-2369.
46. KUJOVICH, J.L. Thrombophilia and Pregnancy Complications. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004, vol. 191, no. 2, s. 412-424. ISSN 0002-9378.

47. CHAN, W.S., ANAND, S. and GINSBERG, J.S. Anticoagulation of Pregnant Women with Mechanical Heart Valves: A Systematic Review of the Literature. *Archives of Internal Medicine*. 2000, vol. 160, no. 2, s. 191-196. ISSN 0003-9926.
48. KOEBERT, M.K., HAUN, J.M. and PAULI, R.M. Temporal Evolution of Risk Estimates for Presumed Human Teratogens. *Reproductive Toxicology*. 1993, vol. 7, no. 4, s. 343-348. ISSN 0890-6238.
49. SCHAEFER, C., et al. Vitamin K Antagonists and Pregnancy Outcome. A Multi-Centre Prospective Study. *Thrombosis and Haemostasis*. 2006, vol. 95, no. 6, s. 949-957. ISSN 0340-6245.
50. COOMARASAMY, A., et al. Aspirin for Prevention of Preeclampsia in Women with Historical Risk Factors: A Systematic Review. *Obstetrics and Gynecology*. 2003, vol. 101, no. 6, s. 1319-1332. ISSN 0029-7844.
51. KOZER, E., et al. Aspirin Consumption during the First Trimester of Pregnancy and Congenital Anomalies: A Meta-Analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2002, vol. 187, no. 6, s. 1623-1630. ISSN 0002-9378.
52. GREINACHER, A., ECKHARDT, T., MUSSMANN, J. and MUELLER-ECKHARDT, C. Pregnancy Complicated by Heparin Associated Thrombocytopenia: Management by a Prospectively in Vitro Selected Heparinoid. *Thrombosis Research*. 1993, vol. 71, no. 2, s. 123-126. ISSN 0049-3848.
53. HIRSH, J., et al. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin: Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety. *Chest*. 2001, vol. 119, no. 1 Suppl, s. 64S-94S. ISSN 0012-3692.
54. GINSBERG, J.S. and BATES, S.M. Management of Venous Thromboembolism during Pregnancy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003, vol. 1, no. 7, s. 1435-42. ISSN 1538-7933.
55. ANDERSON, F.A., Jr, et al. A Population-Based Perspective of the Hospital Incidence and Case-Fatality Rates of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism. the Worcester DVT Study. *Archives of Internal Medicine*. 1991, vol. 151, no. 5, s. 933-938. ISSN 0003-9926.
56. WARKENTIN, T.E. HIT Paradigms and Paradoxes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011, vol. 9 Suppl 1, s. 105-117. ISSN 1538-7836.

57. DE VALK, H.W., et al. Comparing Subcutaneous Danaparoid with Intravenous Unfractionated Heparin for the Treatment of Venous Thromboembolism. A Randomized Controlled Trial. *Annals of Internal Medicine*. 1995, vol. 123, no. 1, s. 1-9. ISSN 0003-4819.
58. WAWRZYNSKA, L., et al. Changes in Bone Density during Long-Term Administration of Low-Molecular-Weight Heparins Or Acenocoumarol for Secondary Prophylaxis of Venous Thromboembolism. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2003, vol. 33, no. 2, s. 64-7. ISSN 1424-8832.
59. HANDSCHIN, A.E., et al. Effect of Low Molecular Weight Heparin (Dalteparin) and Fondaparinux (Arixtra) on Human Osteoblasts in Vitro. *British Journal of Surgery*. 2005, vol. 92, no. 2, s. 177-83. ISSN 0007-1323.
60. GRIFFITH, G.C., G., N., Jr, ASHER, J.D. and FLANAGAN, B. Heparin Osteoporosis. *Jama*. 1965, vol. 193, s. 91-4. ISSN 0098-7484.
61. MONREAL, M., et al. Heparin-Related Osteoporosis in Rats. A Comparative Study between Unfractionated Heparin and a Low-Molecular-Weight Heparin. *Haemostasis*. 1990, vol. 20, no. 4, s. 204-207. ISSN 0301-0147.
62. HORLOCKER, T.T. and HEIT, J.A. Low Molecular Weight Heparin: Biochemistry, Pharmacology, Perioperative Prophylaxis Regimens, and Guidelines for Regional Anesthetic Management. *Anesthesia and Analgesia*. 1997, vol. 85, no. 4, s. 874-885. ISSN 0003-2999.
63. SHAFIQ, N., et al. A Randomized Controlled Clinical Trial to Evaluate the Efficacy, Safety, Cost-Effectiveness and Effect on PAI-1 Levels of the Three Low-Molecular-Weight Heparins--Enoxaparin, Nadroparin and Dalteparin. the ESCAPE-END Study. *Pharmacology*. 2006, vol. 78, no. 3, s. 136-143. ISSN 0031-7012.
64. HANSEN, J.B. and SANDSET, P.M. Differential Effects of Low Molecular Weight Heparin and Unfractionated Heparin on Circulating Levels of Antithrombin and Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI): A Possible Mechanism for Difference in Therapeutic Efficacy. *Thrombosis Research*. 1998, vol. 91, no. 4, s. 177-181. ISSN 0049-3848.

65. SEPHTON, V., et al. A Longitudinal Study of Maternal Dose Response to Low Molecular Weight Heparin in Pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*. 2003, vol. 101, no. 6, s. 1307-1311. ISSN 0029-7844.
66. SANDERINK, G.J., et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Prophylactic Dose of Enoxaparin Once Daily Over 4 Days in Patients with Renal Impairment. *Thrombosis Research*. 2002, vol. 105, no. 3, s. 225-231. ISSN 0049-3848.
67. SAMAMA, M.M., BARA, L. and GEROTZIAFAS, G.T. Mechanisms for the Antithrombotic Activity in Man of Low Molecular Weight Heparins (LMWHs). *Haemostasis*. 1994, vol. 24, no. 2, s. 105-117. ISSN 0301-0147.
68. FOX, N.S., et al. Anti-Factor Xa Plasma Levels in Pregnant Women Receiving Low Molecular Weight Heparin Thromboprophylaxis. *Obstetrics and Gynecology*. 2008, vol. 112, no. 4, s. 884-889. ISSN 0029-7844.
69. LEPERCQ, J., et al. Venous Thromboembolism during Pregnancy: A Retrospective Study of Enoxaparin Safety in 624 Pregnancies. *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2001, vol. 108, no. 11, s. 1134-1140. ISSN 1470-0328.
70. GYAMFI, C., COHEN, R., DESANCHO, M.T. and GADDIPATI, S. Prophylactic Dosing Adjustment in Pregnancy Based upon Measurements of Anti-Factor Xa Levels. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2005, vol. 18, no. 5, s. 329-331. ISSN 1476-7058.
71. DI SIMONE, N., et al. Low-Molecular Weight Heparin Induces in Vitro Trophoblast Invasiveness: Role of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors. *Placenta*. 2007, vol. 28, no. 4, s. 298-304. ISSN 0143-4004.
72. DI SIMONE, N., et al. Low-Molecular Weight Heparin Restores in-Vitro Trophoblast Invasiveness and Differentiation in Presence of Immunoglobulin G Fractions obtained from Patients with Antiphospholipid Syndrome. *Human Reproduction*. 1999, vol. 14, no. 2, s. 489-495. ISSN 0268-1161.
73. LEE, A.Y., et al. Low-Molecular-Weight Heparin Versus a Coumarin for the Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism in Patients with Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2003, vol. 349, no. 2, s. 146-153. ISSN 1533-4406.

74. BATES, S.M., GREER, I.A., HIRSH, J. and GINSBERG, J.S. Use of Antithrombotic Agents during Pregnancy: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, Sep, 2004, vol. 126, no. 3 Suppl, s. 627S-644S. ISSN 0012-3692.
75. KRALOVA, S., et al. Heparin Induced Thrombocytopenia. *Vnitřní Lékarství*. 2006, vol. 52 Suppl 1, s. 98-106. ISSN 0042-773X.
76. BARBOUR, L.A., et al. A Prospective Study of Heparin-Induced Osteoporosis in Pregnancy using Bone Densitometry. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1994, vol. 170, no. 3, s. 862-869. ISSN 0002-9378.
77. DAHLMAN, T.C., SJOBERG, H.E. and RINGERTZ, H. Bone Mineral Density during Long-Term Prophylaxis with Heparin in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1994, vol. 170, no. 5, s. 1315-20. ISSN 0002-9378.
78. LEFKOU, E., KHAMASHTA, M., HAMPSON, G. and HUNT, B.J. Low-Molecular-Weight Heparin-Induced Osteoporosis and Osteoporotic Fractures: A Myth Or an Existing Entity? *Lupus*. 2010, vol. 19, no. 1, s. 3-12. ISSN 1477-0962.
79. BLAKE, G.M. and FOGELMAN, I. The Clinical Role of Dual Energy X-Ray Absorptiometry. *European Journal of Radiology*. 2009, vol. 71, no. 3, s. 406-414. ISSN 1872-7727.
80. HUNT, B.J., et al. Thromboprophylaxis with Low Molecular Weight Heparin (Fragmin) in High Risk Pregnancies. *Thrombosis and Haemostasis*. 1997, vol. 77, no. 1, s. 39-43. ISSN 0340-6245.
81. BYRD, L.M., SHIACH, C.R., HAY, C.R. and JOHNSTON, T.A. Osteopenic Fractures in Pregnancy: Is Low Molecular Weight Heparin (LMWH) Implicated?. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2008, vol. 28, no. 5, s. 539-542. ISSN 1364-6893.
82. GOEB, V., et al. Post-Partum Sacral Fracture Associated with Heparin Treatment. *Clinical Rheumatology*. 2008, vol. 27 Suppl 2, s. S51-3. ISSN 1434-9949.
83. BREUIL, V., BROCCQ, O., EULLER-ZIEGLER, L. and GRIMAUD, A. Insufficiency Fracture of the Sacrum Revealing a Pregnancy Associated Osteoporo-

sis. First Case Report. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1997, vol. 56, no. 4, s. 278-279. ISSN 0003-4967.

84. SIVAKUMARAN, M., GHOSH, K., ZAIDI, Y. and HUTCHINSON, R.M. Osteoporosis and Vertebral Collapse Following Low-Dose, Low Molecular Weight Heparin Therapy in a Young Patient. *Clinical and Laboratory Haematology*. 1996, vol. 18, no. 1, s. 55-57. ISSN 0141-9854.

85. GREER, I.A. and NELSON-PIERCY, C. Low-Molecular-Weight Heparins for Thromboprophylaxis and Treatment of Venous Thromboembolism in Pregnancy: A Systematic Review of Safety and Efficacy. *Blood*. 2005, vol. 106, no. 2, s. 401-407. ISSN 0006-4971.

86. ENSOM, M.H. and STEPHENSON, M.D. Low-Molecular-Weight Heparins in Pregnancy. *Pharmacotherapy*. 1999, vol. 19, no. 9, s. 1013-1025. ISSN 0277-0008.

87. CASELE, H., et al. Bone Density Changes in Women Who Receive Thromboprophylaxis in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2006, vol. 195, no. 4, s. 1109-13. ISSN 1097-6868.

88. PETTILA, V., et al. Postpartum Bone Mineral Density in Women Treated for Thromboprophylaxis with Unfractionated Heparin or LMW Heparin. *Thrombosis and Haemostasis*. 2002, vol. 87, no. 2, s. 182-186. ISSN 0340-6245.

89. LEPERCQ, J., et al. Venous Thromboembolism during Pregnancy: A Retrospective Study of Enoxaparin Safety in 624 Pregnancies. *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2001, vol. 108, no. 11, s. 1134-1140. ISSN 1470-0328.

90. CASELE, H.L. and LAIFER, S.A. Prospective Evaluation of Bone Density in Pregnant Women Receiving the Low Molecular Weight Heparin Enoxaparin Sodium. *The Journal of Maternal-Fetal Medicine*. 2000, vol. 9, no. 2, s. 122-125. ISSN 1057-0802.

91. CARLIN, A.J., et al. Prospective Observational Study of Bone Mineral Density during Pregnancy: Low Molecular Weight Heparin Versus Control. *Human Reproduction*. 2004, vol. 19, no. 5, s. 1211-1214. ISSN 0268-1161.

92. RODGER, M.A., et al. Long-Term Dalteparin in Pregnancy Not Associated with a Decrease in Bone Mineral Density: Substudy of a Randomized Con-

- trolled Trial. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007, vol. 5, no. 8, s. 1600-6. ISSN 1538-7933.
93. HURLEY, M.M., KREAM, B.E. and RAISZ, L.G. Structural Determinants of the Capacity of Heparin to Inhibit Collagen Synthesis in 21-Day Fetal Rat Calvariae. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1990, vol. 5, no. 11, s. 1127-1133. ISSN 0884-0431.
94. ROGERS, A. and EASTELL, R. Circulating Osteoprotegerin and Receptor Activator for Nuclear Factor kappaB Ligand: Clinical Utility in Metabolic Bone Disease Assessment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005, vol. 90, no. 11, s. 6323-31. ISSN 0021-972X.
95. IRIE, A., et al. Heparin Enhances Osteoclastic Bone Resorption by Inhibiting Osteoprotegerin Activity. *Bone*. 2007, vol. 41, no. 2, s. 165-74. ISSN 8756-3282.
96. VIK, A., BRODIN, E., SVEINBJORNSSON, B. and HANSEN, J.B. Heparin Induces Mobilization of Osteoprotegerin into the Circulation. *Thrombosis and Haemostasis*. 2007, vol. 98, no. 1, s. 148-54. ISSN 0340-6245.
97. HANDSCHIN, A.E., et al. Cbfa-1 (Runx-2) and Osteocalcin Expression by Human Osteoblasts in Heparin Osteoporosis in Vitro. *Clinical and Applied Thrombosis and Hemostasis*. 2006, vol. 12, no. 4, s. 465-72. ISSN 1076-0296.
98. FARAH, N., et al. The Influence of Maternal Body Composition on Birth Weight. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. 2011, vol. 157, no. 1, s. 14-17. ISSN 1872-7654.
99. LEVY, J.A. and MURPHY, L.D. Thrombocytopenia in Pregnancy. *The Journal of the American Board of Family Practice*. 2002, vol. 15, no. 4, s. 290-297. ISSN 0893-8652.
100. ESPANA, F., et al. Complexes of Activated Protein C with Alpha 1-Antitrypsin in Normal Pregnancy and in Severe Preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1991, vol. 164, no. 5, s. 1310-1316. ISSN 0002-9378.
101. SOUBASI, V., et al. Association of Increased Maternal Ferritin Levels with Gestational Diabetes and Intra-Uterine Growth Retardation. *Diabetes & Metabolism*. 2010, vol. 36, no. 1, s. 58-63. ISSN 1878-1780.

102. POPOWSKI, T., et al. Prediction of Maternofetal Infection in Preterm Premature Rupture of Membranes: Serum Maternal Markers. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*. 2011, vol. 39, no. 5, s. 302-308. ISSN 1769-6682.
103. MOLVAREC, A., et al. Serum Leptin Levels in Relation to Circulating Cytokines, Chemokines, Adhesion Molecules and Angiogenic Factors in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2011, vol. 9, no. 1, s. 124. ISSN 1477-7827.
104. GOUIN-THIBAUT, I., SIGURET, V. and PAUTAS, E. A Need for Evidence-Based Clinical Practice Guidelines for the use of Heparins in the Elderly. *Clinical Interventions in Aging*. 2010, vol. 5, s. 119-121. ISSN 1178-1998.
105. GARON, J.E. Monitoring Low Molecular Weight Heparins. *Clinical Leadership & Management Review*. 2003, vol. 17, no. 1, s. 47-50. ISSN 1527-3954.
106. SEPHTON, V., et al. A Longitudinal Study of Maternal Dose Response to Low Molecular Weight Heparin in Pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*. 2003, vol. 101, no. 6, s. 1307-1311. ISSN 0029-7844.
107. MICHOTA, F. and MERLI, G. Anticoagulation in Special Patient Populations: Are Special Dosing Considerations Required?. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2005, vol. 72 Suppl 1, s. S37-42. ISSN 0891-1150.
108. THALER, E., HUCH, R., HUCH, A. and ZIMMERMANN, R. Compression Stockings Prophylaxis of Emergent Varicose Veins in Pregnancy: A Prospective Randomised Controlled Study. *Swiss Medical Weekly*. 2001, vol. 131, no. 45-46, s. 659-662. ISSN 1424-7860.
109. BAMIGBOYE, A.A. and SMYTH, R. Interventions for Varicose Veins and Leg Oedema in Pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2007, vol. 1, no. 1, s. CD001066. ISSN 1361-6137.
110. HELLMEYER, L., et al. Biochemical Markers of Bone Turnover during Pregnancy: A Longitudinal Study. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 2006, vol. 114, no. 9, s. 506-10. ISSN 0947-7349.
111. SEIBEL, M.J. Clinical Application of Biochemical Markers of Bone Turnover. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia*. 2006, vol. 50, no. 4, s. 603-20. ISSN 0004-2730.

112. MATZIOLIS, G., PERKA, C., DISCH, A. and ZIPPEL, H. Effects of Fondaparinux Compared with Dalteparin, Enoxaparin and Unfractionated Heparin on Human Osteoblasts. *Calcified Tissue International*. 2003, vol. 73, no. 4, s. 370-9. ISSN 0171-967X.
113. BHANDARI, M., et al. The Effects of Standard and Low Molecular Weight Heparin on Bone Nodule Formation in Vitro. *Thrombosis and Haemostasis*. 1998, vol. 80, no. 3, s. 413-7. ISSN 0340-6245.
114. VALENZUELA, G.J., MUNSON, L.A., TARBAUX, N.M. and FARLEY, J.R. Time-Dependent Changes in Bone, Placental, Intestinal, and Hepatic Alkaline Phosphatase Activities in Serum during Human Pregnancy. *Clinical Chemistry*. 1987, vol. 33, no. 10, s. 1801-1806. ISSN 0009-9147.
115. GOL, M., et al. Fetal Gender Affects Maternal Serum Total and Placental Alkaline Phosphatase Levels during Pregnancy. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. 2006, vol. 128, no. 1-2, s. 253-256. ISSN 0301-2115.
116. NAYLOR, K.E., et al. The Effect of Pregnancy on Bone Density and Bone Turnover. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2000, vol. 15, no. 1, s. 129-37. ISSN 0884-0431.
117. FOLWARCZNA, J., SLIWINSKI, L., JANIEC, W. and PIKUL, M. Effects of Standard Heparin and Low-Molecular-Weight Heparins on the Formation of Murine Osteoclasts in Vitro. *Pharmacological Reports*. 2005, vol. 57, no. 5, s. 635-45. ISSN 1734-1140.
118. SIMONET, W.S., et al. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*. 1997, vol. 89, no. 2, s. 309-19. ISSN 0092-8674.
119. RODGER, M.A., et al. Long-Term Dalteparin in Pregnancy Not Associated with a Decrease in Bone Mineral Density: Substudy of a Randomized Controlled Trial. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007, vol. 5, no. 8, s. 1600-1606. ISSN 1538-7933.