

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Renata Radziszewska

Ocena przydatności oznaczania aktywności antytrombiny III
i białka C w procesie diagnostycznym w posocznicy u noworodków.

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab.med. Ryszard Lauterbach

Pracę wykonano w Klinice Neonatologii CMUJ.

Kierownik jednostki Prof. dr hab.med. Ryszard Lauterbach

Kraków, rok 2005

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania
Panu Profesorowi Ryszardowi Lauterbachowi
za pomoc okazaną przy realizacji niniejszej pracy.*

Spis treści

1.	Wstęp.....	4
1.1.	Epidemiologia posocznicy.....	4
1.2.	Fizjologia hemostazy.....	6
1.3.	Układ krzepnięcia.....	9
1.4	Układ fibrynolizy.....	13
1.5.	Rola układu siateczkowo –śródbłonkowego i krwinek białych w hemostazie.....	16
1.6.	Odrębności układu krzepnięcia i fibrynolizy u noworodków.....	17
1.7.	Zaburzenia hemostazy u noworodków.....	19
1.8.	Mechanizmy uruchamiające procesy wykrzepiania i fibrynolizy w przebiegu infekcji.....	20
1.9.	Badania laboratoryjne w diagnostyce posocznicy u noworodków.....	23
1.10.	Diagnostyka hemostazy.....	25
1.10.1.	Badania przesiewowe.....	25
1.10.2.	Badania specjalistyczne.....	26
2.	Założenia i cel pracy.....	28
3.	Materiał i metodyka.....	30
3.1.	Metody statystyczne.....	36
4.	Wyniki.....	38
5.	Dyskusja.....	81
6.	Wnioski.....	89
7.	Streszczenie.....	90
8.	Summary	94
9.	Piśmiennictwo.....	97

1. Wstęp.

1.1. Epidemiologia posocznicy.

Uogólniona infekcja bakteryjna jest jedną z najczęstszych przyczyn zachorowalności i umieralności noworodków (1, 2). Częstość występowania posocznicy w krajach wysoko rozwiniętych oceniana jest na 1-5 /1000 żywo urodzonych noworodków i wzrasta do 10 przypadków/1000 żywo urodzonych dzieci w państwach rozwijających się (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Postęp w diagnostyce i leczeniu posocznicy bakteryjnej przyczynił się do obniżenia śmiertelności wśród noworodków, która aktualnie wynosi kilkanaście procent (13). Istotnym czynnikiem ryzyka w przebiegu tej jednostki chorobowej, poza rodzajem mikroorganizmu wywołującego schorzenie, jest niedojrzałość dziecka. Ostatnie dane z piśmiennictwa sugerują, iż śmiertelność z powodu infekcji uogólnionej obniża się, natomiast nie maleje ilość powikłań wynikających z uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego oraz innych ważnych życiowo narządów (14, 15, 16, 17, 18).

Na podstawie danych epidemiologicznych można stwierdzić, iż liczba porodów przedwczesnych nie maleje a jednym z głównych czynników ryzyka wystąpienia przedwczesnej akcji porodowej jest zakażenie w przebiegu ciąży. Częstość wrodzonych bakteryjnych zakażeń ocenia się w Polsce na 0,5 – 2% wszystkich urodzonych noworodków. Ta postać infekcji podobnie jak i późne zakażenia bakteryjne, występujące po 1 tygodniu życia, stanowią nadal istotny problem diagnostyczno-terapeutyczny w oddziałach intensywnej terapii noworodka. Wynika to z faktu, iż pacjentami tych oddziałów są często skrajnie niedojrzałe dzieci, szczególnie narażone na rozwój uogólnionej infekcji. Ponadto, czynnikami ułatwiającymi powstanie zakażenia są liczne inwazyjne procedury stosowane w procesie leczenia tych pacjentów (19, 20, 21).

Zmniejszona zdolność organizmu noworodka do odpowiedzi na infekcję, wynikająca z niedojrzałości układu immunologicznego w tym okresie życia, jest również jedną z przyczyn skąpej symptomatologii rozwijającego się zakażenia (22, 23, 24, 25, 26). Współistnienie innych chorób towarzyszących powoduje często trudności w ustaleniu rozpoznania. Brak dostatecznie szybkich, czułych i specyficznych badań laboratoryjnych jest kolejnym czynnikiem utrudniającym potwierdzenie rozpoznania tej jednostki chorobowej (27, 28). Ujemny wynik badania bakteriologicznego krwi pomimo wyraźnych objawów klinicznych infekcji stwierdza się w około 40% przypadków posocznicy (29).

Przyczyną fałszywie ujemnych wyników badania bakteriologicznego krwi może być między innymi stosowanie antybiotyków u matki w okresie poprzedzającym poród, a także zbyt mała objętość pobranej próbki krwi (27, 29, 30, 31, 32).

Obecnie coraz częściej zwraca się uwagę na fakt, iż w patomechanizmie rozwijającej się uogólnionej infekcji bakteryjnej poza nadmiernie nasiloną reakcją zapalną istotną rolę odgrywa zaburzenie równowagi pomiędzy układem krzepnięcia i fibrynolizy. Produkowane, bowiem w odpowiedzi na obecność bakterii i ich toksyn, prozapalne cytokiny aktywują proces krzepnięcia hamując równocześnie fibrynolizę. Z kolei, aktywne składowe kaskady krzepnięcia takie jak: trombina oraz czynnik Xa, stymulują w makrofagach i monocytach produkcję prozapalnych cytokin. W ten sposób powstaje „błędne koło”, którego efektem jest gwałtowne nasilenie reakcji zapalnej i ciągła aktywacja kaskady krzepnięcia prowadząca do zużycia jej składowych. W konsekwencji tych zmian może dochodzić do wystąpienia objawów skazy krwotocznej (33, 34, 35).

1.2. Fizjologia hemostazy.

Hemostaza stanowi zespół fizjologicznych procesów, które zapewniają ograniczenie krwawienia po przerwaniu ciągłości ściany naczyń krwionośnych, utrzymanie szczelności łożyska naczyniowego oraz płynności krążącej krwi. W zabezpieczeniu prawidłowej hemostazy uczestniczą komórki śródbłónka naczyń krwionośnych, płytki krwi oraz czynniki układu krzepnięcia i fibrynolizy (36, 37). Na aktywność poszczególnych czynników hemostazy mają istotny wpływ czynniki genetyczne, metaboliczne i środowiskowe.

W warunkach fizjologii w łożysku naczyniowym, stale w niewielkich ilościach tworzy się sieć fibryny, która pod wpływem czynników fibrynolitycznych ulega rozpuszczaniu. Procesy krzepnięcia i fibrynolizy w prawidłowych warunkach pozostają, zatem w równowadze (38).

Jak wiadomo hemostaza jest procesem wieloetapowym, składającym się z szeregu rozmaitych interakcji komórkowych i enzymatycznych. Wyróżniamy trzy podstawowe fazy: hemostazę pierwotną, wtórną i fibrynolizę. W procesie hemostazy pierwotnej uczestniczą komórki naczyń oraz płytki krwi. W chwili, kiedy dochodzi do uszkodzenia naczynia następuje odsłonięcie struktur kolagenu, co stymuluje proces adhezji i agregacji trombocytów. Równocześnie z komórek śródbłónka zostaje uwolniona serotonina powodująca obkurczenie naczyń w miejscu urazu. Faza hemostazy pierwotnej trwa zwykle od 3 do 5 minut i kończy się wytworzeniem czopu płytkowego. W procesie hemostazy wtórnej bardzo ważną rolę odgrywa czynnik tkankowy (TF-tissue factor), który zostaje uwolniony po uszkodzeniu ściany naczynia z warstwy znajdującej się pod komórkami śródbłónka. Jak wiadomo jest on aktywatorem czynników VII, IX i X będących istotnymi składowymi procesu krzepnięcia. Aktywacja tego układu prowadzi do powstania trombiny,

która z kolei powoduje przemianę fibrynogenu w nierozpuszczalną sieć fibryny. Ta ostatnia stabilizuje tak zwany czop płytkowy. Czas potrzebny na powstanie włókna od chwili zadziałania urazu wynosi zwykle od 5 do 10 minut. Ostatnim etapem w procesie hemostazy jest aktywacja plazminogenu do plazminy i uczynnienie fibrynolizy, której istotą jest rozpuszczenie śródnaczyniowych złogów fibryny i utrzymanie drożności łożyska naczyniowego (36, 39, 40, 41).

Niezwykle istotną rolę w zachowaniu procesu hemostazy odgrywają komórki śródbłónka naczyń. Są one, bowiem odpowiedzialne za produkcję i aktywację czynników zarówno o właściwościach prokoagulacyjnych jak i antykoagulacyjnych. Do grupy tych pierwszych należą: TF, czynnik V, czynnik von Willebranda (vWf-von Willebrand factor) oraz inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI-plasminogen activator inhibitor). Natomiast uwalniane przez komórki śródbłónka tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA-tissue type plasminogen activator), urokinaza (u-PA-urokinase plasminogen activator), białko S, trombomodulina a także prostacyklina biorą udział w hamowaniu krzepnięcia (40, 42, 43, 44, 45).

W kontroli hemostazy uczestniczy przede wszystkim błona wewnętrzna ściany naczyniowej utworzona z pojedynczej warstwy komórek śródbłónka oraz podśródbłónkowej tkanki łącznej. Zwróconą do światła naczyń powierzchnię komórek śródbłónka pokrywa glikokaliks, który jest mieszaniną glikozaminoglikanów (GAG) i glikolipidów. Około 80% składowych GAG stanowi siarczan heparanu posiadający właściwości antykoagulacyjne (37).

W komórkach endotelium produkowane są również i uwalniane do krwiobiegu substancje o silnym działaniu naczynioruchowym oraz wpływającym na adhezję, aktywację i agregację płytek. Należą do nich: prostacyklina i śródbłónkowy czynnik rozszerzający (EDRF-endothelium-derived relaxing factor), zidentyfikowany jako tlenek azotu (NO) (46).

W stanie zdrowia, w komórkach śródbłónka zachodzi w sposób ciągły synteza tlenku azotu. Jest ona zależna od aktywności izoenzymu konstytutywnej syntetazy e-NOS. Tlenek azotu podobnie jak prostacyklina, oddziałuje hamująco na proces adhezji trombocytów. Ponadto, prostacyklina jak i tlenek azotu poprawiają perfuzję krwi w mikrokrażeniu poprzez działanie wazodilacyjne (47). Antagonistami ich są endotelina 1 i tromboksan A_2 (TXA₂) produkowane również przez komórki endotelium. W procesie hamowania agregacji płytek krwi bierze także udział adenozyzna powstająca z ADP pod wpływem endonukleotydazy. Komórki śródbłónka są ponadto źródłem czynników odpowiedzialnych za proces fibrynolizy. Należy do nich t-PA a także częściowo vWf. Niezwykle interesującym białkiem produkowanym przez komórki śródbłónka jest trombomodulina (TM). Jak sama nazwa wskazuje, ma ona działanie modulujące funkcje trombiny. W wyniku łączenia się TM z trombiną ta ostatnia traci zdolności prokoagulacyjne. Ponadto kompleks trombomodulina-trombina (TM-trombina) jest niezbędny do procesu aktywacji białka C, istotnego inhibitora czynników Va, VIIIa oraz PAI (37, 40, 44).

Jak już wspomniałam, w procesie tworzenia skrzepu podstawowe zadanie odgrywają płytki krwi. Są one bezjądrzastymi komórkami powstającymi przez fragmentację megakariocytów. Liczba płytek krwi u osób zdrowych waha się 140 000 - 440 000/ul (140-440 G/l). Czas ich przeżycia w krwiobiegu wynosi 8-12 dni. Około 2/3 całkowitej puli trombocytów znajduje się we krwi krążącej, a 1/3 w śledzionie. W skład struktur wewnątrzkomórkowych płytek krwi wchodzi kilka rodzajów ziarnistości. Do głównych z nich zaliczamy ziarnistości gęste oraz alfa. Natomiast pozostałe stanowią lizosomy, peroksosomy oraz nieliczne mitochondria. Ziarnistości gęste zawierają nukleotydy adeninowe, guanozynowe, jony wapnia i magnezu, serotoninę oraz fosfoinozytole. Natomiast ziarnistości alfa są magazynem czynnika płytkowego 4, beta-tromboglobuliny,

fibronektyny oraz vWf. Zawierają one również białka adhezyjne takie jak trombospondyna i witronektyna. Wśród innych protein wchodzących w skład ziarnistości alfa należy wymienić fibrynogen, czynnik V, XI, wielkocząsteczkowy kininogen, inhibitor C1-esterazy, białko S oraz PAI-1 (inhibitor 1 aktywatora plazminogenu) i t-PA. Lizosomy płytek krwi zawierają kwaśne hydrolazy, natomiast peroksysomy są bogate w katalazy. Substancje uwalniane z ziarnistości powodują przyspieszenie procesów adhezji i agregacji płytek krwi (39, 44, 48, 49, 50, 51).

1.3. Układ krzepnięcia.

Kaskadę krzepnięcia tradycyjnie dzieli się na szlak, wewnątrzpochodny i zewnątrzpochodny, każdy uruchamiany przez odmienny mechanizm. W roku 1964 Davie i Macfarlane przedstawili teorię „kaskady”, dotyczącą wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia (52). Obecnie uważa się jednak, iż tzw. szlak wewnątrzpochodny, który rozpoczyna się aktywacją czynnika XII, występuje jedynie wtedy, gdy krew styka się ze szklanymi powierzchniami. Bowiem to nie aktywny czynnik XII jest aktywatorem czynnika XI ale czyni to trombina. Wiadomo, bowiem iż u osób z izolowanym niedoborem czynnika XII procesy krzepnięcia przebiegają prawidłowo (37). Jedynie w sytuacji zastosowania krążenia pozaustrojowego, kontakt z powierzchniami szklanymi może mieć podstawowe znaczenie w aktywacji procesu krzepnięcia. W pozostałych przypadkach najważniejszym czynnikiem odpowiedzialnym za rozpoczęcie procesu krzepnięcia jest TF (33, 53, 54, 55, 56). Jak już wspomniano może on być uwalniany z warstwy znajdującej się pod komórkami śródbłónka bądź też z komórek mikrogleju, gdyż tam znajdują się największe zapasy tego białka. Całkowicie odmienną jest stymulacja procesu krzepnięcia w posocznicy, w której nagle gwałtownie wzrasta stężenie TF w łożysku naczyniowym w wielu regionach

organizmu. Wtedy, bowiem produkowane i uwalniane przez chorobotwórcze bakterie toksyny stymulują zarówno monocyty jak i makrofagii a także komórki endotelium do produkcji TF. Połączenie się TF z czynnikiem VII powoduje aktywację tego ostatniego a następnie uczynnienie czynnika X i IX. Powstały wówczas aktywny czynnik X powoduje przekształcenie protrombiny w trombinę (57).

Białka enzymatyczne biorące udział w krzepnięciu można podzielić na trzy grupy. Do pierwszej z nich należą czynniki II, VII, IX, X, których synteza zależna jest od witaminy K, czyli tzw. czynniki zespołu protrombiny. Są one produkowane w hepatocytach. Zawierają w cząsteczce kwas γ -karboksylglutaminowy, co determinuje ich zdolność do wiązania jonów wapnia.

Do kolejnej grupy białek biorących udział w krzepnięciu zaliczamy czynnik I, V, VIII, XIII. Są one wrażliwe na działanie trombiny. Następną grupę stanowią czynniki kontaktu, czyli czynnik XI, XII i prekalikreina (czynnik Fletchera) oraz wielkocząsteczkowy kininogen - czynnik Fitzgeralda (HMWK-high molecular weight kininogen) (58, 59, 60).

Z wyjątkiem takich składowych jak czynnik V, VIII i Fitzgeralda większość enzymów aktywujących proces krzepnięcia występuje w osoczu w postaci nieaktywnej. Przekształcenie do formy aktywnej, czyli proteazy serynowej odbywa się na drodze reakcji proteolizy. Należy przy tym nadmienić, iż forma zymogenu jest substratem dla istniejącego już aktywnego enzymu będącego produktem wcześniejszej aktywacji. Powoduje to zwielokrotnienie procesu uczynniania form nieaktywnych a przebieg całej reakcji zachodzi w sposób kaskadowy (61).

Istotną rolę w utrzymaniu płynności krwi krążącej odgrywają naturalne inhibitory krzepnięcia. Największe znaczenie przypisuje się antytrombinie III, białku C i S oraz inhibitorowi szlaku czynnika tkankowego –TFPI.

Antytrombina III jest jednołańcuchową glikoproteiną, o masie cząsteczkowej 58 000 daltonów. Syntetyzowana jest głównie w wątrobie, a także przez komórki śródbłónka naczyń i płytki krwi. Gen odpowiedzialny za jej syntezę znajduje się na ramieniu długim chromosomu 1. Antytrombina III należy do rodziny serpin, czyli białek inaktywujących proteazy serynowe. Istnieje zależność pomiędzy wartościami stężenia antytrombiny III w surowicy krwi a wiekiem. Jej poziom w osoczu człowieka dorosłego wynosi około 19-31 mg% a aktywność od 65 do 130%. U noworodków aktywność antytrombiny III jest nieco niższa a zakres normy wynosi od 42 do 80%. Wartości podobne do obserwowanych u dorosłych stwierdza się dopiero u niemowląt około 6 miesiąca życia (60, 62, 63).

Białko C jest jednym ze składników antykoagulacyjnego układu w skład, którego wchodzi także: TM, śródbłonkowy receptor dla PC (EPCR- endothelial cell protein C receptor) i białka S. Białko C jest witamino-K zależną glikoproteiną o masie cząsteczkowej 62 000 daltonów, krążącą w osoczu w postaci nieczynnego proenzymu. Głównym miejscem syntezy tego białka jest wątroba. Gen kodujący produkcję białka C znajduje się na chromosomie 2. Prawidłowe stężenie białka C w osoczu wynosi 50-80 nmol/l, a aktywność waha się pomiędzy 70 a 140%. U noworodków stwierdza się niższe wartości, które wynoszą od 25 do 42%. Prawdopodobnie może wynikać to z niedojrzałości enzymatycznej wątroby (60, 62, 64, 65).

Aktywne białko C (APC) powstające z nieaktywnego prekursora w obecności kofaktora, czyli białka S, TM i receptora znajdującego się na komórkach śródbłónka, posiada właściwości antykoagulacyjne, profibrynolityczne i przeciwzapalne. Wpływ tego białka na układ krzepnięcia związany jest z jego zdolnością do enzymatycznego rozkładu czynników V i VIII. Ponadto pobudza ono proces fibrynolizy poprzez hamowanie PAI-1. Aktywne białka C łącząc się w cytoplazmie komórki z czynnikiem transkrypcyjnym NF- κ B

inaktywuje go. Powoduje to obniżenie produkcji cytokin prozapalnych, zmniejszenie ekspresji cząstek adhezyjnych i hamowanie aktywacji neutrofili (60, 66, 67, 68, 69).

Białko S jest kofaktorem białka C. Wytwarzane jest głównie w wątrobie przy udziale witaminy K, ale także w krwinkach płytkowych i komórkach śródbłónka. Gen ludzkiego białka S znajduje się na chromosomie 3. Około 60% białka S zawartego w osoczu tworzy kompleks z białkiem wiążącym składnik C4 komplementu-C4bBP. Pozostała wolna frakcja białka S działa jako kofaktor aktywnego białka C. Prawidłowe stężenie białka S w osoczu u osób dorosłych wynosi 20-25 mg%, a aktywność waha się pomiędzy 72 a 118%. U noworodków te parametry są wyraźnie niższe, aktywność białka S wynosi od 21 do 47%. Wartości zbliżone do dorosłych można stwierdzić dopiero w wieku od 6 do 36 miesięcy (60, 62).

Inhibitor czynnika tkankowego (TFPI - tissue factor pathway inhibitor) jest białkiem syntetyzowanym przez komórki śródbłónka naczyniowego, wątroby oraz w płytkach krwi. W osoczu występuje w postaci związanej z lipoproteinami a jego stężenie znacznie wzrasta po wpływie heparyny, która uwalnia TFPI z puli związanej z glikozaminoglikanami. TFPI zawiera miejsca wiążące dla kompleksu TF-VIIa, dla czynnika Xa oraz heparyny (70, 71, 72, 73, 74, 75).

Do inhibitorów krzepnięcia zaliczamy ponadto neksynę proteazową 1, która hamuje aktywność trombiny, plazminy i urokinazy. Do tej grupy należy również niedawno zidentyfikowana, glikoproteina będąca inhibitorem proteaz zależnym od białka Z (ZPI-protein Z-dependent protease inhibitor). Występuje ona w osoczu ludzi zdrowych a syntetyzowana jest w wątrobie (61, 63, 76).

1.4. Układ fibrynolizy.

Fibrynoliza jest naturalnym mechanizmem obronnym, który przeciwdziała odkładaniu się fibryny w naczyniach krwionośnych i w ten sposób utrzymuje ich drożność. W procesie tym bierze udział kilka osoczowych proteaz. Do głównych enzymów tego układu należą dwa aktywatory plazminogenu oraz powstająca w procesie aktywacji plazmina. Podobnie jak w układzie krzepnięcia tak i w układzie fibrynolizy można wyróżnić dwa szlaki aktywacji. Szlak wewnątrzpochodny wspólny z układem krzepnięcia, rozpoczyna się uaktywnieniem czynnika kontaktu XII i kalikreiny. Natomiast szlak zewnątrzpochodny, mający istotne znaczenie w patofizjologii wielu zaburzeń charakteryzuje się działaniem t-PA i u-PA (37, 77).

Szybkość działania t-PA jest uzależniona od obecności fibryny i wzrasta, od 200-400 krotnie gdy kompleks plazminogen- t-PA przyłącza się do włókniaka (78). W wyniku działania t-PA powstaje aktywna proteaza serynowa, czyli plazmina odpowiedzialna za hydrolizę endogennych białek uczestniczących w hemostazie. Plazmina powoduje fibrynolizę fibryny, fibrynogenu, czynników XII, V, VIII oraz vWf. Podczas procesu proteolizy z fibryny i fibrynogenu powstają produkty degradacji fibrynogenu (FDP- fibrynogen/fibrin degradation products). Z kolei ze stabilnej fibryny powstają pod wpływem plazminy tzw. D-dimery (60, 79, 80).

Proces fibrynolizy może być zahamowany zarówno przez czynniki hamujące przemianę plazminogenu do plazminy oraz takie, które ograniczają aktywność samej plazminy. Do tych ostatnich należy zaliczyć alfa 2-antyplazminę i alfa 2 –makroglobulinę. Alfa 2 antyplazmina produkowana jest w wątrobie i tworzy nieaktywny kompleks z plazminą (81, 82).

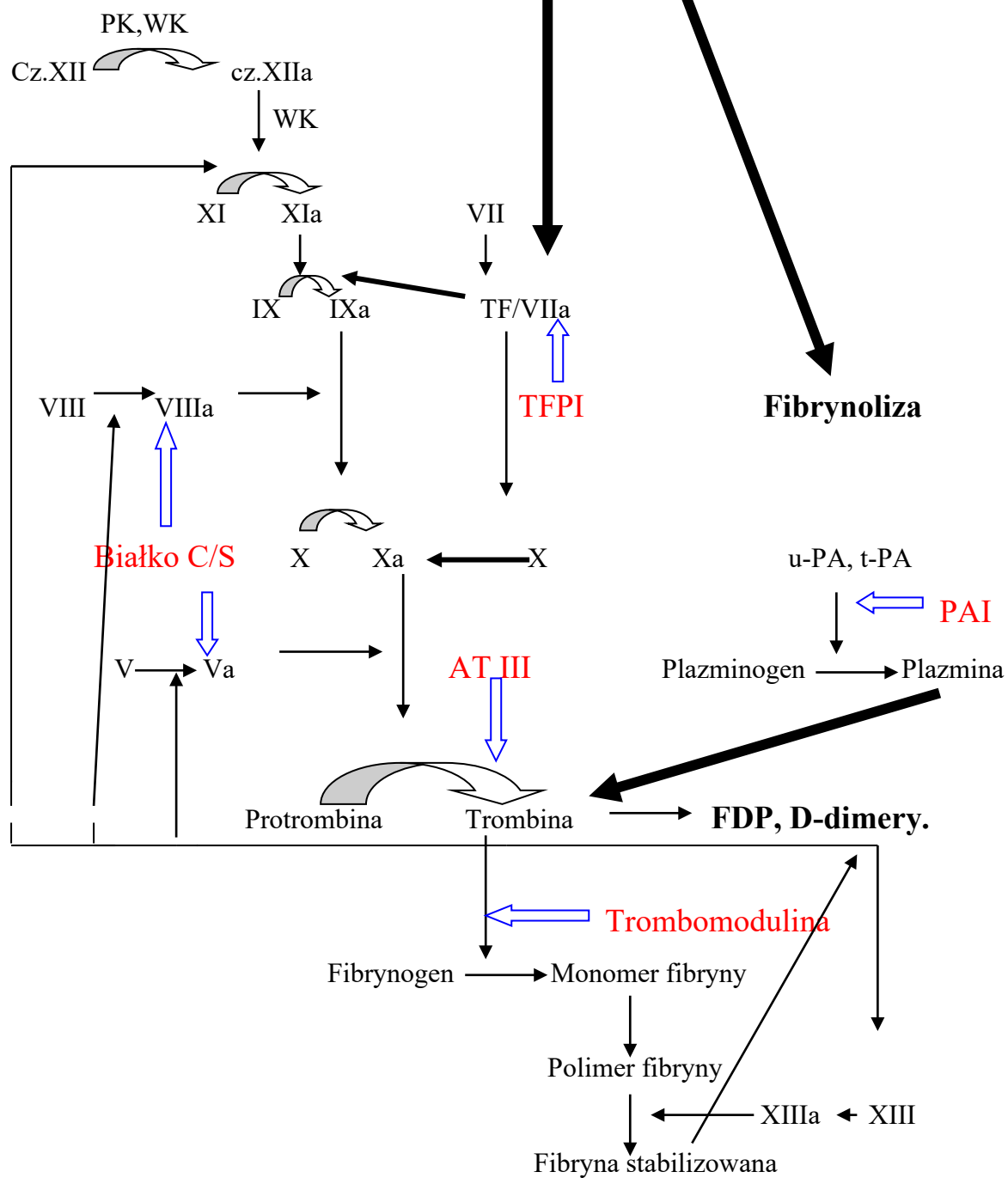
Z kolei reakcję przejścia plazminogenu w plazminę hamuje PAI-1 oraz inhibitor 2 aktywatora plazminogenu (PAI-2). PAI-1 produkowany jest w komórkach wątroby, endotelium, mięśni gładkich i w megakariocytach. Wiąże się on z t-PA lub u-PA powodując inaktywację tych enzymów. PAI-2 syntetyzowany jest przez monocyty, makrofagi i posiada większą aktywność w odniesieniu do u-PA (61).

Do innych czynników o działaniu antyfibrynolitycznym należą w organizmie człowieka następujące substancje: C1 inhibitor esterazy, neksyna proteazowa, trombospodyna, lipoproteina(a) oraz inhibitor fibrynolizy aktywowany przez trombinę (TAFI-thrombin activatable fibrinolysis inhibitor). C1 inhibitor esterazy działa poprzez hamowanie aktywności czynników kontaktu. Z kolei neksyna proteazowa zmniejsza aktywność plazminy i urokinazy. Lipoproteina (a), zawiera w swojej cząsteczce białkowy element - apolipoproteinę (a), która jest strukturalnie podobna do plazminogenu. Współzawodniczy ona z plazminogenem, plazminą i prawdopodobnie z t-PA o miejsca wiążące na fibrynie. TAFI występuje w osoczu w formie proenzymu a jego aktywacja zachodzi pod wpływem trombiny i plazminy. Czynniki te są aktywowane 1000 x razy silniej przez kompleks trombina – TM w porównaniu do działania wolnej trombiny (57, 63, 83, 84, 85).

Schemat kaskady krzepnięcia i fibrynolizy oraz miejsca działania ich głównych inhibitorów przedstawiony został na rycinie 1.

Czynnik uszkodzający śródbłonek naczyniowy
(odsłonięcie kolagenu)

Kaskada krzepnięcia



PK- prekalikreina, WK- wielkocząsteczkowy kininogen, ⇨ miejsca działania inhibitorów.

Rycina 1. Schemat kaskady krzepnięcia i fibrynolizy (60, 37).

1.5. Rola układu siateczkowo – śródbłonkowego i krwinek białych w hemostazie.

Komórki tego układu biorą udział w kontroli hemostazy poprzez usuwanie z krwi takich czynników aktywujących krzepnięcie jak: produkty rozpadu tkanek, bakterie, wirusy a także efekty aktywacji krzepnięcia. Do tych ostatnich należy rozpuszczalna fibryna i aktywowane płytki krwi. W badaniach histologicznych tkanek pobranych z miejsc o nasilonym odczynie zapalnym oraz niektórych nowotworów stwierdza się obecność licznych nacieków leukocytnych wraz ze złogami fibryny. Wiadomym jest także, iż wywołanemu eksperymentalnie procesowi wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC) można zapobiec poprzez wcześniejsze obniżenie ilości leukocytów. Zarówno monocyty jak i makrofagi mogą, więc nasilać proces krzepnięcia. Wykryto w nich, bowiem obecność wielu czynników krzepnięcia takich jak: II, V, VII, IX, X, XII, wielkocząsteczkowy kininogen a także proteazy aktywujące bezpośrednio czynnik X i protrombinę. Niezwykle istotne było stwierdzenie, że pod wpływem działania prozapalnych cytokin dochodzi do wzrostu syntezy i uwalniania czynnika tkankowego przez monocyty (63).

Z kolei makrofagi posiadają na swojej powierzchni fosfolipidy do tworzenia kompleksów aktywacyjnych tenazy i protrombinazy, enzymów odpowiedzialnych za uczynnienie czynnika X (36). Ponadto komórki te uwalniają czynniki aktywujące płytki oraz enzymy uszkadzające ścianę naczyń krwionośnych. Do takich należą toksyczne metabolity tlenu, czynnik aktywujący płytki (PAF-platelets activating factor), leukotrieny, tromboksany i interleukina 1 (IL-1) (86, 87).

1.6. Odrębności układu krzepnięcia i fibrynolizy u noworodków.

U noworodków i niemowląt układ hemostazy jest nieco odmienny w porównaniu do osób dorosłych. Największe różnice stwierdza się u noworodków urodzonych przedwcześnie. Układ krzepnięcia i fibrynolizy wykazuje u nich znaczne niedobory ilościowe i jakościowe (88, 89). Szybkość reakcji powstawania trombiny z protrombiny jest o 50% wolniejsza u noworodków w porównaniu do osób dorosłych. Prawdopodobnie chroni to dzieci w tym wieku przed powstawaniem zakrzepów (90, 91, 92, 93, 94).

Istniejący względny stan równowagi kształtują z jednej strony niskie stężenia niektórych czynników krzepnięcia a z drugiej niedobór naturalnych inhibitorów krzepnięcia takich jak antytrombina III, białka C i białko. Wypadkową tych różnic jest stwierdzany u noworodków nieznacznie skrócony czas krwawienia. Natomiast liczba trombocytów jest podobna jak u osób dorosłych (95, 96, 97, 98).

Poziom niektórych składowych układu fibrynolitycznego jest również odmienny w okresie noworodkowym. Stężenia plazminogenu i alfa 2–antyplazminy, mierzone we krwi pępowinowej są niskie i dopiero w 6 miesiącu życia osiągają wartości podobne do obserwowanych u osób dorosłych. Podobnie stężenie t-PA w osoczu noworodków jest obniżone. Z kolei poziom PAI-1 oraz alfa 2-makroglobuliny jest podwyższony, co może być przyczyną niższej aktywności fibrynolitycznej osocza w tym okresie życia (93, 99, 100, 101).

Parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy u noworodków donoszonych i wcześniaków w porównaniu do wartości stwierdzanych u osób dorosłych przedstawia tabela 1.

Wybrane parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy	Wcześnieiki	Donoszone
Liczba płytek krwi	↓-N	N
Retrakcja skrzepu	↓	↓
Czas krwawienia	N	N
Czas kaolinowo-kefalinowy (APTT)	↑	↑↑
Czas protrombinowy (PT)	↑↑	↑-N
Czas trombinowy (TT)	↑-N	N
Fibrynogen	↓-N	N
Czynnik V	N	N
Czynnik VIII	N	N
Czynnik II	↓	↓
Czynnik VII	↓↓	↓↓
Czynnik IX	↓↓	↓↓
Czynnik X	↓↓	↓↓
Czynnik XI	↓↓	↓↓
Czynnik XII	↓↓	↓↓
Czynnik XIII	↓	↓
Prekalikreina	↓↓	↓↓
HMW kininogen	↓↓	↓
Białko C	↓↓	↓
Białko S	↓↓	↓
Antytrombina III	↓↓	↓
α 2 makroglobulina	↑	↑
Plazminogen	↓↓	↓
Aktywatory plazminogenu	↑	↑

N - wartość identyczna, ↓ - wartość obniżona w stosunku do osób dorosłych, ↓↓ - znaczne obniżenie wartości w stosunku do osób dorosłych, ↑ - wzrost wartości lub wydłużenie czasu w stosunku do osób dorosłych, ↑↑ - znaczny wzrost wartości lub wydłużenie czasu w stosunku do osób dorosłych.

Tabela 1. Porównanie parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy u wcześniaków i noworodków donoszonych z wartościami stwierdzanymi u osób dorosłych (102).

1.7. Zaburzenia hemostazy u noworodka.

Do najczęstszych przyczyn występowania zaburzeń hemostazy u noworodka zaliczamy zarówno wrodzony jak i nabyty niedobór osoczowych czynników krzepnięcia oraz różne postacie małopłytkowości.

Wrodzone defekty dotyczą głównie niedoborów czynnika VII lub IX (hemofilia A lub B) i rzadko objawiają się klinicznie w okresie noworodkowym. Najczęściej pierwsze symptomy tych jednostek chorobowych pojawiają się dopiero około 1 roku życia, gdy dziecko zaczyna chodzić i jest narażone na urazy. Jeżeli jednak występuje znaczny niedobór czynnika VII i jego aktywność stanowi zaledwie około 1% normy, wtedy objawy chorobowe mogą wystąpić już w pierwszych godzinach życia. Należą do nich krwawienia z miejsc nakłucia, z kikuta pępowiny, z błon śluzowych jamy ustnej oraz wylewy krwi do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Skojarzone niedobory kilku czynników krzepnięcia ujawniają się w okresie noworodkowym niezwykle rzadko (103, 104, 105).

Wśród nabytych zaburzeń hemostazy należy wymienić chorobę krwotoczną noworodka. Jest ona spowodowana przejściowym niedoborem produkowanych w wątrobie czynników krzepnięcia zależnych od witaminy K (II, VII, IX, X). Względnie często do zaburzeń hemostazy dochodzi także w trakcie ciężko przebiegających infekcji bakteryjnych, które mogą być powikłane zespołem rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (103, 106).

Przyczyną zbyt małej ilości płytek może być ich niewystarczająca produkcja lub nadmierne zużycie, do którego dochodzi między innymi w trakcie procesu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego .

Wrodzone postacie małopłytkowości występują rzadko i należą do nich zespół Fanconiego, trombocytopenia amegakariocytarna (105).

1.8. Mechanizmy uruchamiające procesy wykrzepiania i fibrynolizy w przebiegu infekcji.

Do najczęstszych przyczyn nabytych zaburzeń hemostazy u noworodków należy zaliczyć zakażenia zarówno bakteryjne jak i wirusowe, riketsjowe, grzybicze a także pierwotniakowe. Chociaż nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych w zakresie parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy stwierdza się w przebiegu zakażenia u około 80% noworodków, to jednak tylko u 20-30% z nich występują objawy kliniczne, w postaci krwawień lub zakrzepicy wewnątrznaczyniowej (37, 95, 104).

Odpowiedź zapalna układu immunologicznego powstająca w przebiegu zakażenia jest niezbędna, aby w możliwie jak najkrótszym czasie ograniczyć namnażanie się i rozsiew drobnoustrojów chorobotwórczych w organizmie chorego noworodka. Pomimo licznych „niedoborów” systemu odpornościowego, może w tym okresie życia dochodzić do niekontrolowanej, nadmiernej odpowiedzi zapalnej, przebiegającej w sposób kaskadowy (26, 107). Problem ten dotyczy zarówno noworodków donoszonych jak i wcześniaków. Jak już wcześniej stwierdzono uogólniona reakcja zapalna stymuluje proces krzepnięcia i jednocześnie hamuje fibrynolizę. Z kolei aktywacja czynników krzepnięcia nasila reakcję zapalną poprzez oddziaływanie tych substancji na produkcję prozapalnych cytokin. I tak np.: aktywny czynnik X pobudza komórki śródbłónka do syntezy interleukiny 6 (IL-6) i interleukiny 8 (IL-8) a czynnik VIIa stymuluje makrofagii do produkcji reaktywnych form cząsteczek tlenu i cytokin IL6, IL-8. Natomiast trombina poprzez pobudzający wpływ na produkcję selektyny P w komórkach endotelium powoduje aktywację monocytów, co prowadzi do zwiększonego uwalniania IL-1, IL-6, IL-8 i kachektyny (TNF-alfa). W ten sposób zamyka się „błędne koło” zmian patologicznych powodujących wykrzepianie

wewnątrznaczyniowe, niewydolność wielonarządową, a przy braku skutecznej interwencji terapeutycznej, do zgonu pacjenta (54, 108).

W początkowym okresie zakażenia bakterie a zwłaszcza składowe ich ściany komórkowej takie jak: peptydoglikan a w przypadku bakterii Gram (-) endotoksyna lipopolisacharydowa (LPS) oraz entero- i egzotoksyny powodują pobudzenie układu immunologicznego. LPS uwolniona z bakterii Gram (-) jest we krwi wiązana z rozpuszczalnym receptorem CD14 (sCD14) oraz cząsteczkami lipoprotein. Procesy te katalizowane są przez białko wiążące dla LPS (LBP- LPS binding protein). Związanie się lipopolisacharydu z lipoproteinami powoduje jego neutralizację, natomiast połączenie z receptorem sCD14 stymuluje aktywację komórek układu immunologicznego. Pewna pula receptora CD14 istnieje także na powierzchni neutrofilów i makrofagów jako białko GPI (mCD14). Następnie LPS przetransportowany jest w postaci kompleksu sCD14-LPS do komórek zawierających mCD14. Powoduje to na komórkach śródbłónka wzrost ekspresji cząstek adhezyjnych takich jak: selektyna E, selektyna P, ICAM-1, VCAM a także TF. Czynniki te z kolei stymulują monocyty, makrofagii do produkcji i uwalniania cytokin prozapalnych takich jak: TNF-alfa i IL-1 (54, 108, 109, 110, 111). TF jest istotnym receptorem dla czynnika VIIa na powierzchni komórek. Pojawienie się czynnika tkankowego na komórkach śródbłónka jest sygnałem do uczynnienia kaskady krzepnięcia i równoczesnej aktywacji fibrynolizy (34, 35, 77, 112, 113). W prawidłowych warunkach aktywacja procesu krzepnięcia równolegle stymuluje fibrynolizę. Jednak te same cytokiny prozapalne, które zwiększają ekspresję TF powodują także wzrost syntezy PAI-1 w komórkach śródbłónka, monocytach, makrofagach, co prowadzi do hamowania procesu fibrynolizy (114). Dodatkowo spadek poziomu plazminogenu w surowicy obserwowany w przebiegu posocznicy upośledza fibrynolizę. Z kolei wzrost stężenia alfa-1 antytrypsyny w posocznicy, prowadzi do hamowania aktywacji białka C i w ten sposób nasila

wykrzepianie. W początkowym etapie infekcji dochodzi, zatem do znacznego przechylenia równowagi pomiędzy krzepnięciem a fibrynolizą na stronę krzepnięcia. Pierwszym sygnałem zaburzeń hemostazy stwierdzanym w posocznicy w badaniach laboratoryjnych może być spadek aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi. Ponadto dochodzi do wzrostu stężenia fragmentów protrombiny (F 1+2) w osoczu, które uwalniane są w trakcie powstawania aktywnej trombiny. Dochodzi też to zwiększenia stężenia kompleksu trombina-antytrombina (T-AT). Jak wiadomo powstawanie kompleksów T-AT jest wynikiem neutralizującego działania antytrombiny III na trombinę. Obserwuje się również zmiany w stężeniu t-PA. Początkowo następuje jego wzrost a następnie spadek stężenia, przy czym stwierdza się równoczesny wzrost poziomu w osoczu jego inhibitora. Wiadomo, iż aktywne składowe układu krzepnięcia stymulują produkcję czynników kaskady zapalnej. I tak, np.: aktywny czynnik X pobudza komórki śródbłónka do syntezy IL-6 i IL-8 oraz cząstek ICAM i VCAM. Z kolei czynnik VIIa stymuluje makrofagi do produkcji reaktywnych cząstek tlenu a także do uwalniania cytokin prozapalnych IL-6, IL-8. Trombina pobudzając produkcję selektyny P w komórkach endotelium zwiększa migrację leukocytów do miejsca zakażenia oraz aktywuje monocyty, które uwalniają IL-1, IL-6, IL-8 i TNF-alfa. Mechanizm działania trombiny polega na aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-kB w monocytach i komórkach endotelium (37, 44, 108). Wynikiem ciągłej aktywacji procesu krzepnięcia jest powstanie mikrozatorów w wielu narządach. W konsekwencji powoduje to uszkodzenie funkcji tych narządów. W trakcie reakcji wykrzepiania dochodzi do zużycia czynników krzepnięcia, obniżenia ilości płytek krwi oraz zapasów endogennych inhibitorów krzepnięcia, co powoduje stan hipokoagulopatii. Może to prowadzić do objawów skazy krwotocznej. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się wtedy obniżenie aktywności inhibitorów krzepnięcia, wydłużenie czasu protrombiny i czasu częściowo aktywowanej tromboplastyny. Wzrasta stężenie produktów

degradacji fibrynogenu i fibryny (60, 115, 116). W obrazie klinicznym obserwuje się wtedy przedłużone krwawienia z miejsc wkłucia, wybroczyny na błonach śluzowych i skórze. Można również stwierdzić krwawienie z dróg oddechowych, przewodu pokarmowego a także wylewy do OUN. Należy podkreślić, iż u noworodka niedojrzałość układu immunologicznego z jednej strony a także labilność mechanizmów regulujących procesy krzepnięcia i fibrynolizy powodują, iż w przebiegu posocznicy może szybko dochodzić do ciężkiego i nieodwracalnego uszkodzenia wielu tkanek i narządów. Niedokrwienie i niedotlenienie w obrębie ścian jelit jest jedną z przyczyn nekrotycznego zapalenia jelit (NEC). Z kolei mikrozatorowość kłębuszków nerkowych prowadzi do niewydolności nerek. Powstające mikrozakrzepy w naczyniach kory nadnerczy są częstą przyczyną ich ostrej niewydolności (24, 26, 112).

1.9. Badania laboratoryjne w diagnostyce posocznicy u noworodków.

Posocznica u noworodka jest stanem klinicznym, w którym wczesne rozpoznanie oraz wdrożenie odpowiedniego postępowania terapeutycznego decyduje o pomyślnym rokowaniu. Im mniej dojrzałe dziecko tym rozpoznanie infekcji uogólnionej na podstawie obrazu klinicznego jest trudniejsze. Niecharakterystyczne objawy chorobowe, brak jednego czułego i szybkiego testu laboratoryjnego potwierdzającego zakażenie przed uzyskaniem wyniku badania bakteriologicznego krwi może być przyczyną zbyt późnego rozpoznania i opóźnienia w zastosowaniu odpowiedniego leczenia (117, 118).

Według wytycznych Polskiego Towarzystwa Neonatologicznego „rozpoznanie posocznicy stawiamy na podstawie stwierdzenia przynajmniej 3 objawów klinicznych i uzyskania, co najmniej 3 nieprawidłowych wyników badań laboratoryjnych”. Do takich objawów klinicznych zaliczamy: tachykardię lub bradykardię, tachypnoe, pojedyncze

bezdechy, hipo- lub hipertemię bez lub z zaburzeniami perfuzji, niechęć do ssania, zaleganie treści pokarmowej, wzdęcie brzucha, żółtaczkę. Wśród badań laboratoryjnych wyróżniamy: hiperglikemię >180 mg/dl lub hipoglikemię <40 mg/dl, liczbę białych krwinek $>20,0$ G/l (z wyjątkiem pierwszych 7 dni życia) lub $<4,0$ G/l, wartość stosunku form „młodych” do całkowitej ilości neutrofilów (I:T ratio) $>0,2$, podwyższony poziom białka C-reaktywnego w surowicy (119).

Oznaczanie I:T ratio jak i określenie całkowitej liczby leukocytów w krwi obwodowej ma ograniczoną przydatność diagnostyczną u noworodków. Jest to spowodowane różnicami w metodach laboratoryjnych dotyczących oceny rozmazów a także obecnością pewnych czynników występujących w okresie okołoporodowym, wpływających na liczbę komórek układu białokrwinkowego (120). Zaliczamy do nich: nadciśnienie lub gorączkę u matki, niedotlenienie okołoporodowe dziecka czy zespół zachłyśnięcia smółką. U noworodków z bardzo małą masą urodzeniową zmienność tych parametrów w morfologii krwi obwodowej jest jeszcze większa (121).

Lepsze poznanie patomechanizmów oraz określenie roli mediatorów stanu zapalnego uwalnianych w trakcie zakażenia stało się podstawą do opracowania nowych możliwości diagnostycznych w posocznicy. Do takich metod należy m.in.: oznaczanie poziomu prokalcytoniny w surowicy, stężenia cytokin prozapalnych, z których największe znaczenie diagnostyczne ma ocena poziomu IL-6 w surowicy krwi. Wśród białek ostrej fazy tylko białko C-reaktywne spełnia kryteria diagnostyczne w rozpoznawaniu posocznicy (122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130). Ciągły postęp wiedzy dotyczącej zaburzeń hemostazy, do których dochodzi już w początkowym okresie trwania infekcji choroby spowodował rozszerzenie standardu diagnostycznego o analizę parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy.

1.10. Diagnostyka hemostazy.

Schemat postępowania w diagnostyce zaburzeń krzepnięcia i fibrynolizy obejmuje badania podstawowe, czyli przesiewowe oraz w następnym etapie badania specjalistyczne (37, 104, 131).

1.10.1. Badania przesiewowe.

Dokładny wywiad i badanie kliniczne są podstawą prawidłowej diagnozy w rozpoznawaniu zaburzeń naczyniowych. Natomiast głównym badaniem laboratoryjnym jest oznaczanie czasu krwawienia według modyfikacji Ivy.

Badania dotyczące zaburzeń funkcji płytek obejmują liczbę trombocytów z oceną ich morfologii (wielkość, kształt, obecność agregatów), ocenę kurczliwości skrzepu oraz pomiar czasu krwawienia standaryzowaną metodą wg.Ivy.

Do podstawowych badań układu krzepnięcia zaliczamy: oznaczanie czasu kaolinowo-kefalinowego (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji [APTT- activated partial thromboplastin time], czasu protrombinowego (PT-prothrombin time) oraz czasu trombinowego (TT- thrombin time) a także pomiar stężenia fibrynogenu.

Dla oceny układu fibrynolizy wykonujemy oznaczenie czasu lizy euglobin, czasu trombinowego oraz testy parakoagulacji (oznaczanie ilościowe lub jakościowe monomerów fibryny). Stwierdzenie nieprawidłowości w wynikach testów podstawowych wymaga poszerzenia diagnostyki o dalsze badania specjalistyczne (104, 131, 132, 133).

1.10.2. Badania specjalistyczne.

Celem specjalistycznych badań dotyczących na przykład zaburzeń płytkowych jest ocena ich funkcji. Wykorzystujemy do tego szereg badań laboratoryjnych. Należy do nich badanie adhezji (test mało specyficzny) i agregacji płytek krwi, czas ich życia oraz oznaczanie substancji uwalnianych z ziarnistości gęstych trombocytów. Dodatkowo wykonuje się ocenę czasu zużycia protrombiny. W badaniach immunologicznych wykrywa się obecność przeciwciał przeciwplatek (131, 133).

Zaburzenia układu krzepnięcia i fibrynolizy diagnozujemy na podstawie analizy stężeń niektórych czynników krzepnięcia, krążących antykoagulantów a także inhibitorów krzepnięcia. Ponadto innymi substancjami, których oznaczanie wykorzystuje się w diagnostyce są: aktywatory i inhibitory fibrynolizy. Zastosowanie znalazło również badanie poziomu produktów degradacji fibryny i fibrynogenu oraz oznaczanie stężenia D-dimerów (104).

Występujące zaburzenia równowagi pomiędzy układem krzepnięcia i fibrynolizy już w początkowej fazie infekcji powodują, iż obecnie podstawowe badania diagnostyczne mające na celu rozpoznanie uogólnionego zakażenia obejmują oprócz badań biochemicznych i bakteriologicznych również ocenę układu krzepnięcia. Do zestawu takich analiz zaliczamy oznaczanie liczby płytek krwi, czasu kaolinowo-kefalinowego, czasu protrombinowego, stężenia fibrynogenu oraz FDP lub stężenia D-dimerów osoczu. Jednak w początkowej fazie choroby, wyniki powyższych oznaczeń mogą być prawidłowe. Dlatego obecnie coraz większą uwagę zwraca się na wykorzystanie w diagnostyce posocznicy specjalistycznych badań obejmujących oznaczanie aktywności antytrombiny III oraz krążących antykoagulantów, czyli białka C i białka S. Stwierdzenie nieprawidłowości w zakresie tych parametrów często znacznie wyprzedza zaburzenia stwierdzone

w tzn. podstawowych badaniach układu krzepnięcia. Wiadomości te dotyczą głównie osób dorosłych i dzieci starszych. Do chwili obecnej brak jest jednak danych, które opisywałyby występowanie podobnych zależności u noworodków a zwłaszcza u wcześniaków.

2. Założenia i cel pracy.

Biorąc pod uwagę istotną rolę antytrombiny III i białka C w regulacji zaburzeń procesu krzepnięcia i fibrynolizy powstających w przebiegu posocznicy u osób dorosłych, postanowiłam odpowiedzieć na pytanie czy oznaczanie aktywności antytrombiny III i białka C, już na początkowym etapie rozpoznawania posocznicy u noworodków i wcześniaków może być istotnym wskaźnikiem diagnostycznym oraz czy istnieje korelacja pomiędzy poziomem antytrombiny III i/lub białka C w surowicy krwi a rokowaniem w tej jednostce chorobowej.

Szczegółowym celem pracy było:

1. Porównanie aktywności antytrombiny III oraz białka C w surowicy krwi u noworodków w początkowej fazie posocznicy potwierdzonej bakteriologicznie z wartościami tych parametrów oznaczonych u dzieci zdrowych.
2. Porównanie aktywności antytrombiny III oraz białka C w surowicy krwi u noworodków prezentujących kliniczne objawy posocznicy niepotwierdzonej wynikiem badania bakteriologicznego krwi a wartościami tych parametrów oznaczonych u dzieci zdrowych.
3. Określenie zależności pomiędzy poziomem aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi a rodzajem flory bakteryjnej wywołującej posocnicę.
4. Określenie zależności pomiędzy aktywnością antytrombiny III i białka C w surowicy krwi noworodków a następującymi czynnikami ryzyka wystąpienia infekcji stwierdzonymi w okresie życia wewnątrzmacicznego:

- przedwczesne odpływanie płynu owodniowego > 24 godz.,
 - gorączka w okresie okołoporodowym u matki, podwyższony poziom CRP w surowicy krwi matki, wartość leukocytozy w krwi matki > 15000/mm³,
 - stan po obumarciu jednego płodu w ciąży wielopłodowej,
 - znacznego stopnia hypotrofia płodu (poniżej 10 percentyla).
5. Próba odpowiedzi na pytanie czy istnieje korelacja pomiędzy poziomem antytrombiny III i/lub białka C, oznaczonych w surowicy krwi na początku posocznicy a rokowaniem w tej jednostce chorobowej?

3. Materiał i metodyka.

Badanie przeprowadzono u 330 noworodków urodzonych i hospitalizowanych w Klinice Neonatologii Katedry Ginekologii i Położnictwa Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Badaną populację podzielono na 3 grupy w zależności od stanu klinicznego i uzyskanych wyników badań bakteriologicznych krwi oraz badań laboratoryjnych.

Do analizy nie zostały włączone noworodki z wadami wrodzonymi, dzieci urodzone w zamartwicy, ocenione w skali Apgar od 0 – 6 pkt w 1-3 minucie życia a także noworodki z krwinkami podokostnowymi lub znacznymi zasinieniami pourazowymi powłok skórnych.

Grupę I stanowiło 150 noworodków, u których na podstawie oceny stanu klinicznego, wyników badań laboratoryjnych oraz danych z przebiegu ciąży wstępnie rozpoznano wrodzone zakażenie bakteryjne.

Kryterium włączenia do tej grupy było równoczesne stwierdzenie 3-ech poniżej wymienionych parametrów:

1. wiek dziecka, pierwsze 7 dni życia,
2. występowanie przed porodem czynników ryzyka zwiększających możliwość rozwoju infekcji u dziecka takich jak:
 - a) przedwczesne odpływanie płynu owodniowego powyżej 24 godz.,
 - b) objawy zakażenia u matki: gorączka, podwyższony poziom CRP w surowicy krwi oraz wartość leukocytozy krwi obwodowej powyżej 15000/mm³,
 - c) stan po obumarciu jednego płodu w ciąży wielopłodowej,
 - d) urodzeniowa masa ciała poniżej 10 percentyla dla danego wieku płodowego.

3. obecność przynajmniej 3-ech spośród niżej wymienionych klinicznych objawów posocznicy u noworodka (tachypnoe lub bezdech, tachykardia lub bradykardia, hypo- lub hipertermia bez lub z zaburzeniami perfuzji obwodowej, apatia, niechęć do ssania, zaleganie treści pokarmowej, wzdęcie brzucha, żółtaczka).

Spośród analizowanych 150 noworodków w tej grupie u 105 dzieci z uwagi na występujące czynniki ryzyka infekcji w okresie poprzedzającym poród, diagnostykę posocznicy rozpoczęto już w pierwszych godzinach życia. Natomiast u 45 noworodków nie stwierdzano przed porodem czynników ryzyka infekcji, jednakże w okresie od 1 do 7 doby życia wystąpiły u nich wyraźne objawy kliniczne infekcji, co spowodowało wdrożenie postępowania diagnostycznego.

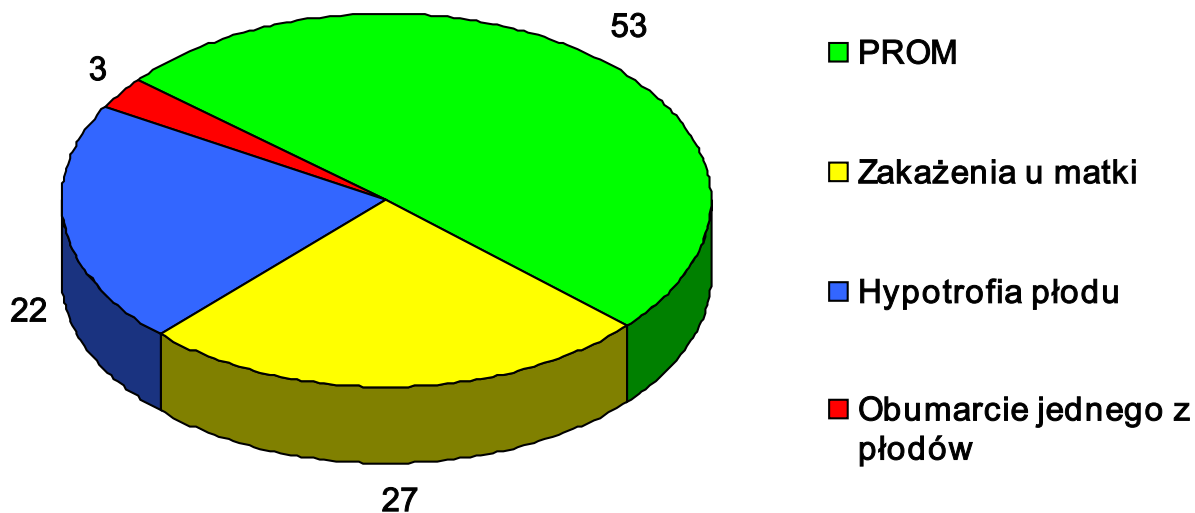
W tabeli 2 przedstawiono dane dotyczące urodzeniowej masy ciała oraz wieku płodowego u noworodków grupy I-ej.

Badane noworodki (n=150)	Średnia	Mediana	Minimum	Maximum	Odchylenie standardowe
Urodzeniowa masa ciała (g)	1862,6	1675,0	670,0	4200,0	842,8
Wiek płodowy (tyg.cięży)	32,77	33,0	25,0	41,0	3,88

Tabela 2. Rozkład urodzeniowej masy ciała i wieku płodowego u noworodków grupy I-ej.

W badanej grupie było 89 noworodków płci męskiej (59,3%) oraz 61 noworodków płci żeńskiej (41,7%). Dzieci urodzone przedwcześnie stanowiły 84,0%.

Ilościowy rozkład czynników ryzyka wrodzonej infekcji uogólnionej został przedstawiony na rycinie 2.



Rycina 2. Czynniki ryzyka rozwoju wrodzonej infekcji uogólnionej.

Grupę II stanowiło 150 noworodków, u których objawy kliniczne uogólnionej infekcji bakteryjnej wystąpiły po 7 dobie życia. Szczegółowe przedstawienie doby zachorowania u noworodków w grupie II-ej zostało przedstawione w tabeli 3.

Badane noworodki	Doba zachorowania.				
	Średnia	Mediana	Minimum	Maximum	Odchylenie standardowe
(n=150)	21,1	14,5	8,0	172,0	21,99

Tabela 3. Doba zachorowania u noworodków grupy II-ej.

W badanej grupie było 79 noworodków płci męskiej (52,7%) oraz 71 noworodków płci żeńskiej (47,3%).

Grupę III, kontrolną stanowiło 30 zdrowych noworodków, urodzonych drogami i siłami natury po prawidłowo przebiegającej ciąży, trwającej powyżej 37 tygodni. W tabeli 4 przedstawiono wartości dotyczące urodzeniowej masy ciała i wieku płodowego pacjentów w grupie kontrolnej.

Badane noworodki (n=150)	Średnia	Mediana	Minimum	Maximum	Odchylenie standardowe
Urodzeniowa masa ciała (g)	3335,0	3315,0	2500,0	4650,0	565,16
Wiek płodowy (tyg.cięży)	39,2	39,0	37,0	40,0	1,18

Tabela 4. Rozkład urodzeniowej masy ciała i wieku płodowego noworodków w grupie kontrolnej.

W badanej grupie było 16 noworodków płci żeńskiej (53,3%) oraz 14 noworodków płci męskiej (46,7%).

U noworodków w grupie I i II posocznicę diagnozowano na podstawie następujących badań biochemicznych: morfologia krwi obwodowej ze szczególnym uwzględnieniem leukocytozy oraz liczby płytek krwi, stężenie prokalcytoniny, białka C-reaktywnego oraz interleukiny-6 w surowicy krwi. Ponadto oznaczano poziom elektrolitów w surowicy krwi oraz równowagę kwasowo-zasadową krwi tętniczej lub kapilarnej. W każdym przypadku wykonywano również badanie bakteriologiczne krwi. W zależności od współtowarzyszących objawów klinicznych dodatkowo badano

bakteriologicznie mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy oraz treść zaaspirowaną z oskrzeli (BAL). U każdego dziecka w chwili wstępnego ustalenia rozpoznania posocznicy, wykonywano pomiar aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi.

W grupie kontrolnej oznaczono jedynie aktywność antytrombiny III i białka C. Krew do badań pobierana była w 1 dobie życia przy okazji badania grupy krwi, które rutynowo wykonuje się w klinice u wszystkich dzieci urodzonych przez matki z grupą krwi „0”.

Aktywność antytrombiny III i białka C oznaczana była za pomocą koagulometru Chrom-7 firmy Bio-ksel z użyciem odczynników tej firmy. Jest to półautomatyczny aparat, którego zakres pomiarowy wynosi od 1 do 999 %, rozdzielczość 1 % i dokładność 1 %. Pomiar aktywności antytrombiny III i białka C wykonywany jest przy użyciu substratów chromogennych z zastosowaniem pomiaru kinetyki reakcji kalorymetrycznej. Ilość surowicy potrzebna do badania wynosi 120 µl. Krew w ilości 1,4 ml potrzebną do oznaczenia aktywności antytrombiny III i białka C pobierano do probówki z podłożem zawierającym 3,2% cytrynian sodu, następnie powoli mieszano celem uniknięcia hemolizy. Materiał odwirowywano przez 10 minut z szybkością 2000 obrotów/minutę. Następnie objętość 20 µl surowicy rozcieńczano w 600 µl soli fizjologicznej i do tak rozcieńczonego roztworu o objętości 50 µl dodawano identyczną objętość odczynnika zawierającego trombinę. Zawartość trombiny w 1 ml tego odczynnika wynosi nie mniej niż 10 U. Następnie roztwór trombiny i rozcieńczonej surowicy inkubowano przez 60 sekund w temperaturze 37° C. W kolejnym etapie badania do inkubowanego roztworu dodawano 50 µl substratu chromogenego i ostatecznie wykonywano pomiar aktywności antytrombiny III. Z kolei do oznaczania aktywności białka C zużywano 100 µl surowicy, którą w pierwszym etapie oznaczania mieszano z 300 µl rozcieńczalnika. Następnie do 50 µl uzyskanego roztworu dodawano identyczną objętość aktywatora zawierającego białko

pochodzące z jadu żmiji *Agkistrodon c. Contortrix*. Uzyskany roztwór inkubowano w temperaturze 37° C przez 5 minut. W kolejnym etapie badania dostrzykiwano 50 µl substratu chromogennego i wykonywano pomiar.

Do oznaczania prokalcytoniny w surowicy krwi zastosowano półilościowy test płytkowy firmy BRAHMS. W teście tym wykorzystuje się metodę immunochromatografii pozwalającą na określenie następujących zakresów poziomów prokalcytoniny w surowicy: od 0 do 0,5; od 0,5 do 2; od 2 do 10 oraz powyżej 10 ng/ml. Ilość materiału potrzebnego do wykonania badania wynosiła 200 µl surowicy krwi, co stanowiło 6 kropli. Za wynik dodatni potwierdzający rozpoznanie sepsy przyjmowano wartości powyżej 10 ng/ml.

Stężenie interleukiny 6 w surowicy krwi oznaczano przy pomocy immunoenzymatycznego, chemiluminescencyjnego, sekwencyjnego testu kanapkowego fazy stałej firmy DPC Biemann GmbH w Medycznym Centrum Laboratoryjnym Diagnostyka. Wartość interleukiny 6 w surowicy krwi powyżej 10 pg/ml uznawano się za przekraczające zakres normy.

Równowagę kwasowo-zasadową we krwi tętniczej lub kapilarnej noworodków badano za pomocą aparatu Rapidlab firmy Chiron Diagnostics.

Badania morfologii krwi obwodowej, poziomu elektrolitów w surowicy krwi, stężenia białka C-reaktywnego, aktywności układu krzepnięcia oraz badanie płynu mózgowo rdzeniowego a także moczu wykonywano w Pracowni Zakładu Diagnostyki Biochemicznej Szpitala Uniwersyteckiego według obowiązujących standardów europejskich. Wartość stężenia białka C-reaktywnego przekraczająca 7 ng/ml była uznawana za wynik dodatni. Wynik badania morfologii krwi obwodowej uznawano za nieprawidłowy gdy liczba leukocytów wynosiła poniżej 4 000/mm³ lub powyżej 20 000/mm³. W przypadku płytek krwi dolna wartość uznawana za prawidłową wynosiła 100 000/mm³.

Badania bakteriologiczne zarówno krwi jak i płynu mózgowo rdzeniowego oraz popłuczyn z oskrzeli a także moczu wykonywane były w Zakładzie Diagnostyki, Pracowni Bakteriologii Szpitala Uniwersyteckiego według obowiązujących standardów. Celem wykonania badania bakteriologicznego krew pobierano do probówek zawierających odpowiednie podłoża transportowe zarówno dla bakterii tlenowych jak i beztlenowych. W przypadku noworodków nieleczonych antybiotykami pobierano 0,5 do 1 ml krwi. Natomiast w wypadku równocześnie stosowanej antybiotykoterapii oraz u dzieci bez objawów posocznicy, ale w obecności czynników ryzyka infekcji pobieraną objętość krwi zwiększano do 2 ml. Wynik badania bakteriologicznego krwi uznawano za jałowy, jeśli w ciągu 72 godzin nie zaobserwowano wzrostu bakterii.

Leczenie posocznicy prowadzono według zasad opisywanych w Rekomendacjach Postępowania w Medycynie Perinatalnej (119). U żadnego z noworodków włączonych do analizy nie stosowano preparatów antytrombiny III i /lub białka C.

3.1. Metody statystyczne.

Do sprawdzenia hipotezy dotyczącej rozkładów antytrombiny III i białka C użyto nieparametrycznego testu zgodności chi-kwadrat.

Model analizy wariancji (ANOVA) i dokładny dwustronny test Fischera zastosowano w celu zbadania występowania ewentualnych różnic między wartościami oczekiwanymi w wyszczególnionych podgrupach. Dodatkowo testem Bracketta analizowano hipotezę o równości wariancji w poszczególnych podgrupach. Ponieważ jednym z warunków stosowania testu Fischera jest spełnienie hipotezy o równości wartości oczekiwanych w grupach, w przypadku jej braku, wyszukiwano istotne statystycznie

różnice między wartościami oczekiwanymi w każdej parze wygenerowanej z danych grup. W tym celu zastosowano test Scheffe.

Jeśli założenia analizy wariancji nie były spełnione (tzn. próba nie pochodziła z populacji o rozkładzie normalnym i między grupami występowała jednakowa wariancja) hipotezę o jednorodności rozkładów między poszczególnymi grupami badano testem nieparametrycznymi Kruskala-Walissa. W przypadku, gdy hipoteza o jednorodności rozkładów była odrzucona, testem Manna-Whitneya analizowano jednorodność rozkładów w każdej parze.

Do badania wpływu wybranych czynników tj. antytrombiny III i białka C na zmienną typu dychotomicznego (np. zgon lub przeżycie; wystąpienie posocznicy lub nie wystąpienie) wykorzystano metody analizy regresji logistycznej.

Zmienność występowania antytrombiny III i białka C zbadano przy użyciu metod analizy regresji.

Ponadto zastosowano techniki metod opisowych w postaci tabeli, rycin i wykresów.

Do oceny przyjęto poziom istotności $p=0,05$.

Wszystkie analizy statystyczne wykonywano w programie STATISTICA 6.0 dla programu Windows.

4. Wyniki.

4.1. Aktywność antytrombiny III i białka C w surowicy krwi u dzieci w grupie kontrolnej i u noworodków diagnozowanych w kierunku posocznicy wrodzonej.

Grupę I podzielono w zależności od stanu klinicznego noworodków oraz uzyskanych wyników badań bakteriologicznych lub biochemicznych krwi na następujące trzy podgrupy:

- Podgrupa A – stanowiła 110 noworodków, u których na podstawie stanu klinicznego oraz wyników bakteriologicznego i biochemicznego badania krwi wykluczono wstępne rozpoznanie posocznicy wrodzonej.
- Podgrupa B – licząca 25 noworodków, u których rozpoznano posocnicę wrodzoną. U tych dzieci wystąpiły odchylenia od normy w zakresie objawów klinicznych oraz uzyskano dodatni wynik hodowli bakteriologicznej krwi.
- Podgrupa C – w skład, której wchodziło 15 noworodków, u których nie uzyskano bakteriologicznego potwierdzenia uogólnionego zakażenia. Jednak stwierdzone nieprawidłowości zarówno w stanie klinicznym jak i w wynikach badań laboratoryjnych krwi pozwoliły rozpoznać zespół uogólnionej odpowiedzi zapalnej.

W związku ze zbyt małą liczebnością pacjentów w podgrupie C a także z uzyskaniem porównywalnych wartości dotyczących aktywności zarówno antytrombiny III jak i białka C z analogicznymi danymi w podgrupie B, zdecydowano o połączeniu wyników uzyskanych w obu podgrupach i dalszym analizowaniu ich jako całości. W ten sposób powstała podgrupa B, w której znalazły się wszystkie noworodki z posocnicą wrodzoną rozpoznaną na podstawie objawów klinicznych i wyników badań biochemicznych.

Ostateczny podział grupy I-ej przedstawiał się następująco:

- **Podgrupa A** – stanowiła 110 noworodków, u których na podstawie stanu klinicznego oraz wyników bakteriologicznego i biochemicznego badania krwi wykluczono wstępne rozpoznanie posocznicy wrodzonej.
- **Podgrupa B** – zawierająca 40 noworodki z posocznicą wrodzoną rozpoznaną na podstawie objawów klinicznych i wyników badań biochemicznych, niezależnie od uzyskanych wyników badań bakteriologicznych krwi.

Wyniki pomiarów aktywności antytrombiny III i białka C uzyskane w grupie kontrolnej (III) oraz w podgrupach A i B grupy I-ej przedstawia tabela 5 i 6.

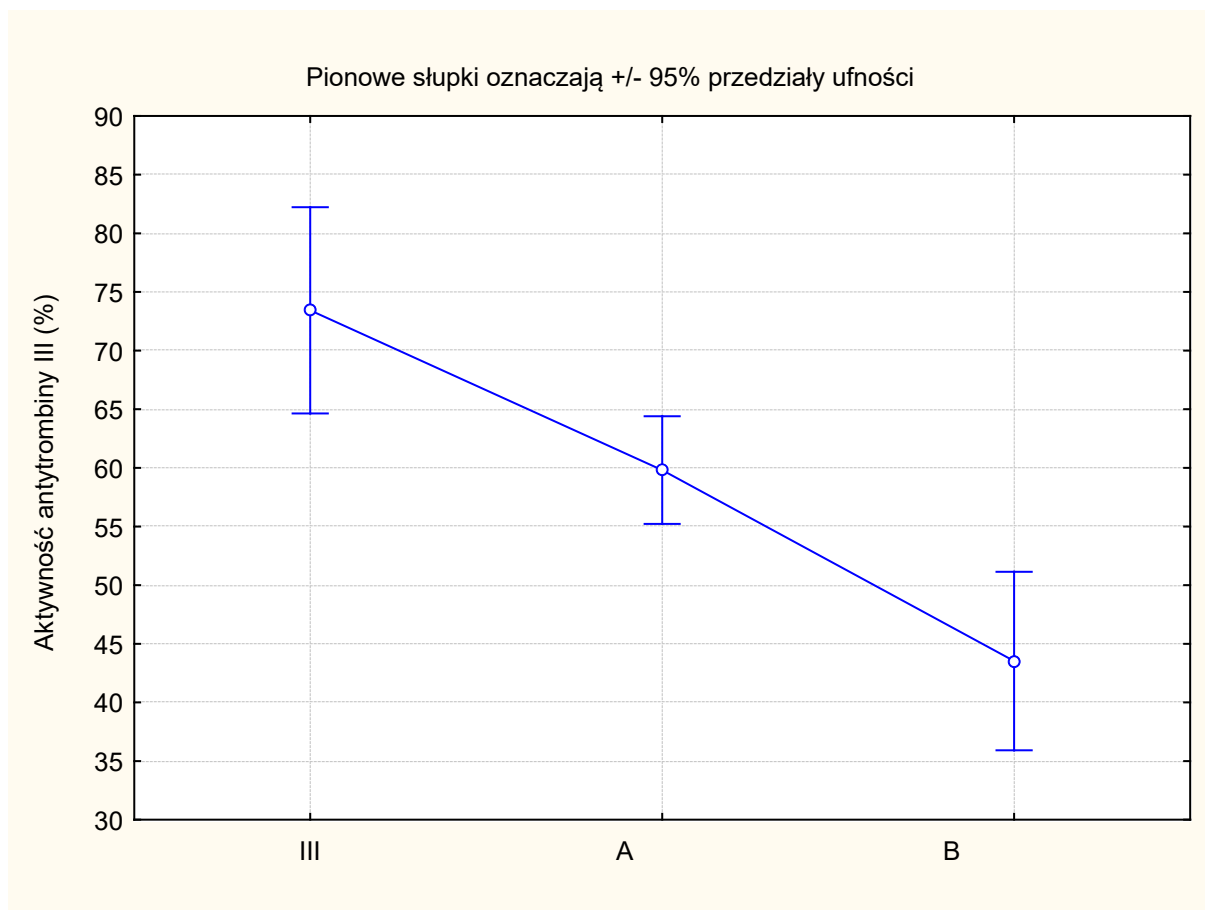
Antytrombina III (%)	N	Średnia	Odch. stand.	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Grupa kontrolna	30	73,4	14,2	202,9	46,0	97,0	76,5
Podgrupa A grupy I-ej	110	59,8	24,6	604,7	14,0	140,0	56,0
Podgrupa B grupy I-ej	40	43,5	29,3	858,5	5,0	162,0	36,5

Tabela 5. Aktywność antytrombiny III w surowicy krwi u dzieci w grupie kontrolnej oraz u noworodków podgrupach A i B grupy I-ej.

Białko C (%)	N	Średnia	Odch. stand.	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Grupa kontrolna	30	34,9	9,5	90,6	22,0	63,0	33,5
Podgrupa A grupy I-ej	110	19,4	8,9	78,8	5,0	48,0	18,0
Podgrupa B grupy I-ej	40	14,0	8,9	79,3	3,0	42,0	11,5

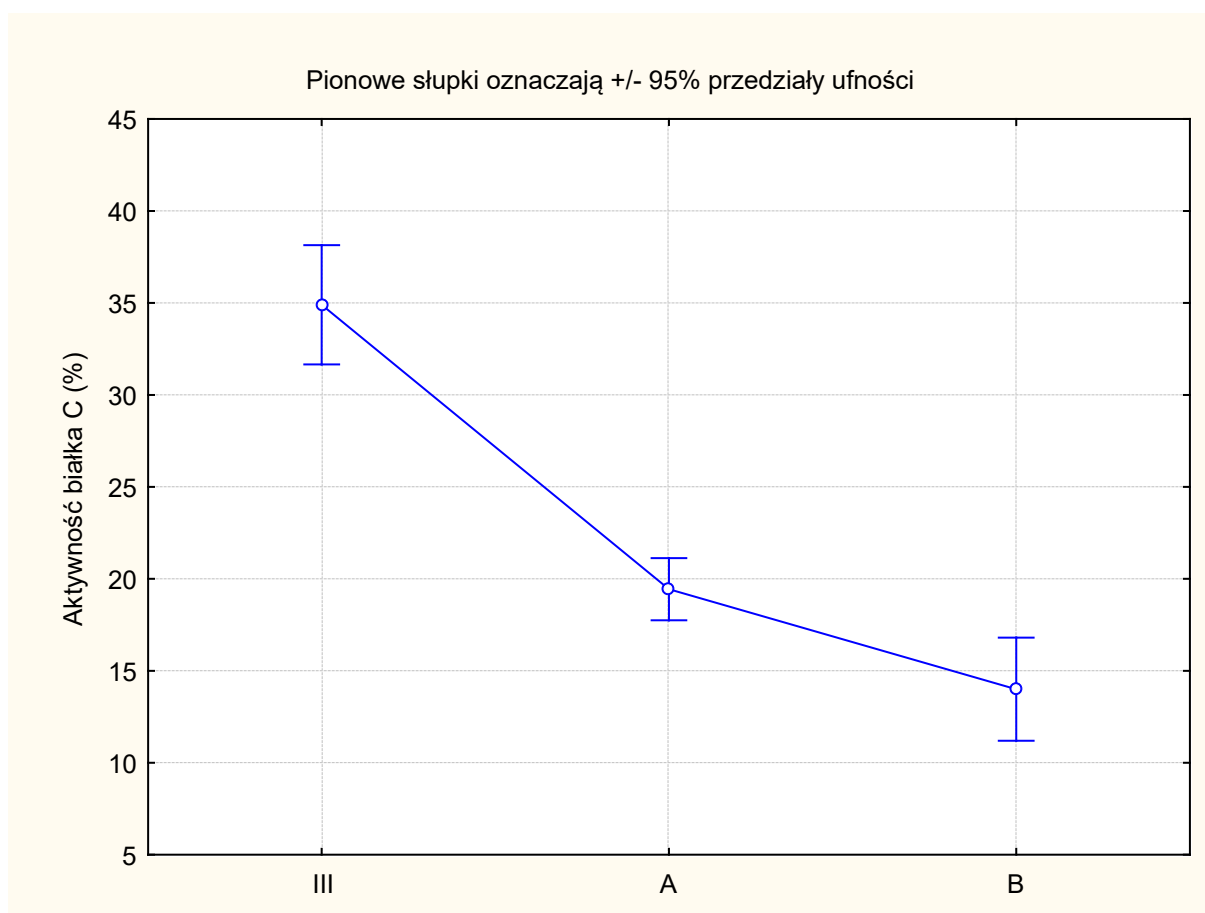
Tabela 6. Aktywność białka C w surowicy krwi u dzieci w grupie kontrolnej oraz u noworodków podgrupach A i B grupy I-ej.

Przeprowadzone porównanie aktywności antytrombiny III pomiędzy grupą kontrolną a obiema podgrupami dzieci wydzielonymi z grupy I-ej wykazało znamienne niższą aktywność antytrombiny III zarówno w podgrupie A jak i B w odniesieniu do wartości uzyskanych w grupie kontrolnej (odpowiednio dla podgrupy A wartość $p=0,027228$ i podgrupy B wartość $p=0,000006$). Ponadto, aktywność antytrombiny III w podgrupie B była statystycznie znamienne niższa w porównaniu do danych uzyskanych w podgrupie A ($p=0,001821$). W sposób graficzny przedstawiono to na wykresie 1.



Wykres 1. Porównanie wartości średnich aktywności antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków w grupie kontrolnej (III) oraz u dzieci w podgrupach A i B grupy I-ej.

Porównanie aktywności białka C pomiędzy grupą kontrolną a obiema podgrupami dzieci wydzielonymi z grupy I-ej wykazało znamienne niższą aktywność białka C zarówno w podgrupie A jak i B w odniesieniu do wartości uzyskanych w grupie kontrolnej (odpowiednio dla podgrupy A wartość $p < 0,0000001$ i podgrupy B wartość $p < 0,0000001$). Ponadto, aktywność białka w podgrupie B była statystycznie znamienne niższa w porównaniu do danych uzyskanych w podgrupie A ($p = 0,005487$). W sposób graficzny przedstawiono to na wykresie 2.



Wykres 2. Porównanie wartości średnich aktywności białka C w surowicy krwi u noworodków w grupie kontrolnej (III) oraz u dzieci w podgrupach A i B grupy I-ej.

4.2. Aktywność antytrombiny III i białka C w surowicy krwi u dzieci w grupie kontrolnej i u noworodków diagnozowanych w kierunku posocznicy nabytej.

W grupie II wydzielono, w zależności od stanu klinicznego noworodków oraz uzyskanych wyników badań bakteriologicznych lub biochemicznych krwi trzy, następujące podgrupy:

- Podgrupa A – liczyła 57 noworodki, u których na podstawie uzyskanych wyników badań bakteriologicznych i biochemicznych krwi, wykluczono rozpoznanie posocznicy nabytej.
- Podgrupa B – licząca 74 noworodki, u których stwierdzono odchylenia od normy w stanie klinicznym oraz uzyskano dodatni wynik badania bakteriologicznego krwi.
- Podgrupa C – w skład, której wchodziło 19 noworodków. W podgrupie tej rozpoznanie posocznicy oparto jedynie na obrazie klinicznym oraz wynikach badań biochemicznych. Natomiast nie uzyskano potwierdzenia rozpoznania w badaniu bakteriologicznym krwi.

W związku ze zbyt małą liczebnością w podgrupie C a także z uzyskaniem porównywalnych poziomów zarówno w przypadku aktywności antytrombiny III i białka C do analogicznych danych w podgrupie B, zdecydowano o połączeniu wyników dla obu podgrup i dalszym analizowaniu ich jako całości. W ten sposób powstała podgrupa B, w której znalazły się noworodki z posocznicą nabytą rozpoznaną na podstawie objawów klinicznych i wyników badań biochemicznych niezależnie od uzyskanego wyniku badania bakteriologicznego krwi.

Ostateczny podział grupy II-ej przedstawiał się, zatem następująco:

- **Podgrupa A** – licząca 57 noworodki, u których na podstawie uzyskanych wyników badań bakteriologicznych i biochemicznych krwi, wykluczono obecność posocznicy nabytej.
- **Podgrupa B** - zawierająca 93 noworodki z rozpoznaną posocznicą nabytą stwierdzoną na podstawie objawów klinicznych i wyników badań biochemicznych, niezależnie od uzyskanych wyników badań bakteriologicznych krwi.

Wyniki oznaczeń aktywności antytrombiny III i białka C uzyskane w grupie kontrolnej (III) oraz w podgrupach A i B grupy II-ej przedstawia tabela 7 i 8.

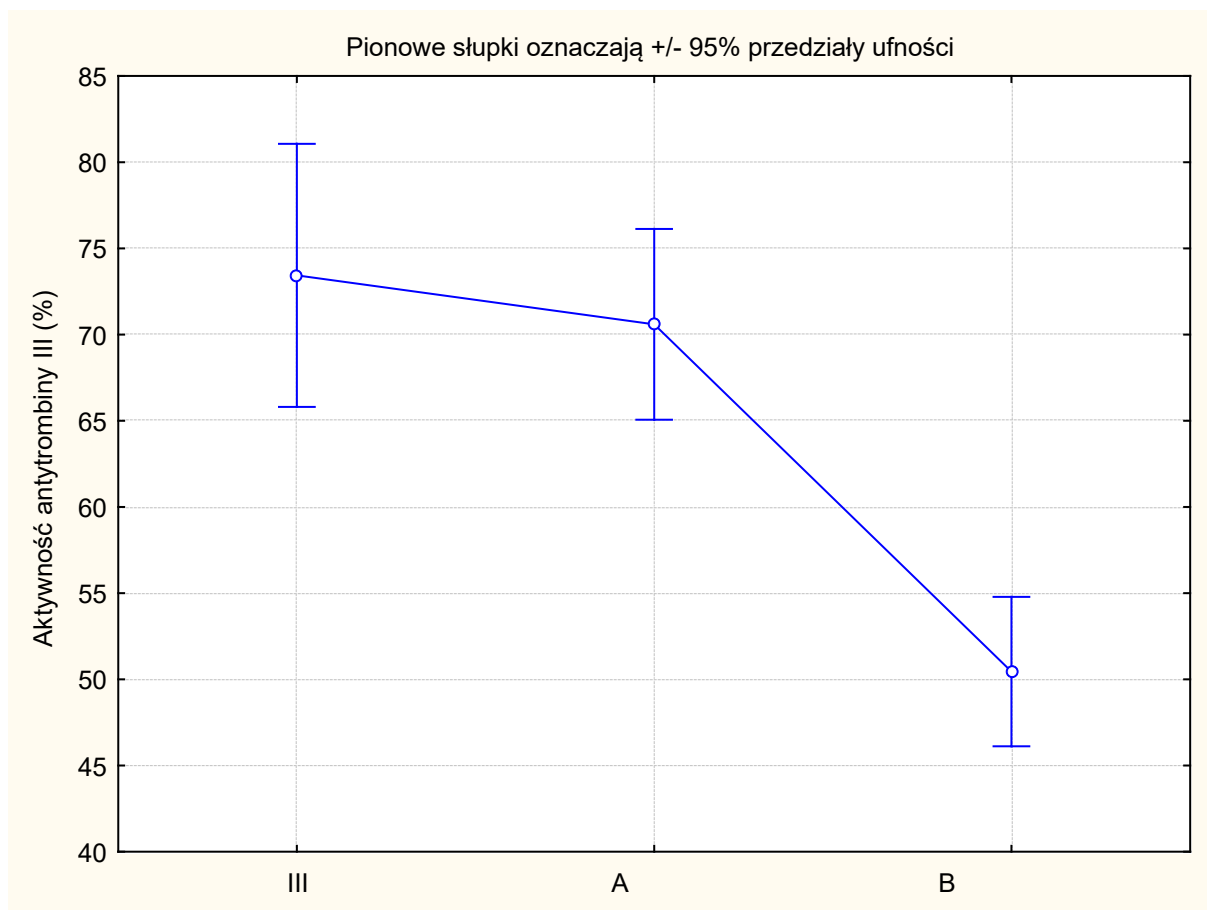
Antytrombina III (%)	N	Średnia	Odch. stand.	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Grupa kontrolna	30	73,4	14,2	202,8	46,0	97,0	76,5
Podgrupa A grupy II-ej	57	70,6	17,6	310,4	43,0	121,0	65,0
Podgrupa B grupy II-ej	93	50,4	24,7	609,5	6,0	105,0	48,0

Tabela 7. Aktywność antytrombiny III w surowicy krwi u dzieci w grupie kontrolnej oraz u noworodków podgrupach A i B grupy II-ej.

Białko C (%)	N	Średnia	Odch. stand	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Grupa kontrolna	30	34,9	9,5	90,5	22,0	63,0	33,5
Podgrupa A grupy II-ej	57	26,1	11,5	132,9	11,0	82,0	24,0
Podgrupa B grupy II-ej	93	17,9	9,5	90,5	2,0	57,0	17,0

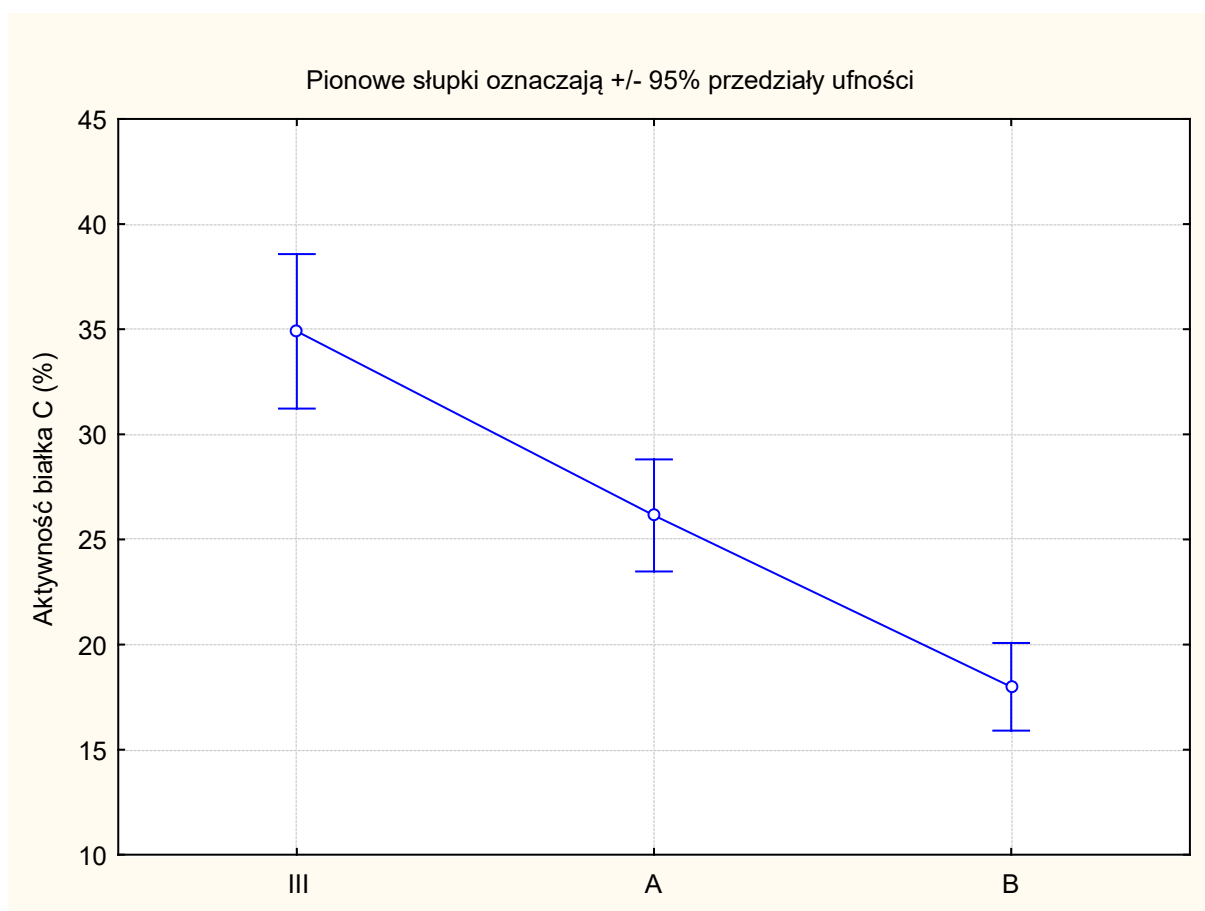
Tabela 8. Aktywność białka C w surowicy krwi u dzieci w grupie kontrolnej oraz u noworodków w podgrupach A i B grupy II-ej.

Przeprowadzone porównanie aktywności antytrombiny III pomiędzy grupą kontrolną a obiema podgrupami dzieci wydzielonymi z grupy II-ej wykazało znamienne niższą aktywność antytrombiny III w podgrupie B w odniesieniu do wartości uzyskanych w grupie kontrolnej, natomiast nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic w aktywności antytrombiny III pomiędzy podgrupą A a grupą kontrolną (odpowiednio dla podgrupy B wartość $p=0,000004$ i podgrupy A wartość $p=0,838$). Aktywność antytrombiny III w podgrupie B była statystycznie znamienne niższa w porównaniu do danych uzyskanych w podgrupie A ($p<0,0000001$). W sposób graficzny przedstawiono to na wykresie 3.



Wykres 3. Porównanie wartości średnich aktywności antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków w grupie kontrolnej (III) oraz u dzieci w podgrupach A i B grupy II-ej.

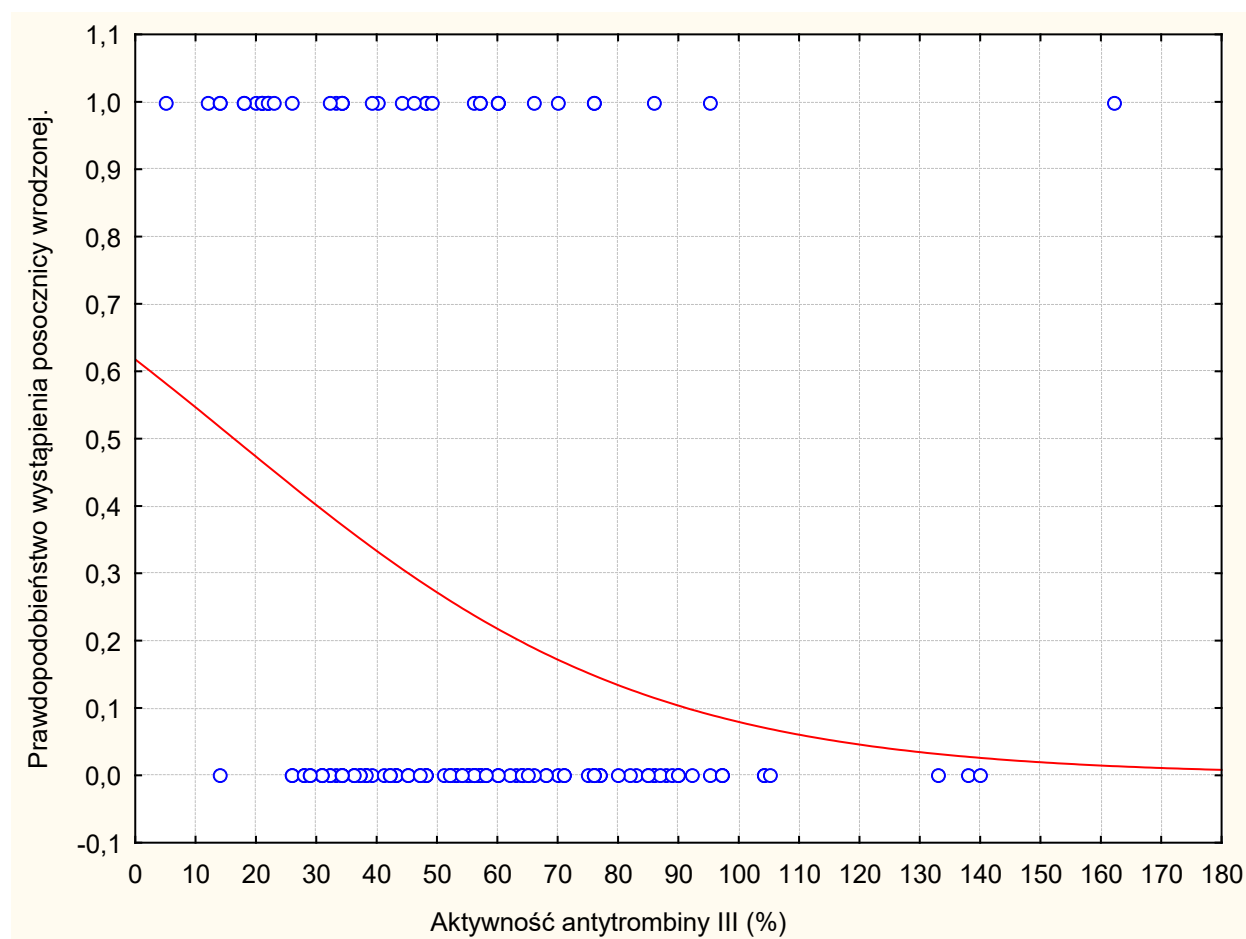
Z kolei porównanie aktywności białka C pomiędzy grupą kontrolną a obiema podgrupami dzieci wydzielonymi z grupy II-ej wykazało statystycznie znamienne niższą aktywność białka C zarówno w podgrupie A jak i B w odniesieniu do wartości uzyskanych w grupie kontrolnej (odpowiednio dla podgrupy A wartość $p < 0,0000001$ i podgrupy B wartość $p < 0,0000001$). Ponadto, aktywność białka C w podgrupie B była statystycznie znamienne niższa w porównaniu do podgrupy A ($p = 0,000024$). W sposób graficzny przedstawiono to na wykresie 4.



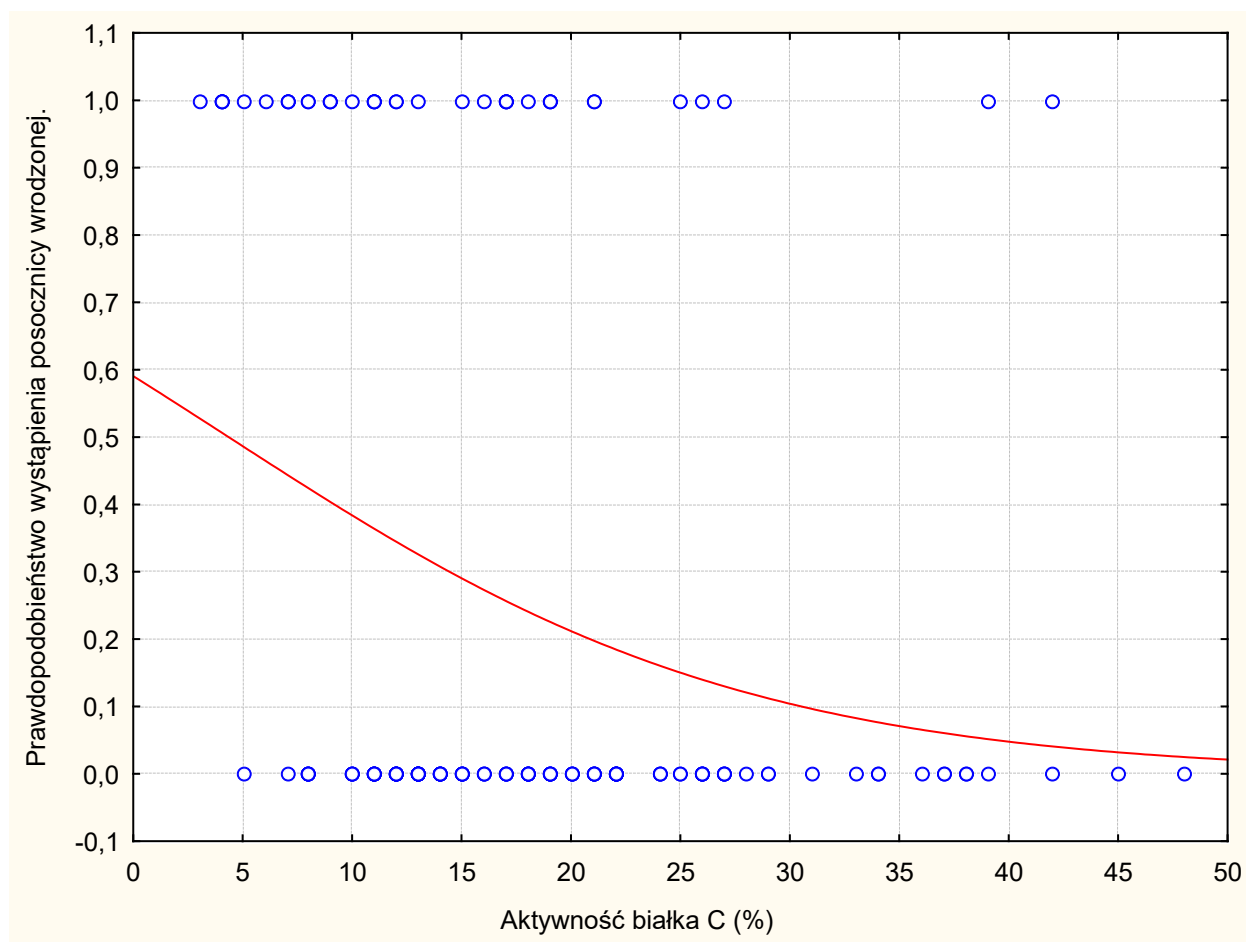
Wykres 4. Porównanie wartości średnich aktywności białka C w surowicy krwi u noworodków w grupie kontrolnej (III) oraz u dzieci w podgrupach A i B grupy II-ej.

4.3. Prawdopodobieństwo wystąpienia posocznicy wrodzonej (Grupa I) w zależności od aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi.

W grupie I-iej, czyli u 150 noworodków diagnozowanych w kierunku posocznicy wrodzonej, na podstawie przeprowadzonej analizy regresji logistycznej stwierdzono znamiennej statystycznie zależność pomiędzy poziomem aktywności antytrombiny III w surowicy krwi, a prawdopodobieństwem wystąpienia posocznicy ($p=0,00167$). Podobną statystycznie znamiennej zależność stwierdzono w przypadku aktywności białka C w surowicy krwi ($p=0,00244$). W sposób graficzny przedstawiono to na wykresach 5 i 6.



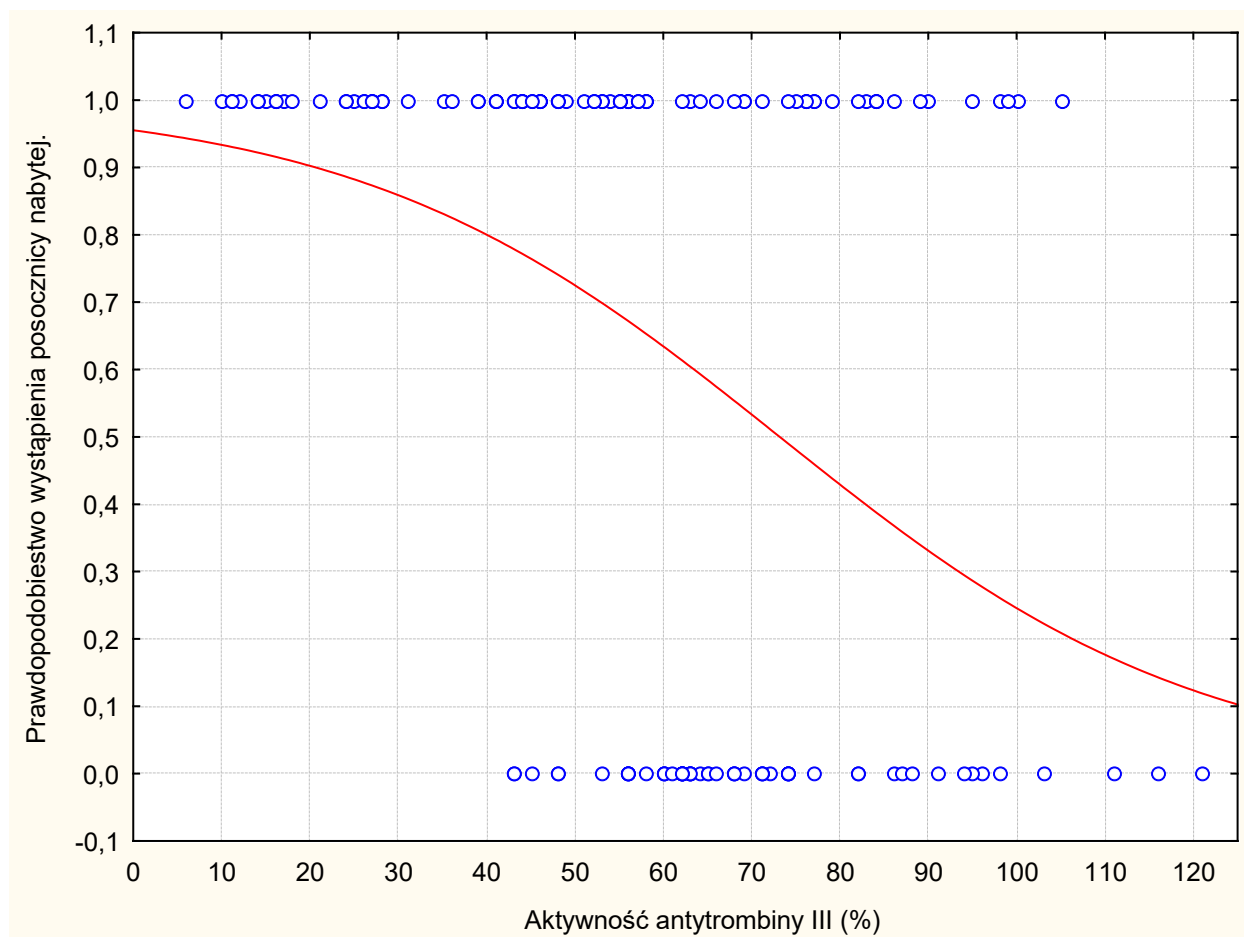
Wykres 5. Prawdopodobieństwo wystąpienia posocznicy wrodzonej w zależności od poziomu aktywności antytrombiny III w surowicy krwi.



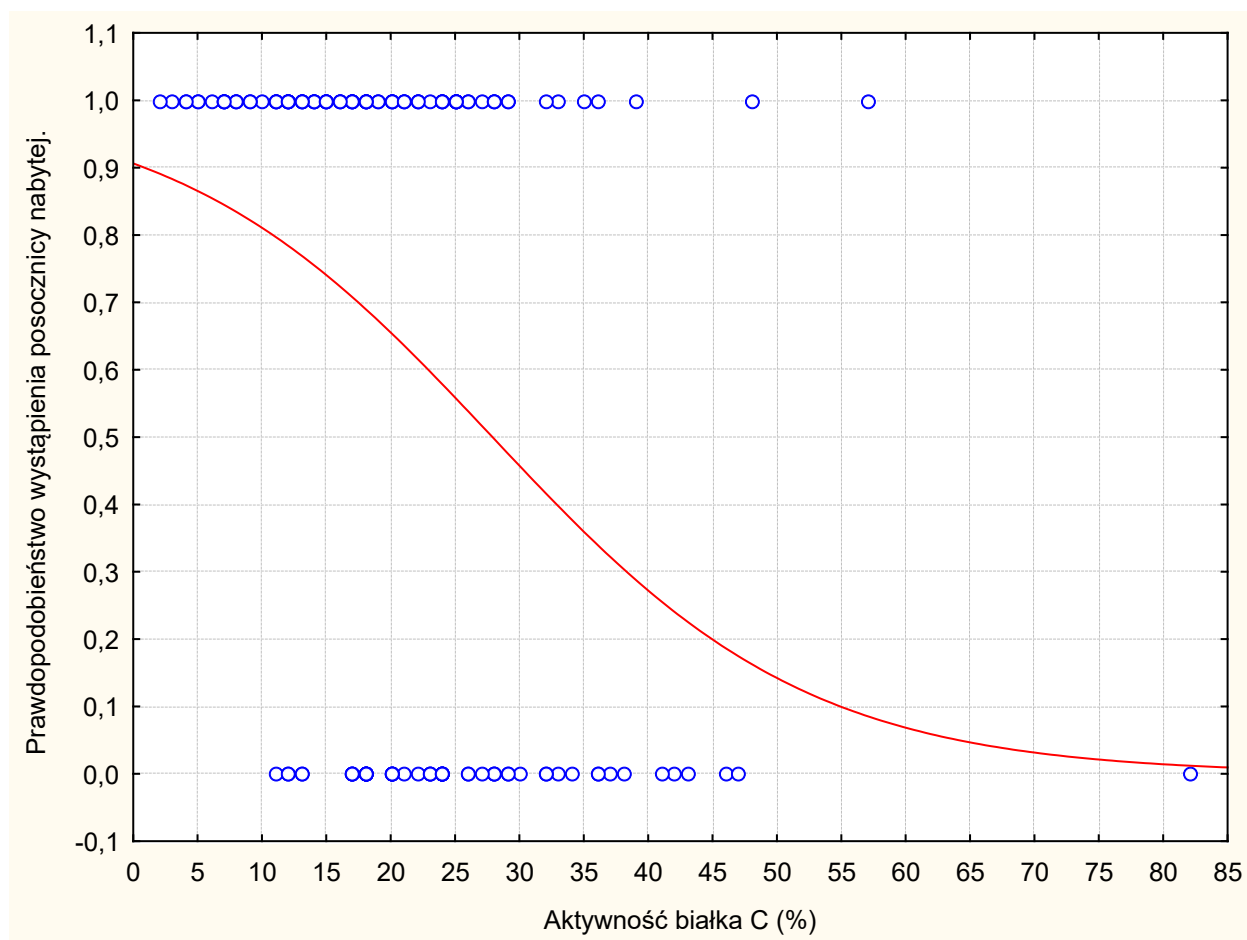
Wykres 6. Prawdopodobieństwo wystąpienia posocznicy wrodzonej w zależności od poziomu aktywności białka C w surowicy krwi.

4.4. Prawdopodobieństwo wystąpienia posocznicy nabytej (Grupa II) w zależności od aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi.

W grupie II-ej, czyli u 150 noworodków diagnozowanych w kierunku posocznicy nabytej, na podstawie przeprowadzonej analizy regresji logistycznej stwierdzono znamiennej statystycznie zależność pomiędzy wystąpieniem posocznicy a poziomem aktywności antytrombiny III ($p=0,00001$). Podobną zależność zaobserwowano także w odniesieniu do aktywności białka C w surowicy krwi ($p=0,00011$). W sposób graficzny przedstawiono to na wykresach 7 i 8.



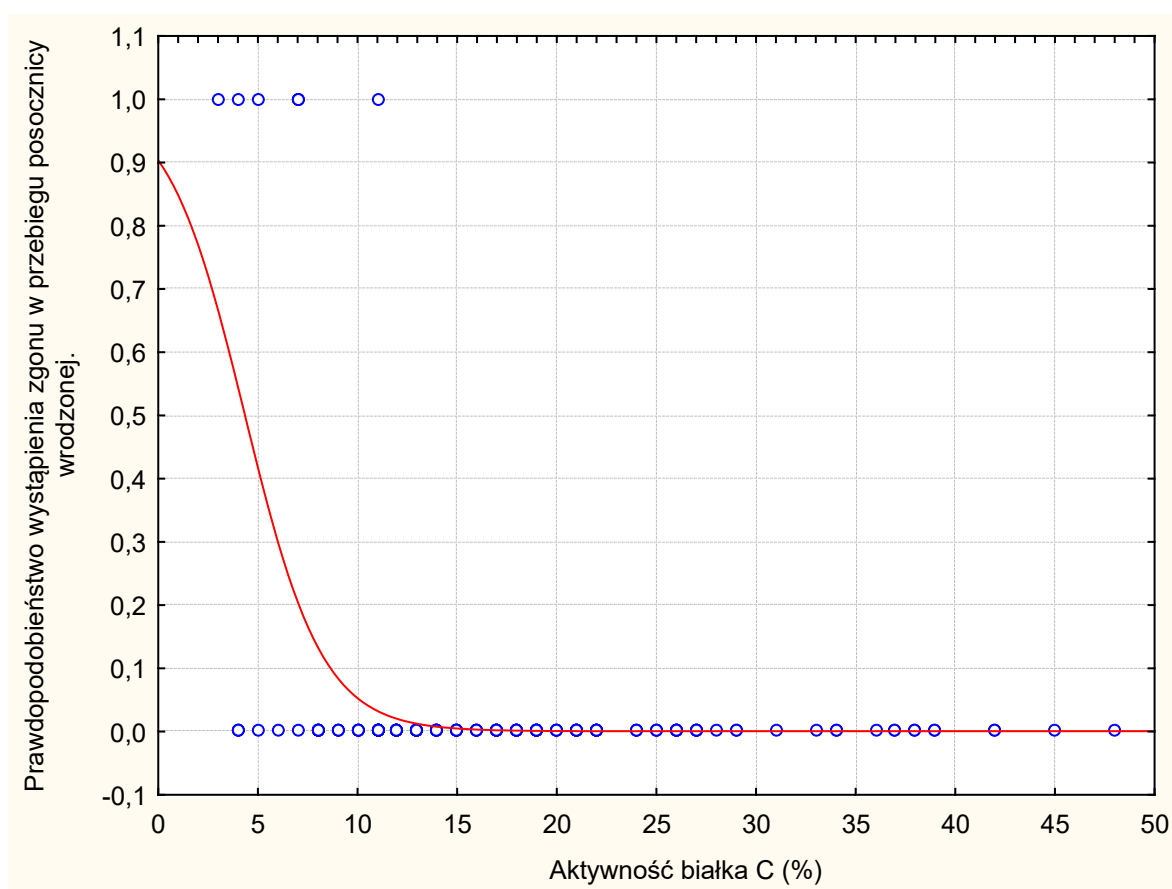
Wykres 7. Prawdopodobieństwo wystąpienia posocznicy nabytej w zależności od poziomu aktywności antytrombiny III w surowicy krwi.



Wykres 8. Prawdopodobieństwo wystąpienia posocznicy nabytej w zależności od poziomu aktywności białka C w surowicy krwi.

4.5. Zależność pomiędzy aktywnością antytrombiny III i białka C w surowicy krwi, a rokowaniem w przebiegu posocznicy wrodzonej (Grupa I).

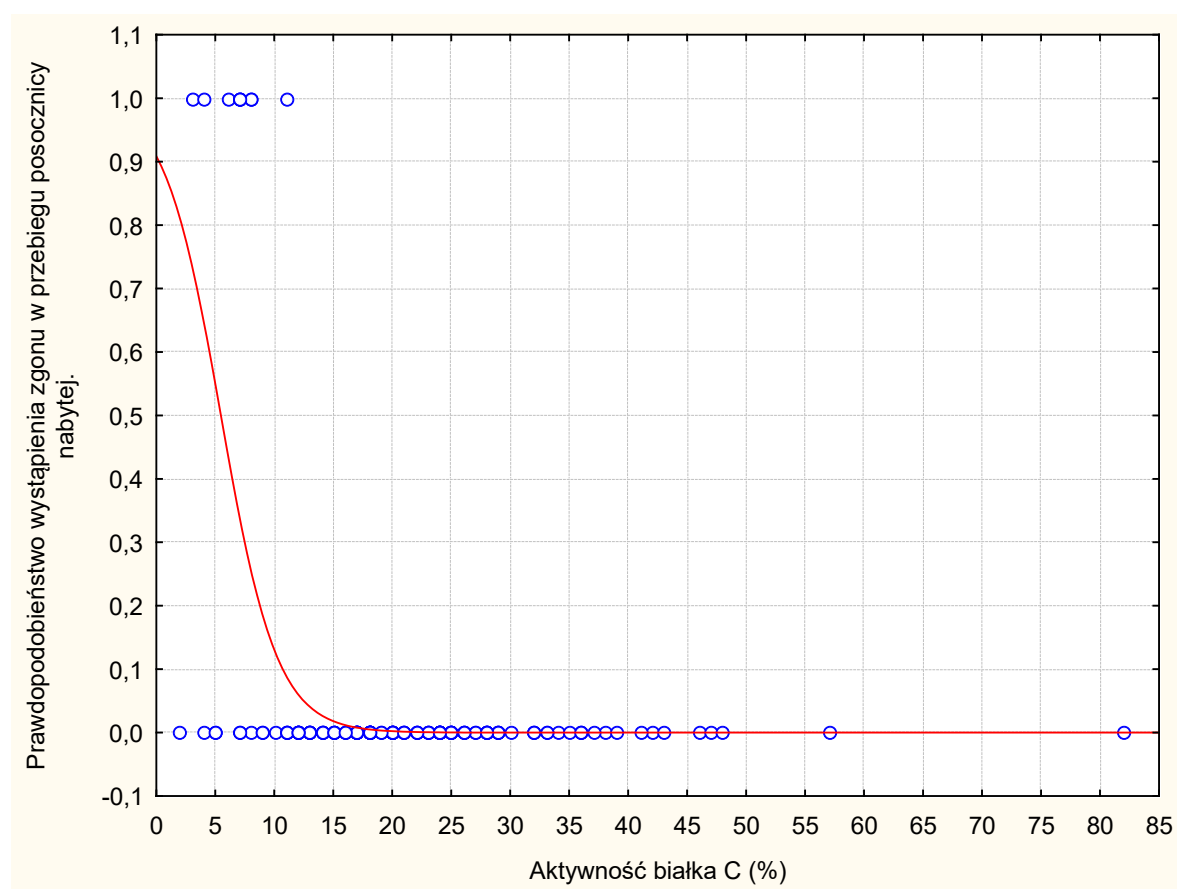
W grupie I wśród przypadków z niepotwierdzonym wstępnym rozpoznaniem posocznicy wrodzonej (podgrupa A) wszystkie noworodki przeżyły, dlatego wyników uzyskanych w tej grupie nie brano pod uwagę przy dalszej analizie. Natomiast w podgrupie B stwierdzono 7 zgonów. W tej podgrupie liczącej 40 noworodków wykazano znamiennej statystycznie zależność pomiędzy aktywnością białka C w surowicy krwi, a wystąpieniem zgonu ($p=0,00179$). W sposób graficzny przedstawiono to na wykresie 9. Takiej zależności nie stwierdzono w odniesieniu do aktywności antytrombiny III.



Wykres 9. Zależność pomiędzy aktywnością białka C w surowicy krwi a rokowaniem w przebiegu posocznicy wrodzonej.

4.6. Zależność pomiędzy aktywnością antytrombiny III i białka C w surowicy krwi, a rokowaniem w przebiegu posocznicy nabytej (Grupa II).

Z analizy statystycznej przeprowadzonej w grupie II-iej wykluczono 57 noworodków (podgrupa A) z niepotwierdzoną posocznicą nabytą, wśród których nie stwierdzono zgonu. Dalszym obliczeniom poddano podgrupę B liczącą 93 noworodki, w której stwierdzono 9 zgonów. Wśród badanych noworodków stwierdzono statystycznie znamiennej zależność pomiędzy aktywnością białka C w surowicy krwi, a prawdopodobieństwem wystąpienia zgonu ($p=0,00165$). W sposób graficzny przedstawiono to na wykresie 10. Nie stwierdzono natomiast takiej zależności w tej podgrupie noworodków w odniesieniu do aktywności antytrombiny III.



Wykres 10. Prawdopodobieństwo wystąpienia zgonu w zależności od poziomu aktywności białka C w surowicy krwi w przebiegu posocznicy nabytej.

4.7. Aktywność antytrombiny III i białka C w surowicy krwi rokowanie w przebiegu posocznicy (Grupa I i II).

Aby ocenić czy aktywność antytrombiny III i białka C ma wpływ na rokowanie w tej jednostce chorobowej analizą objęto 133 pacjentów z grupy I-ej i II-ej, u których rozpoznano bądź posocznicę wrodzoną bądź nabytą. W zależności od rokowania podzielono pacjentów na dwie podgrupy:

- a) przeżycia - podgrupa licząca 117 noworodków,
- b) zgony - podgrupa zawierająca 16 noworodków-przyczyną zgonu była posocznica, potwierdzona na podstawie wyniku badania sekcyjnego .

Oznaczenia aktywności antytrombiny III i białka C uzyskane u noworodków z posocznicą w zależności od rokowania przedstawiają tabele 9 i 10.

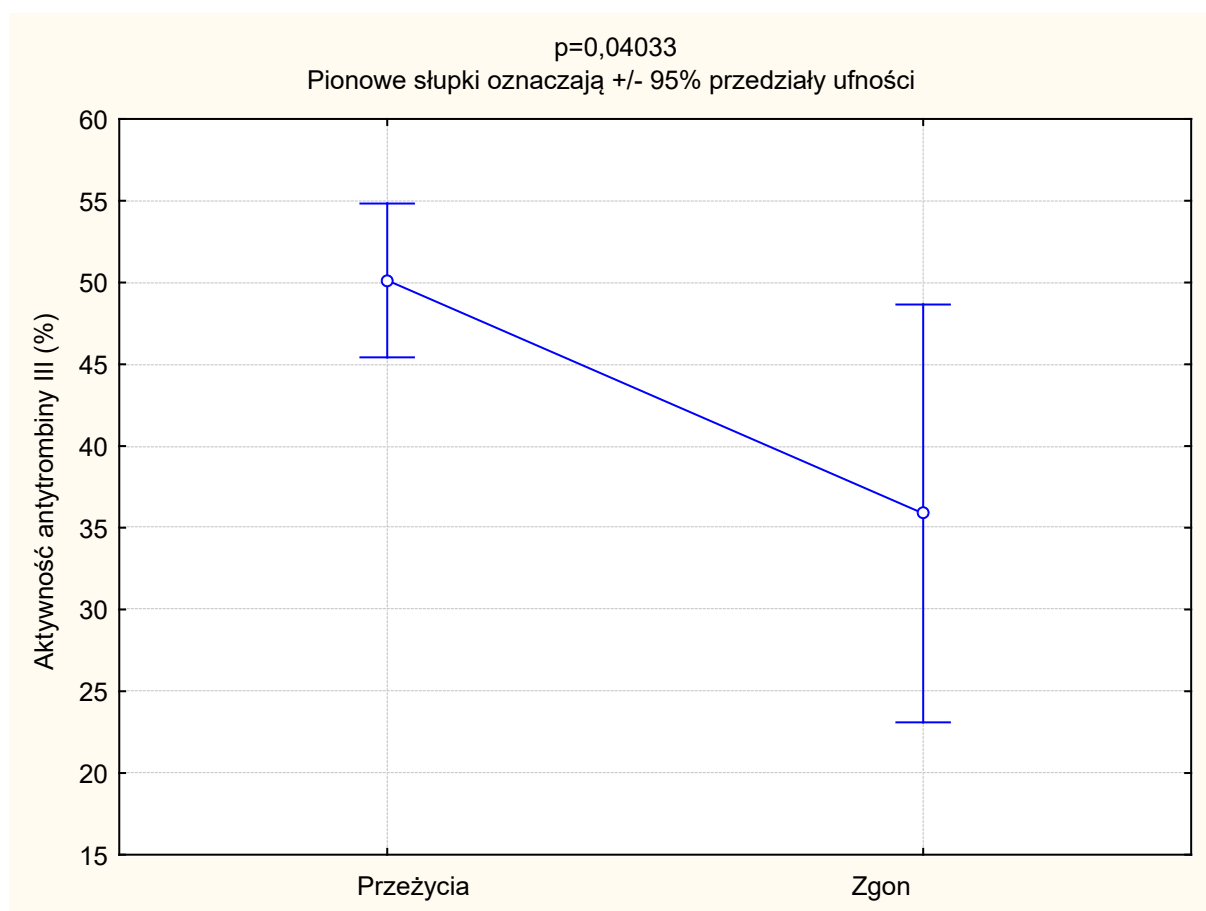
Antytrombina III (%)	N	Średnia	Odch. stand	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Przeżycia	117	50,1	26,4	694,9	6,0	162,0	48,0
Zgon	16	35,9	21,3	452,9	5,0	70,0	33,5

Tabela 9. Aktywności antytrombiny III noworodków surowicy krwi u noworodków z rozpoznaną posocznicą a rokowanie w tej jednostce chorobowej.

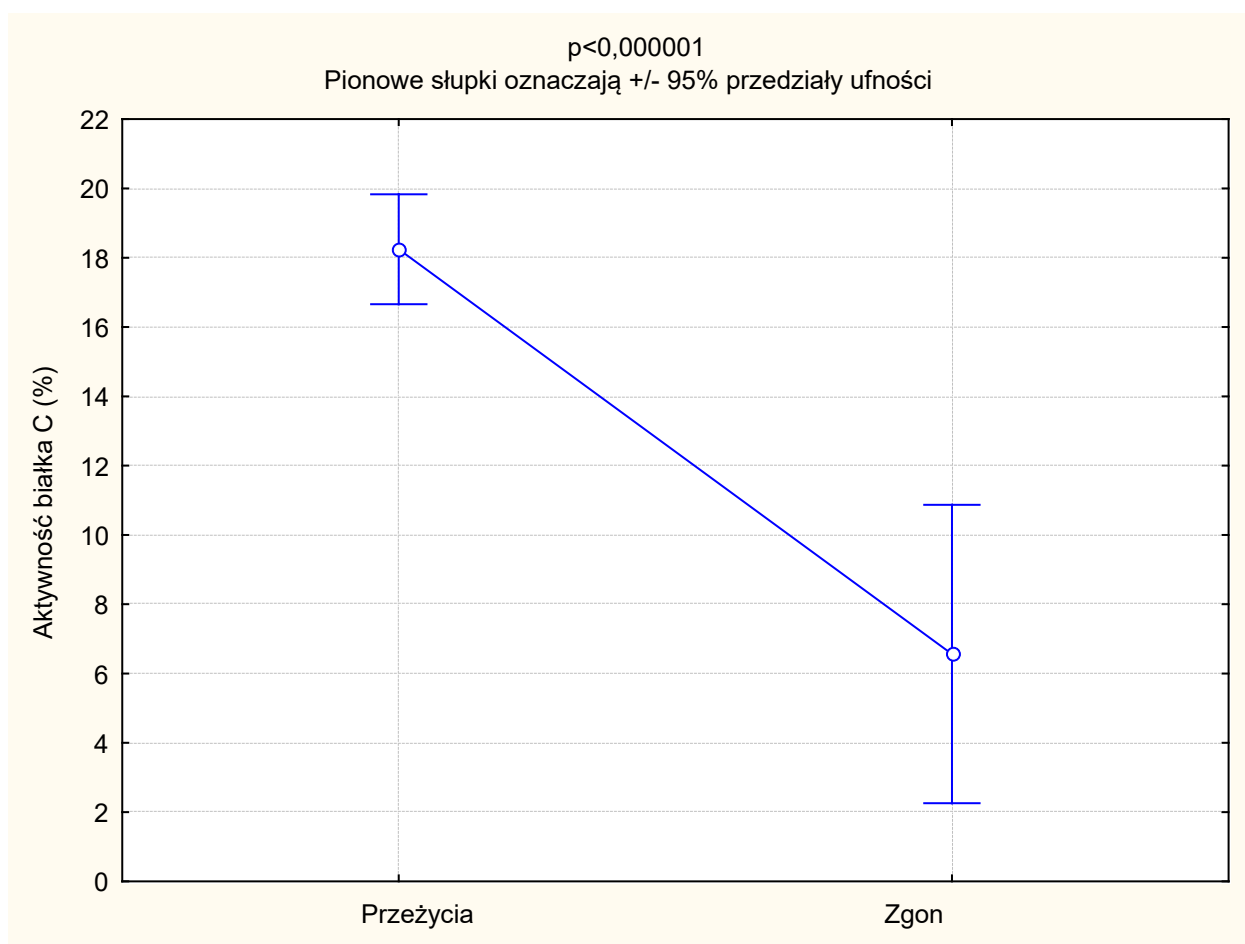
Białko C (%)	N	Średnia	Odch. stand	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Przeżycia	117	18,3	9,2	84,8	2,0	57,0	17,0
Zgon	16	6,6	2,4	5,7	3,0	11,0	7,0

Tabela 10. Aktywności białka C w surowicy krwi u noworodków z posocznicą a rokowanie w tej jednostce chorobowej.

U noworodków, które zmarły z powodu posocznicy stwierdzono w surowicy krwi statystycznie znamienne niższą aktywność zarówno antytrombiny III ($p=0,04033$) jak również i białka C ($p<0,00001$) w porównaniu do dzieci, które przeżyły. W sposób graficzny przedstawiono to na wykresach 11 i 12.



Wykres 11. Porównanie wartości średnich dotyczących aktywności antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków z posoczną w zależności od rokowania.



Wykres 12. Porównanie wartości średnich dotyczących aktywności białka C w surowicy krwi u noworodków z posocznicą w zależności od rokowania.

Następnie podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy podobne zależności pomiędzy rokowaniem w posocznicy a aktywnością antytrombiny III i białka C występują w posocznicy wrodzonej i odrębnie w posocznicy nabytej.

4.8. Aktywność antytrombiny III i białka C w surowicy krwi w zależności od rokowania w przebiegu posocznicy wrodzonej (Grupa I).

W tabeli 11 przedstawione zostały rodzaje bakterii, które spowodowały posocnicę wrodzoną o bardzo ciężkim przebiegu prowadzącą do wystąpienia zgonu.

Posocznica wrodzona (n=40)	Zgony (n=7)	
Etiologia Gram dodatnia (n=12)	Streptococcus beta	1
Etiologia Gram ujemna (n=13)	E.coli	2
	Klebsiella pneumoniae	1
	Acinetobacter bowmanii	1
Brak potwierdzenia bakteriologicznego (n=15)		2

Tabela 11. Etiologia posocznicy wrodzonej ze szczególnym uwzględnieniem przypadków powikłanych zgonem w przebiegu choroby.

W grupie I-ej analizą objęto 40 noworodków (podgrupa B), u których rozpoznano posocnicę wrodzoną. W grupie tej stwierdzono 7 zgonów. Przyczyną ich była posocznica, co potwierdziły objawy kliniczne oraz wynik badania sekcyjnego.

Dane dotyczące aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi u noworodków z posoczną wrodzoną w zależności od rokowania przedstawiono w tabelach 12 i 13.

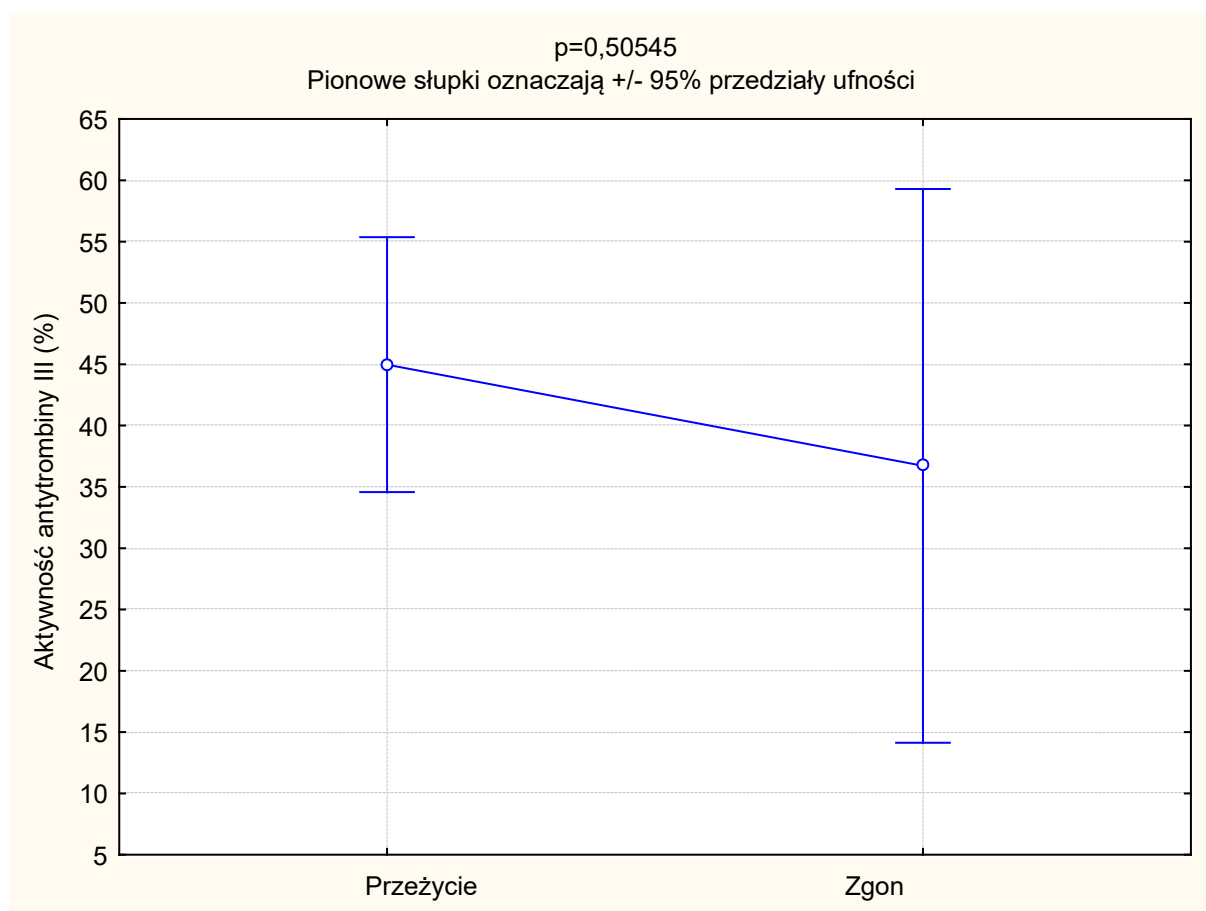
Antytrombina III (%)	N	Średnia	Odch. std	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Przeżycia	33	44,9	30,3	915,9	12,0	162,0	39,0
Zgon	7	36,7	25,1	629,9	5,0	70,0	26,0

Tabela 12. Aktywność antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków z wrodzoną posoczną w zależności od rokowania.

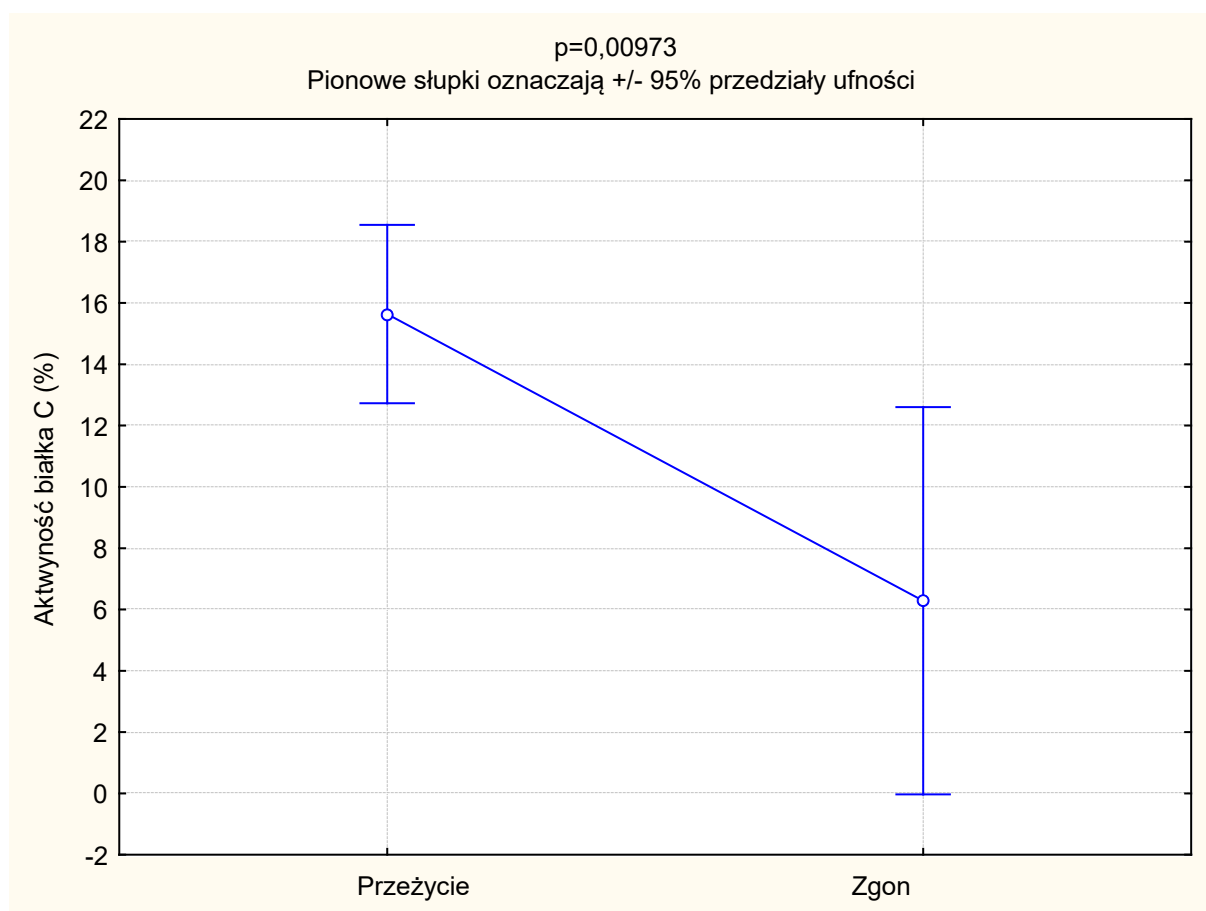
Białko C (%)	N	Średnia	Odch.std	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Przeżycia	33	15,6	8,9	79,6	4,0	42,0	15,0
Zgon	7	6,3	2,6	6,9	3,0	11,0	7,0

Tabela 13. Aktywność białka C w surowicy krwi u noworodków z wrodzoną posoczną w zależności od rokowania.

W grupie I-iej stwierdzono statystycznie znamienne niższą aktywność białka C u noworodków, u których w przebiegu posocznicy wrodzonej wystąpił zgon w porównaniu do dzieci, które przeżyły ($p=0,00973$). Takiej różnicy nie obserwowano natomiast w przypadku antytrombiny III. W sposób graficzny przedstawiono to na wykresach 13 i 14.



Wykres 13. Porównanie wartości średnich dotyczących aktywności antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków z wrodzoną posocznicą w zależności od rokowania.



Wykres 14. Porównanie wartości średnich dotyczących aktywności białka C w surowicy krwi u noworodków z wrodzoną posocznicą w zależności od rokowania.

4.9. Aktywność antytrombiny III i białka C w surowicy krwi a rokowanie w przebiegu posocznicy nabytej (Grupa II).

W tabeli 14 przedstawione zostały rodzaje bakterii, które spowodowały posocnicę nabytą o bardzo ciężkim przebiegu prowadzącą do wystąpienia zgonu.

Posocznica nabyta (n=93)	Zgony (n=9)	
Etiologia Gram dodatnia (n=56)		0
Etiologia Gram ujemna (n=18)	Serratia marcescens	3
	E.coli	2
	Pseudomonas aeruginosa	2
Brak potwierdzenia bakteriologicznego (n=19)		2

Tabela 14. Etiologia posocznicy nabytej ze szczególnym uwzględnieniem przypadków powikłanych zgonem w przebiegu choroby.

U noworodków w grupie II-ej posocnicę nabytą rozpoznano w 73 przypadkach. U 9 pacjentów choroba zakończyła się zgonem. W badaniach autopsyjnych potwierdzono kliniczne rozpoznanie posocznicy.

Wartości dotyczące aktywności antytrombiny III i białka C surowicy krwi u noworodków z posoczną nabytą w zależności od rokowania zostało przedstawione w tabelach 15 i 16.

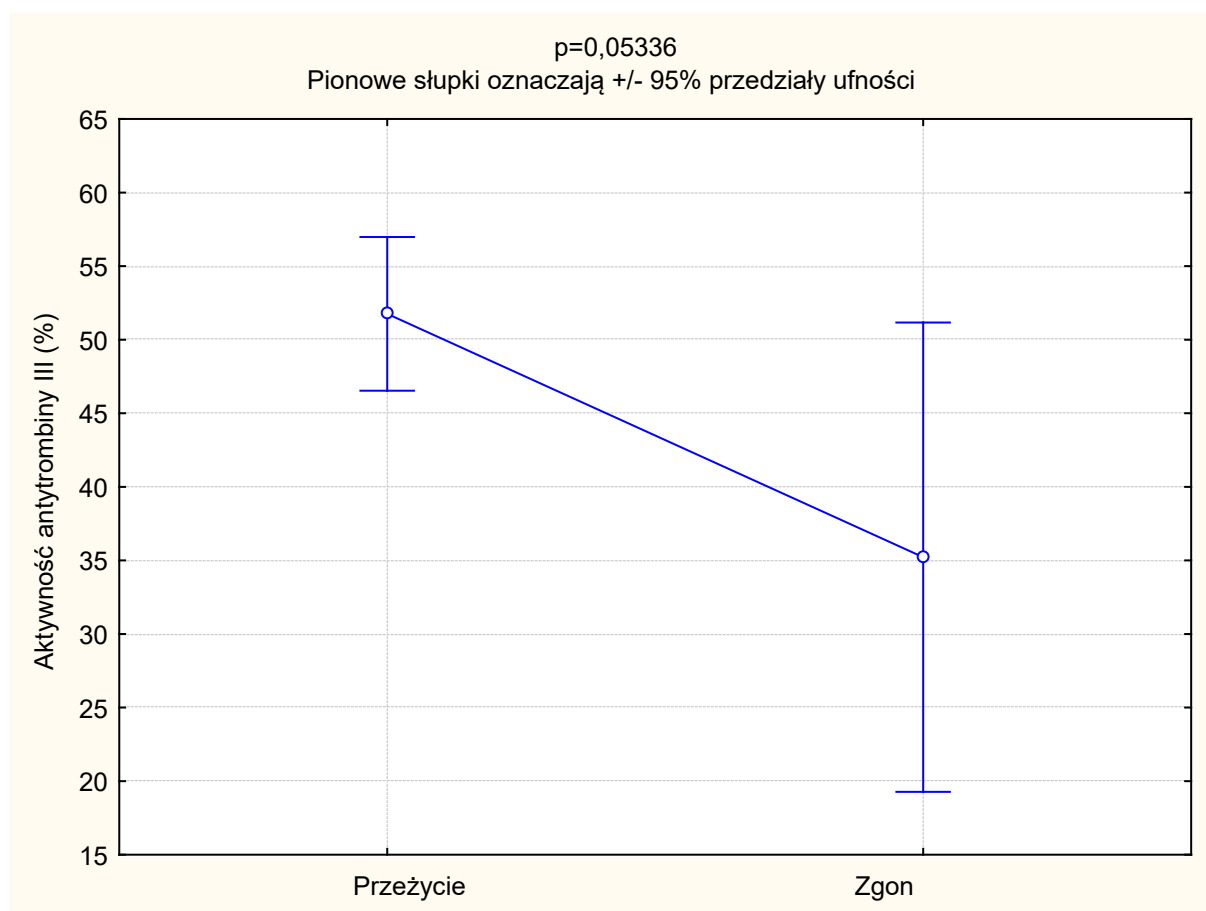
Antytrombina III (%)	N	Średnia	Odch. stand	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Przeżycia	84	51,8	24,5	600,1	6,0	105,0	51,5
Zgon	9	35,28	19,4	375,7	14,0	64,0	41,0

Tabela 15. Aktywność antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków z nabytą posoczną w zależności od rokowania.

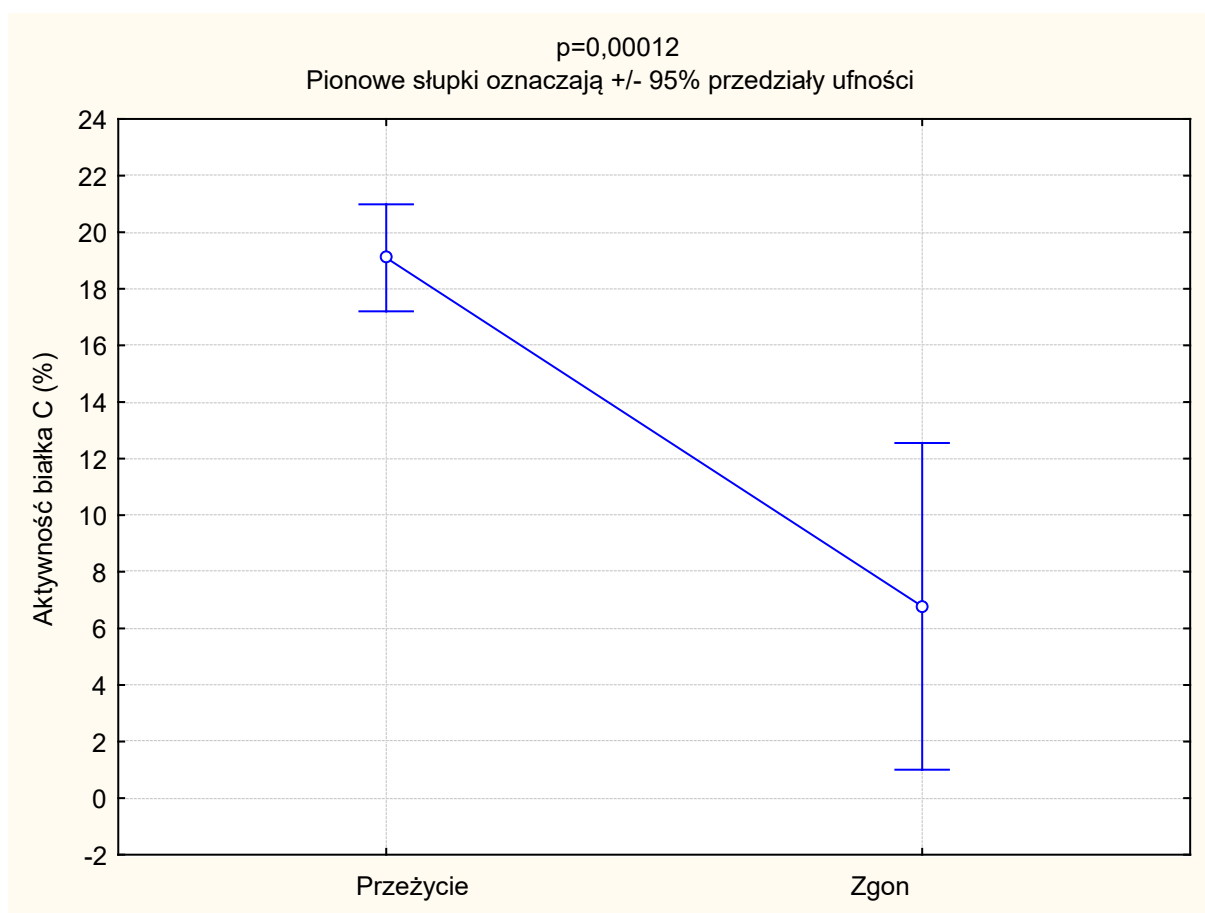
Białko C (%)	N	Średnia	Odch. stand	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Przeżycia	84	19,1	9,1	82,8	2,0	57,0	18,0
Zgon	9	6,7	2,3	5,4	3,0	11,0	7,0

Tabela 16. Aktywność białka C w surowicy krwi u noworodków z nabytą posoczną w zależności od rokowania.

Podobnie jak u dzieci w grupie I-ej także u noworodków w grupie II-ej stwierdzono statystycznie znamienne niższą aktywność białka C w surowicy krwi u tych pacjentów noworodków, u których w przebiegu choroby wystąpił zgon ($p=0,00012$). Takiej różnicy nie obserwowano natomiast w przypadku antytrombiny III. W sposób graficzny przedstawiono to na wykresach 15 i 16.



Wykres 15. Porównanie wartości średnich dotyczących aktywności antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków z nabytą posocznicą w zależności od rokowania.

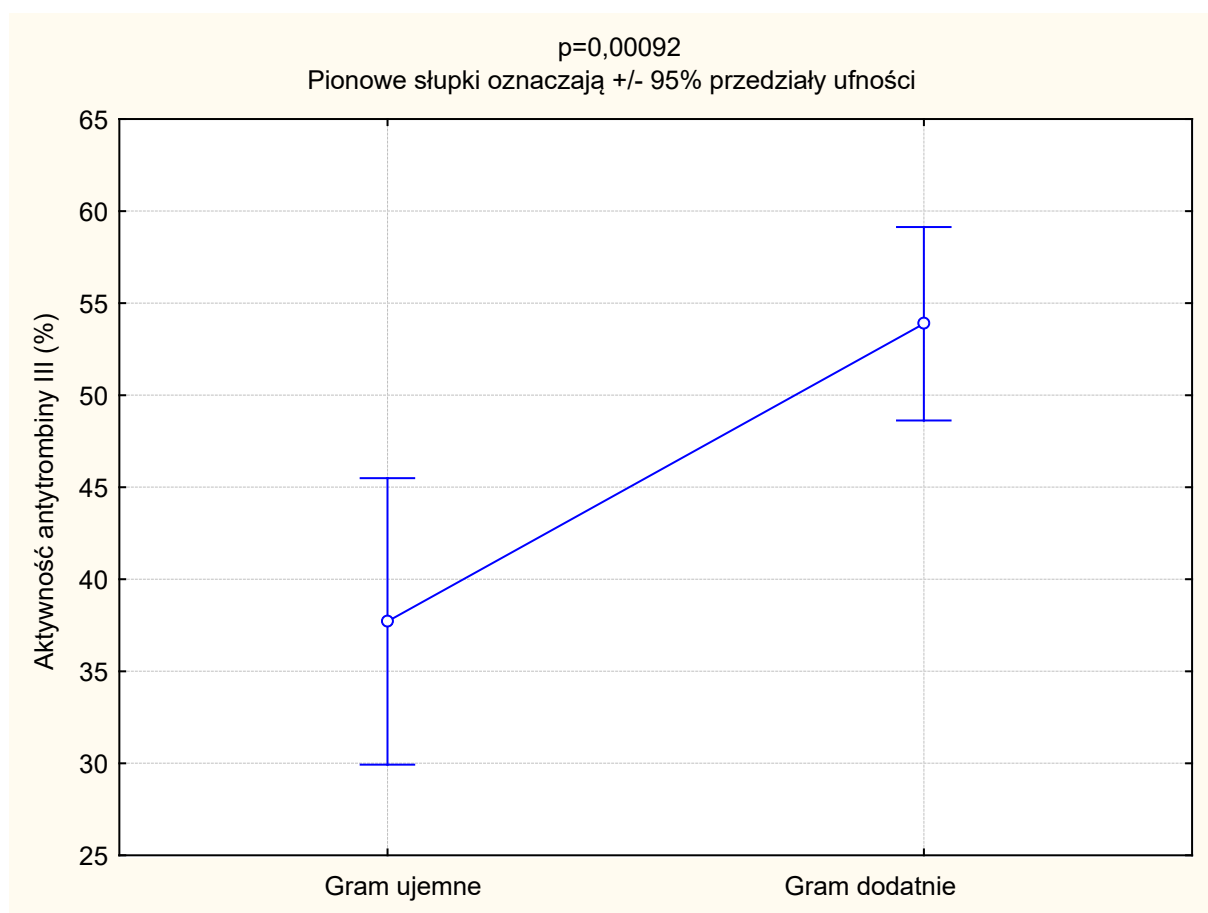


Wykres 16. Porównanie wartości średnich dotyczących aktywności białka C w surowicy krwi u noworodków z nabytą posocznicą w zależności od rokowania.

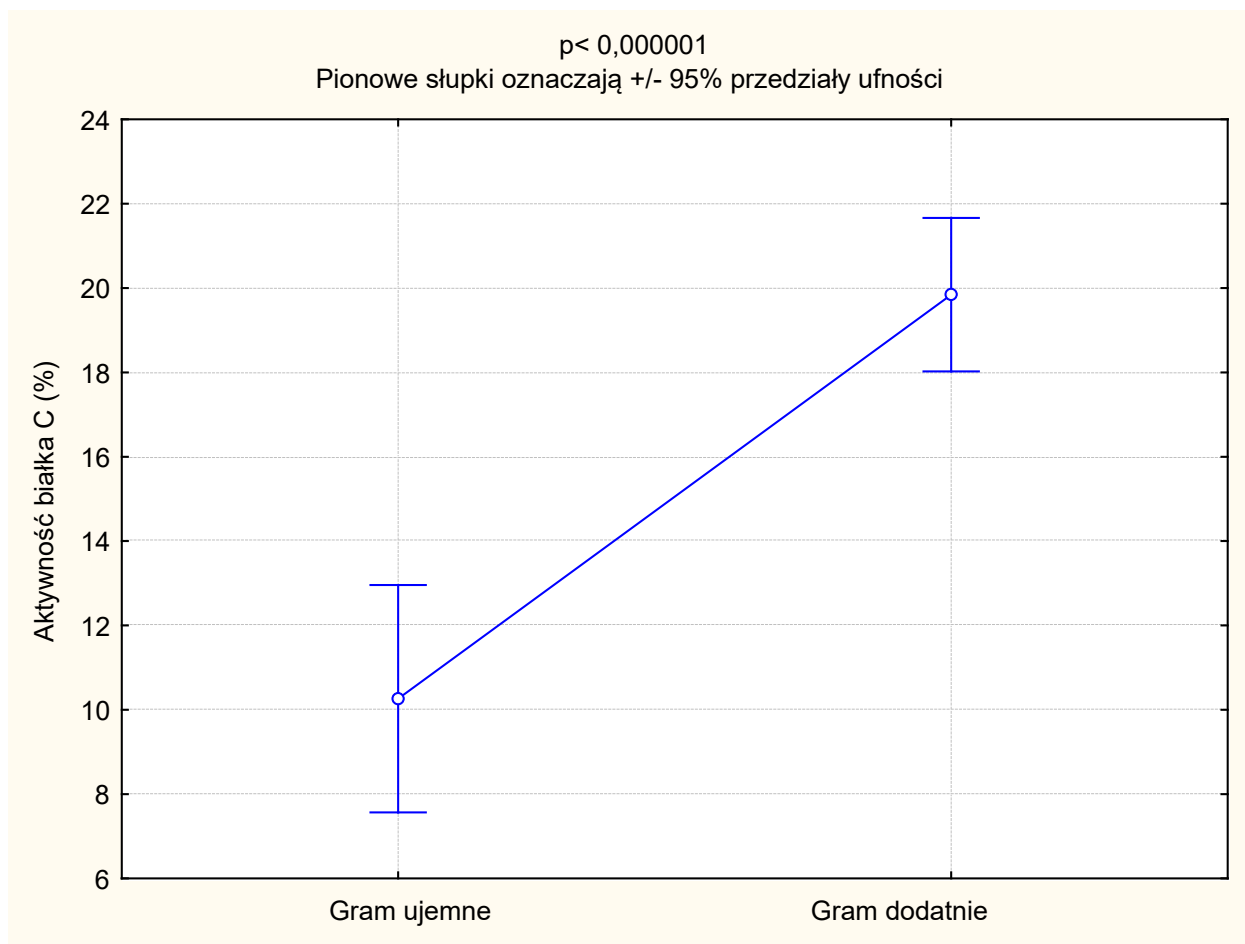
4.10. Ocena zależności pomiędzy rodzajem patogenu wywołującego posocznicę zarówno wrodzoną jak i nabytą (Grupa I i II), a aktywnością antytrombiny III i białka C w surowicy krwi.

Następnie podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy rodzaj patogenu wywołującego posocznicę zarówno wrodzoną jak i nabytą ma wpływ na poziom aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi. Analizę przeprowadzono jedynie w grupie 99 dzieci, u których uzyskano dodatni wynik badania bakteriologicznego krwi. U 68 dzieci przyczyną posocznicy były bakterie Gram dodatnie natomiast w 31 przypadkach we krwi wyhodowano bakterie Gram ujemne.

W grupie dzieci z posocznicą o etiologii Gram ujemnej stwierdzono znamienne niższe poziomy aktywności zarówno w przypadku antytrombiny III ($p=0,00092$) jak i białka C w surowicy krwi ($p<0,000001$) w porównaniu do noworodków z posocznicą o etiologii Gram dodatniej, niezależnie od postaci posocznicy. W sposób graficzny przedstawiono to na wykresach 17 i 18.



Wykres 17. Porównanie wartości średnich aktywności antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków z posocznicą o etiologii Gram ujemnej i Gram dodatniej niezależnie od postaci choroby.



Wykres 18. Porównanie wartości średnich aktywności białka C w surowicy krwi u noworodków z posocznicą o etiologii Gram ujemnej i Gram dodatniej niezależnie od postaci choroby.

W dalszej części analizy przy użyciu testu regresji logistycznej określono ryzyko wystąpienia zgonu w zależności od czynnika etiologicznego u dzieci z posocznicą zarówno wrodzoną, jak i nabytą. Stwierdzono, iż ryzyko zgonu z powodu posocznicy o etiologii Gram ujemnej było około 37 razy większe niż w przebiegu posocznicy Gram dodatniej ($OR=0,027$; $p=0,00114$). Dokładną analizę przedstawiono w tabeli 17.

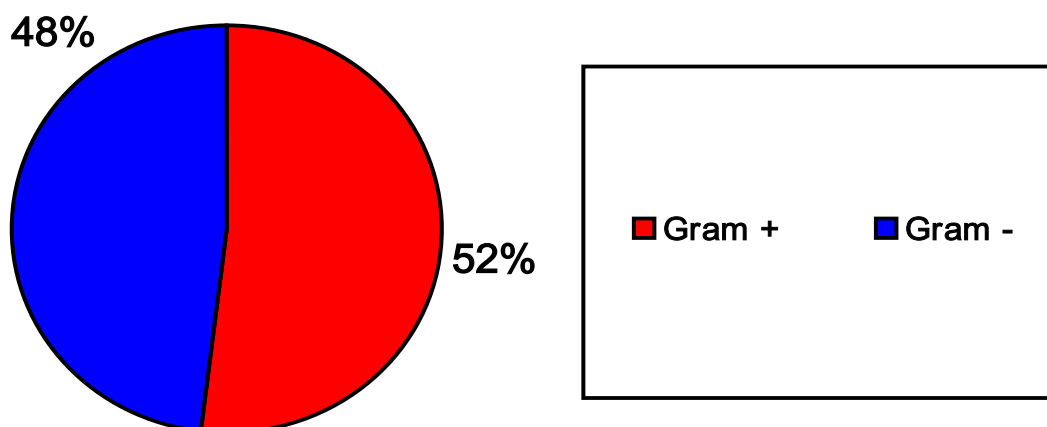
	Stała B0	Rodzaj bakterii
Ocena	-0,59784	-3,60686
Bd standard.	0,37538	1,07521
t(97)	-1,59261	-3,35457
poziom p	0,11450	0,00114
-95%CL	-1,34287	-5,74084
+95%CL	0,14719	-1,47287
Chi-kwadrat Walda	2,53639	11,25314
poziom p	0,11126	0,00080
Iloraz szans z.jedn.	0,55000	0,02714
-95%CL	0,26110	0,00321
+95%CL	1,15858	0,22927

Tabela 17. Wartości określające ryzyko zgonu w przebiegu posocznicy wrodzonej i nabytej potwierdzonej dodatnim wynikiem badania bakteriologicznego krwi.

4.11. Ocena zależności pomiędzy rodzajem patogenu wywołującego wrodzoną posocnicę (Grupa I), a aktywnością antytrombiny III i białka C w surowicy krwi.

U 25 noworodków z posocnicą wrodzoną, potwierdzoną wynikiem badania bakteriologicznego krwi, przyczyną choroby były w 12 przypadkach bakterie Gram dodatnie, natomiast u 13 dzieci stwierdzono drobnoustroje Gram ujemne.

Procentowy rozkład drobnoustrojów chorobotwórczych odpowiedzialnych za wystąpienie posocznicy wrodzonej przedstawia rycina 3.



Rycina 3. Rodzaj drobnoustrojów wywołujących posocnicę wrodzoną.

Aktywność antytrombiny III i białka C u noworodków z wrodzoną posocznicą w zależności od rodzaju bakterii, przedstawiają tabele 18 i 19.

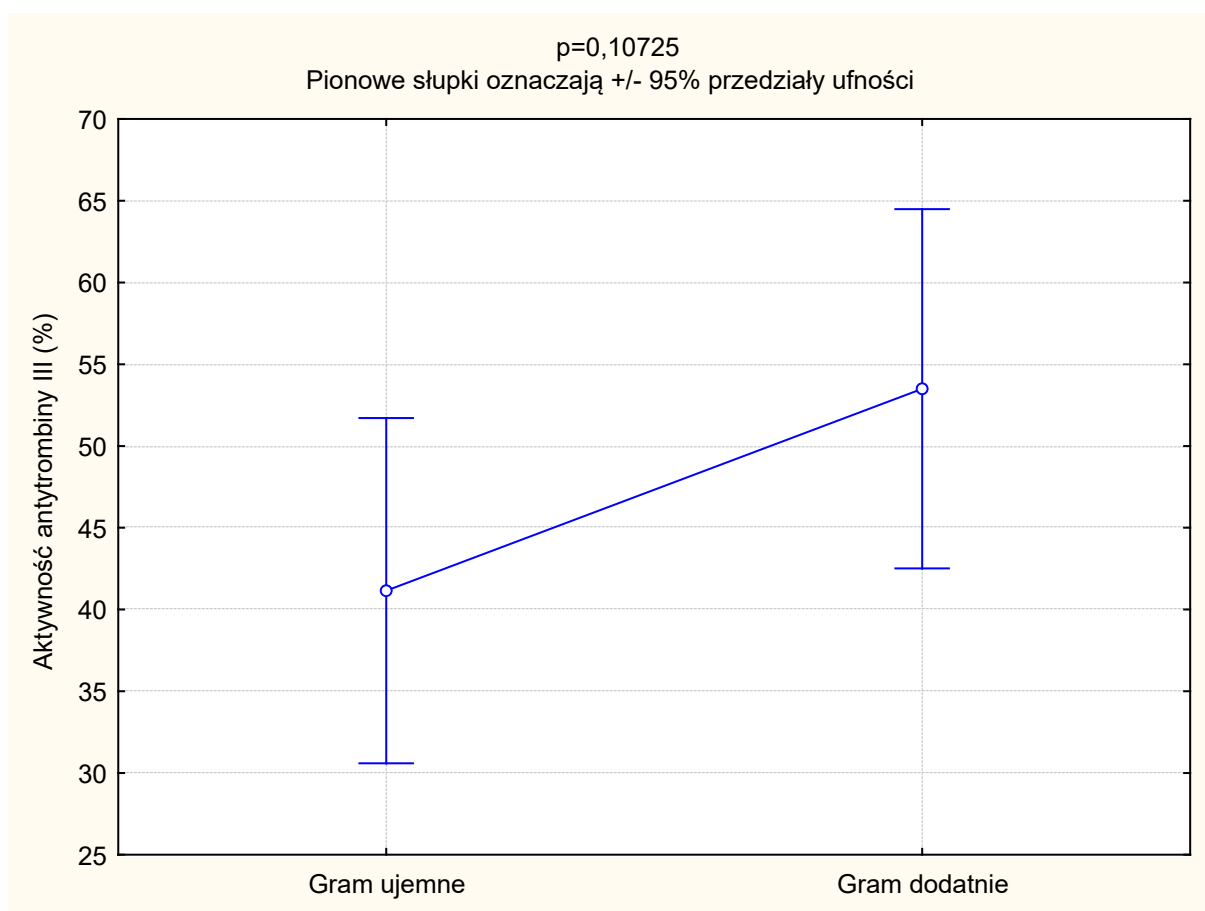
Antytrombina III (%)	N	Średnia	Odch. stand	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Bakterie Gram (-)	13	41,1	16,5	272,8	20,0	70,0	44,0
Bakterie Gram (+)	12	53,5	20,2	410,3	21,0	95,0	56,5

Tabela 18. Aktywność antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków z wrodzoną posocznicą w zależności od rodzaju bakterii.

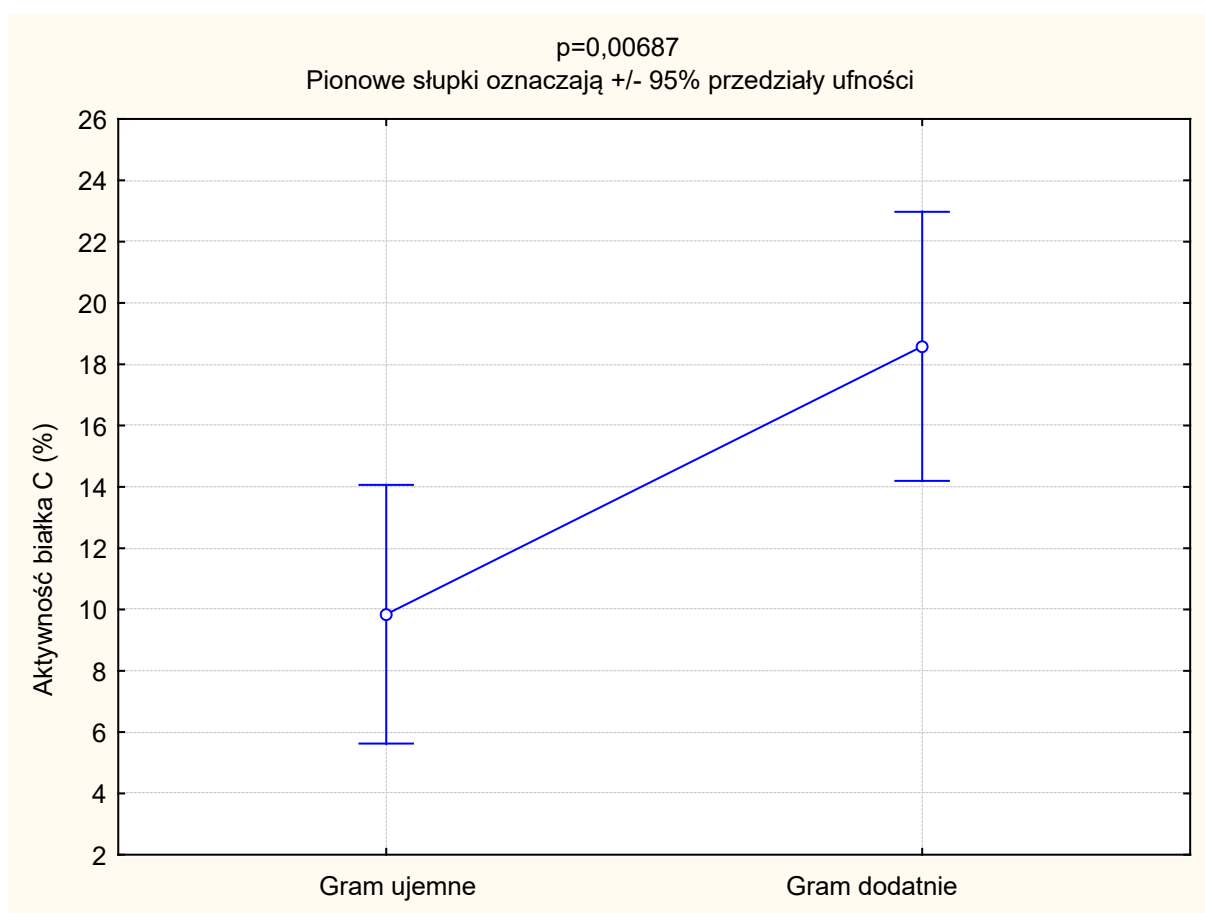
Białko C (%)	N	Średnia	Odch. stand	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Bakterie Gram (-)	13	9,8	6,5	36,6	3,0	21,0	8,0
Bakterie Gram (+)	12	18,6	8,5	73,0	9,0	39,0	17,0

Tabela 19. Aktywność białka C w surowicy krwi u noworodków z wrodzoną posocznicą w zależności od rodzaju bakterii.

U dzieci z posocznicą wrodzoną o etiologii Gram ujemnej stwierdzono statystycznie znamienne niższe poziomy aktywności białka C w surowicy krwi w porównaniu do noworodków z posocznicą wrodzoną o etiologii Gram dodatniej ($p=0,00687$). Takiej zależności nie obserwowano w odniesieniu do antytrombiny III. W sposób graficzny przedstawiono to na wykresach 19 i 20.



Wykres 19. Porównanie wartości średnich aktywności antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków z wrodzoną posocznicą w zależności od rodzaju bakterii.

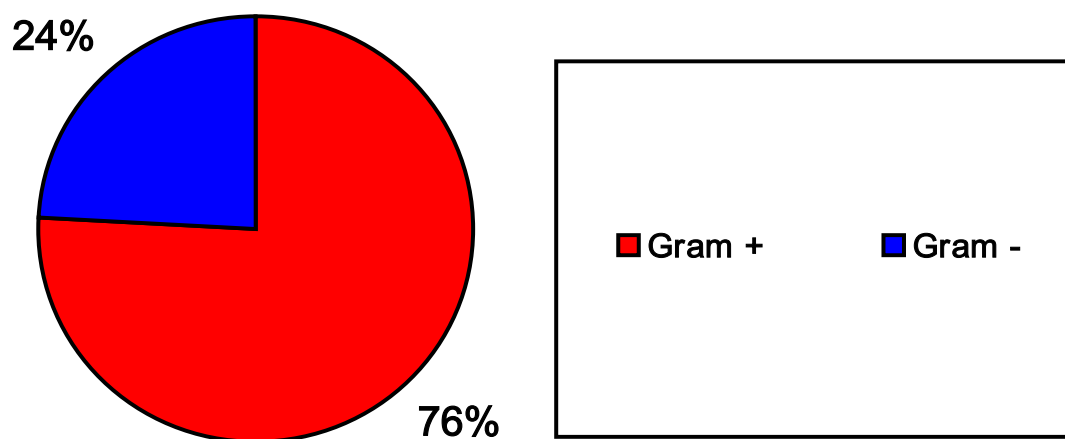


Wykres 20. Porównanie wartości średnich aktywności białka C w surowicy krwi u noworodków z wrodzoną posocznicą w zależności od rodzaju bakterii.

4.12. Ocena zależności pomiędzy rodzajem patogenu wywołującego nabytą posocznicę (Grupa II), a poziomem aktywności antytrombiny III i białka w surowicy krwi.

W grupie 74 noworodków z rozpoznaną nabytą posocznicą w 56 przypadkach przyczyną choroby były bakterie Gram dodatnie, natomiast u 18 dzieci stwierdzono obecność drobnoustrojów Gram ujemnych.

Procentowy rozkład drobnoustrojów chorobotwórczych odpowiedzialnych za wystąpienie nabytej posocznicy przedstawia rycina 4.



Rycina 4. Charakterystyka drobnoustrojów wywołujących posocznicę nabytą.

Aktywność antytrombiny III i białka C w surowicy krwi u noworodków z nabytą posocznicą w zależności od rodzaju bakterii, przedstawiają tabele 20 i 21.

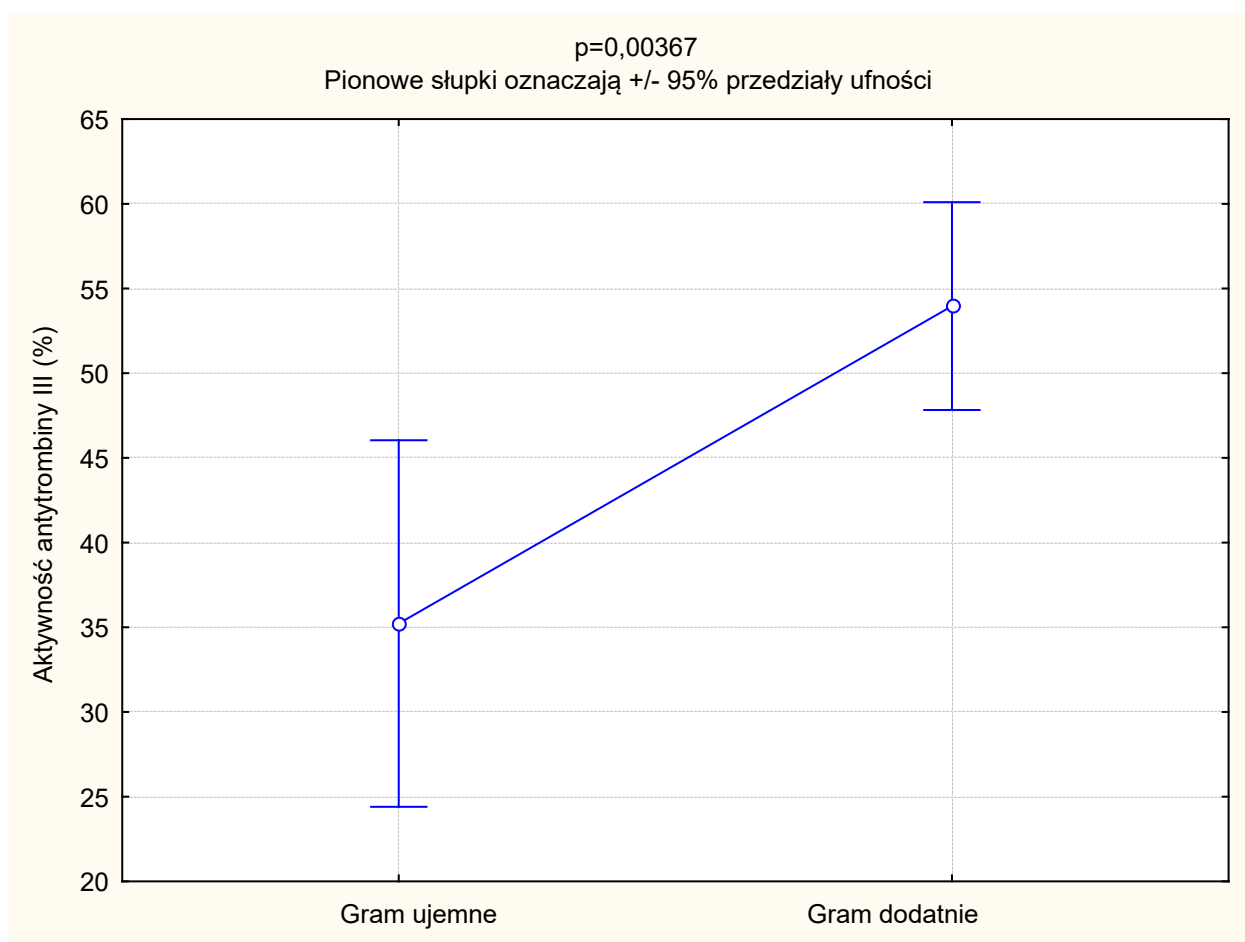
Antytrombina III (%)	N	Średnia	Odch. stand	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Bakterie Gram (-)	18	35,2	19,2	370,3	6,0	64,0	43,0
Bakterie Gram (+)	56	54,0	24,1	579,8	10,0	98,0	54,5

Tabela 20. Aktywność antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków z nabytą posocznicą w zależności od rodzaju bakterii.

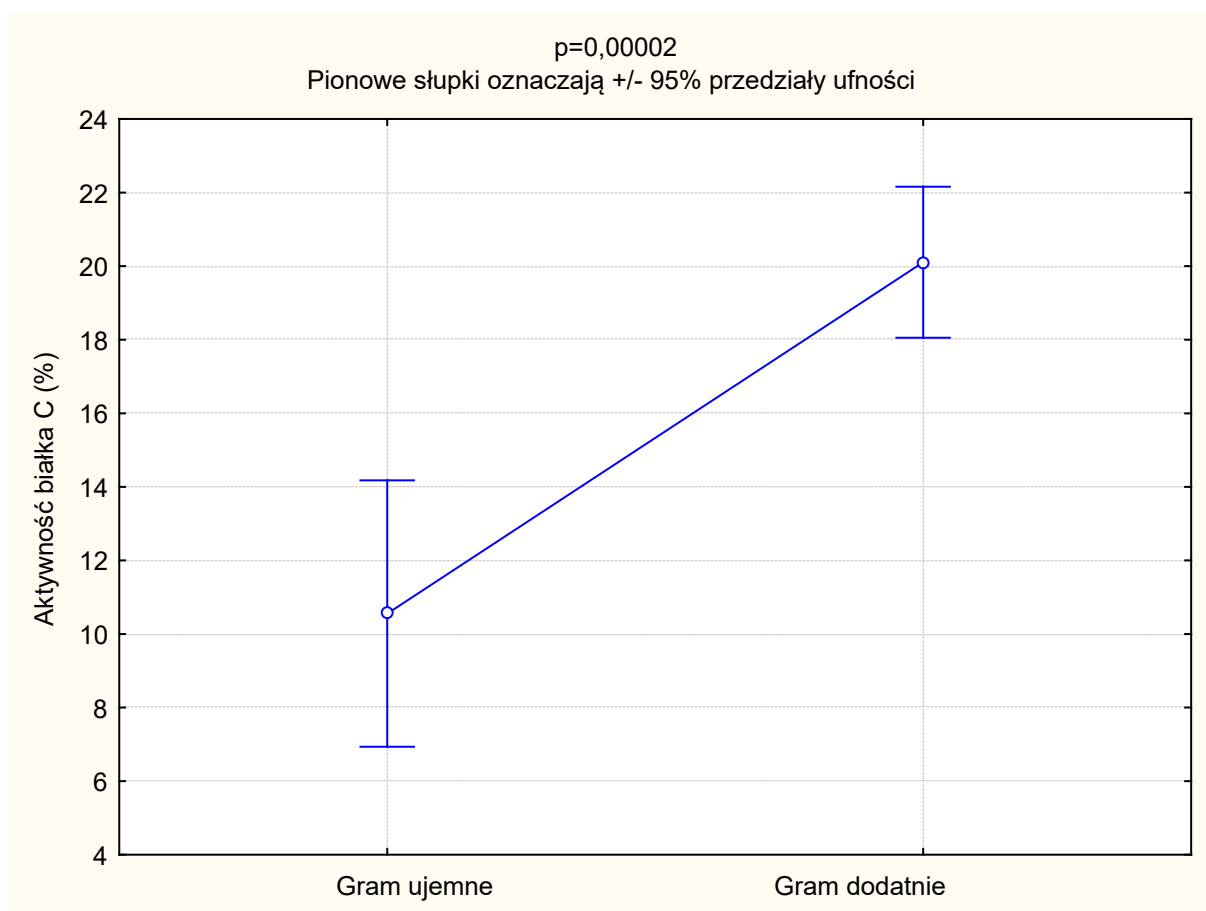
Białko C (%)	N	Średnia	Odch. stand	Wariancja	Minimum	Maximum	Mediana
Bakterie Gram (-)	18	10,5	7,4	54,8	3,0	26,0	7,5
Bakterie Gram (+)	56	20,1	7,8	60,8	7,0	48,0	18,5

Tabela 21. Aktywność białka C w surowicy krwi u noworodków z nabytą posocznicą w zależności od rodzaju bakterii.

U dzieci z nabytą posocznicą o etiologii Gram ujemnej stwierdzono statystycznie znamienne niższy poziom aktywności antytrombiny III ($p=0,00367$) jak i białka C ($p=0,00002$) w porównaniu do noworodków, u których przyczyną nabytej posocznicy były bakterie Gram dodatnie. W sposób graficzny przedstawiono to na wykresach 21 i 22.



Wykres 21. Porównanie wartości średnich aktywności antytrombiny III w surowicy krwi u noworodków z nabytą posocznicą w zależności od rodzaju bakterii.



Wykres 22. Porównanie wartości średnich aktywności białka C w surowicy krwi u noworodków z nabytą posocznicą w zależności od rodzaju bakterii.

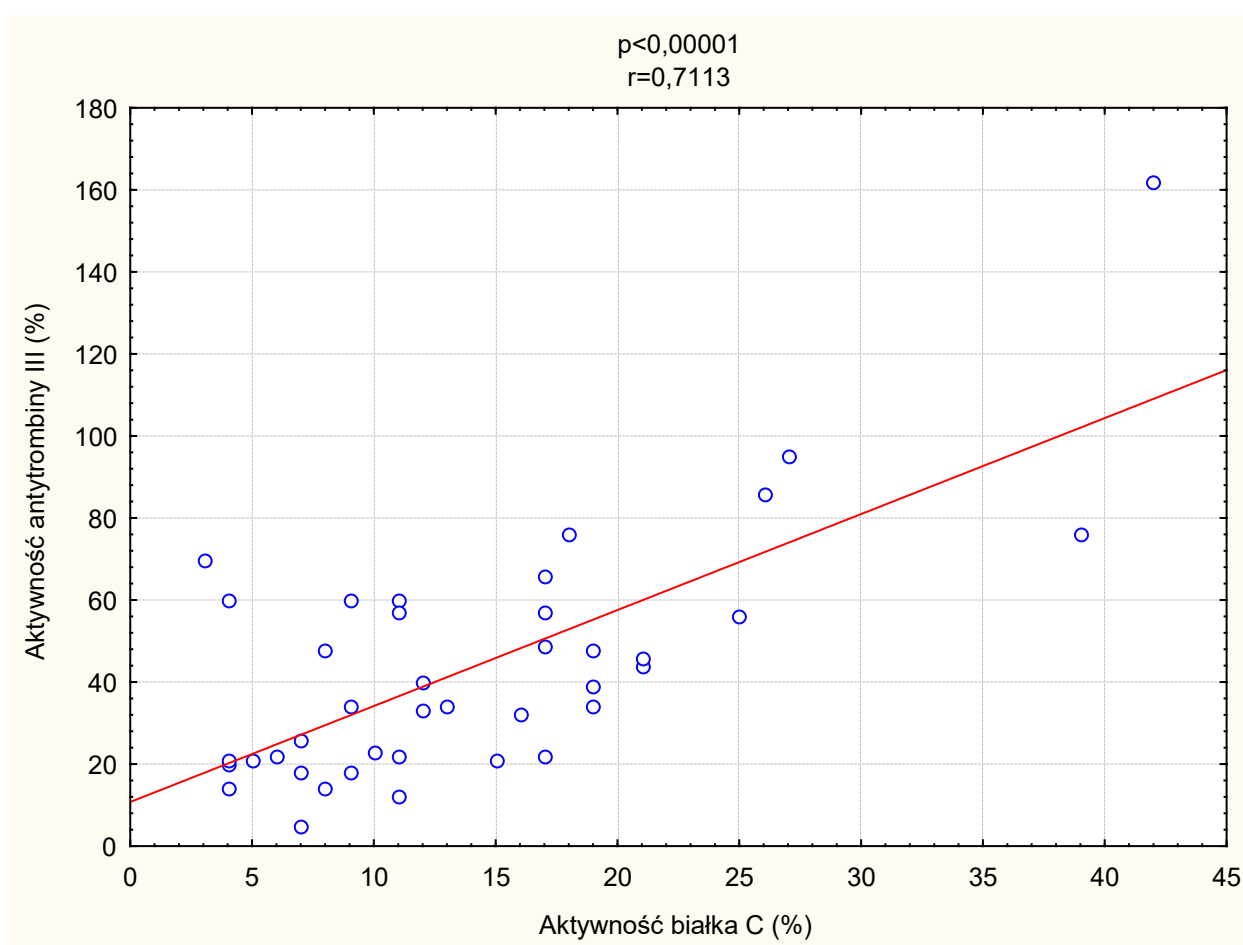
4.13. Określenie zależności pomiędzy występowaniem czynników ryzyka wrodzonej posocznicy takich jak: przedwczesne odpływanie płynu owodniowego, objawy zakażenia u matki, zahamowanie wzrastania wewnątrzmacicznego płodu, a rozpoznaniem tej jednostki chorobowej.

Wśród badanych 105 noworodków grupy I retrospektywnie stwierdzono następujące czynniki ryzyka rozwoju posocznicy wrodzonej: przedwczesne odpływanie płynu owodniowego (powyżej 24 godzin do czasu wystąpienia porodu) w 53 przypadkach, objawy zakażenia u matki w 27 przypadkach, zahamowanie wzrostu wewnątrzmacicznego u 22 płodów, ciąża mnoga - stan po obumarciu jednego płodu w 3 przypadkach.

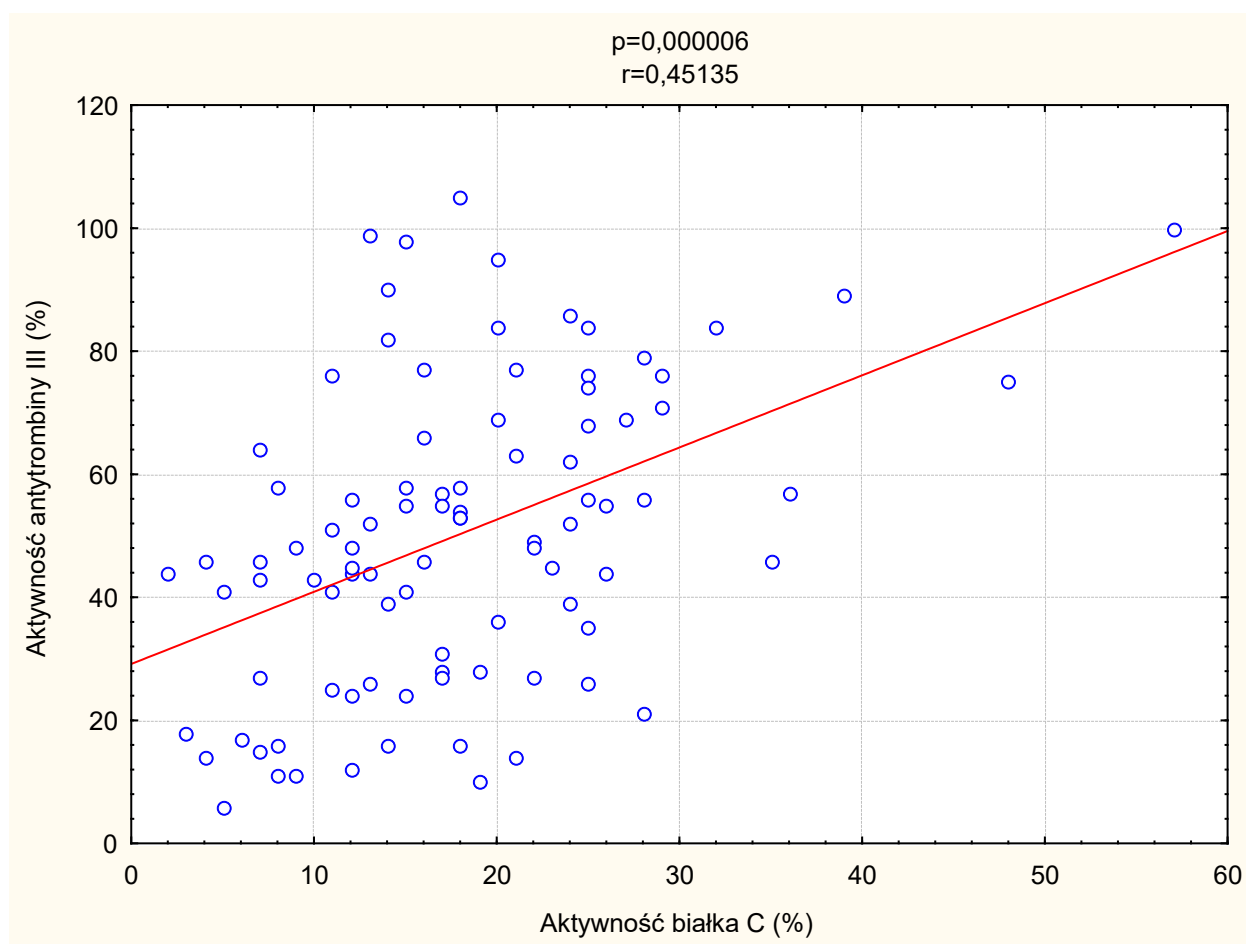
Wyniki analizy statystycznej wykazały istotną zależność pomiędzy przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego, a wystąpieniem posocznicy wrodzonej ($OR=0,36111$, $p=0,02208$). Wyliczono, iż ryzyko wystąpienia infekcji wrodzonej w przypadku przedwczesnego odpływania płynu owodniowego jest 2,7 razy większa w porównaniu do przypadków, gdy brak było tego czynnika ryzyka zakażenia. Natomiast podobnych zależności nie stwierdzono w przypadkach infekcji u matki oraz hypotrofii płodu. U żadnego dziecka urodzonego z ciąży mnogiej, w której wystąpiło obumarcie jednego z płodów (3 przypadki) nie rozwinęła się posocznica.

4.14. Ocena wzajemnej zależności pomiędzy antytrombina III i białkiem C w surowicy krwi w obu postaciach posocznicy.

Wykorzystując analizę regresji stwierdzono statystycznie istotną zależność pomiędzy aktywnością antytrombiny III a aktywnością białka C w surowicy krwi zarówno w posocznicy wrodzonej ($r=0,7113$, $p<0,00001$), jak również w posocznicy nabytej ($r=0,45135$, $p=0,00006$). W sposób graficzny przedstawiono to na wykresach 23 i 24.



Wykres 23. Zależność pomiędzy aktywnością antytrombiny III i białka C w surowicy krwi u noworodków z wrodzoną posocznicą.



Wykres 24. Zależność pomiędzy aktywnością antytrombiny III i białka C w surowicy krwi u noworodków z nabytą posocznicą.

5. Dyskusja.

Ostatnio zwraca się uwagę na fakt, iż w patomechanizmie posocznicy, oprócz nasilonej reakcji zapalnej, istotną rolę odgrywa także nadmierna aktywacja układu krzepnięcia i fibrynolizy (134, 135). Powstające w posocznicy mediatory odpowiedzi zapalnej takie jak cytokiny, leukotrieny, chemokiny, aktywują czynniki krzepnięcia, które z kolei potęgują produkcję i uwalnianie wymienionych prozapalnych mediatorów. Oznacza to na przykład, iż występująca w nadmiarze w surowicy krwi w przebiegu zakażenia, główna prozapalna cytokina, jaką jest TNF-alfa, stymuluje produkcję czynnika tkankowego, który inicjuje proces krzepnięcia, a z kolei powstała wtedy trombina doprowadza do zwiększenia syntezy i uwalniania TNF-alfa przez monocyty (66, 68, 155). Dochodzi w ten sposób do powstania „błędnego koła”, które jest przyczyną klinicznych i laboratoryjnych objawów uszkodzenia funkcji narządów poprzez tworzenie się w nich mikrozatorów i mikrozakrzepów. W konsekwencji dalszych zaburzeń może dochodzić do zużycia czynników krzepnięcia i powstania skazy krwotocznej jako powikłania uogólnionego zakażenia (136).

U noworodków, a zwłaszcza niedojrzałych wcześniaków, w przebiegu posocznicy mamy do czynienia z podobną sytuacją (137). Należy podkreślić, iż u tych pacjentów istnieje nawet w stanie zdrowia znacznie niższy zapas czynników decydujących o równowadze pomiędzy układem krzepnięcia i fibrynolizy. Z kolei często stwierdza się u nich bardzo wysokie stężenie zarówno TNF-alfa jak i IL-6 w surowicy krwi w przebiegu posocznicy (107, 138, 139, 140). Taki stan szybko może prowadzić do poważnych zaburzeń krzepnięcia i fibrynolizy z wszelkimi tego konsekwencjami. Jest sprawą oczywistą, iż podanie antybiotyku oraz zastosowanie leków wazopresyjnych czy poprawiających perfuzję nie zahamuje zmian zachodzących w układzie krzepnięcia i fibrynolizy. A zatem ingerencja

w uruchomioną już kaskadę krzepnięcia może okazać się bardzo istotnym czynnikiem terapeutycznym. Jak wiadomo skaza krwotoczna stanowi bardzo częste powikłanie występujące w przebiegu zakażenia uogólnionego i jest czynnikiem wpływającym w decydujący sposób na końcowy rezultat terapii tej jednostki chorobowej (141, 142, 143, 144, 145, 146, 147).

Ostatnio coraz częściej sugeruje się konieczność suplementacji endogennych inhibitorów kaskady krzepnięcia w leczeniu posocznicy. Do takich preparatów należy antytrombina III i białko C. Szczególne zainteresowanie budzi podaż aktywnej postaci białka C (APC) w terapii zakażenia uogólnionego. Skuteczność takiego postępowania udowodniono w randomizowanych badaniach kontrolnych przeprowadzonych u osób dorosłych (148, 149, 150). Jednakże ostatnio pojawiło się coraz więcej znaków zapytania dotyczących mechanizmu działania APC (69, 151, 152, 153, 154). I tak na przykład Brueckamn i wsp. (69) wykazali, że APC nie wywiera wpływu na układ krzepnięcia a jedynie wykazuje działanie p/zapalne i p/apaptozie. Natomiast Derhasching i wsp. (151) stwierdzili minimalny wpływ APC na markery krzepnięcia i fibrynolizy jak również brak jego działania p/zapalnego.

Natomiast Rice i wsp. (155) oraz Cunnen i wsp. (156) stwierdzili, że APC powoduje zmniejszenie umieralności, ale jest to zależne od czasu podażu preparatu u pacjentów z ciężką posocznicą.

W badaniach eksperymentalnych wykazano jedynie stymulujące działanie APC na aktywność leukocytów w krążeniu płucnym. Podobnie, istnieją do tej pory znaczne rozbieżności, co do wskazań dotyczących stosowania preparatu APC w leczeniu posocznicy u dzieci. Spowodowane są one przede wszystkim, opisywanymi w niektórych przypadkach terapii, powikłaniami w postaci krwawień występujących głównie do ośrodkowego układu nerwowego. Z tego powodu FDA przerwało wieloośrodkowe, randomizowane badanie

numer F1K-MC-EVBP mające wyjaśnić zasadność i bezpieczeństwo podaży preparatu APC w leczeniu posocznicy u dzieci. Jak wiadomo po przeprowadzeniu częściowej analizy w grupie niemowląt otrzymujących preparat APC stwierdzono istotnie większą częstość krwawień do ośrodkowego układu nerwowego u najmłodszych pacjentów. W świetle tych wyników, na uwagę zasługują rezultaty badania Kleina i wsp. (157), który wykazał, iż podaż preparatu białka C prowadzi do wzrostu stężenia jego aktywnej postaci w sposób zależny od dawki postaci nieaktywnej. Taki sposób postępowania terapeutycznego wydaje się być bardziej „fizjologiczny”, gdyż dostarczony zostaje wtedy jedynie substrat konieczny do produkcji aktywnej postaci a szybkość reakcji zależna jest od potrzeb organizmu. Jednakże istotnym warunkiem aktywacji jest obecność kofaktorów, do których należy białko S, trombomodulina oraz odpowiedni receptor dla białka C znajdujący się na komórkach śródbłona (44, 158). Można przypuszczać, iż zbyt późna suplementacja białka C nie będzie skutkować zwiększoną syntezą APC z uwagi na istniejący już wtedy niedostatek kofaktorów. Stąd tak ważnym wydaje się częsty pomiar stężenia czy aktywności białka C w surowicy krwi w przebiegu posocznicy, aby można było decyzję o rozpoczęciu suplementacji podjąć w odpowiednim momencie.

W świetle tych wiadomości interesujące wydają się być rezultaty uzyskane w prezentowanym badaniu. Na ich podstawie można stwierdzić, iż niższy *a priori* poziom aktywności zarówno antytrombiny III jak i białka C w surowicy krwi u noworodków ulega dalszemu obniżaniu się już w początkowej fazie uogólnionego zakażenia bakteryjnego. Natężenie tego zjawiska zależne jest od rodzaju flory bakteryjnej powodującej posocnicę. Szczególnie wyraźnie występuje to zjawisko w zakażeniach uogólnionych spowodowanych bakteriami Gram ujemnymi. Istnieją niewielkie różnice w szybkości zachodzących zmian pomiędzy posocnicą wrodzoną i nabytą. Na podstawie otrzymanych wyników można sądzić, że szybciej do zaburzeń dochodzi u dzieci, u których posocznica rozpoczyna się po

7 dobie życia. Być może zmiany zapalne w odpowiedzi na zakażenie, powstające przed bądź bezpośrednio po urodzeniu są modyfikowane produkowanymi przez łożysko mediatorami przeciwzapalnymi takimi jak IL-10, bądź odpowiedź zapalna samego płodu jest mniej nasilona w porównaniu do sytuacji, która dotyczy późniejszego okresu po urodzeniu (26, 29, 159, 160, 161). Szczególnie interesującym wynikiem, uzyskanym w trakcie przeprowadzonego badania jest stwierdzenie wysoce znamiennej korelacji pomiędzy aktywnością białka C w surowicy krwi a występowaniem zgonu w przebiegu posocznicy. Podobne wyniki uzyskał Yan i wsp. w badanej grupie osób dorosłych (158, 162). Jak można zauważyć na wykresach 9 i 10 gwałtowny wzrost ryzyka zgonu pojawia się w chwili, gdy aktywność białka C w surowicy krwi obniża się poniżej 10%. Należy, zatem z dużym prawdopodobieństwem przyjąć tę wartość za wskazanie do natychmiastowej suplementacji białka C. Dalszy spadek aktywności tego czynnika może powodować, bowiem gwałtowny wzrost ryzyka zgonu, który przy poziomie aktywności 5% w surowicy krwi wynosił dla posocznicy wrodzonej 40% a w przypadku posocznicy nabytej 52%.

Na podstawie uzyskanych wyników można również postawić tezę, iż zaburzenia krzepnięcia, których wypadkową jest gwałtowne obniżanie się aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi, a którym nie muszą w pierwszych chwilach zachorowania towarzyszyć objawy skazy krwotocznej, są już wskazaniem do rozpoczęcia leczenia preparatami antytrombiny III i białka C. Wartością będącą wskazaniem do takiego postępowania jest w przypadku białka C aktywność w surowicy krwi poniżej 10%. Nie można natomiast, na podstawie uzyskanych wyników ustalić precyzyjnie podobnych zależności w odniesieniu do antytrombiny III. Chociaż w początkowej fazie infekcji dochodzi do obniżenia się jej aktywności, co jest szczególnie wyraźne w posocznicy wywołanej bakteriami Gram ujemnymi to jednak brak jest statystycznej zależności

między poziomem antytrombiny III w surowicy krwi a rokowaniem w przebiegu posocznicy.

Kolejnym pytaniem, na które chciałam uzyskać odpowiedź analizując wyniki badania było określenie przydatności wykonywania oznaczeń aktywności antytrombiny III i białka C w diagnostyce posocznicy. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że istnieje statystycznie znamienne korelacja pomiędzy aktywnością antytrombiny III i białka C w surowicy krwi a wystąpieniem posocznicy, zarówno jej postaci wrodzonej jak i nabytej. Należy dodać, iż korelacje te są bardziej znamienne w odniesieniu do posocznicy nabytej. Aktywność antytrombiny III w surowicy krwi na poziomie 20%, przy współistniejących innych objawach posocznicy nabytej daje ponad 90% prawdopodobieństwa, iż u dziecka doszło do rozwinięcia się uogólnionego zakażenia. Z kolei przy poziomie aktywności antytrombiny III w surowicy krwi ocenianej na 60%, a więc wartości, którą uważa się za normę, prawdopodobieństwo wystąpienia posocznicy wynosiło aż 60%. Jak zatem widać, podobne zależności w zakresie wyższych wartości poziomów aktywności antytrombiny III należy interpretować z dużą ostrożnością. Taki stan może być, bowiem spowodowany krótkotrwałym zwiększeniem produkcji tego białka w wątrobie i następowym wzrostem aktywności antytrombiny III w surowicy krwi w początkowej fazie infekcji. Podobne wyniki stwierdzali w badaniach inni autorzy (163). Biorąc jednak pod uwagę uzyskane dane należy podkreślić, iż ocena aktywności antytrombiny III jak i białka C w surowicy krwi może stanowić dodatkowy wskaźnik, zwiększający prawdopodobieństwo rozpoznania posocznicy a także być pomocnym w ustaleniu rokowania w tej jednostce chorobowej.

Wniosek ten wydaje się być poparty stwierdzonym w badaniu brakiem różnic pomiędzy aktywnością zarówno antytrombiny III jak i białka C w surowicy krwi u dzieci, u których posocznica nie została potwierdzona badaniem bakteriologicznym krwi a danymi

uzyskanymi u noworodków z dodatnim wynikiem badania bakteriologicznego. Jak wiadomo, aż w około 40% nie uzyskuje się potwierdzenia bakteriologicznego rozpoznania posocznicy, pomimo wyraźnych objawów klinicznych i biochemicznych. A zatem, oznaczenie aktywności zarówno antytrombiny III jak i białka C w surowicy krwi ułatwiłoby ustalenie rozpoznania. Obecność mediatorów zapalnych uwalnianych pod wpływem entero-, endo- i egzotoksyn bakteryjnych decyduje, bowiem o nasileniu zmian chorobowych w przebiegu posocznicy, także w układzie krzepnięcia (113, 153, 164).

Na podstawie danych uzyskanych w badaniu można stwierdzić, że znamienne statystycznie obniżenie poziomu aktywności białka C w surowicy krwi występowało jedynie w przypadkach posocznicy wrodzonej wywołanej przez bakterie Gram ujemne. Natomiast w odniesieniu do posocznicy nabytej o etiologii Gram ujemnej zarówno aktywność antytrombiny III jak i białka C w surowicy krwi były znamienne statystycznie niższe w porównaniu do poziomów tych parametrów obserwowanych w posocznicy Gram dodatniej.

Rokowanie w przebiegu posocznicy o etiologii Gram ujemnej było w analizowanym materiale znacznie gorsze. W przypadku posocznicy wrodzonej bakterie Gram ujemne odpowiedzialne były za 57,1% zgonów, natomiast w odniesieniu do posocznicy nabytej odpowiednie dane wynosiły 77,8%. Wykazałam także, iż w przebiegu posocznicy zarówno wrodzonej, jak i nabytej ryzyko wystąpienia zgonu u dzieci w posocznicy o etiologii Gram ujemnej było 37 razy większe niż w przypadku posocznicy Gram dodatniej (165, 166, 167, 168).

Podobne zależności pomiędzy nieprawidłowymi poziomami aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi a działaniem układu krzepnięcia można zaobserwować u dzieci urodzonych w zamartwicy. W przypadku tej jednostki chorobowej u 100% dzieci stwierdza się obniżenie aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy

krwi i powikłania krwotoczne. W 50% zmiany w układzie krzepnięcia były bardzo gwałtowne, w postaci uogólnionego wykrzepiania prowadzącego do uszkodzenia funkcji ważnych życiowo narządów i zgonu (169). Jak wiadomo, niedotlenienie jest niezwykle ważnym czynnikiem stymulującym odpowiedź zapalną organizmu. Prawdopodobnie, istnieje zbliżony mechanizm, odpowiedzialny za aktywację układu krzepnięcia w niedotlenieniu i w posocznicy. Jednakże potwierdzenie tego zjawiska u noworodków wymaga dalszych badań.

Interesującą wydaje się ocena wzajemnej zależności pomiędzy aktywnością zarówno antytrombiny III i białka C w surowicy krwi w przebiegu posocznicy wrodzonej jak i nabytej. Wykazała ona, iż w przebiegu posocznicy dochodzi do obniżenia poziomów obu tych parametrów w sposób bardzo zbliżony, jakby równolegle. Stwierdziłam, bowiem istotną korelację pomiędzy zmianami aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi w przebiegu posocznicy. Przedstawiono to na wykresach 23 i 24. Dlatego też w diagnostyce zaburzeń krzepnięcia powstających w trakcie posocznicy celowe jest oznaczanie aktywności zarówno antytrombiny III jak i białka C w surowicy krwi.

Spśród czynników ryzyka uogólnionej infekcji takich jak przedwczesne odpływanie płynu owodniowego, objawy zakażenia u matki, zahamowanie wzrastania wewnątrzmacicznego płodu, w analizowanym materiale jedynie przedwczesne odpływanie płynu owodniowego korelowało z możliwością wystąpienia posocznicy wrodzonej. Być może spowodowane było to niezbyt dużą liczebnością analizowanych przypadków posocznicy wrodzonej (15, 170).

W podsumowaniu należy stwierdzić, iż ocena aktywności zarówno białka C jak i antytrombiny III w surowicy krwi jest istotnym czynnikiem diagnostycznym, mogącym stanowić istotne wskazanie do modyfikacji leczenia poprzez suplementację tych preparatów. W analizowanym badaniu wyraźnie wskazałam poziom aktywności tych

białek, przy którym należy podjąć decyzję o terapii. Pozwoli to ograniczyć zarówno ciężkość przebiegu schorzenia jak i zmniejszyć liczbę niepowodzeń terapeutycznych.

6. Wnioski.

1. Oznaczanie aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi u noworodków w diagnozowaniu posocznicy może być pomocne w ustaleniu rozpoznania.
2. Stwierdzenie aktywności białka C w surowicy krwi poniżej 10%, w początkowym etapie posocznicy, zwłaszcza spowodowanej bakterią Gram ujemną, jest ważnym czynnikiem ryzyka wystąpienia zgonu i może być wskazaniem do suplementacji.
3. Biorąc pod uwagę synergistyczne działanie antytrombiny III i białka C oraz stwierdzoną istotną korelację pomiędzy stężeniem tych białek w początkowym etapie posocznicy należy w chwili podjęcia decyzji o ich suplementacji brać pod uwagę celowość podaży obydwóch preparatów.

7. Streszczenie.

W początkowej fazie infekcji, dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy układem krzepnięcia i fibrynolizy, w której istotną rolę odgrywają antytrombina III i białko C. U zdrowych noworodków poziom tych parametrów w surowicy krwi jest obniżony w porównaniu do osób dorosłych. W moim badaniu postanowiłam odpowiedzieć na pytanie czy oznaczanie antytrombiny III i białka C w surowicy krwi u noworodków może być pomocne w wykrywaniu zaburzeń hemostazy w początkowym stadium posocznicy oraz czy istnieje korelacja pomiędzy poziomem tych czynników a rokowaniem w tej jednostce chorobowej.

Do badania zakwalifikowano 330 noworodków urodzonych i hospitalizowanych w Klinice Neonatologii Katedry Ginekologii i Położnictwa Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Badaną populację podzielono na 3 grupy w zależności od stanu klinicznego i uzyskanych wyników badań bakteriologicznych oraz biochemicznych krwi.

Grupę I stanowiło 150 noworodków, u których na podstawie oceny stanu klinicznego, wyników badań laboratoryjnych oraz danych z przebiegu ciąży wstępnie rozpoznano wrodzone zakażenie. Do grupy tej włączono noworodki w wieku od 1 do 7 doby życia, u których występowały czynniki ryzyka rozwoju infekcji wrodzonej lub w tym okresie życia stwierdzono u nich wyraźne kliniczne objawy zakażenia. U 110 noworodków na podstawie stanu klinicznego oraz wyników bakteriologicznego i biochemicznego badania krwi wykluczono wstępne rozpoznanie posocznicy. Natomiast u 25 noworodków wrodzone zakażenie potwierdzone zostało uzyskanym wynikiem zarówno badania bakteriologicznego i biochemicznego krwi. W 15 przypadkach rozpoznano zespół uogólnionej odpowiedzi zapalnej.

Grupę II stanowiło 150 noworodków, u których objawy kliniczne infekcji wystąpiły po 7 dobie życia. U 57 noworodków na podstawie uzyskanych wyników badań bakteriologicznych i biochemicznych krwi, wykluczono obecność posocznicy nabytej. W 93 przypadkach rozpoznano infekcję jednakże dodatni wynik badania bakteriologicznego krwi uzyskano u 74 pacjentów. U pozostałych 19 dzieci rozpoznano zespół uogólnionej odpowiedzi zapalnej na podstawie objawów klinicznych i wyników badań biochemicznych.

Grupę III, kontrolną stanowiło 30 zdrowych noworodków, urodzonych drogami i siłami natury po prawidłowo przebiegającej ciąży, trwającej powyżej 37 tygodni.

U noworodków w grupie I i II posocznicę diagnozowano na podstawie następujących badań biochemicznych: morfologia krwi obwodowej ze szczególnym uwzględnieniem leukocytozy oraz liczby płytek krwi, stężenie prokalcytoniny, białka C-reaktywnego oraz interleukiny-6 w surowicy krwi. Ponadto oznaczano poziom elektrolitów w surowicy krwi oraz równowagę kwasowo-zasadową krwi tętniczej lub kapilarnej. W każdym przypadku wykonywano również badanie bakteriologiczne krwi. W zależności od współtowarzyszących objawów klinicznych dodatkowo badano bakteriologicznie mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy oraz treść zaaspirowaną z oskrzeli (BAL). U każdego dziecka w chwili wstępnego ustalenia rozpoznania posocznicy, wykonywano pomiar aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi.

W grupie kontrolnej oznaczono jedynie aktywność antytrombiny III i białka C. Krew do badań pobierana była w 1 dobie życia przy okazji badania grupy krwi, które rutynowo wykonuje się w klinice u wszystkich dzieci urodzonych przez matki z grupą krwi „0”.

Zarówno w posocznicy wrodzonej jak i nabytej stwierdzano znamienne niższe poziomy aktywności antytrombiny III i białka C w surowicy krwi u dzieci z rozpoznaną

infekcją w porównaniu do noworodków, u których wykluczono wstępne rozpoznanie zakażenia.

W badaniu wykazano istnienie korelacji pomiędzy rozpoznaniem posocznicy wrodzonej jak i nabytej a poziomem zarówno antytrombiny III jak i białka C w surowicy krwi. I tak przy aktywności antytrombiny III równej 30% prawdopodobieństwo wystąpienia posocznicy wrodzonej wynosiło 40%, a dla posocznicy nabytej 85%. Przy aktywności białka C równej 5%, prawdopodobieństwo rozpoznania posocznicy wrodzonej wynosiło około 50%, a posocznicy nabytej około 85%.

U noworodków, które zmarły z powodu posocznicy, i to zarówno wrodzonej ($p=0,00973$) jak i nabytej ($p=0,00012$), stwierdzano w surowicy krwi statystycznie znacząco niższą aktywność białka C w porównaniu do dzieci, które przeżyły. Takiej różnicy nie obserwowano natomiast w odniesieniu do wartości antytrombiny III.

Przeprowadzona analiza wykazała także zależności pomiędzy aktywnością białka C w surowicy krwi a ryzykiem zgonu w przebiegu zarówno posocznicy wrodzonej i nabytej. Odpowiednio przy poziomie białka C w surowicy krwi wynoszącej 5%, ryzyko prawdopodobieństwa zgonu w przebiegu posocznicy wrodzonej wynosiło aż 40%, natomiast w przypadku posocznicy nabytej sięgało 52%.

Stwierdzono brak różnic dotyczących aktywności zarówno antytrombiny III jak i białka C w surowicy krwi pomiędzy dziećmi, u których posocznica nie została potwierdzona badaniem bakteriologicznym krwi a pacjentami, u których stwierdzono dodatni wynik badania bakteriologicznego krwi (posocznica wrodzona- dla antytrombiny III $p=0,7$ a dla białka C $p=0,99$; posocznica nabyta odpowiednio $p=0,94$ oraz $p=0,99$).

W przypadkach infekcji nabytej o etiologii Gram ujemnej wykazano statystycznie znacząco niższe poziomy aktywności zarówno antytrombiny III ($p=0,00367$) jak i białka C ($p=0,00002$) w surowicy krwi w porównaniu do sytuacji, kiedy przyczyną choroby były

bakterie Gram dodatnie. W postaci wrodzonej taką zależność uzyskano tylko dla białka C ($p=0,00687$). Stwierdzono, iż ryzyko zgonu z powodu posocznicy o etiologii Gram ujemnej było około 37 razy większe niż w przebiegu posocznicy Gram dodatniej.

Analiza zależności pomiędzy takimi czynnikami ryzyka rozwoju posocznicy wrodzonej jak: przedwczesne odpływanie płynu owodniowego (powyżej 24 godzin do czasu porodu), objawy zakażenia u matki, zahamowanie wzrostu wewnątrzmacicznego, stan po obumarciu jednego płodu w ciąży wielopłodowej a rozwojem posocznicy wrodzonej wykazała jedynie istotną zależność pomiędzy przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego, a wystąpieniem infekcji.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż w diagnostyce zaburzeń układu krzepnięcia i fibrynolizy, do jakich może dochodzić w przebiegu posocznicy bakteryjnej celowe jest oznaczanie zarówno aktywności antytrombiny III jak i białka C już w pierwszym okresie diagnozowania tej jednostki chorobowej.

Istotnym spostrzeżeniem jest fakt, iż ryzyko zgonu gwałtownie wzrastało przy poziomie białka C poniżej 10%. Dlatego też wydaje się, iż przy stwierdzeniu tak niskich wartości białka C należy podjąć decyzję o suplementacji tego czynnika. Nie można natomiast, na podstawie uzyskanych wyników, ustalić podobnych zależności w odniesieniu do antytrombiny III.

7. Summary.

An imbalance between the coagulation and fibrinolysis can be observed at the initial phase of bacterial infection, where an essential role is played by antithrombin III and protein C. In healthy neonates, the blood plasma concentration of mentioned factors is remarkably lower than in adult individuals. The aim of the current study was to determine the possible relationship between antithrombin III and protein C and the prognosis of neonatal sepsis, as well as to evaluate diagnostic value of these parameters in early phase of sepsis.

The study included 330 newborns, born and hospitalized at the Neonatal Department the Gynecology and Obstetrics Chair of the Jagiellonian University Medical College in Cracow. The study population was divided into 3 groups depending on clinical status of the patient combined with bacteriological culture and biochemical blood examinations.

The first group (I) consisted of 150 newborns diagnosed as congenital infections. This group included newborns (age 1 to 7 days) who had risk factors in developing congenital infection or who had clinical symptoms of infection. Preliminary diagnosis of the sepsis was rejected in 110 cases, while in 25 neonates the congenital infection was confirmed bacteriologically and biochemically. In 15 cases the systemic inflammatory response syndrome was diagnosed.

The second group (II) consisted of 150 newborns, in whom clinical signs and symptoms of infection appeared after the 7th day of life. In 57 newborns, acquired sepsis was reject on the basis of bacteriological and biochemical examinations. In 95 cases sepsis was diagnosed but positive blood culture results was achieved in 74 patients. Remaining 19 newborns showed the systemic inflammatory response syndrome.

The third group (control) comprised 30 healthy newborns, naturally born from termed pregnancies (>37 weeks).

The sepsis was diagnosed (in groups I and II) based on the following laboratory results: blood cell count (especially taking into account leucocytosis and thrombocytosis), procalcitonin, C-reactive protein and interleukin-6 (IL-6) blood plasma concentration. Moreover, plasma electrolytes and acid-base equilibrium of arterial/arterialized blood were measured. In every case microbiological blood culture was performed. Depending on coexisted clinical signs and symptoms: urine, cerebrospinal fluid or bronchalveolar lavage (BAL) were examined bacteriologically. In each child, at the moment of initial sepsis diagnosis, activity of antithrombin III and protein C serum level was measured.

Only activity of antithrombin III and protein C blood serum level were measured in the control group. Tested blood was drawn on the 1st day after childbirth along with blood group identification (that is routinely performed in our Clinic in all children that are given birth by a mother with type O blood group).

Significantly lower levels of antithrombin III and protein C blood serum were observed in both congenital and acquired sepsis in patients with confirmed infection in comparison to those whose preliminary diagnosis was rejected.

Research proved correlation between the appearance of congenital and acquired sepsis depending on both activity level of antithrombin III and protein C blood serum level. A percentage of activity level of antithrombin III of 30%, gives 40% probability of congenital sepsis development and 85% probability of acquired sepsis development. Protein C serum level of 5%, indicated about 50% probability of congenital sepsis development and 85% probability of acquired sepsis development.

In the group of newborns, which died due to both congenital ($p=0,00973$) and acquired sepsis ($p=0,00012$), lower activity level of protein C was observed in comparison

to children that survived. However, such a difference was not observed in the case of antithrombin III.

A correlation between level protein C blood serum and a risk of death in the course of congenital or acquired sepsis was established. If the level of protein C was 5%, the probability of death due to congenital sepsis was 40% and the chance of death due to acquired sepsis was 52%.

There was no statistical difference in antithrombin III and protein C blood plasma levels between groups of patients with and without bacteriologically confirmed (in congenital sepsis $p=0,7$ for antithrombin III and for protein C $p=0,99$, in acquired sepsis $p=0,94$ for antithrombin III and $p=0,99$ for protein C)

Antithrombin III ($p=0,00367$) and protein C ($p=0,00002$) blood plasma levels were significantly lower in Gram-negative acquired sepsis in comparison to Gram-positive ones. In congenital sepsis such relationship was observed only for protein C ($p=0,00687$). Risk of death in Gram-negative sepsis was 37 times higher than in Gram-positive one.

The analysis of the dependence among risk factors contributing to the development of congenital sepsis such as: premature rupture of the membranes (more than 24 hours preceding birth), signs and symptoms of infection in the mother, intrauterine growth retardation and fetal death of one fetus during multiple pregnancy has shown only interdependence between premature rupture of the membranes and existence of infection.

In conclusion, based on obtained results we found that antithrombin III and protein C may be valuable diagnostic markers of hemostasis disorders observed in early phase of the neonatal sepsis. Worth to notice is an observation that low level ($<10\%$) of protein C is indicative for high risk of death, thus the supplementation of this protein seems to be essential for the therapy of sepsis in neonates with initial protein C depletion. Such statement can not be proved for antithrombin III supplementation.

8. Piśmiennictwo.

1. Botwinski CA.: Systemic inflammatory response syndrom. Neonatal Netw. 2001 Aug;20(5):21-8.
2. Sparrow A., Willis F.: Management of septic shock in childhood. Emerg Med. Australas. 2004 Apr;16(2):125-34.
3. Ali Z.: Neonatal bacterial septicaemia at the Mount Hope Women's Hospital, Trinidad. Ann Trop Paediatr. 2004 Mar;24(1):41-4.
4. Simiyu DE.: Morbidity and mortality of neonates admitted in general paediatric ward at Kenyatta national Hospital. East Afr Med J. 2003 Dec;80(12):611-6.
5. Madan A, Adams MM., Philip AG.: Frequency and timing of symptoms in infants screened for sepsis: effectiveness of a sepsis-screening pathway. Clin Pediatr. 2003 Jan/Feb;42(1):11-18.
6. Angus DC., Linde-Zwirble WT., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky MR.: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med. 2001 Jul;29(7):1303-10.
7. Vergnano S., Sharland M., Kazembe P., Mwansambo C., Heath PT.: Neonatal sepsis: an international perspective. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2005 May;90(3):F220-4.
8. Chowdhury ME., Akhter HH., Chogsuvivatwong V., Geater AF.: Neonatal mortality in rural Bangladesh: an exploratory study. J Health Popul Nutr. 2005 Mar;23(1):16-24.
9. Lanari M., Papa I., Venturi V., Sermasi S., Corvaglia L., Faldella G., Salvioli GP.: Neonatal sepsis. Recent Prog Med. 2001 Nov;92(11):690-5.
10. Orrett FA., Shurland SM.: Neonatal sepsis and mortality in a regional hospital in Trinidad: aetiology and risk factors. Ann Trop Paediatr. 2001 Mar;21(1):20-5.
11. Osrin D., Vergnano S., Costallo A.: Serious bacterial infections in newborn infants indeveloping countries. Curr Opin Infect Dis. 2004 Jun;17(3):217-24.
12. Lee NC., Chen SJ., Tang RB., Hwang BT.: Neonatal bacteremia in a neonatal intensive care unit: analysis of causative organisms and antimicrobial susceptibility. J Chin Med. Assoc. 2004 Jan;67(1):15-20.
13. Stoll BJ., Holman RC., Schuchat A.: Decline in sepsis- associated neonatal and infant deaths in the United State, 1979 through 1994. Pediatrics 1998 Aug;102(2):18.

14. Stoll BJ., Hansen N., Fanaroff AA., Wright LL., Carlo WA., Ehrenkranz RA., Lemons JA., Donovan EF., Stark AR., Tyson JE., Oh W., Bauer CR., Korones SB., Shankaran S., Laptook AR., Stevenson DK., Papile LA., Poole WK.: To tap or not to tap: high likelihood of meningitis without sepsis among very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2004 May;113(5):1181-6.
15. Hafeed BM., Bilikova E., Kovacicova G., Koprnova J., Krcmery V., Chovancova D., Drobna M., Huttova M.: Infection in premature neonates is not associated with higher attributable mortality, but with more neurologic sequellae. *Int J Antimicrob Agents*. 2003 Mar;21 (3): 292-3.
16. Hagberg H., Peebles D., Mallard C.: Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002;8(1):30-8.
17. Malham GM., Souter MJ.: Systemic inflammatory response syndrome and acute neurological disease. *Br J Neurosurg*. 2001 Oct;15(5):381-7.
18. Leviton A., Dammann O.: Coagulation, inflammation, and the risk of neonatal white matter damage. *Pediatr Res*. 2004 Apr;55(4):541-5
19. Craft A., Finer N.: Nosocomial coagulase negative staphylococcal (CoNS) catheter-related sepsis in preterm infant: definition, diagnosis, prophylaxis, and prevention. *J Perinatol*. 2001 Apr-May;21(3):186-92.
20. Krediet TG., Mascini EM., van Rooij E., Vlooswijk J., Paauw A., Gerards LJ., Flier A.: Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):992-5.
21. Saxena R., Kannan M., Choudhry VP.: Neonatal thrombosis. *Indian J Pediatr*. 2003 Nov;70(11):903-7.
22. Hafeed BM., Bilikova E., Kovacicova G., Koprnova J., Svetlansky I., Chovancova D., Huttova.M., Krcmery V.: Prognostic Factor for 246 Neonates with Infections. *Clin Infect Dis*. 2003 May 1;36(9):1203-5.
23. Chen KT., Ringer S., Cohen AP., Lieberman E.: The role of intrapartum fever in identifying asymptomatic term neonates with aerly-onset neonatal sepsis. *J Perinatol*. 2002 Dec;22(8):653-7.
24. Jędrasiak U., Kępińska M.: Rola makrofagów w reakcjach immunologicznych okresu okołoporodowego. *Nowa Pediatria* 2001 4;zeszyt 27:26-9.

25. Seghaye MC., Heyl W., Grabitz RG., Schumacher K., von Bernuth G., Rath W., Duchateau J.: The production of pro- and anti-inflammatory cytokines in neonates assessed by stimulated whole cord blood culture and by plasma levels at birth. *Biol Neonate*. 1998;73(4):220-7.
26. Shultz C., Temming P., Bucsky P., Gopel W., Strunk T., Hartel C.: Immature anti-inflammatory response in neonate. *Clin Exp Immunol*. 2004 Jan;135(1):130-6.
27. Pollin RA.: The „ins and outs” of neonatal sepsis. *J Pediatr*. 2003 Jul;143:3-4
28. Clark R., Powers R., White R., Bloom B., Sanchez P., Benjamin DK Jr.: Nosocomial Infection in the NICU: a medical complication or unavoidable problem? *J Perinatol*. 2004 Jun;24(6):382-8.
29. Lott JW.: Neonatal bacterial sepsis. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2003 Mar;15(1):35-46.
30. Kellogg JA., Manzella JP., Bankert DA.: Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J Clin Microbiol*. 2000 Jun;38(6):2181-5.
31. Edwards RK., Jamie WE., Sterner D., Gentry S., Counts K., Duff P.: Intrapartum antibiotic prophylaxis and early-onset neonatal sepsis patterns. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2003;11(4):221-6.
32. Alarcon A., Pena P., Salas S., Sancha M., Omeeenaca F.: Neonatal early onset *Escherichia coli* sepsis: trends in incidence and antimicrobial resistance in the era of intrapartum antimicrobial prophylaxis. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Apr;23(4):295-9.
33. Esmon CT., Fukudome K., Mather T., Bode W., Regan LM., Stearns-Kurosawa DJ., Kurosawa S.: Inflammation, sepsis, and coagulation, *Haematologica*. 1999 Mar;84(3):254-9.
34. Esmon CT.: Possible involvement of cytokines in diffuse intraventricular coagulation and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 1999 Sep;12(3):343-59. Esmon CT., Gu JM., Xu J., Qu D., Stearns-Kurosawa DJ., Kurosawa S.: Regulation and function of the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica*. 1999 Apr;84(4):363-8.
35. Vincent JL.: Update on sepsis: pathophysiology and treatment. *Acta Clin Belg*. 2000 Mar-Apr;55(2):79-87.

36. Skotnicki AB., Sacha T.: Fizjologia krzepnięcia krwi i fibrynolizy. W: Zaburzenia krzepnięcia krwi. Diagnostyka i leczenie. Skotnicki AB., Sacha T.: Medycyna Praktyczna, Kraków 1997:7-54.
37. Łopaciuk S.: Zaburzenia krzepnięcia krwi. W: Interna. red. Januszewicz W., Kokot F.: PZWL Warszawa 2001:853-880.
38. Herold G.: Hematologia. W: Medycyna Wewnętrzna. Wyd. Lekarskie PZWL Warszawa 1996:19-139.
39. Massberg S., Vogt F., Dickfeld T., Brand K., Page S., Gawaz M.: Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells. *Thromb Res.* 2003 Jun 1;110(4):187-94.
40. Preissner KT., Nawroth PP., Kanse SM.: Vascular protease receptors: integrating haemostasis and endothelial cell functions. *J Pathol* 2000 Feb;190(3):360-72.
41. Lanzkowsky P.: Hematologia i onkologia dziecięca. PZWL Warszawa 1994;178-81.
42. Boldt J., Wollbruck T., Sonneborn S., Welters A., Hempelmann G.: Thrombomodulin in intensive care patients. *Intensive Care Med.* 1995 Aug;21(8):645-50.
43. McGill SN., Ahmed NA., Christou NV.: Endothelial cells: role in infection and inflammation. *World J Surg.* 1998 Feb;22(2):171-8.
44. Boldt J.: Changes of the Hemostatic Network in the Critically III. In: Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine Edited by Vincent L. 2001:123-133.
45. Aird WC.: The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003 May 15;191(10):3765-77.
46. Gryglewski RJ., Moncada S., Plamer RM.: Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 1997 Feb;120(4 Suppl):494-503.
47. Fabre JE., Nguyen M., Athirakul K., Coggins K., McNeish JD., Austin S., Parise LK., FitzGerald GA., Coffman TM., Koller BH.: Activation of the murine AP3 receptor for PGE2 inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation. *J Clin Invest.* 2001 Mar;107(5):603-10.
48. Furie B., Furie BC., Flaumenhaft R.: A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost.* 2001 Jul;86(1):214-21.

49. Zawilska K.: Płytkowe skazy krwotoczne. W: Interna. red. Januszewicz W., Kokot F.: PZWL, Warszawa 2001:824-846.
50. Kralisz U., Cierniewski CS.: Differential effects of the tyrosine kinase inhibitors on collagen type 1-induced platelet aggregation and adhesion to this protein. *Thromb Res.* 1997 May 15;86(4):287-99.
51. Falls LA., Furie B., Furie BC.: Role of phosphatidylethanolamine in assembly and function of the factor IXa-factor VIIIa complex on membrane surfaces. *Biochemistry.* 2000 Oct 31;39(43):13216-22.
52. French JE., Macfarlane RG., Sanders AG.: The structure of haemostatics plus and experimental thrombin in small arteries. *Br J Exp Pathol.* 1964 Oct;45:467-74.
53. Colman RW.: Biologic activities of the contact factors in vivo-potentiation of hypotension, inflammation, and fibrinolysis, and inhibition of cell adhesion, angiogenesis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 1999;82:1568-1577.
54. Green J., Doughty L., Kaplan SS., Sasser H., Carcillo JA.: The tissue factor on plasminogen activator inhibitor type-1 response in pediatric sepsis-induced multiple organ failure. *Thromb Haemost.* 2002 Feb;87(2):218-23.
55. Esmon CT.: The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res.* 2004;114(5-6):321-7.
56. Hoffman JN., Faist E.: Coagulation inhibitors replacement during sepsis: useless? *Crit Care Med.* 2000 Sep;29(9 Suppl):S74-6.
57. Lu G., Broze DJ., Krishnaswamy S.: Formation of Factors IXa and Xa by the extrinsic pathway. *J. Biol. Chem.*, 2004 Apr;279(17):17241-17249.
58. Skotnicki AB., Nowak WS.: Układ hemostatyczny. W: Podstawy hematologii dla studentów i lekarzy. Skotnicki AB., Nowak WS.: Medycyna Praktyczna, Kraków 1998:145-171.
59. Stefanovic J.: Inflammation, immunity and surgery. *Bratisl Lek Listy.* 1995 May;96(5):245-9.
60. de Jonge E., Levi M., van der Poll T.: Natural Anticoagulants in Disseminated Intravascular Coagulation and Sepsis. In: Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine Edited by Vincent L. 2001:113-122.
61. Kopeć M., Łopaciuk S.: Hemostaza fizjologiczna. W: Zakrzepy i zatory red. Łopaciuk S.: PZWL, Warszawa 2002:19-52.

62. Wyględowska G.: Rola endogennych inhibitorów układu krzepnięcia: antytrombiny III, białka C, białka S w układzie hemostazy. *Nowa Pediatría* 4/2001: zeszyt 27:30-32.
63. Łopaciuk S.: Wrodzona trombofilia. W: *Zakrzepy i zatory* red. Łopaciuk S.: PZWL, Warszawa 2002:65-88.
64. Pateja J., Manco-Johnson MJ.: Protein C pathway in infants and children. *Semin Thromb Hemost.* 2003 Aug;29(4):349-62.
65. McLeay AM.: Drotrecogin alfa: a role in emergency department treatment of severe sepsis? *Emerg Med. Australas.* 2004 Aug;16(4):324-35.
66. Joyce DE., Gelbert L, Ciaccia A., DeHoff B., Grinnel BW.: Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001 Apr 6;276(14):11199-11203.
67. Esmon CT.: Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7 Suppl):S48-51.
68. Grinnel BW., Joyce D.: Recombinant human activated protein C: a system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7 Suppl):S53-60.
69. Brueckmann M., Hoffmann U., Dvortsak E., Lang S., Kaden JJ., Borggrefe M., Haase KK.: Drotrecogin alfa (activated) inhibits NF-kappa B activation and MIP-1-alpha release from isolated mononuclear cells of patients with severe spsis. *Inflamm Res.* 2004 Oct;53(10):528-33.
70. Camerota AJ., Creasey AA., Patla V., Larkin VA., Fink MP.: Delayed treatment with recombinant human tissue factor pathway improves survival in rabbits with gram-negative peritonitis. *J Infect Dis.* 1998 Mar;177(3):668-76.
71. Sandset PM.: Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)—an update. *Haemostasis.* 1996 Oct;26 Suppl 4:154-65.
72. LaRosa SP., Opal SM.: Tissue factor pathway inhibitor and antithrombin trial results. *Crit care Clin.* 2005 Jul;21(3):433-48.
73. Dahm AE., Andersen TO., Rosendaal F., Sandset PM.: A novel anticoagulant activity assay of tissue factor pathway inhibitor I (TPFI). *J Thromb Haemost.* 2005 Apr;3(4):651-8.
74. Broze GJ Jr.: Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Ann Rev Med.* 1995;46:10-112.

75. Kemme MJ., Burggraaf J., Schoemaker RC., Paulson S., Karim A., Lentjes EG., Childs A., Braeckman RA., Cohen AF.: The influence of reduced liver blood flow on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant tissue factor pathway inhibitor. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 May;67(5):504-11.
76. Schettini F Jr., Laforgia N., Altomare M., Mautone A., Del Vecchio GC.: Plasma protein Z levels in healthy and high-risk newborn infants. *Acta Paediatr.* 2004 May;93(5):654-7.
77. McGilvray ID., Rotstein OD.: Role of the coagulation system in the local and systemic inflammatory response. *World J Surg.* 1998 Feb;22(2):179-86.
78. Matsuno H., Kozawa O., Ueshima S., Matsuo O., Collen D., Uematsu T.: Lack of tPA significantly affects antithrombotic therapy by a GPIIb/IIIa antagonist, but not by a thrombin inhibitor in mice. *Thromb Haemost.* 2000 Apr;83(4):605-9.
79. Collen D.: The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):259-70.
80. Matsuno H., Kozawa O., Niwa M., Ueshima S., Matsuo O., Collen D., Uematsu T.: Differential role of components of the fibrinolytic system in the formation and removal of thrombin induced by endothelial injury. *Thromb Haemost.* 1999 Apr;81(4):601-4.
81. Ling X., Delorme M., Berry L., Ofosu F., Mitchell L., Paes B., Andrew M.: Alpha 2-macroglobulin remains as important as antithrombin III for thrombin regulation in cord plasma in the presence of endothelial cell surface. *Pediatr Res.* 1995 Mar;37(3):373-8.
82. Lijnen HR., Okada K., Matsuo O., Collen D., Dewerchin M.: Alpha2-antiplasmin gene deficiency in mice is associated with enhanced fibrinolytic potential without over bleeding. *Blood.* 1999 Apr 1;93(7):2274-81.
83. Bajzar L., Manuel R., Nesheim ME.: Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem.* 1995;270:14477-84.
84. Bouma BN., Mosnier LO.: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) at the interface between coagulation and fibrinolysis. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003 Sep-2004 Dec;33(5-6):375-81.
85. Monasterio J., Bermudez P., Quiroga D., Francisco E., Meneses B., Montaner J.: Plasma thrombin-activatable fibrinolytic inhibitor (TAFI) among healthy subjects and patients with vascular diseases: a validation study. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003 Sep-2004 Dec;33(5-6):382-6.

86. Levi M., ten Cate H., van der Poll T., van Deventer S.J.: Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA*. 1993 Aug 25;270(8):975-9.
87. Caplan M.S., Simon D., Jilling T.: The role of PAF, TLR, and the inflammatory response in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg*. 2005 Aug;14(3):145-51.
88. Koh S.C., Cheong Y.C., Arulkumaran S., Ratnam S.S.: Coagulation activation, fibrinolysis and inhibitors in neonates. *Ann Acad Med Singapore*. 1997 Nov;26(6):767-71.
89. Ries M., Klinge J., Rauch R., Zenker M., Aydin I., Harms D.: Changes in the activation markers of blood coagulation and fibrinolysis in the neonatal period. *Klin Padiatr*. 1996 Nov-Dec;208(6):350-4.
90. Grenda R., Litwin M.: Leczenie przeciwwzakrzepowe u dzieci. W: *Zakrzepy i zatory* red. Łopaciuk S.: PZWL, Warszawa 2002:537-549.
91. Korbal P.: Układ krzepnięcia we krwi noworodka cz.I. Noworodki donoszone. *Postępy Neonatologii*. 1995;71-75.
92. Korbal P., Jurkowski P.: Układ krzepnięcia we krwi noworodka cz.II. Wcześnieiki. *Postępy Neonatologii*. 1995;76-78.
93. Korbal P., Sułczyński J.: Układ fibrynolizy we krwi noworodków. *Postępy Neonatologii*. 1995;79-85.
94. Andrew M.: Developmental hemostasis: relevance to hemostatic problems during childhood. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21(4):341-56.
95. Kasprzak J., Godula-Stuglik U., Kasprzak G.: Zmiany aktywności białka C w osoczu noworodków z ostrą niewydolnością oddechową. *Pediatrics Polska*. 1999, LXXIV,10:971-76.
96. Korbal P., Roś D., Żekanowska E., Kotschy M.: Układ krzepnięcia we krwi pępowinowej noworodków donoszonych i wcześniaków cz.I. *Postępy Neonatologii*. 1995;86-97.
97. Korbal P., Jurkowski P., Wiśniewska E., Kotschy M.: Układ krzepnięcia we krwi pępowinowej noworodków donoszonych i wcześniaków cz.II. *Postępy Neonatologii*. 1995;98-101.
98. Schmidt B., Andrew M.: Neonatal thrombosis: report of a prospective Canadian and international registry. *Pediatrics*. 1995 Nov;96(5 Pt 1):939-43.

99. Albisetti M.: The fibrinolytic system in children. *Semin Thromb Hemost.* 2003 Aug;29(4):339-48.
100. Andrew M.: The relevance of developmental hemostasis to hemorrhagic disorders of newborns. *Semin Perinatol.* 1997 Feb;21(1):70-85.
101. Ries M., Easton RL., Longstaff C., Zenker M., Corran PH., Morris HR., Dell A., Gaffney PJ.: Differences between neonates and adults in tissue-type-plasminogen activator (t-PA)-catalyzed plasminogen activation with various effectors and in carbohydrate sequences of fibrinogen chains. *Thromb Res.* 2001 Aug 1;103(3):173-84.
102. Lanzkowsky P.: *Hematologia i onkologia dziecięca.* PZWL Warszawa 1994;393.
103. Armata J.: *Choroby krwi u dzieci.* Seria wydawnicza *Pediatrics*, Kraków 1993;Zeszyt 3:26-41.
104. Skotnicki AB., Sacha T.: *Skazy krwotoczne.* W: *Zaburzenia krzepnięcia krwi. Diagnostyka i leczenie.* Skotnicki AB., Sacha T.: *Medycyna Praktyczna*, Kraków 1997:165-212.
105. Shetty AK., Warriar RP.: *Hematologia noworodków.* W: *Neonatalogia* red.Gadzinowski J, Vidyasagar D. OWN Poznań 2000; 427-449.
106. Rokicka-Milewska R.: *Skazy krwotoczne u dzieci.* W *Pediatrics* red. Kubika K, Kawalec W.: PZWL Warszawa 2004; 425-440
107. Schultz C., Root C., Temming P., Schlenke P., Moller JC., Buesky P.: Enhanced interleukin -6 nad interleukin -8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res.* 2002 Mar;51(3):317-22.
108. Carcillo JA.: *Pediatric Sepsis and Multiple Organ Failure at the Millenium: A US Perspective.* In: *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* Edited by Vincent L. 2001: 23-34.
109. Roitt I., Brostoff J., Male D.: *Immunologia.* PZWL Warszawa 2000; 229-42.
110. Dembiński J., Behrendt D., Reinsberg J., Bartmann P.: Endotoxin-stimulated production of IL-6 and IL-8 is increased in short-term cultures of whole blood from healthy term neonates. *Cytokine.* 2002 Apr21;18(2):116-9.
111. Hajjar AM., Ernst RK., Tsai JH., CB., Miller SI.: Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications.
112. Mavrommatis AC., Theodoridis T., Economau M., Kotanidou A., El Ali M., Christopoulou-Kokkinou V., Zakynthinos SG.: Activation of the fibrynolytic

- system and utilization of the coagulation inhibitors in sepsis: comparison with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2001 Dec ;27(12):1853-9.
113. Taylor FB Jr., Wada H., Kinasewitz G.: Description of compensated and uncompensated disseminated intravascular coagulation (DIC) responses (non-overt and overt DIC) in baboon models of intravenous and intraperitoneal *Escherichia Coli* sepsis and in the human model of endotoxemia: towards a better definition of DIC. *Crit Care Med*, 2000 Sep;28(9 suppl):S12-9.
 114. Levi M., de Jonge E., van der Poll T., ten Cate H.: Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):695-705.
 115. Lee WL., Downey GP.: Coagulation inhibitors in sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Intensive Care Med* 2000 Nov;26(11):1701-6.
 116. Barton MH., Morris DD., Norton N, Prasse KW.: Hemostatic and fibrinolytic indices in neonatal foals with presumed septicemia. *J Vet Intern Med.* 1998 Jan-Feb;12(1):26-35.
 117. Ng PC.: Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004 May;89(3):F229-35.
 118. Lott JW.: Neonatal bacterial sepsis. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2003 Mar;15(1):35-46.
 119. Lauterbach R.: Postępowanie w posocznicy bakteryjnej u noworodka W: Rekomendacje postępowania w medycynie perinatalnej. wyd 2 red. Gadzinowski J., Bręborowicz GH. OWN Poznań 2000:31-36.
 120. Varsha, Rusia U., Sikka M., Faridi MM., Madan N.: Validity of hematologic parameters in identification of early and late onset neonatal infection.
 121. Lauterbach R.: ABC zakażeń u noworodka. wyd.1 Medycyna Praktyczna, Kraków 2001:23-29.
 122. Hengst JM.: The role of C-reactive protein in the evaluation and management of infants with suspected sepsis. *Adv Neonatal Care.* 2003 Feb;3(1):3-13.
 123. Icagasioglu D., Caksen H., Sutcu I., Cevit O.: Serum C-reactive protein and interleukin 6 levels in neonatal sepsis. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2002;45(3):111-3.
 124. Chiesa C., Pellegrini G., Panero A., Osborn JF., Signore F., Assumma M., Pacifico L.: C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin Chem.* 2003 Jan;49(1):60-8.

125. Magudumana MO., Ballot DE., Cooper PA., Trusler J., Cory BJ., Viljoen E., Carter AC.: Serial interleukin 6 measurement in the early diagnosis of neonatal sepsis. *J Trop Pediatr.* 2000 Oct;46(5):267-71.
126. Dollner H., Vatten L., Austgulen R.: Early diagnostic markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour factor receptors and soluble adhesion molecules. *Clin Epidemiol.* 2001 Dec;54(12):1251-7.
127. Laborada G., Rego M., Jain A., Juliana M., Stavola J., Ballabh P., Krauss AN., Auld PA., Nesin M.: Diagnostic value of cytokines and C-reactive protein in the first 24 hours of neonatal sepsis. *Am J Perinatal.* 2003 Nov;20(8):491-501.
128. Gonzalez BE., Mercado CK., Johnson L., Brodsky NL., Bhanbari V.: Early markers of late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokines profile. *J Perinatal Med.* 2003;31(1):60-8.
129. Janota J., Stranak Z., Belohlavkova S.: Interleukin-6, procalcitonin, C-reactive protein and the immature to total neutrophil ratio (I/T) in the diagnosis of early-onset sepsis in low birth weight neonates. *Ceska Ginekol.* 2000 dec;65 Suppl 1:29-33.
130. Garland SM., Bosman ED.: Reappraisal of C-reactive protein as a screening tool for neonatal sepsis. *Pathology.* 2003 Jun;35(3):240-3.
131. Skotnicki AB., Sacha T.: Ogólne próby krzepnięcia krwi, badania układu fibrynolizy. W: Zaburzenia krzepnięcia krwi. Diagnostyka i leczenie. Skotnicki AB., Sacha T.: Medycyna Praktyczna, Kraków 1997:55-74.
132. Bomski H.: Podstawowe laboratoryjne badania hematologiczne. PZWL, Warszawa 1995.
133. Jakubowski Z., Kabata J., Kalinowski L., Szczepańska-Konkel M., Angielski S.: Badania laboratoryjne w codziennej praktyce wartości referencyjne i interpretacje. Mak med. Gdańsk 1996.
134. Esmon CT.: Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res.* 2003;9(3):192-8.
135. Esmon CT.: Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2003 Jul;1(7):1343-8.
136. Esmon CT.: Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas.* 2004 Apr 15;47(4):305-14.
137. Short MA.: Linking the sepsis triad of inflammation, coagulation, and suppressed fibrinolysis to infants. *Adv Neonatal Care.* 2004 Oct;4(5):258-73.

138. Lauterbach R., Pawlik D., Kowalczyk D., Ksycinski W., Helwich E., Zembala M.: Effect of the immunomodulating agent, pentoxifylline, in the treatment of sepsis in prematurely delivered infants: placebo-controlled, double-blind trial. *Crit Care Med.* 1999 Apr;27(4):807-14.
139. Dollner H., Vatten L., Linnebo I., Zanussi GF., Laerdal A., Austgulen R.: Inflammatory mediators in umbilical plasma from neonates who develop early-onset sepsis. *Biol Neonate.* 2001 Jul;80(1):41-7.
140. Rite Gracia S., Grasa Ullrich JM., Ruiz de la Cuesta Martin C., Grasa Biec JM., Rebage Moises V., Marco Tello A., Rite Montanes S.: Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha as marker of vertically-transmitted neonatal bacterial infection. *An Pediatr (Barc).* 2003 Sep;59(3):246-51.
141. Healy DP.: New and emerging therapies for sepsis. *Ann Pharmacother.* 2002 Apr;36(4):648-54.
142. Novakowa D., Simak J., Janota J., Stranak Z.: Development of multiple organ failure in critically ill newborns under AT III substitution. *Sb Lek* 2000;101(2):143-8.
143. Sajon I., Da-Silva SS., Dellinger RP.: Drotrecogin alfa (activated) in an infant with gram-negative septic shock. *J Intensive Care Med.* 2004 Jan-Feb;19(1):51-5.
144. Rawicz M., Sitkowska B., Rudzińska I., Kornacka KM., Bocheński P.: Recombinant human activated protein C for severe sepsis in a neonate. *Med. Sci Monit.* 2002 Nov;8(11):CS90-94.
145. Frommhold D., Birle A., Linderkamp O., Zilow E., Poschl J.: Drotrecogin alpha (activated) in neonatal septic shock. *Scand J Infect Dis.* 2005;37(4):306-8.
146. Streif W., Mitchell LG., Andrew M.: Antithrombotic therapy in children. *Curr Opin Pediatr.* 1999 Feb;11(1):56-64.
147. Rice TW., Bernard GR.: New additions to the intensive care armamentarium. *Drugs Today (Barc).* 2004 Feb;40(2):157-70.
148. Bernard GR., Macias WL., Joyce DE., Williams MD., Bailey J., Vincent JL.: Safety assessment of drotrecogin alfa (activated) in the treatment of adult patients with severe sepsis. *Crit Care.* 2003 Apr;7(2):155-63.
149. Angus DC., Laterre PF., Helterbrand J., Ely EW., Ball DE., Garg R., Weissfeld LA., Bernard GR; PROWESS Investigators. The effect of drotrecogin alfa (activated) on long-term survival after severe sepsis. *Crit Care Med.* 2004 Nov;32(11):2199-206.

150. Dhainaut JF., Laterre PF., Janes JM., Bernard GR., Artigas A., Bakker J., Riess H., Basson BR., Charpentier J., Utterback BG., Vincent JL; Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Sepsis (PROWESS) Study Group. *Intensive Care Med.* 2003 Jun;29(6):894-903.
151. Derhasching U., Reiter R., Knobl P., Baumgartner M., Keen P., Jilma B.: Recombinant human activated protein C (rhAPC; drotrecogin alfa [activated]) has minimal effect on markers of coagulation, fibrinolysis, and inflammation in acute human endotoxemia. *Blood.* 2003 Sep 15;102(6):2093-8.
152. Dhainaut JF., Yan SB., Margolis BD., Lorente JA., Russel JA., Freebairn RC., Spapen HD., Riess H., Basson B., Johnson G. 3rd, Kinasewitz CT.; PROWESS Sepsis Study Group. Drotrecogin alfa (activated) (recombinant human activated protein C) reduces host coagulopathy response in patient with severe sepsis. *Thromb Haemost.* 2003 Oct;90(4):642-53.
153. O'Brien JM Jr., Abraham E.: Human models of endotoxemia and recombinant human activated protein C. *Crit Care Med.* 2004 May;32(5 Suppl):S202-8.
154. Barie PS., Williams MD., McCollam JS., Bates BM., Qualy RL., Lowry SF., Fry DE.; PROWESS Surgical Evaluation Communittee.: Benefit/risk profile of drotrecogin alfa (activated) in surgical patient with severe sepsis. *Am J Surg.* 2004 Sep;188(3):212-20.
155. Rice TW., Bernard GR.: Drotrecogin alfa (activated) for treatment of severe sepsis and septic shock. *Am J Med. Sci.* 2004 Oct;328(4):205-14.
156. Cunneen J., Cartwright M.: The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. *AACN Clin Issues.* 2004 Jan-Mar;15(1):18-44.
157. de Kleijn AD., de Groot R., Hack CE., Mulder PG., Engl W., Moritz B., Joosten KF., Hazelzet JA.: Activation of protein C following infusion of protein C concentrate in children with severe meningococcal sepsis and purpura fulminans: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-finding study. *Crit Care Med.* 2003 Jun;31(6):1839-47.
158. Yan SB., Dhainaut JF.: Activated protein C versus protein C in severe sepsis. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7 Suppl):S69-74.
159. Ng PC., Li K., Wong RP., Chui K., Wong E., Li G., Fok TF.: Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003 May;88(3):F209-13.

160. Loisa P., Rinne T., Laine S., Hurme M., Kaukinen S.: Anti-inflammatory cytokines response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2003 Mar;47(3):319-25.
161. Sikora JP., Chlebna-Sokol D., Krzyzanska-Oberbek A.: Proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8), cytokine inhibitors (IL-6sR, sTNFRII) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) in the pathogenesis of sepsis in newborns and infants. *Arch Immunol Ther Exp.* 2001;49(5):399-404.
162. Yan SB., Helterbrand JD., Hartman DL., Wright TJ., Bernard GR.: Low levels of protein C are associated with poor outcome in severe sepsis. *Chest* 2001 Sep;120(3):915-22.
163. Dudyńska M, Ziaja K, Zmelonek A.: Ocena stężenia antytrombiny III w surowicy krwi noworodków jako czynnika diagnostycznego w rozpoznaniu posocznicy. *Przegląd Lekarski* 2003, Suplement 2;12.
164. Pavlidis TE.: Cellular changes in association with defense mechanisms in intra-abdominal sepsis. *Minerva Chir.* 2003 Dec;58(6):777-81.
165. Opal SM., Garber GE., LaRosa SP., Maki DG., Freebairn RC., Kinasewitz GT., Dhainaut JF., Yan SB., Williams MD., Graham DE., Nelson DR., Levy H., Bernard GR.: Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). *Clin Infect Dis.* 2003 Jul;37(1):50-8.
166. Mayor-Lynn K., Gonzalez-Quintero VH., O'Sullivan MJ. Hartstein AI., Roger S., Tamayo M.: Comparison of early-onset neonatal sepsis caused by *Escherichia coli* and group B *Streptococcus*. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 May;192(5):1437-9.
167. Chuansumrit A., Hotrakitya S., Sirinavain S., Supapanachart S., Khowsathit P., Chantarojanasiri T., Phuapradit P., Hathirat P.: Disseminated intravascular coagulation finding in 100 patients. *J Med Assoc Thai.* 1999 Nov;82 Suppl 1:S63-8.
168. Cone LA., Stone RA., Jesser K., Nelson R.: Clinical experience with drotrecogin alfa in treating gram-positive and gram-negative pathogens in patients with severe sepsis. *J Investig Med.* 2004 Nov;52(7):470-4.
169. Beshlawy AE., Hussein HA., Abou-Elew HH., Eldin MS., Kader MA.: Study of protein C, protein S, and antithrombin III in hypoxic newborn. *Pediatr Crit Care Med.* 2004 5(2):163-66.

170. Bergstrom S.: Infection-related morbidities in the mother, fetus and neonate. J Nutr. 2003 May;133(5 Suppl 2):1656S-1660S.