

Badanie hemostazy: osoczowy układ krzepnięcia i zaburzenia dotyczące płytek krwi

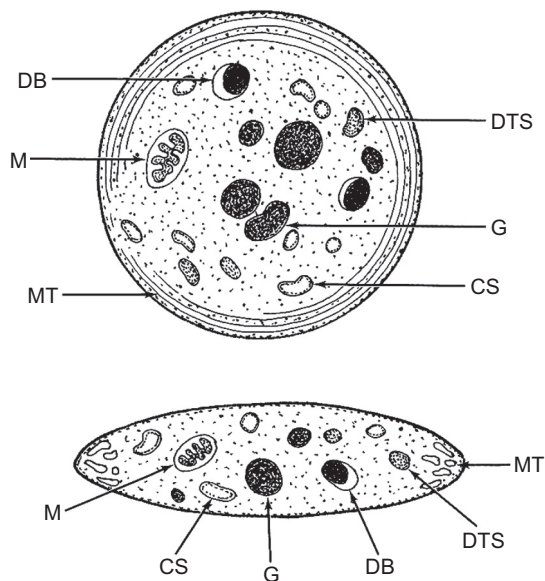
Hemostaza jest uzależniona od integralności naczyń, liczby i funkcji płytek krwi oraz osoczowego układu krzepnięcia. Integralność naczyń jest w dużej mierze związana ze stanem komórek śródbłonna oraz podnabłonkowej tkanki łącznej. Uszkodzenie ściany naczynia krwionośnego może prowadzić do krwawienia i (lub) aktywacji płytek krwi oraz zapoczątkowania krzepnięcia. Gdy dojdzie do uszkodzenia tętnic, przejściowy skurcz naczyń spowalnia utratę krwi i pozwala na wydłużenie czasu potrzebnego do rozpoczęcia formowania czopu z płytek krwi oraz procesu krzepnięcia, co ostatecznie prowadzi do powstania stabilnego skrzepu.

PŁYTKI KRWI

Płytki krwi (trombocyty) u ssaków są niewielkimi, okrągłymi do owalnych komórkami pozbawionymi jąder. Powstają z wypustek cytoplazmy megakariocytów. Cytoplazma płytek krwi w rutynowych metodach barwienia jest jasnoniebieska, z licznymi, małymi czerwono-fioletowymi ziarnistościami. W badaniu z użyciem mikroskopu skaningowego niestymulowane płytki krwi wyglądają jak cienkie dyski. U większości zwierząt domowych ich czas przeżycia wynosi od 5 do 10 dni. Prawidłowa liczba płytek krwi jest odmienna u różnych gatunków zwierząt, z minimalną wartością tak niską, jak $100 \times 10^3/\mu\text{l}$ u koni i maksymalną wartością tak wysoką, jak $800 \times 10^3/\mu\text{l}$ u kilku gatunków zwierząt domowych. Liczba trombocytów we krwi znacząco przewyższa ich liczbę niezbędną do prawidłowej hemostazy. U ludzi 30% płytek jest przechowywane w śledzionie, ale jej skurcz spowodowany stymulacją adrenergiczną (jak to ma miejsce podczas wysiłku) nie prowadzi do nadpłytkowości u koni czy psów.

Trombocyty u gatunków zwierząt niebędących ssakami mają jądra komórkowe i są znacznie większe niż u ssaków. Mają one wysoki stosunek objętości jądra komórkowego do objętości cytoplazmy. W zabarwionych rozmazach są one często owalne lub wydłużone, z jasnoniebieską cytoplazmą. W jednym lub obu końcach komórki mogą być obecne wakuole. Ziarnistości zazwyczaj nie występują. Gdy trombocyty są bardziej okrągłe, mogą być bardzo trudne do odróżnienia od limfocytów. Podobnie jak u ssaków, aktywowane płytki krwi występują w zlepekach w rozmazie. Liczba trombocytów u gatunków zwierząt niebędących ssakami jest znacznie niższa niż u ssaków. U większości gatunków ptaków liczba trombocytów mieści się w zakresie od $20 \times 10^3/\mu\text{l}$ do $30 \times 10^3/\mu\text{l}$.

Podobnie jak w przypadku innych komórek, głównym źródłem energii dla płytek krwi jest glukoza. W przeciwieństwie do pozbawionych jądra erytrocytów płytki krwi posiadają mitochondria, a zatem zachodzi u nich cykl Krebsa oraz fosforylacja tlenowa, ale niewielka ilość pirogronianu powstającego podczas glikolizy jest metabolizowana w cyklu Krebsa. Biochemicznie płytki krwi porównywane są często do białych mięśni szkieletowych. Mają one aktywną glikolizę beztlenową oraz syntetyzują i zużywają duże ilości glikogenu. Płytki krwi są zaopatrzone w gęsty system kanalików, który jest analogiczny do siateczki śródplazmatycznej sekwestrującej jony wapnia (Ca^{2+}) w mięśniach szkieletowych (ryc. 6-1). U większości spośród zwierząt domowych występuje dobrze rozwinięty system kanalików, który ciągnie się aż do ich błony komórkowej. W trombocytach występują mikrotubule i mikrofilamenty zbudowane z różnych białek kurczliwych, w tym z aktyny, miozyny i związanych z nimi protein. System mikrotubul pomaga w utrzymaniu dyskowatego kształtu spoczynkowych



Ryc. 6-1 Ultrastruktura płytki krwi. *DB*, ciała gęste; *M*, mitochondria; *MT*, mikrotubule; *DTS*, gęsty system kanalików; *G*, ziarnistości; *CS*, system kanalików.

płytek krwi. Głównym mediatorem wykorzystania energii w tych komórkach jest adenozynotryfosfataza podobna do aktomizyny, która jest zależna od jonów Ca^{2+} i magnezu. Zmiany w strukturze przestrzennej włókien aktynowych oraz organizacja białek zależnych są niezbędne do zmiany kształtu trombocytów, rozprzestrzeniania, agregacji, wydzielania oraz kurczenia skrzepu.

Nukleotydy adeninowe występują w przybliżonych ilościach w puli metabolicznej i w puli zapasowej. Podobnie jak w innych komórkach trifosforan adenozyny (ATP) stanowi większość nukleotydu adeninowego zaliczającego się do puli metabolicznej. ATP z tej puli stanowi źródło energii potrzebne do podtrzymania funkcji komórek. Poza energią niezbędną do prawidłowej homeostazy, płytki zużywają dużą jej ilość podczas agregacji i reakcji uwalniania, co zostało opisane w dalszej części rozdziału. Około 50% nukleotydów adeninowych jest obecne w ziarnistościach gęstych i ziarnistościach δ (pula zapasowa). Ziarnistości gęste oprócz ATP zawierają istotny difosforan adenozyny (ADP), Ca^{++} , jony magnezu oraz serotoninę, które to substancje są wydzielane na zewnątrz podczas reakcji uwalniania (degranulacji). Zawartość innych ziarnistości (ziarnistości α) jest również uwalniana na zewnątrz, gdy płytki krwi są aktywowane. Część składników tych ziarnistości jest syntetyzowana przez megakariocyty, inne pochodzą z osocza. Zawartość ziarnistości α jest zróżnicowana u różnych gatunków. Ich zawartość mogą stanowić: białka adhezyjne (czynnik von Willebranda [vWF], fibrynogen, fibronektyna, trombospondyna), czynniki krzepnięcia V i XI, inhibitory fibrylizacji (inhibitor aktywatora plazminogenu, inhibitor α -plazminy), chemokiny (czynnik płytkowy 4 i β -tromboglobulina), p-selektyna, receptory dla glikoproteiny (GP) GPIb (CD42b-c) i GPIIb/IIIa (CD41/CD61) oraz inne składniki, takie jak: czynniki leukotaktyczne, mitogeny oraz czynniki naczyniorucho-

we warunkujące przepuszczalność naczyń. W płytkach krwi znajdują się również lizosomy, które zawierają enzymy hydrolityczne.

Na swej powierzchni płytki krwi prezentują różne cząsteczki glikoprotein, które są niezbędne do prawidłowego przebiegu adhezji (płytki do tkanki łącznej pozakomórkowej) oraz agregacji (łączenia płytek między sobą). Kompleks glikoprotein GPIb/IX/V (CD42a-d) jest szczególnie istotny dla adhezji płytek do vWF, który jest związany z tkanką łączną podśródnabłonkową. Kompleks GPIIb/IIIa (integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$) jest niezbędny do prawidłowej agregacji płytek krwi, w której udział bierze w głównej mierze fibrynogen.

Płytki krwi odgrywają 3 podstawowe funkcje w hemostazie. Po pierwsze, w miejscu uszkodzenia jest formowany czop z płytek. Powstanie jedynie czopu płytkowego jest wystarczające do zahamowania krwawienia z małego naczynia krwionośnego. Po drugie, w wyniku aktywacji płytek krwi dochodzi do przemieszczenia ujemnie naładowanych fosfolipidów (przede wszystkim fosfatydyloseryny) z powierzchni wewnętrznej na powierzchnię zewnętrzną trombocytów. Te aminofosfolipidy wiążą pewne czynniki krzepnięcia w niewielkiej odległości, przyspieszając w ten sposób krzepnięcie. Po trzecie, obecność płytek krwi zapewnia w pewien sposób prawidłową integralność naczyń krwionośnych. Śródbłonek naczyń krwionośnych jest cienki i bardziej podatny na przerwanie u zwierząt z niewielką liczbą płytek krwi (trombocytopenią).

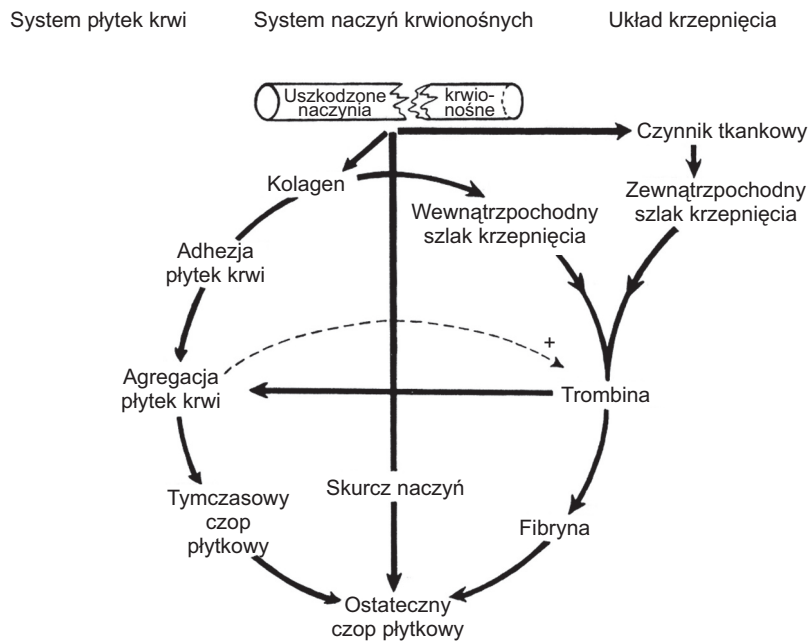
HEMOSTAZA PIERWOTNA

Faza naczyniowa

Hemostaza pierwotna składa się z fazy naczyniowej i fazy płytkowej (ryc. 6-2). Po uszkodzeniu naczynia odruchowy skurcz naczyń czasowo opóźnia przepływ krwi, co zapewnia czas na uformowanie czopu płytkowego i tworzenie skrzepu. Uszkodzenie lub ubytek komórek śródbłonna prowadzi do odsłonięcia tkanki łącznej podśródnabłonkowej, adhezji i aktywacji płytek krwi, a także do zainicjowania wewnątrzpochoźnego szlaku krzepnięcia. Komórki śródbłonna i inne uszkodzone tkanki uwalniają ADP i czynnik tkankowy (TF, tromboplastynę tkankową), co zapoczątkowuje odpowiednio agregację trombocytów oraz zewnątrzpochoźny szlak krzepnięcia.

Faza płytkowa

W odpowiedzi na uszkodzenie naczyń krwionośnych lub ekspozycję na obce powierzchnie, płytki krwi szybko podlegają procesom adhezji, zmiany kształtu, uwalniania i agregacji poprzez złożoną serię skoordynowanych procesów, które kończą się powstaniem precyzyjnie umiejscowionego czopu płytkowego. Z powodu szybkości odpowiedzi wewnątrzkomórkowej i współdziałania między systemami wtórnych przekaźników, nie jest możliwe uporządkowanie różnych układów efektorów w jasno zdefiniowaną sekwencję czasową. Wzajemna aktywacja układów efektorów również utrudnia określenie dokładnej sekwencji zdarzeń.

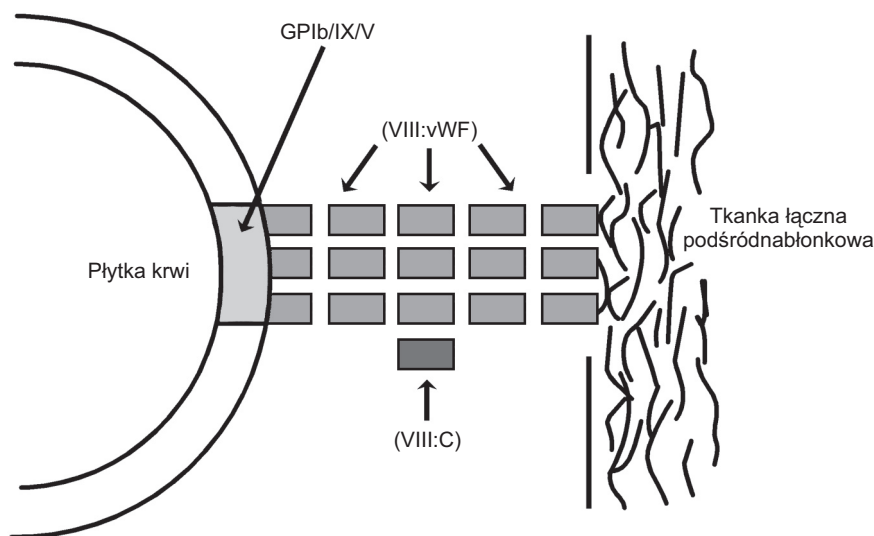


Ryc. 6-2 Opis ogólnej hemostazy pierwotnej.

Adhezja płytek krwi

Do optymalnej adhezji niezbędne jest związanie płytkowych glikoprotein powierzchniowych GPIb kompleksu GPIb/IX/V bogatego w leucynę do cząsteczek vWF. Ten kompleks glikoprotein GPIb/IX/V nie wiąże się z rozpuszczalną formą vWF, łączy się tylko z nieruchomymi cząsteczkami czynnika von Willebranda, które zostały zdeponowane w tkance łącznej podśródnabłonkowej. vWF jest w tym miejscu pierwotnie związany z mikrowłóknami kolagenu (ryc. 6-3). Czynnik ten jest składnikiem wielocząsteczkowego kompleksu czynnika VIII. Jest to duży tetramer połączony mostkami dwusiarczkowymi (o masie cząsteczkowej 850 000 D), który krąży jako duże multimery (od 8 do 12×10^6 D) we krwi.

Multimetry vWF łączą się z VIII czynnikiem krzepnięcia (VIII:C), mniejszym białkiem (o masie cząsteczkowej 250 000 D), które funkcjonuje jako prokoagulant w wewnętrznym szlaku krzepnięcia. Związany z czynnikiem VIII:C vWF wydaje się przedłużać czas krążenia czynnika VIII:C. Te dwa czynniki są kontrolowane przez różne geny i są syntetyzowane niezależnie. vWF, określany również jako czynnik VIII:R (*antygen związany*), jest kodowany przez gen autosomalny i syntetyzowany przez komórki śródbłonka oraz megakariocyty (u niektórych gatunków zwierząt). Czynnik VIII:C, określany jako *czynnik VIII:AHF (czynnik przeciwhemofilowy)*, jest produktem związanym z genem X i jest wytwarzany przez komórki śródbłonka.



Ryc. 6-3 Czynnik von Willebranda (vWF), składnik kompleksu czynnika VIII (VIII:vWF) jest niezbędny do optymalnego łączenia się płytek krwi z warstwą podśródnabłonkową. vWF łączy się z kompleksem glikoproteinowym GPIb/IX/V na powierzchni płytki krwi. VIII:C, część koagulacyjna kompleksu czynnika VIII.

Poza obecnością vWF w układzie krążenia, występuje on również w ziarnistościach płytek krwi niektórych gatunków (trombocyty psa zawierają niewiele vWF) i jest związany z tkanką łączną podśródnabłonkową, do której jest uwalniany przez komórki śródbłonka. Trombocyty nie łączą się z krążącym czynnikiem von Willebranda. Wydaje się, że po przyłączeniu do tkanki łącznej podśródnabłonkowej vWF zmienia kształt, co powoduje, że łatwo łączy się z receptorem GPIIb płytek krwi, zwłaszcza pod wpływem sił ścinających, np. wówczas, gdy płynąca krew ma kontakt z powierzchnią podśródnabłonkową.

Aktywacja płytek krwi

Adhezja płytek krwi do macierzy pozakomórkowej oraz wiązanie kolagenu i innych silnych agonistów (stymulatorów), takich jak trombina i tromboksan A_2 (TxA_2) w wysokich stężeniach, powoduje aktywację fosfolipazy C w błonie komórkowej trombocytów (ryc. 6-4). Fosfolipaza C rozkłada unikatowy fosfolipid błony 4,5-difosforanfosfatydyloinozytolu do trifosforanu inozytolu i diacyloglicerolu. Trifosforan inozytolu łączy się z receptorem w gęstym systemie kanalików, powodując uwolnienie wewnątrzkomórkowego Ca^{++} , a diacyloglicerol nasila aktywację białkowej lipazy C. Reakcje te stymulują płytki krwi na różne sposoby, prowadząc do zmiany ich kształtu, uwalniania i agregacji.

Tacy agoniści, jak: ADP, serotonina i niskie stężenie trombiny, aktywują fosfolipazę A_2 , która stymuluje hydrolizę fosfolipidów (zwłaszcza fosfatydylocholinę), powodując uwolnienie kwasu arachidonowego. Kwas arachidonowy jest następnie metabolizowany do TxA_2 szlakiem enzymatycznym cyklooksygenazy (ryc. 6-5). Fosfolipaza A_2 (w powiązaniu z acetylotransferazą) jest również związana z tworzeniem czynnika aktywującego płytki krwi (PAF) (1-0-acetylo-2-0-glicerylo-3-fosforylocholina), innego agonisty powodującego agregację

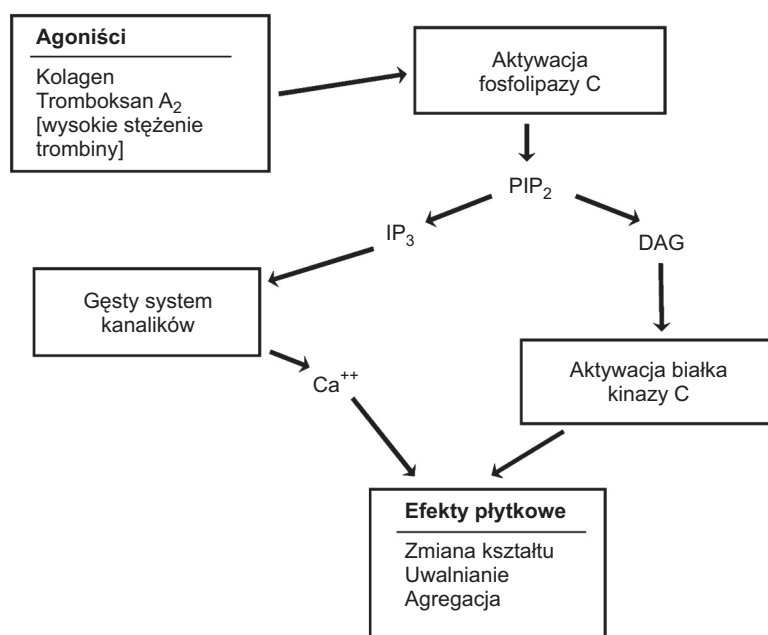
trombocytów. PAF może być wytwarzany nie tylko przez aktywowane płytki krwi, ale również przez komórki śródbłonka i leukocyty.

Adrenalina nie pełni bezpośrednio roli agonisty, ale nasila aktywację płytek krwi i sekrecję, zapoczątkowaną przez innych agonistów. Trombocyty niektórych psów nie są wrażliwe na działanie TxA_2 *in vitro*, z powodu upośledzonego sprzęgnięcia tromboksanu z białkiem G. Defekt ten nie występuje, jeśli wcześniej płytki zostaną poddane działaniu adrenaliny.

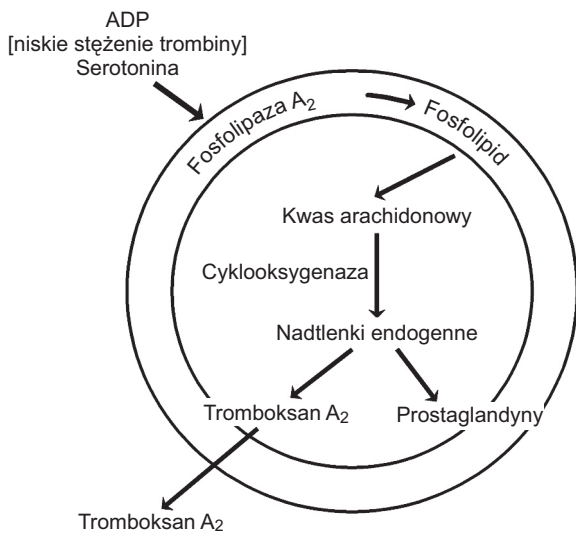
Aktywacja płytek krwi jest hamowana przez prostacyklinę. Pod wpływem stymulacji przez trombinę, komórki śródbłonka wytwarzają prostacyklinę, jako produkt szlaku metabolicznego kwasu arachidonowego. Antagonista ten powoduje agregację poprzez stymulację syntezy cyklicznego monofosforanu adenozyliny w płytkach krwi. (Agonista przyczynia się do zmniejszenia tego efektu poprzez obniżenie stężenia cyklicznego monofosforanu adenozyliny w trombocytach). Prostacyklina pełni również rolę czynnika rozszerzającego naczynia krwionośne. Aktywowane komórki śródbłonka najprawdopodobniej również tłumią aktywność płytek krwi poprzez wzrost ilości wytwarzanego tlenu azotu. Tlenek azotu u ludzi wydaje się lepiej hamować adhezję płytek niż prostacyklina.

Zmiana kształtu

Dyskoidalny kształt spoczynkowych płytek krwi jest utrzymywany dzięki obwodowym pęczkom mikrotubul znajdujących się pod błoną komórkową trombocytów i rozległej sieci krótkich włókien aktyny, które tworzą szkielet błonowy. Po związaniu z vWF i składnikami tkanki łącznej podśródnabłonkowej dochodzi do aktywacji płytek krwi, zwoje przyjmują kształt liniowy oraz zwiększa się polimeryzacja aktyny, co powoduje powiększenie rozmiarów komórek i prowadzi do powstania



Ryc. 6-4 Aktywacja fosfolipazy C i jej skutki dotyczące płytek. PIP_2 , fosfolipid 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu; DAG, diacyloglicerol; Ca^{++} , jony wapnia



Ryc. 6-5 Aktywacja fosfolipazy A₂ i wytwarzanie trombosanu A₂.

filopodiów. Na powierzchni są również ekspozowane ujemnie naładowane fosfolipidy i receptory glikoproteinowe. Trombocyty mają receptory powierzchniowe, są to głównie β_1 -integryny, dla różnych składników podśrobnabłonkowych, takich jak kolagen, fibronektyna, lamininy i trombospondyna. Receptor dla kolagenu ($\alpha_1\beta_1$ integryna) odgrywa rolę w adhezji oraz pełni funkcję agonisty receptora.

Wydzielanie płytek krwi

Do wydzielania płytek krwi (uwalniania lub degranulacji) niezbędny jest uzależniony od energii mechanizm skurczu. Ciałka gęste i ziarnistości α są razem miażdżone (połączenie i rozpuszczenie) przez otaczającą sieć mikrotubul i mikrofilamentów. Zawartość ciałek gęstych i ziarnistości jest wydzielana do otwartego systemu kanalików, które łączą się z powierzchnią płytki krwi. Trombocyty bydła i ślony mają minimalną liczbę canali-

ków; ziarnistości i ciałka gęste uwalniają swoją zawartość przede wszystkim przez łączenie się z zewnętrzną błoną płytkową. Kurczenie się poszczególnych płytek krwi i ich skupianie się ułatwia wydalanie zawartości do otaczającego osocza. ADP, serotonina i wapń uwolniony z ciałek gęstych sprzyjają agregacji płytek krwi.

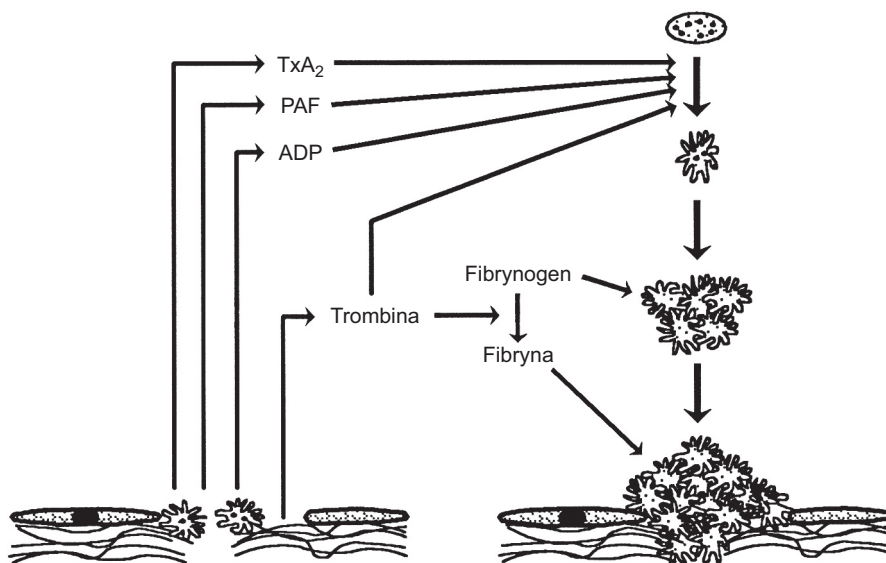
Agregacja płytek krwi

ADP, TxA₂, trombina (produkt powstający podczas krzepnięcia) i PAF są ważnymi agonistami pobudzającymi agregację płytek krwi. U niektórych gatunków zwierząt ważnym agonistą jest również serotonina. Do optymalnej agregacji płytek krwi niezbędne są fibrynogen i Ca⁺⁺. Działanie tych agonistów prowadzi do ekspozycji lub aktywacji kompleksu GPIIb/IIIa, receptora powierzchniowego płytek dla integryny β_3 , który wiąże fibrynogen (ryc. 6-6). Agregacja zachodzi wówczas, gdy symetryczne cząsteczki fibrynogenu połączą się z wyeksponowanymi receptorami sąsiednich płytek krwi. vWF sprzyja agregacji trombocytów również wówczas, gdy siły ścinające w przepływającej krwi są duże. Powstający czop płytkowy może być wystarczający do zatrzymania krwawienia z małych naczyń krwionośnych. Opisane w dalszej części badanie czasu krwawienia, w którym mierzony jest czas niezbędny do uformowania czopu z płytek krwi, jest uzależnione od liczby i funkcji trombocytów. W przypadku płytek krwi ptaków, odmiennie niż u ssaków, podczas agregacji nie jest wydzielany ADP, nie jest on także istotnym agonistą tego procesu. Wydaje się, że ważnym agonistą agregacji płytek krwi u ptaków jest serotonina.

HEMOSTAZA WTÓRNA

Omówienie

Na hemostazę wtórną składa się krzepnięcie i wzmocnienie tymczasowego czopu płytkowego, który przekształca się w ostateczny czop hemostatyczny. Koagulacja



Ryc. 6-6 Główne czynniki biorące udział w agregacji płytek krwi. TxA₂, trombosan A₂; PAF, czynnik aktywacji płytek krwi; ADP, adenozyno-5-difosforan.

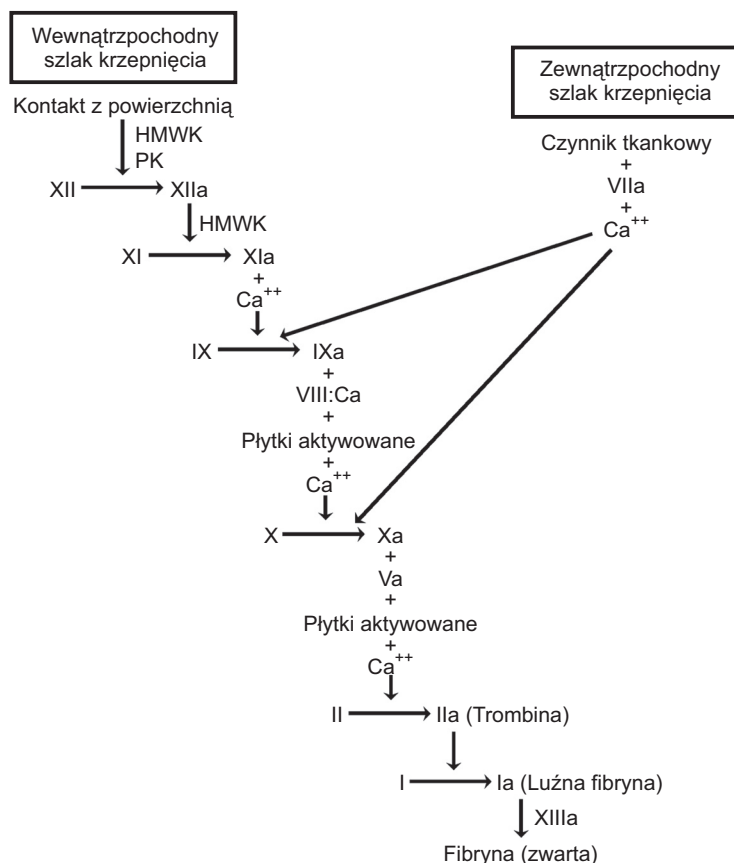
jest procesem enzymatycznym, w którym dochodzi od przekształcania proenzymów do aktywnej postaci enzymów. Niektóre spośród czynników krzepnięcia są enzymami, inne zaś łączą się w kompleksy, aby uzyskać specyficzną aktywność enzymatyczną. Kaskadowy efekt aktywacji enzymatycznej powoduje wzmocnienie działania pierwotnego bodźca stymulującego (ryc. 6-7). Do zwielokrotnionej reakcji podczas krzepnięcia, jak to przedstawiono na ryc. 6-7, niezbędne są jony Ca^{++} . Końcowym produktem krzepnięcia są usieciowane włókienka fibryny, które znajdują się wokół i w mniejszym stopniu wewnątrz czopu płytkowego, powodując jego wzmocnienie oraz zmniejszając prawdopodobieństwo powtórnego krwawienia.

Czynniki krzepnięcia otrzymały jedną lub więcej nazw, a każdy z nich został oznaczony cyfrą rzymską. W przypadku fibrynogenu (czynnika I), protrombiny (czynnika II), TF (czynnika III) oraz Ca^{++} (czynnika IV) są zazwyczaj używane ich nazwy. Pozostałe czynniki są określane za pomocą cyfr. Nie istnieje czynnik VI. Wszystkie spośród czynników krzepnięcia, poza Ca^{++} , są białkami, które są wytwarzane w wątrobie. Wszystkie z nich, oprócz TF, są normalnie obecne we krwi.

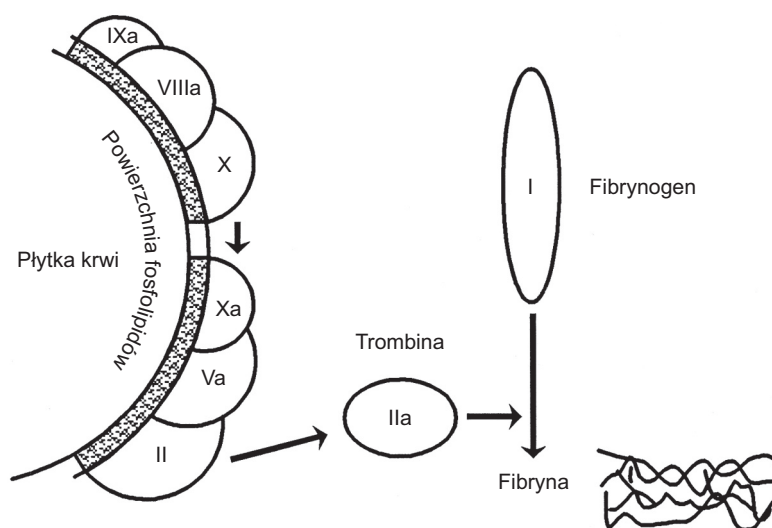
Do syntezy lub działania czynników II, VII, IX i X niezbędna jest witamina K. Aby mogło dojść do przyłączenia Ca^{++} i powstania formy aktywnej czynnika, po wytworzeniu cząsteczek białek w wątrobie niezbędna jest karboksylacja reszt kwasu glutaminowego zależna od witaminy K.

In vitro krzepnięcie może być aktywowane na dwa sposoby: (1) poprzez przyłączenie czynnika VII do TF uwolnionego z tkanek (szlak zewnątrzpochodny) lub (2) przez przyłączenie czynnika XII do powierzchni prowadzącej do „aktywacji kontaktowej” (szlak wewnątrzpochodny). Czynniki XII może być aktywowany poprzez przyłączenie do wielu różnych powierzchni, takich jak: kolagen, błona podstawna, skóra i wiele powierzchni obcych, między innymi szkło. Te dwa szlaki aktywacji przebiegają tak samo od momentu wytworzenia trombiny. Trombina nie tylko przekształca fibrynogen w fibrynę, ale również aktywuje czynniki V, VIII, XI i XII. Aktywacja krzepnięcia *in vivo* przebiega nieco inaczej, zwłaszcza w odniesieniu do szlaku wewnątrzpochodnego, co zostanie opisane w dalszej części rozdziału.

Aktywacja płytek krwi przez agonistów powoduje przemieszczenie ujemnie naładowanych fosfolipidów z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony trombocytów. Te ujemnie naładowane aminofosfolipidy (przede wszystkim fosfatydyloseryna) dawniej były określane jako *czynnik płytkowy 3* lub *aktywność płytkowa krwi*. Przemieszczenie fosfatydyloseryny na powierzchnię aktywowanych płytek krwi przyspiesza krzepnięcie, ponieważ naładowane dodatnio jony wapnia przyłączają się do ujemnie naładowanych fosfolipidów i grup karboksylowych czynników krzepnięcia. Przyłączenie czynników krzepnięcia do trombocytów nie tylko zbliża je do siebie, zwiększając wzajemne oddziaływanie, ale także chroni przed czynnikami hamującymi (ryc. 6-8).



Ryc. 6-7 Kaskada krzepnięcia krwi. *HMWK*, kininogen wielkocząsteczkowy; *PK*, prekalikreina; *VIII:C*, część koagulacyjna kompleksu czynnika VIII; Ca^{++} , jony wapnia. Cyfry rzymskie odnoszą się do czynników krzepnięcia, a towarzysząca im litera *a* oznacza, że czynnik jest aktywowany. Ekspresja ujemnie naładowanych fosfolipidów (przede wszystkim fosfatydyloseryny) na powierzchni płytek krwi.



Ryc. 6-8 Nagromadzenie czynników krzepnięcia na powierzchni aktywowanych płytek, związanych pierwotnie z fosfatydyloseryną fosfolipidów. Cyfry rzymskie odnoszą się do czynników krzepnięcia, a towarzysząca im litera a oznacza, że czynnik jest aktywowany.

Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia

Wydaje się, że krzepnięcie *in vivo* jest zapoczątkowane przez TF (tromboplastynę tkankową) ekspozowaną na powierzchni komórek, zwłaszcza aktywowanych lub uszkodzonych komórek śródbłonka. TF jest glikoproteiną śródbłonkową, która posiada miejsca wiążące fosfolipidy. Nie jest ona wykrywana w nieuszkodzonych komórkach śródbłonka, ale występuje w błonie komórkowej wielu innych typów komórek, które nie stykają się w normalnych warunkach z krwią. Gdy TF jest ekspozowany na powierzchni aktywowanych lub uszkodzonych komórek śródbłonka, albo jeśli dochodzi do kontaktu krwi z komórkami tkanek pozanaczyniowych ekspozujących TF na powierzchni, TF łączy się z czynnikiem VII. Nie jest jasne, jak powstaje wyjściowy czynnik VII (VIIa), ale niewielka jego ilość występuje we krwi zdrowych ludzi. Kompleks TF-VIIa na powierzchni pobudzonych komórek śródbłonka aktywuje czynniki IX i X do IXa i Xa. Kompleks TF-VIIa i czynnik Xa na drodze sprzężenia zwrotnego dodatkowo aktywuje jeszcze więcej czynnika VIIa. Wydaje się, że rolą zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia *in vivo* jest szybkie dostarczenie śladowych ilości trombiny, która aktywuje czynniki XI, VIII i V oraz powoduje agregację płytek krwi, a wszystkie te elementy przyspieszają krzepnięcie szlakiem wewnątrzpochodnym.

Wewnątrzpochodny szlak krzepnięcia

Aktywacja kontaktowa następuje wówczas, gdy czynnik XII jest przyłączany do ujemnie naładowanych powierzchni i wchodzi w reakcję z prekalikreiną, która jest również wiązana z powierzchnią przez kininogen o dużej masie cząsteczkowej (HMWK). Aktywny czynnik XII (XIIa) i kalikreina są generowane przez wzajemną aktywację. Połączony z powierzchnią czynnik XIIa aktywuje czynnik XI, który również łączy się z powierzchnią za pośrednictwem HMWK. Przez wiele lat ta metoda aktywacji krzepnięcia była uważana za główną drogę

inicjującą krzepnięcie. Ponieważ u ludzi, kotów i psów z niedoborem czynnika XII nie obserwuje się skłonności do krwawień, a u niektórych zwierząt (walenie, ptaki, gady) czynnik ten normalnie nie występuje, uważa się, że w warunkach prawidłowych nie jest on zaangażowany w hemostazę.

Niedobór czynnika XI powoduje niewielką skłonność do krwawienia. Wydaje się, że czynnik XI łączy się z aktywowanymi płytkami krwi i *in vivo* jest aktywowany przez małe ilości trombiny, powstałej po uruchomieniu zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia. Czynnik IX jest aktywowany zarówno przez czynnik XIa, jak i kompleks TF-VIIa. Czynnik VIII:C jest aktywowany przez niewielkie ilości trombiny. Do przekształcenia czynnika VIII:C w VIII:Ca niezbędne jest przeniesienie tej części z vWF. Czynnik VIII:Ca nie jest enzymem, ale pełni rolę kofaktora, który łącząc się z enzymem XIa na aktywowanej powierzchni płytek krwi, tworzy kompleks określany czasem jako *tenaza*, który aktywuje czynnik X (zob. ryc. 6-8).

Wspólny szlak krzepnięcia

Czynnik V jest aktywowany przez niewielkie ilości trombiny do formy aktywnej Va. Forma ta jest kofaktorem dla czynnika Xa i bierze udział w powstawaniu kompleksu zwanego *protrombinazą* na powierzchni aktywowanych płytek krwi, który przekształca protrombinę do trombiny. Powstała trombina przekształca fibrynogen w monomery, które polimeryzując samoistnie poprzez wiązania wodorowe, tworzą niestabilne, niezwiązane krzyżowo polimery fibryny wokół czopu płytkowego. Ostatni etap polimeryzacji fibryny obejmuje tworzenie kowalentnych wiązań krzyżowych między monomerami. Czynnik XIII (czynnik stabilizujący fibrynę) jest aktywowany przez trombinę. Powstający czynnik XIIIa jest zależny od Ca^{++} transglutaminazą, która katalizuje powstawanie wiązań kowalentnych między lizyną i glutaminą znajdującą się w różnych monomerach. Powstała fibryna stabilizowa-

na jest nierozpuszczalnym polimerem białkowym, który stabilizuje czop płytkowy.

Inhibitory tworzenia skrzepu

Po utworzeniu nad miejscem uszkodzenia naczynia krwi skrzepu złożonego z płytek krwi i fibryny, proces krzepnięcia musi zostać zakończony, aby zapobiec zamknięciu niezmiennych obszarów naczyń przylegających do części uszkodzonej. Szczególnie ważną rolę przy udziale różnych mechanizmów, pełnią w tym procesie komórki śródbłonka. Niestymulowane płytki krwi nie przylegają do prawidłowych komórek śródbłonka naczyń krwionośnych, ponieważ posiadają one właściwości przeciwzakrzepowe. Komórki śródbłonka wytwarzają i uwalniają prostacyklinę i tlenek azotu, będące silnymi środkami rozkurczającymi naczynia krwionośne, które hamują również agregację trombocytów. Komórki śródbłonka hamują także funkcje płytek krwi dzięki działaniu ektoenzymu, CD39, o aktywności difosfatazy adenozy, mającej zdolność rozkładania ADP uwolnionego z płytek krwi.

Komórki śródbłonka wytwarzają proteoglikany siarczanu heparanu, które są ściśle związane ze śródbłonkiem i są w stanie przyspieszać unieczynnianie czynników krzepnięcia poprzez antytrombinę III. Komórki te wytwarzają także trombomodulinę. Ta związana z powierzchnią komórki glikoproteina hamuje prokoagulacyjne działanie trombiny i proces aktywacji białka C przez trombinę. Inhibitor zewnątrzpo pochodnego szlaku krzepnięcia (TFPI) jest wytwarzany w komórkach śródbłonka naczyń włosowatych. Komórki śródbłonka wytwarzają aktywator plazminogenu tkankowego (tPA), który jest nierozłącznie związany z fibrynolizą.

Głównym inhibitorem trombiny jest antytrombina III. Hamuje ona również inne proteazy, takie jak czynniki: IXa, Xa, XIa i XIIa. Do jej optymalnego działania niezbędne są glikozaminoglikany (np. siarczan heparanu na powierzchni komórek lub w macierzy pozakomórkowej).

Czynnik Xa i kompleks VIIa są hamowane przez dwuwartościowy TFPI, określane dawniej jako $\alpha 1$ -inhibitor krzepnięcia związany z lipoproteinami. Inhibitor proteaz ($\alpha 1$ -antytrypsyna), inhibitor C1-esterazy i $\alpha 1$ -makroglobulina, są mniej istotnymi czynnikami hamującymi tworzenie się skrzepu.

FIBRYNOLIZA

Trombina łączy się z receptorem białkowym (trombomoduliną) komórek śródbłonka, a ten kompleks 1:1 aktywuje białko C i białko osoczowe zależne od witaminy K (ryc. 6-9). Trombina, która jest związana z trombomoduliną, nie posiada już znaczącej aktywności prokoagulacyjnej. Białko C aktywne (Ca) w obecności kofaktora zależnego od witaminy K (białka S), fosfolipidów powierzchniowych i jonów wapnia (Ca^{++}) hamuje krzepnięcie poprzez proteolityczną degradację czynników Va, VIIIa i Xa.

Białko Ca łączy się z tPA, powodując zwiększenie uwalniania tPA z komórek śródbłonka. Plazminogen wykrzepia się razem z fibryną podczas powstawania

skrzepu. Przekształcanie plazminogenu do plazminy przez tPA jest przyspieszane w obecności fibryny (ryc. 6-10). Plazmina nie jest bardzo specyficznym enzymem, ale jej powinowactwo do fibryny pozwala ograniczyć to działanie. Hydroliza fibryny katalizowana przez plazminę prowadzi do powstania produktów degradacji włókniaka (FDPs, produkty rozpadu włókniaka), które mają właściwości hamujące hemostazę.

Inhibitory fibrynolizy występują również w osoczu. Komórki śródbłonka produkują inhibitor aktywacji plazminogenu, który hamuje tPA. $\alpha 2$ -antyplazmina hamuje wolną plazminę, lecz plazmina związana z fibryną jest chroniona. $\alpha 2$ -makroglobulina hamuje białko Ca oraz może w pewnym stopniu hamować plazminę. Hamuje ona również niektóre aktywowane czynniki krzepnięcia.

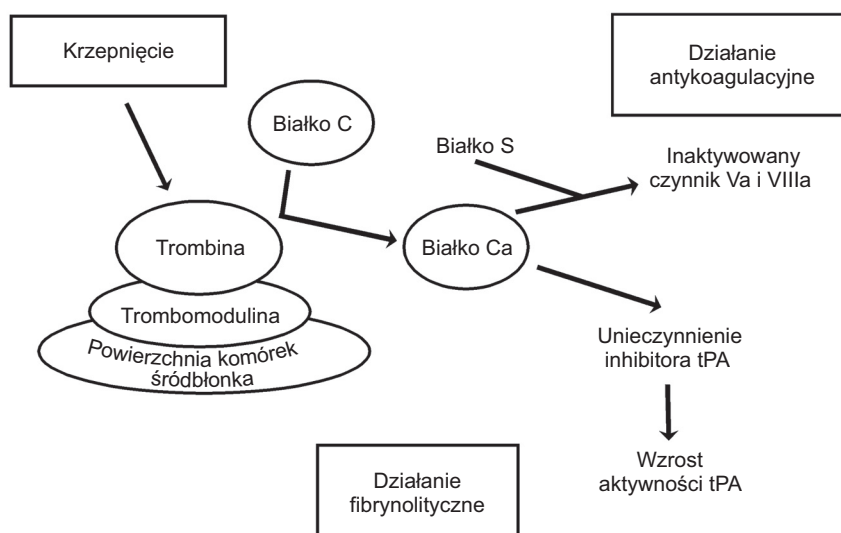
Fibrynoliza przebiega znacznie łatwiej w naczyniach włosowatych niż w krążeniu dużym. W kapilarach komórki śródbłonka są o wiele gęściej ułożone. Szacuje się, że w naczyniach włosowatych znajduje się ponad 99% obszaru powierzchni śródbłonka występującego w całym ciele. W konsekwencji tego, aktywacja białka C przebiegająca za pośrednictwem trombomoduliny oraz usuwanie trombiny jest znacznie bardziej nasilone we włosniczkach niż w dużych naczyniach. Dodatkowo w naczyniach kapilarnych wydzielanie tPA jest znacznie większe a dostępność antyplazminy hamującej fibrynolizę może być mniejsza. Gwałtowna fibrynoliza w dużych naczyniach może być groźna dla życia, ale proces ten może być istotny w utrzymaniu integralności łożyska naczyń włosowatych.

ANTYKOAGULANTY

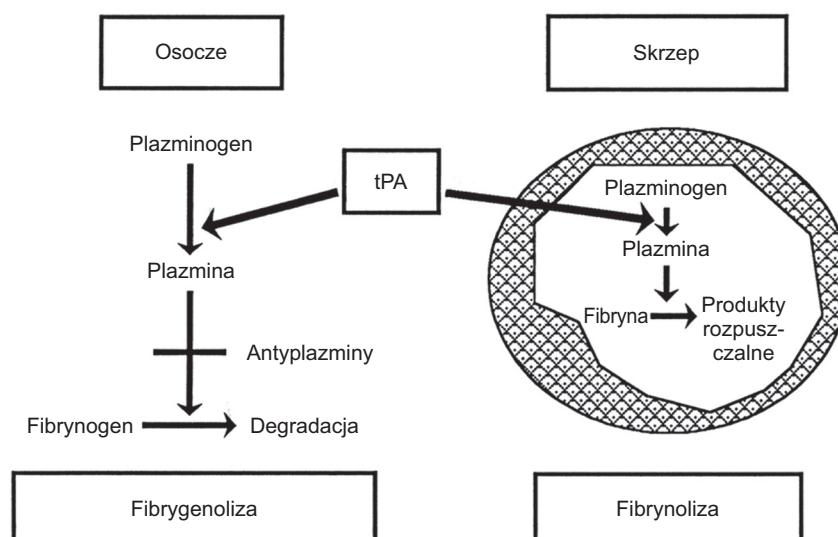
Krzepnięciu próbek krwi zapobiega się poprzez użycie w probówkach związków chelatujących Ca^{++} (kwasu etylenodiaminotetraoctowego [EDTA] i cytrynianu) lub heparyny. U większości gatunków EDTA jest preferowanym antykoagulantem w przypadku badania morfologii krwi. Po wymieszaniu z EDTA rozcieńczenie próbki jest minimalne, a rozmazy krwi z dodatkiem tego antykoagulantu wybarwiają się najlepiej metodami rutynowymi. Niestety krew niektórych ptaków i gadów ulega hemolizie, gdy jest pobierana do probówek z EDTA. U tych gatunków jako antykoagulantu używa się zwykle heparyny. Niedogodnością związaną z wykorzystaniem heparyny w porównaniu z EDTA jest niewystarczająco dobre wybarwienie się leukocytów oraz większa tendencja do tworzenia się zlepek płytek krwi.

Najlepszym antykoagulantem do pobierania osocza do badań krzepliwości i do badania funkcji płytek jest cytrynian. Próbki pobrane do roztworu cytrynianu są rozcieńczone o 10%. Jeśli są zliczane płytki, ich liczba musi być skorygowana o to rozcieńczenie. Cytrynian jest antykoagulantem stosowanym typowo przy pobieraniu i przechowywaniu krwi do przetoczeń.

Wiązanie heparyny z antytrombiną III znacznie przyspiesza hamowanie trombiny przez antytrombinę III, a przez to spowalnia krzepnięcie. Czynniki krzepnięcia IXa i Xa oraz kompleks VIIa-TF również wydają się hamowane poprzez połączenie antytrombina III-



Ryc. 6-9 Mechanizmy z udziałem białka C. tPA, tkankowy aktywator plazminogenu.



Ryc. 6-10 Działanie tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA) i plazminy.

heparyna. Heparyna jest antykoagulantem używanym do badania morfologii krwi u gatunków, u których EDTA powoduje hemolizę. Gdy do badań biochemicznych jest używane osocze (zamiast surowicy), stosuje się heparynę litową. Heparyna jest także często dodawana do roztworów izotonicznych soli, wykorzystywanych do przepłukiwania dostępu żylnego, oraz może być wykorzystywana do hamowania krzepnięcia *in vivo*.

TESTY PRZESIEWOWE W ZABURZENIACH HEMOSTAZY

Nie istnieje jeden rodzaj testu, który ocenia wszystkie elementy układu krzepnięcia. W związku z tym wykonywanych jest kilka rodzajów badań, które są zwykle stosowane do określenia typu zaburzeń krzepliwości.

Liczba płytek krwi

W każdym przypadku potwierdzenia niskiej liczby płytek krwi uzyskanej metodą manualną lub automatyczną powinno się ocenić zabarwiony rozmaz. Obecność zlepiń płytek krwi może powodować fałszywe zaniżenie ich liczby. Współczynniki, które są używane do oceny liczby płytek krwi, różnią się w zależności od rodzaju mikroskopu, metody przygotowania rozmazu oraz oglądanego obszaru; jednakże poniższy wzór jest ogólnie wykorzystywany do oszacowania liczby trombocytów:

$$\begin{aligned} \text{Liczba płytek krwi na mikrolitr} &= \\ &= \text{liczba płytek krwi w polu widzenia rozmazu oglądanego} \\ &\quad \text{pod imersją i pod powiększeniem } 100\times \times 20\,000 \end{aligned}$$

Płytki krwi kotów są większe niż u innych gatunków zwierząt domowych, dlatego też niemożliwe jest

ich precyzyjne odróżnienie na podstawie rozmiarów od erytrocytów, w aparatach, których działanie jest oparte na metodzie impedancyjnej (takich jak Coulter counter S+4 i Abbot Cell-Dyne 3500). Do bardziej dokładnego zmierzenia liczby trombocytów u kotów przydatne są analizatory, których działanie opiera się na cytometrii przepływowej (na przykład Bayer Adivia 120). Niestety, podczas pobierania krwi u kotów łatwo tworzą się zlepy płytek, w wyniku czego często w metodach zautomatyzowanych obserwowane są nieprawdziwie zaniżone liczby płytek. Przydatne mogą być antykoagulanty z dodatkiem inhibitorów płytek, które zmniejszają agregację trombocytów.

Liczba płytek krwi u zdrowych greyhoundów i Cavalier King Charles spanieli jest zazwyczaj niższa niż u innych ras psów. Dolna granica przedziału referencyjnego liczby płytek mierzonych analizatorami impedancyjnymi u greyhoundów jest opisywana jako $70 \times 10^3/\mu\text{l}$. Nieco wyższe wartości uzyskuje się metodami manualnymi. Dolna granica przedziału referencyjnego dla Cavalier King Charles spanieli jest trudna do wiarygodnego określenia z powodu częstego występowania bezobjawowej dziedzicznej małopłytkowości z obecnością makropłytek. Dolna granica przedziału referencyjnego wynosi najprawdopodobniej około $100 \times 10^3/\mu\text{l}$, ponieważ wielkość płytek krwi jest zazwyczaj prawidłowa u zwierząt z ich liczbą powyżej $100 \times 10^3/\mu\text{l}$. Liczba płytek jest określana błędnie w analizatorach opartych na metodzie impedancyjnej u Cavalier King Charles spanieli, dlatego że tego typu urządzenia nie są w stanie odróżnić dużych trombocytów od małych erytrocytów.

Srednia objętość płytki krwi

Średnia objętość płytki krwi (MPV) jest wartością określoną w femtolitrach. Analizatory działające na zasadzie impedancji są w stanie dokładnie zmierzyć MPV we krwi pełnej psów i koni, ale nie kotów. Liczba i objętość płytek krwi wyrażone średnią we krwi kotów, mogą być oznaczane w laserowym cytometrze przepływowym, ale zlepy płytkowe powstające z łatwością podczas pobierania krwi mogą fałszywie zawyżać MPV.

Zanim uzna się liczbę płytek i MPV w próbce krwi za wiarygodne, analizatory określają, czy rozkład wielkości trombocytów jest zbliżony do histogramu prawidłowego dla tych krwinek. Jeśli histogram ma nieprawidłowy kształt lub liczba płytek jest zbyt mała do prawidłowego skonstruowania histogramu, wartości te nie zostaną obliczone. W rezultacie liczba płytek we krwi pełnej i MPV mogą nie być określone dla każdej próbki. Niestety wartości MPV często nie są opisywane u zwierząt z trombocytopenią, co mogłoby być bardzo przydatne w takich przypadkach.

U niektórych gatunków zwierząt istnieje odwrotna zależność między liczbą i objętością płytek krwi w zakresie wartości prawidłowych. Wyniki badań odnoszące się do wpływu antykoagulantów i warunków przechowywania próbki są niejednoznaczne. MPV może być nieznacznie wyższe, jeśli krew jest pobierana do probówek z EDTA, niż w próbce z cytrynianem. Wzrost MPV jest bardziej prawdopodobny, gdy krew jest przechowywana w 5°C , a nie w temperaturze pokojowej. Duża wartość

MPV sugeruje występowanie nasilonej trombozy, ale może być ona również wysoka u zwierząt z zespołem mielodysplastycznym. U Cavalier King Charles spanieli z dziedziczną trombocytopenią MPV może być większe z powodu obecności populacji makropłytek. Prawidłowa wartość MPV nie wyklucza zwiększonej trombozy. Obecność niewielkich zlepy płytek w próbkach krwi może powodować fałszywe zawyżenie wartości MPV. Obniżone MPV (obecność mikropłytek) wiązało się z trombocytopenią tła immunologicznego u psów i ludzi, w wyniku fragmentacji płytek. Po zastosowaniu odpowiedniego leczenia MPV u osobników z trombocytopenią tła immunologicznego może wzrosnąć powyżej wartości prawidłowych. Opisywano, że MPV była nieco wyższa u kotów z nadczynnością tarczycy, a nieco niższa u psów z niedoczynnością tego gruczołu. U psów z niedoborem fosforofruktokinazy w erytrocytach i mięśniach szkieletowych stwierdza się nieznacznie podwyższoną MPV, przy prawidłowej liczbie płytek krwi.

Czas krwawienia

Czas krwawienia jest prostym, ale prymitywnym testem. Czas ten ulega wydłużeniu u zwierząt z nieprawidłowościami dotyczącymi płytek krwi. Ze względu na to, że u zwierząt z niską liczbą płytek krwi spodziewane jest wydłużenie czasu krwawienia, badanie to nie wnosi dodatkowych informacji na temat ich stanu. Czas krwawienia badany na błonie śluzowej policzka jest używany do oceny funkcji płytek krwi u zwierząt z prawidłową lub prawie prawidłową liczbą trombocytów. Po przecięciu skalpelem błony śluzowej, miejsce nacięcia powinno krwawić swobodnie. Jeśli nie będzie ono naruszone, powinno przestać krwawić w czasie krótszym niż 4 minuty u zdrowych psów i 3 minuty u zdrowych kotów. Czas krwawienia oceniany po obcięciu pazura u psów i kotów w znieczuleniu ogólnym, pozwala nie tylko określić funkcje płytek krwi, ale również wykryć ciężkie zaburzenia krzepnięcia, ponieważ uszkodzenie naczyń w tej metodzie jest poważniejsze niż podczas badania czasu krwawienia z błony śluzowej policzka. Czas krwawienia z pazura jest trudny do wystandaryzowania i nie jest powtarzalny.

Czas krzepnięcia po aktywacji

Badanie czasu krzepnięcia po aktywacji (ACT) umożliwia ocenę wewnątrzprzewodnego i wspólnego szlaku krzepnięcia (ryc. 6-11). Musi ono być wykonywane blisko badanego zwierzęcia. Do badania ACT potrzebna jest specjalna probówka zawierająca ziemię okrzemkową (produkt nr 366522; Becon, Dickinson and Company) oraz łaźnia utrzymująca probówki w 37°C , aż do momentu powstania skrzepu. ACT zwykle wynosi powyżej 200 s u koni, 165 s u kotów oraz 126 s u psów.

Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji

Badanie czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) jest wykorzystywane do oceny wewnętrznego i wspólnego szlaku krzepnięcia. APTT jest oznaczany w osoczu pozyskanym z krwi pobranej do probówek zawierających 3,2% cytrynianu jako antykoagulantu, w stosunku 9:1 mieszaniny. Probki powinny być prze-

trzymywane w chłodzie, a badanie powinno być wykonane w ciągu 30 minut od pobrania krwi. Równoległe, jako próbkę kontrolną, powinno się zbadać APTT we krwi zdrowego zwierzęcia. APTT jest najprawdopodobniej wydłużony, jeśli czas stwierdzony u pacjenta jest dłuższy o co najmniej 30% od czasu kontrolnego. Przedział wartości referencyjnych jest uzależniony od zastosowanej metody badania. APTT jest nienaturalnie wydłużony, gdy stosunek objętości osocza do antykoagulantu jest nieodpowiednio niski, jak wówczas, gdy krew jest pobierana do probówek próżniowych, zawierających odmierzoną wcześniej ilość roztworu cytrynianu lub przy erytrocytozie (np. jeśli występuje duże odwodnienie).

Czas protrombinowy

Badanie czasu protrombinowego (PT) jest wykorzystywane do oceny zewnątrzpochodnego i wspólnego szlaku krzepnięcia (ryc. 6-11). Do tego badania niezbędne jest osocze pozyskane z krwi pobranej do probówek z cytrynianem jako antykoagulantem. Probki powinny być przetrzymywane w chłodzie, a badanie powinno być wykonane w ciągu 30 minut od pobrania krwi. Równoległe, jako próbkę kontrolną, powinno się zbadać PT we krwi zdrowego zwierzęcia. PT jest najprawdopodobniej wydłużony, jeśli czas stwierdzony u pacjenta jest dłuższy o co najmniej 30% od czasu kontrolnego. Przedział wartości referencyjnych jest uzależniony od zastosowanej metody badania.

Czas trombinowy

Czas trombinowy (TCT) stanowi wskaźnik jakościowych i ilościowych zaburzeń dotyczących fibrynogenu.

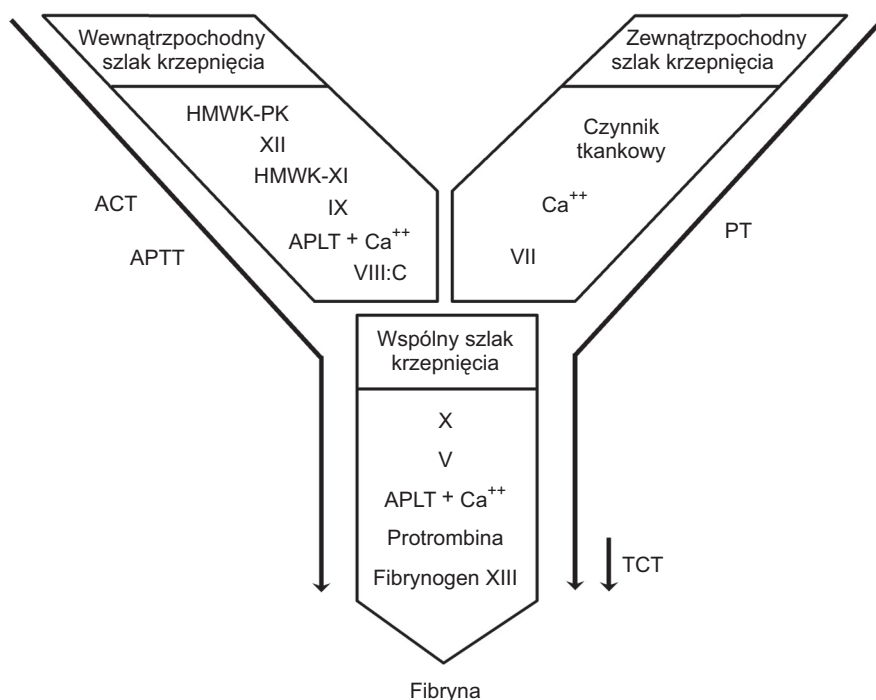
W badaniu tym używane jest osocze cytrynianowe. Probki powinny być przechowywane w chłodzie, a badanie wykonane w ciągu 30 minut od pobrania krwi. Równoległe powinno być przeprowadzone badanie TCT u zdrowego zwierzęcia, celem porównania z wynikiem pacjenta. Zakres referencyjny będzie uzależniony od użytej metody badań.

Fibrynogen

Praktycznym badaniem przydatnym do oceny ilości fibrynogenu jest precypitacja termiczna, ale metoda ta nie jest wystarczająco czuła, aby odróżnić niskie wartości prawidłowe od wartości poniżej normy. Oznaczanie to polega na pomiarze białka całkowitego w refraktometrze. Bardziej dokładne wyniki można uzyskać z użyciem mikrometru okularowego, ale badanie takie wymaga nieco więcej czasu i posiadania mikroskopu ze skalibrowanym mikrometrem okularowym. Najbardziej dokładne pomiary są wykonywane za pomocą testów opartych na wykorzystaniu procesu krzepnięcia.

Produkty degradacji fibrynogenu

Oznaczanie produktów degradacji fibrynogenu (FDP) pozwala dowieść obecności fibrylizacji *in vivo*. FDP powstające podczas fibrylizacji mają właściwości antyhemostatyczne, co może sprzyjać krwotokom, które mogą być skutkiem rozsianego krzepnięcia wewnątrznaczyniowego (DIC). Dostępne są komercyjne zestawy oparte na przeciwciałach do oznaczania FDP w surowicy ludzi. Na szczęście kilka takich testów wykazuje reakcję krzyżową, która jest na tyle wystarczająca, że mogą być one stosowane do badań u zwierząt domowych, choć ich wyniki mogą się różnić w zależności od użytego zestawu



Ryc. 6-11 Część kaskady krzepnięcia ocenianej przy wykorzystaniu: aktywowanego czasu krzepnięcia (ACT), czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT), czasu protrombinowego (PT), czasu trombinowego (TCT). HMWK, kininogen wielkocząsteczkowy; PK, prekalikreina; Ca^{++} , jony wapnia; APLT, aktywowane płytki krwi; VIII:C, część koagulacyjna czynnika VIII.

odczynników. Dodatkowo wyniki testów FDP występują u zwierząt w przypadku obecności fibrynolizy (zapoczątkowanej przez zespół rozsianego krzepnięcia wewnątrznaczyniowego – DIC) oraz fibrynolizy (np. w zatruciu jadem grzechotnika diamentowego). Niewytlumaczalnie u psów z zatruciem rodentycydami antykoagulacyjnymi, testy wykrywające FDP dają wyniki pozytywne, jeśli do oznaczeń wykorzystywana jest surowica. Wyniki te powinny być potwierdzone analogicznymi badaniami osocza. Nieznacznie podwyższona ilość FDP u ludzi jest związana z wysiłkiem i stresem. Falszywie dodatnie wyniki mogą być spowodowane nieprawidłowym sposobem pobierania próbek i obchodzenia się z nimi.

Po rozszczepieniu rozpuszczalnej fibryny (lub fibrynogenu) przez plazminę powstają fragmenty X, Y, D i E. Gdy plazmina rozszczepia usieciowaną fibrynę, powstają różne produkty. Najmniejszym produktem rozpadu powstającym pod wpływem plazminy z tej postaci fibryny jest D-dimer. W testach do oznaczania D-dimeru wykorzystywane są przeciwciała monoklonalne przeciwko ludzkiemu epitopowi D-dimerów. Pozytywny wynik takiego testu oznacza obecność fibrynolizy. Niezbędne są dalsze badania, ale wstępne ustalenia wskazują, że wyniki testów wykrywających D-dimer i inne FDP są zbliżone u zwierząt.

SPECJALISTYCZNE TESTY W ZABURZENIACH KRZEPLIWOŚCI

Czynnik von Willebranda (antygen związany z czynnikiem VIII)

vWF jest glikoproteiną, która składa się z multimerów o różnej masie cząsteczkowej. Czynnikiem ten jest niezbędny do prawidłowej adhezji płytek krwi, w związku z czym jest on oznaczany przy podejrzeniu upośledzenia funkcji trombocytów. Dziedziczny niedobór vWF (choroba von Willebranda) jest szczególnie częsty u niektórych ras psów (do 70% dobermanów). Zatem czynnik ten może być oznaczany przed zabiegami chirurgicznymi oraz kryciem psów pochodzących z hodowli o dużym rozpowszechnieniu tej choroby. Niektórzy badacze wykazali, że niedoczynność tarczycy może powodować obniżenie stężenia vWF w osoczu, ale inni nie byli w stanie potwierdzić tej zależności. Ilość vWF w osoczu jako białka ostrej fazy może się zwiększyć podczas zapalenia. Podwyższone wartości stwierdzono u psów z chorobami wątroby, w okresie okołoporodowym, podczas endotoksemii oraz po podaniu adrenaliny. Interleukina (IL)-11 pobudza syntezę vWF u psów. Przeciwnie, leczenie desmopresyną (1-deamino-8-D-argininowazopresyną) przejściowo zwiększa stężenie vWF w osoczu, poprzez stymulację uwalniania tego czynnika z zasobów znajdujących się w ciałkach Weibela-Palada w śródbłonku.

Stężenie vWF w osoczu jest zazwyczaj oznaczane ilościowo w teście immunoenzymatycznym (ELISA). Identyfikacja zwierząt-nosicieli jest trudna z powodu znacznych wahań stężenia vWF w czasie u poszczególnych psów. W związku z tym może być konieczne wielokrotne przeprowadzenie testów, aby uzyskać rzetelną ocenę stężenia vWF. Do prawidłowej adhezji płytek krwi

niezbędne są multimery o dużej masie cząsteczkowej. Dystrybucja multimerów jest oceniana na podstawie elektroforezy białek.

Antytrombina III

Osoczkowa antytrombina III może być oznaczana za pomocą testów kolorymetrycznych. Jej ilość może być zmniejszona w stanach nadkrzepliwości (np. morzysko u koni), DIC, nefropatii białkogubnej, enteropatii białkogubnej i posocznicy. U kotów podwyższone stężenie antytrombiny III jest stwierdzane w różnych chorobach, co sugeruje, że związek ten zachowuje się jak białko ostrej fazy u tego gatunku.

PIVKA (białka indukowane niedoborem witaminy K lub jej antagonizmem)

Test PIVKA (Thrombotest, Accurate Chemical and Scientific Corp, Westbury, NY, USA) jest prostym, czułym testem krzepliwości, który został stworzony do monitorowania osób leczonych warfaryną. W gruncie rzeczy jest to zmodyfikowana metoda oznaczania PT, w której wykorzystuje się specyficzną tromboplastynę tkankową oraz rozcieńczone osocze, aby uzyskać dłuższy czas krzepnięcia niż w standardowym badaniu PT. Test PIVKA nie jest specyficzny dla niedoborów witaminy K. Wyniki tego badania mogą być wydłużone wskutek różnych zaburzeń zewnątrzpochodnego i wspólnego szlaku krzepnięcia. Test PIVKA nie przewyższa zwykłego badania PT w razie zatrucia rodentycydami, ponieważ czas protrombinowy jest znacznie wydłużony w przypadku takich zaburzeń. Niemniej jednak test ten może być użyteczny w identyfikowaniu niewielkich zaburzeń krzepliwości dotyczących zewnątrzpochodnego i wspólnego szlaku krzepnięcia, ponieważ testy do badania PT są przeznaczone dla ludzi, mogą się charakteryzować brakiem czułości wystarczającej do wykrywania koagulopatii u niektórych gatunków zwierząt.

Liczba płytek retikularnych

Płytki retikularne są nowo powstałymi komórkami, które zawierają zwiększoną ilość RNA. Ich liczba może być ustalona poprzez wykrywanie fluorescencji płytek barwionych oranżem tiazolowym w cytometrze przepływowym, badanie to nie jest jednak łatwo dostępne. Zakres przedziału referencyjnego będzie się różnił w zależności od stosowanych metod i urządzeń. Analogicznie do wykorzystania liczby retikulocytów w ustalaniu przyczyn niedokrwistości, zwiększony odsetek płytek retikularnych u zwierząt z trombocytopenią oznacza, że stan ten wynika ze zmniejszonego niszczenia lub zużycia trombocytów, nie zaś zmniejszonego ich wytwarzania. W przeciwieństwie do anemii degeneratywnych, w których spodziewany jest wzrost bezwzględnej liczby retikulocytów, bezwzględna liczba płytek retikularnych (liczba płytek retikularnych na mikrolitr) nie jest typowo zwiększona w degeneratywnych trombocytopeniach. Ten brak wzrostu liczby płytek retikularnych być może wynika z faktu, iż płytki te są niszczone lub zużywane w takim samym tempie co płytki nieretikularne. Całkowita liczba płytek retikularnych może być zwiększona w małopłytkowości odczynowej, jak to wykazano u psów otrzy-

mujących IL-6. Odsetek płytek retikularnych u zwierząt z małopłytkowością wynikającą z obniżonej produkcji tych krwinek, zwykle zawiera się w przedziale referencyjnym.

Funkcje płytek krwi

Wyspecjalizowane testy badające funkcje płytek krwi nie są wykonywane w większości laboratoriów klinicznych, ale są zwykle przeprowadzane w laboratoriach badawczych zajmujących się hemostazą. Agregacja płytek krwi zwiększa się po dodaniu różnych agonistów (np. ADP, trombiny i kolagenu). Adhezja płytek może być badana w kolumnie z kuleczkami szklanymi lub na filtrze o standardowym rozmiarze.

Przeciwciała przeciwplatekcyjne

Wzrost liczby przeciwciał przeciwplatekcyjnych wykrywany jest u zwierząt metodą cytometrii przepływową lub testem ELISA, ale badania te nie są łatwo dostępne. Bezpośrednie oznaczenia (płytki krwi od pacjenta) są preferowane w stosunku do metod pośrednich (surowica pacjenta i prawidłowe płytki krwi psa) z powodu lepszej czułości. Niestety oznaczenia te muszą być zazwyczaj wykonywane w ciągu kilku godzin od pobrania próbki krwi. Płytki krwi mają w warunkach prawidłowych nieco immunoglobulin związanych z ich powierzchnią, a liczba przeciwciał przeciwplatekcyjnych zwiększa się wraz z wydłużeniem czasu przechowywania próbki, w związku z tym wyniki fałszywie dodatnie stanowią istotny problem tych oznaczeń. Wyniki dodatnie mogą występować zarówno w przypadku adsorpcji kompleksów immunologicznych do płytek, jak i występowania przeciwciał przeciwplatekcyjnych.

Specyficzne czynniki krzepnięcia

Oznaczenia specyficznych enzymów krzepnięcia są przeprowadzane w niewielu laboratoriach badawczych zajmujących się hemostazą. Do badań tych wykorzystuje się osocze pochodzące od ludzi lub zwierząt ze znanym niedoborem czynników krzepnięcia.

OBJAWY KLINICZNE ZABURZEŃ HEMOSTAZY

Jeśli krwawienie jest zbyt obfite lub ma niewyjaśnione przyczyny, może występować defekt hemostazy. Rodzaj krwotoku może stanowić pewną wskazówkę co do natury występującego defektu (defektów). Rozsiane przebarwienia skóry lub błon śluzowych będące wynikiem krwawienia i obrzęku, sugerują obecność wady dotyczącej naczyń krwionośnych. Obecność wybroczyn i podbiegnięć krwawych na skórze i (lub) krwawień z błon śluzowych oraz krwawienia z nosa wskazują na małopłytkowość. Dziedziczne wady dotyczące płytek krwi powinny być podejrzewane u młodych zwierząt z krwawieniami z nosa, błon śluzowych, wybroczynami i podbiegnięciami krwawymi o niejasnym pochodzeniu oraz nadmiernym krwawieniem po wypadnięciu zębów lub niewielkim urazie. Krwawienie z błon śluzowych, krwiaki na skórze i wydłużony czas krwawienia z ran chirurgicznych lub pourazowych są typowo obserwowane

ne u psów z chorobą von Willebranda, lecz wybroczyny nie wydają się objawem tej choroby. Powstałe samoistnie krwiaki i krwiaki śródstawowe są raczej wynikiem zaburzeń krzepnięcia, niż nieprawidłowości dotyczących naczyń krwionośnych czy płytek krwi.

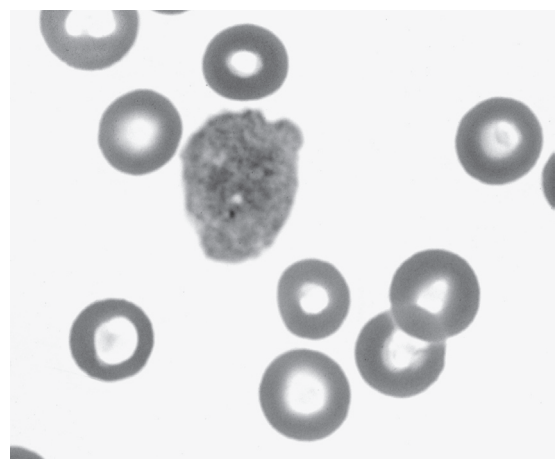
ZABURZENIA DOTYCZĄCE PŁYTEK KRWI

Nieprawidłowa budowa morfologiczna płytek krwi

Średnica płytek krwi różni się u różnych gatunków zwierząt. U kotów są one większe niż u innych gatunków zwierząt domowych. Obecność dużych płytek krwi (makropłytek lub płytek olbrzymich) u zwierząt z małopłytkowością wskazuje na upośledzenie trombopoetyzy (ryc. 6-12). Makropłytki mogą również występować u zwierząt z małopłytkowością i chorobami mielodysplastycznymi lub mieloproliferacyjnymi. Populacja makropłytek może występować u niektórych Cavalier King Charles spanieli.

Podczas aktywacji płytek krwi ich ziarnistości są zgęstniane razem przez otaczającą sieć mikrotubul i mikrofilamentów. Te centralnie położone skupiska ziarnistości mogą być pomyłone z jądrem komórkowym. Obecność trombocytów o niewielkiej ilości ziarnistości może być wynikiem aktywacji i wydzielania, ale była również obserwowana u zwierząt z zespołami mieloproliferacyjnymi. Po aktywacji płytek krwi *in vitro* powstają ich zlepy. Jeśli dojdzie do degranulacji, zlepy mogą być trudne do rozpoznania, ponieważ w zabarwionych rozmazach krwi występuje jasnoniebieski materiał. Obecność zlepy płytkowych powinna być odnotowana, ponieważ liczba płytek krwi może być fałszywie zaniżona, gdy występują takie agregaty.

Organizmem pasożytującym z rodzaju riketsji, który specyficznie zakaża płytki krwi u psów, jest *Anaplasma platys* (wcześniejsza nazwa *Ehrlichia platys*). Morule wyglądają jak ciasno upakowane skupisko zasadochłonnych organizmów znajdujących się w cytoplazmie płytek krwi (zdjęcie 18).



Ryc. 6-12 Płytki olbrzymie we krwi psa z małopłytkowością i zwiększoną odnową płytek krwi.

Małopłytkowość

Małopłytkowość oznacza zmniejszoną liczbę płytek krwi. Do pierwotnych przyczyn małopłytkowości zalicza się: zmniejszone ich wytwarzanie, zwiększone zużycie podczas powstawania skrzepu oraz zwiększone niszczenie. Różnicowanie tych przyczyn nie zawsze jest oczywiste, a patogeniza małopłytkowości związanej z czynnikami zakaźnymi (wirusy, bakterie, riketsje i pierwotniaki) wydaje się wieloprzyczynowa. Do mniej prawdopodobnych przyczyn małopłytkowości zalicza się sekwestrację i ostry, obfity krwotok zewnętrzny. Często podczas ustalania rozpoznania różnicowego małopłytkowości wskazane jest badanie szpiku kostnego, zwłaszcza przy braku zaburzeń krzepliwości.

Zmniejszone wytwarzanie płytek krwi

Myelophthisis, zespoły mielodysplastyczne oraz działanie czynników powodujących niedokrwistość aplastyczną (zob. rozdz. 5) zazwyczaj wiążą się z małopłytkowością. W późnej fazie zakażenia *Ehrlichia canis* i prawdopodobnie w innych chorobach spowodowanych przez riketsje, liczba płytek krwi jest obniżona wtórnie do hipoplazji szpiku kostnego. W wyniku większości małopłytkowości o podłożu immunologicznym dochodzi do zwiększonego niszczenia płytek krwi, ale do trombocytopenii może również prowadzić niszczenie megakariocytów na tym samym tle. Małopłytkowość amegakariocytowa jest rzadka u psów, a u kotów opisano tylko jeden przypadek tej choroby. Nieznaczną małopłytkowość cykliczną jest spowodowana okresowym zmniejszeniem wytwarzania płytek krwi u szarych owczarków collie z dziedziczną cykliczną hematopoezą. Długotrwałe stosowanie rekombinowanej trombopoetyny ludzkiej może powodować trwałą małopłytkowość u zwierząt, gdy przeciwciała przeciwko temu leкови powodują również neutralizację endogennej trombopoetyny leczonych gatunków zwierząt. Ten występujący później niedobór trombopoetyny powoduje zmniejszenie wytwarzania płytek krwi.

Zwiększone zużycie płytek krwi

Zwiększone zużycie płytek krwi (konsumpcja) jest również zjawiskiem występującym w powiązaniu z DIC (zostanie to opisane w dalszej części), złośliwym śródbłonniakiem krwionośnym u psów, zapaleniem naczyń krwionośnych i innymi chorobami, w których dochodzi do uszkodzenia śródbłonka. Poza uszkodzeniem naczyń związanym z chorobami zapalnymi, agregację płytek krwi powodują niektóre cytokiny zapalne (szczególnie PAF). Trombocytopenia jest często spotykana po zatruciu jadem grzechotnika. Składniki jadu mogą bezpośrednio indukować agregację płytek krwi, zjawisko to może być również wynikiem uszkodzenia przez nie naczyń krwionośnych.

Zwiększone niszczenie płytek krwi

Obecność zwiększonej liczby immunoglobulin na powierzchni płytek krwi może prowadzić do zwiększenia fagocytozy, a w konsekwencji do małopłytkowości. Małopłytkowość o podłożu immunologicznym

może mieć charakter zarówno pierwotny, jak i wtórny. Małopłytkowość autoimmunologiczna (określana również jako idiopatyczna plamica małopłytkowa) jest częstą przyczyną obniżenia liczby trombocytów u psów, lecz wydaje się rzadko spotykana u innych gatunków. Wtórna małopłytkowość o podłożu immunologicznym wynika z ekspozycji ukrytych lub zmienionych antygenów na powierzchni płytek krwi, przyłączania się zewnętrznych antygenów (np. leków) lub adsorpcji kompleksów antygen–przeciwciało na ich powierzchni. Wtórna małopłytkowość o podłożu immunologicznym może występować w związku ze stosowaniem różnych leków, czynnikami zakaźnymi, nowotworami i innymi chorobami immunologicznymi, takimi jak toczeń rumieniowaty układowy. Małopłytkowość autoimmunologiczna u noworodków została ostatnio opisana u świń, koni i mułów po pobraniu pokarmu. Analogicznie do żółtaczk hemolitycznej, objawy tej choroby pojawiają się, gdy przeciwciała matczyne przeciwko epitopom ojcowskim znajdującym się na powierzchni płytek krwi noworodka są przekazywane wraz z siałą.

Dożylne podanie heparyny często powoduje małopłytkowość u niektórych koni. Mechanizm powstania tego zjawiska jest nieznan, ale małopłytkowość indukowana heparyną u ludzi wydaje się mieć podłoże immunologiczne. Heparyna łączy się z czynnikiem płytek 4 w osoczu, a przeciw kompleksom heparyna–czynnik płytek 4 tworzą się przeciwciała. Przeciwciała połączone z tym kompleksem przyłączają się do receptorów Fc na powierzchni trombocytów, łącząc te receptory krzyżowo. Proces ten zapoczątkowuje intensywną aktywację i agregację płytek krwi.

Małopłytkowość może być następstwem wielu różnych zakażeń bakteryjnych, wirusowych, pierwotniaczych i grzybiczych. Częstą przyczyną małopłytkowości u psów pochodzących z południowo-wschodniej części Stanów Zjednoczonych są zakażenia *Ehrlichia canis*. Czynnikiem ten wywołuje najprawdopodobniej niszczenie płytek krwi na tle immunologicznym w ostrej fazie ehrlichiozy oraz zmniejszenie wytwarzania tych komórek w ciężkiej, przewlekłej fazie tej choroby. Przyczyna (przyczyny) małopłytkowości związanej z innymi czynnikami zakaźnymi nie zawsze jest jasna. Może dochodzić do uszkodzenia naczyń krwionośnych, adsorpcji kompleksów immunologicznych na powierzchni płytek krwi lub obu zjawisk jednocześnie. W przebiegu niektórych zakażeń wirusowych być może wirusy oddziałują bezpośrednio na trombocyty. Podanie czynnika stymulującego kolonie granulocytów i monocytów oraz czynnika stymulującego kolonie makrofagów powoduje u psów skrócenie czasu przeżycia płytek krwi i małopłytkowość, prawdopodobnie poprzez aktywację systemu monocytów/makrofagów. Aktywacja tych komórek może stanowić mechanizm prowadzący do zwiększonego niszczenia płytek krwi, obserwowany w wielu różnych chorobach zapalnych, w których stężenie tych endogennych cytokin w osoczu jest podwyższone. Organizmem pasożytującym z grupy riketsji, który specyficznie zakaża psy, jest *Anaplasma platys*, powodująca cykliczną małopłytkowość.

Sekwestracja płytek krwi

Sekwestracja płytek krwi może powodować małopłytkowość. Sekwestracja ma miejsce w splenomegalii i hipotermii u różnych gatunków zwierząt. Do przyczyn splenomegalii należą: dziedziczne niedokrwistości hemolityczne, choroby o podłożu immunologicznym, zapalenia, zastój w śledzionie oraz choroby naciekowe. W niektórych chorobach do małopłytkowości prowadzi również zwiększone zużycie i niszczenie płytek krwi. Gdy splenomegalia powoduje zwiększone usuwanie trombocytów i (lub) innych krwinek przez śledzionę, może być używane określenie hipersplenizm.

Duże krwotoki zewnętrzne

Z powodu dużych zasobów płytek krwi znajdujących się w śledzionie, płucach lub obu tych narządach, ostre krwotoki zazwyczaj powodują minimalne obniżenie liczby tych komórek. Liczba trombocytów tylko po ostrym krwotoku rzadko spada poniżej $100 \times 10^3/\mu\text{l}$, ale może ona wynosić nawet poniżej $60 \times 10^3/\mu\text{l}$, jeśli obfite krwawienie jest związane z zatruciem rodentycydami antykoagulacyjnymi. Małopłytkowość może się nasilać u zwierząt z krwawieniem, którym przetoczono dużą ilość koncentratu erytrocytów lub krwi przechowywanej. Te przetoczenia ubogie w płytki krwi mogą dawać efekt rozcieńczenia płytek znajdujących się we krwi. Liczba trombocytów jest często podwyższona u zwierząt z przewlekłymi krwawieniami, z powodu zwiększonego ich wytwarzania.

Małopłytkowość dziedziczna

U Cavalier King Charles spanieli często występuje małopłytkowość ($30\text{--}90 \times 10^3/\mu\text{l}$), w wielu przypadkach obecne są makropłytki. Ta choroba dziedziczna jest przekazywana jako recesywna cecha autosomalna. W chorych zwierząt nie występują objawy kliniczne, a funkcje płytek krwi wydają się prawidłowe.

Małopłytkowość rzekoma

W każdym przypadku automatycznego pomiaru liczby płytek krwi, niezbędna jest ocena ich liczby w rozmazie krwi, będąca miarą kontroli jakości. Obecność zlepiń płytek krwi może być przyczyną fałszywie niskiej ich liczby. Zlepiły trombocytów zazwyczaj powstają wskutek aktywacji tych komórek podczas pobierania i niewłaściwego obchodzenia się z próbką krwi. U koni została opisana małopłytkowość rzekoma zależna od EDTA, spowodowana agregacją płytek krwi. Jeśli zjawisko takie występuje, można zapobiec agregacji, pobierając próbki krwi na cytrynian zamiast EDTA. Małopłytkowość rzekoma może być odnotowywana u kotów, gdy płytki we krwi pełnej są liczone w analizatorach elektronicznych, ponieważ komórki te są duże i trudno je odróżnić od krwinek czerwonych na podstawie objętości krwinki. We krwi części Cavalier King Charles spanieli stwierdzana jest populacja makropłytek, które mogą nie być zliczane przez analizatory elektroniczne, w efekcie czego wyniki będą fałszywie zaniżone.

Zaburzenia funkcji płytek krwi

Nabyte zaburzenia funkcji płytek krwi

Przeciwciała skierowane przeciwko płytkom krwi nie tylko powodują małopłytkowość, ale mogą też upośledzać funkcje trombocytów. Fakt ten może być wytłumaczony tym, że receptor fibrynogenu GPIIb/IIIa jest najwyraźniej najczęstszym antygenem docelowym w małopłytkowości pochodzenia immunologicznego. FDP uwalniane podczas fibrylizacji mogą redukować funkcje płytek krwi poprzez antagonizm w stosunku do fibrynogenu związanego z kompleksem GPIIb/IIIa. W chorobach, w których występuje wysokie stężenie przeciwciał, takich jak szpiczak mnogi, dochodzi do opłaszczenia trombocytów oraz zahamowania funkcji płytek krwi. Uszkodzenie tych komórek powodujące upośledzenie ich funkcji może występować w mocznicy i chorobach wątroby. Upośledzenie funkcji płytek krwi może się również pojawić po podaniu niesteroidowych leków przeciwzapalnych, które hamują syntezę TxA_2 , takich jak aspiryna i fenylobutazon. Dodatkowo leki przeciwhistaminowe, metyloksantyny (teofilina, aminofilina), blokery kanałów wapniowych, halotan, barbiturany, kwasy żółciowe i niektóre antybiotyki mogą oddziaływać na płytki krwi, zaburzając prawidłową ich agregację. Funkcje płytek krwi mogą być upośledzone w różnych chorobach mieloproliferacyjnych, w których wytwarzanie tych komórek jest nieprawidłowe. Podobne zjawisko towarzyszy niektórym zakażeniom. Można to wytłumaczyć tym, że płytki krwi są aktywowane *in vivo*, a w testach *in vitro* ich funkcje są upośledzone.

Spotęgowana funkcja płytek krwi może występować w chorobach, w których dochodzi do aktywacji tych krwinek. Do takich zaburzeń zalicza się: cukrzycę, zespół nerczycowy, leczenie erytropoetyną, nowotwory, zakażenie wirusem zakaźnego zapalenia otrzewnej kotów, dirofilariozę oraz alergiczne choroby układu oddechowego.

Dziedziczne zaburzenia funkcji płytek krwi

U zwierząt opisane zostały dziedziczne zaburzenia funkcji płytek krwi (określane jako trombopatie), w wyniku których dochodzi do nadmiernych krwawień. Zwierzęta z tymi chorobami zwykle mają prawidłową liczbę i morfologię trombocytów. Niedobory receptora GPIIb/IIIa powodują zaburzenia funkcji płytek krwi u otterhoundów i pirenejskich psów górskich. Oba typy zaburzeń wydają się analogiczne do trombastenii Glanzmanna u ludzi i są określane jako trombopatia z trombastenią. Trombopatie tego typu zostały opisane u koni pełnej krwi angielskiej i kłusaków amerykańskich, ale nie analizowano u nich receptorów GPIIb/IIIa. Niedobór ziarnistości gęstych (ziarnistości δ) płytek krwi (defekt puli magazynowej) został opisany u świń i amerykańskich cocker spanieli. Zaburzenie to występuje również u kotów perskich, bydła rasy hereford i nerek aleuckich, jako część dziedzicznego zespołu Chédiaka-Higashiego. Zwierzęta z tym zespołem są częściowo albinotyczne i mają defekt ziarnistości w kilku tkankach, w tym w skórze, leukocytach i płytkach krwi. Patogeneza dziedzicznych trombopatii u foxhoundów, terierów szkockich, bokserów,

mieszkańców, bassetów, szpiców i bydła rasy simentalskiej jest niejasna, ale mechanizm ich powstawania obejmuje zaburzenia transdukcji lub wydzielania. Trwałe trombotopatie opisano u dwóch kotów, ale ich szczegółowy mechanizm nie został poznany. Płytki szarych owczarków collie z cykliczną hematopoezą wydają się mieć zaburzenia transdukcji sygnału i puli magazynowej, lecz w tej chorobie krwawienie nie jest istotne klinicznie.

Choroba von Willebranda

Choroba von Willebranda (vWD) jest niejednorodnie dziedziczącą się chorobą z objawami krwawienia, która jest spowodowana ilościowymi i jakościowymi zaburzeniami dotyczącymi vWF. Jak dotychczas jest to najczęściej spotykane zaburzenie krwawienia u psów. Zostało ono wykryte u ponad 50 ras psów. Na podstawie stężenia vWF w osoczu, struktury multimerów i nasilenia klinicznego rozróżnia się trzy główne typy tej choroby. Typ 1. vWD charakteryzuje się niskim stężeniem vWF w osoczu (mniej niż 50% normy), ale struktura multimerów jest prawidłowa. Typ ten wydaje się dziedziczony jako cecha dominująca autosomalna ze zróżnicowaną penetracją. Psy z łagodną formą tej choroby mogą mieć skłonności do krwawień. Większość osobników z tendencjami do krwawień ma mniej niż 20% prawidłowego stężenia vWF w osoczu. U psów z typem 2. vWD stwierdza się niskie stężenie vWF i nieproporcjonalną utratę multimerów o wysokiej masie cząsteczkowej. Zwierzęta z 3. typem vWD właściwie nie mają vWF w osoczu. Dodatkowo umiarkowanie zmniejszona jest ilość czynnika VIII:C. Psy z 2. i 3. typem tej choroby mają tendencję do dużych krwawień. Te dwa typy są dziedziczone jako cecha autosomalna recesywna.

Typ 1. vWD jest powszechnie spotykany u kilku ras psów, takich jak: doberman, owczarki niemieckie, złote retrievery, pudle, Welsh Corgie Pemberton, owczarki szetlandzkie. Typ 2. został opisany u niemieckich wyżłów krótkowłosych i szorstkowłosych. Typ 3. stwierdzono u kilku ras, m.in. u chesapeake retrieverów, płochaczy holenderskich, terierów szkockich i owczarków szetlandzkich. Typ 3. vWD występuje również u świń, opisano też przypadek u kota himalajskiego, konia rasy quarter i cielęcia rasy simentalskiej. U zwierząt z vWD czas krwawienia jest wydłużony, ponieważ vWF jest niezbędny do prawidłowej adhezji płytek krwi do warstwy podśródnabłonkowej. Zmniejszone stężenie vWF może powodować obniżenie aktywności czynnika VIII:C, ponieważ łączenie się czynnika VIII:C z vWF przedłuża okres półtrwania czynnika VIII:C we krwi. Jednakże obniżenie ilości czynnika VIII:C jest zazwyczaj niewystarczające, aby znacząco wydłużeniu uległ APTT.

Nadpłytkowość

Nadpłytkowość odnosi się do obecności liczby płytek krwi, która przewyższa górną granicę przedziału referencyjnego. Zazwyczaj jest ona wynikiem zwiększonego wytwarzania trombopoetyny lub innych czynników, takich jak: IL-1, IL-3, IL-6 i IL-11. Wtórna nadpłytkowość może występować po krwotoku lub w związku z nim. Jest to szczególnie częste, gdy istniejące krwawienie powoduje niedokrwistość z niedoboru żelaza. Może

również występować w niektórych niedokrwistościach hemolitycznych, różnych przewlekłych chorobach zapalnych oraz w reakcji odbicia w odpowiedzi na małopłytkowość. Nadpłytkowość występuje po tygodniu od usunięcia śledziony, mimo że liczba wytwarzanych płytek jest taka sama, co wynika z usunięcia zdolności magazynowania trombocytów w tym narządzie. Liczba płytek krwi może powrócić do normy po kilku miesiącach od splenektomii.

Pierwotna nadpłytkowość występuje niezależnie od obecności trombopoetyny i innych czynników wzrostu. Zjawisko takie może towarzyszyć niektórym chorobom mieloproliferacyjnym. Określenie nadpłytkowość samostanna jest zwykle używane w odniesieniu do choroby mieloproliferacyjnej, która charakteryzuje się stałym, znacznym podwyższeniem liczby płytek krwi. Zjawisko to może być rozważane jako odpowiednik czerwonicy prawdziwej. Rozpoznanie nadpłytkowości samostannej opiera się na wykluczeniu innych przyczyn podwyższenia liczby trombocytów.

ZABURZENIA KRZEPNIĘCIA

Nabyte zaburzenia krzepnięcia

Nadkrzepliwość

W nadkrzepliwości występuje zwiększona tendencja do krzepnięcia krwi, bez objawów klinicznych czy zmian w wynikach badań laboratoryjnych świadczących o zakrzepicy. Zwiększone ryzyko zakrzepicy może być również określane jako trombofilia lub stan przedzakrzepowy. Do potencjalnych przyczyn zalicza się: wstępne reakcje, które w końcu prowadzą do zakrzepicy lub DIC (zob. dyskusja w następnych rozdziałach), niedobór antytrombiny III (np. w zespole nerczycowym u psów) i niedobór białka C (choroba dziedziczna u koni). Stan nadkrzepliwości może się rozwinąć u koni z ciężkim morzyskiem, o czym świadczyć może obniżona ilość antytrombiny III i białka C oraz zwiększona liczba kompleksów trombina-antytrombina w osoczu.

Zakrzepica

Patogeneza zakrzepicy może obejmować aktywację lub uszkodzenie śródbłonka, zaburzenia przepływu krwi (zawirowania lub zastój), zmiany dotyczące czynników krzepnięcia, czynników fibrynolitycznych lub ich inhibitorów oraz aktywację płytek krwi. Zakrzepica może towarzyszyć uszkodzeniu naczyń w: zaburzeniach immunologicznych, chorobach zakaźnych, po mechanicznym urazie, przebiegu chorób nowotworowych (zwłaszcza w złośliwym śródbłoniaku krwionośnym u psów), niedokrwistości hemolitycznej o podłożu immunologicznym (częstej u psów), małopłytkowości o podłożu immunologicznym, nefropatii białkogubnej, nadczynności kory nadnerczy, podczas leczenia glikokortykosteroidami, w ostrej martwicy trzustki (u psów), nadpłytkowości, hipowolemii, chorobach serca (wegetatywnym zapaleniu wsierdza, dirofilariozie, kardiomiopatii) oraz podczas stosowania cewników dożylnych. Gdy zakrzep powstaje miejscowo, liczba płytek krwi, wyniki testów koagulologicznych i wartości FDP są często prawidłowe.

Rozsiane krzepnięcie wewnątrznaczyniowe

DIC jest zespołem, w którym w małych naczyniach krwionośnych dochodzi do rozsianego krzepnięcia i występującej wtórnie fibrylizacji. DIC nie jest zaburzeniem typu pierwotnego. Zawsze występuje ono w powiązaniu z innymi chorobami. Powstanie zatorów w naczyniach krwionośnych może prowadzić do niedotlenienia tkanek i uszkodzenia narządów (ryc. 6-13). Zużycie czynników krzepnięcia i płytek krwi podczas formowania tych zakrzepów powoduje tendencję do krwawień. Skłonność ta jest potęgowana przez występującą później fibrylizację, która nie tylko powoduje rozpad skrzepu, ale prowadzi do powstania FDP interferujących z prawidłową agregacją płytek krwi i polimeryzacją fibryny. DIC występuje często jako stan zagrażający życiu, który powoduje uszkodzenie narządów wewnętrznych, krwawienia lub obydwie te zjawiska, ale może również przyjmować postać przewlekłą, bez ciężkich objawów klinicznych. DIC może powodować wstrząs, a wstrząs może nasilać DIC, w wyniku czego powstaje „błędne koło”. Nadmierne miejscowe krzepnięcie wewnątrznaczyniowe może występować u niektórych psów ze złośliwym śródbłoniakiem krwionośnym. Wyniki badań laboratoryjnych w tych przypadkach są podobne jak w DIC, co utrudnia odróżnienie DIC od miejscowego krzepnięcia wewnątrznaczyniowego.

DIC może występować w chorobach, w których TF jest wyeksponowany na powierzchni komórek, gdy ma miejsce rozległe uszkodzenie naczyń krwionośnych, znaczna aktywacja płytek krwi, zredukowany przepływ krwi, upośledzone usuwanie aktywowanych czynników krzepnięcia w wątrobie. Przykłady zaburzeń, które mogą zapoczątkować DIC, zostały zamieszczone w ramce 6-1. Bez wątplenia do tej listy mogą być dodane inne choroby.

Choroby wątroby

Wątroba jest głównym miejscem syntezy czynników krzepnięcia. W związku z tym uogólniona choroba wątroby może powodować zwiększenie tendencji do krwawień, w wyniku obniżenia liczby krążących czynni-

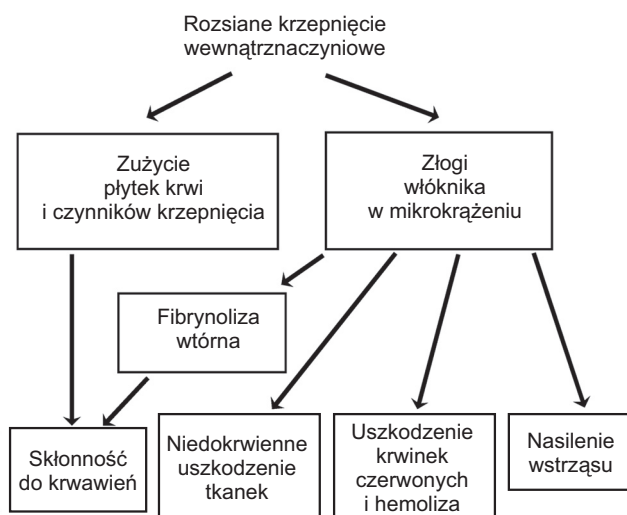
ków krzepnięcia. Z powodu tej roli wątroby i jej obfitego unaczynienia, przed biopsją tego narządu przeprowadza się przesiewowe badanie krzepliwości. Choroby wątroby mogą się również przyczyniać do rozwoju DIC.

Niedobór witaminy K

Witamina K jest niezbędna do reakcji karboksylacji, w wyniku której powstają aktywne formy czynników krzepnięcia: II, VII, IX i X. Niedobór witaminy K może występować w zespołach złego wchłaniania (np. przy zatkaniu dróg żółciowych) lub w wyniku wyjąłowania jelit przez długotrwałe stosowane antybiotyki. Dikumarol, produkt występujący w spleśniałej koniczynie, hamuje reakcję karboksylacji zależną od witaminy K. Zatem zatrucie dikumarolem może powodować krwawienia u bydła i innych gatunków zwierząt spożywających spleśniałą koniczynę. Odkrycie to doprowadziło do opracowania pochodnych chemicznych, które są obecnie używane jako rodentycydy i leki przeciwzakrzepowe. U zwierząt, które skonsumowały te rodentycydy antykoagulacyjne, dochodzi do groźnych dla życia krwawień charakteryzujących się wydłużonym PT i APTT. Badanie PT w wykrywaniu wcześniejszych zmian powodowanych przez rodentycydy antykoagulacyjne jest opisywane zazwyczaj jako bardziej czułe niż APTT, z powodu krótkiego czasu półtrwania czynnika VII we krwi. Jednakże APTT był częściej wydłużony niż PT u koni z eksperymentalnym zatruciem brodifakum.

Jad węży

Jad węży zawiera różne składniki, wykazujące działanie stymulujące lub hamujące mechanizmy hemostatyczne, do których zaliczają się: krzepnięcie, fibrylizacja, funkcje płytek krwi oraz integralność naczyń włosowatych. Jady węży różnią się zawartością fibrylizyny i prokoagulantu. Większość prokoagulantów wywiera swoje działanie w późniejszej części kaskady krzepnięcia, aktywując czynnik X lub protrombinę, albo działając bezpośrednio na przekształcenie fibrynogenu w fibrynę. Jad grzechotnika diamentowego zawiera enzym degradujący fibrynogen – krotolazę. Jad grzechotnika teksańskiego zarówno



Ryc. 6-13 Patofizjologia rozsianego krzepnięcia wewnątrznaczyniowego.

RAMKA 6-1 Zaburzenia, które mogą prowadzić do rozsianego krzepnięcia wewnątrznaczyniowego

- Posocznica (różne bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie)
- Wiremia (zakaźne zapalenie wątroby, herpeswirus u psów, nosówka psów, parwowirus u kotów, zakaźne zapalenie otrzewnej kotów, afrykański pomór świń, choroba niebieskiego języka i pomór świń)
- Pierwotniaki pasożytnicze (babeszjoza, trypanosomoza, leiszmanioza i cytoukszoonoza)
- Pasożyty z grupy *Metazoa* (dirofilarioza, robaki płucne)
- Znaczne uszkodzenie tkanek (zawał serca, uraz i zabiegi chirurgiczne)
- Hemoliza wewnątrznaczyniowa
- Powikłania położnicze
- Nowotworzenie (złośliwy śródbłoniak krwionośny, rozsiane raki)
- Wstrząs pourazowy
- Choroba wątroby
- Zapalenie trzustki
- Rozszerzenie i skręt żołądka
- Toksyny (jad węży i owadów, aflatoksyna i środki owadobójcze)

pośrednio, jak i bezpośrednio aktywuje plazminogen do plazminy, która następnie powoduje proteolizę fibrynogeny. Zatrucie jadem obu tych gatunków węży powoduje, że krew nie krzepnie po pobraniu. Liczba płytek krwi może być prawidłowa, ale często jest obniżona. Krwawienia po ukąszeniu grzechotnika nasilają się również wskutek obecności w jadzie czynników, które powodują bezpośrednie uszkodzenie śródbłonna. Zaburzenia hemostazy nie są klinicznie istotnym aspektem zatrucia jadem mokasyna błotnego, mokasyna miedziogłowca czy węża koralowego.

Dziedziczne zaburzenia krzepnięcia

Występowanie dziedzicznych niedoborów czynników krzepnięcia należy wziąć pod uwagę, jeśli dojdzie do krwawień o niewyjaśnionej przyczynie lub gdy krwawienie po zabiegu chirurgicznym wydłuża się. Dziedziczne zaburzenia krzepnięcia występują o wiele częściej u psów niż u innych gatunków zwierząt. Prawdopodobieństwo, że zaburzenie w krzepnięciu spowoduje istotne krwawienie jest zróżnicowane, w zależności od rodzaju istniejącego defektu.

Zaburzenia krzepnięcia dotyczące szlaku wewnątrzpochodnego

U zwierząt z niedoborem czynnika XII wydłużony jest APTT i ACT, ale nie występują krwawienia. W związku z tym uważa się powszechnie, że czynnik ten nie bierze udziału w prawidłowej hemostazie. Podobnie jak w przypadku niedoboru czynnika XII, zwierzęta z niedoborem prekalikreiny zwykle nie wykazują zwiększonej skłonności do krwawień, chociaż został opisany przypadek konia belgijskiego z niedoborem tego czynnika, u którego po kastracji obserwowano nadmierne krwawienie.

Niedobór czynnika XI powodował wydłużenie krwawienia po zabiegach chirurgicznych u psów i bydła.

Niedobory czynnika IX (hemofilia B) i czynnika VIII:C (hemofilia A, klasyczna forma tej choroby) są dziedziczne jako cecha recesywna związana z chromosomem X, wskutek czego choroba ta jest zwykle rozpoznawana u osobników męskich. Niedobory te zazwyczaj prowadzą do dużych krwawień.

Zaburzenia krzepnięcia dotyczące szlaku zewnątrzpochodnego

Niedobór czynnika VII był opisywany u kilku ras psów. Występuje on często u beagli. Niedobór ten powoduje chorobę o niewielkim nasileniu, bez widocznej skłonności do krwawień, z wyjątkiem zwiększonej tendencji do powstawania wylewów podskórnych.

Zaburzenia krzepnięcia dotyczące szlaku wspólnego

Niedobór czynnika X u psów prowadzi do epizodów krwawień o dużym nasileniu. U amerykańskich cocker spanieli niedobór ten powoduje rodzenie się martwych szczeniąt lub śmiertelne krwawienia w okresie noworodkowym. U psów z niewielkimi skłonnościami do krwawień były opisywane niedobory protrombiny (czynnika II). Niedobór fibrynogenu (czynnika I) prowadzi do krwawień od nieznacznego do dużego nasilenia u psów i kóz z tym zaburzeniem. U zwierząt nie stwierdzono niedoborów czynników V i XII.

Zaburzenia krzepnięcia zależne od niedoboru witaminy K

Zaburzenia krzepnięcia zależne od niedoboru witaminy K zostały rozpoznane u kotów rasy Devon rex oraz u owiec rasy rambouillet. U chorych zwierząt występuje niedobór enzymu karboksylazy gamma-glutamulowej, wskutek którego zredukowana jest aktywność czynników II, VII, IX i X. U niektórych zwierząt skłonności do krwawień są minimalne, ale zdarzały się też śmiertelne krwotoki u chorych kotów. U jagniąt z tą chorobą dochodzi do krwotoków i zgonów w okresie okołoporodowym.

INTERPRETACJA WYNIKÓW BADAŃ HEMOSTAZY

Wykorzystanie wielu testów hemostatycznych łącznie ułatwia różnicowanie przyczyn krwawień, takich jak: małopłytkowość prosta, DIC, vWD, zapalenie naczyń, zatrucie rodentycydami, choroby wątroby oraz dziedziczne niedobory dotyczące szlaku wewnątrzpochodnego, zewnątrzpochodnego i wspólnego. Przykłady profili badań hemostatycznych zebrane zostały w formie poniższego zestawienia:

1. *Małopłytkowość, wyniki badań APTT, PT i FDP w normie.* Małopłytkowość bez nieprawidłowości w wynikach badań krzepliwości jest zwykle wynikiem niedoboru wytwarzania płytek krwi lub zwiększonego ich niszczenia. Do ustalenia, czy istnieje nieprawidłowe wytwarzanie płytek krwi z megakariocytów, niezbędna jest biopsja szpiku kostnego. Uogólniona hip-