

Laboratorijska dijagnostika poremećaja hemostaze

Varjačić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:080238>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Ana Varjačić

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA POREMEĆAJA HEMOSTAZE

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

ZAVOD ZA KEMIJU I BIOKEMIJU

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Renate Barić Rafaj

Predstojnica: prof. dr. sc. Renata Barić Rafaj

Voditeljica: prof.dr.sc. Renata Barić Rafaj

Povjerenstvo za ocjenu diplomskog rada:

Doc. dr. sc. Iva Šmit

Doc. dr. sc. Maja Belić

Prof. dr. sc. Renata Barić Rafaj

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Renati Barić Rafaj na stručnom vodstvu, sugestijama i ispravkama pri izradi ovog diplomskog rada.

POPIS KRATICA

ACT – aktivirano vrijeme zgrušavanja
ADP – adenzin-difosfat
Anti-Xa – antitrombokinaza
APC – aktivirani protein C
aPTT – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
BMBT – vrijeme krvarenja bukalne sluznice
CADP – membrane obložena adrenalinom
cAMP – ciklički adenzin-monofosfat
CEPI – membrana obložena kolagenom
cGMP - ciklički gvanozin-monofosfat
CT – vrijeme zgrušavanja
DIK – diseminirana intravakularna koagulacija
ELISA – imunoenzimski test
FDP – razgradni produkt fibrina
FI-FXIII – faktori zgrušavanja krvi
g – gravitacijska sila
GP – glikoprotein
K – vrijeme zgrušavanja
K-EDTA – kalijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline (antikoagulans)
LMWH – heparin niske molekularne mase
LTA – agregometrija transmisije svjetlosti
LY60 – postotak lize tijekom 60 minuta
MA – maksimalna amplituda
MCV – srednji korpuskularni volumen eritrocita
MDIF – imunofluorescentni test za megakariocite
MPV – srednji volume trombocita
NO – dušikov oksid
P2Y12 – kemoreceptor za ADP na površini trombocita

PAF – trombocitni aktivirajući faktor
PAI – inhibitor aktivatora plazminogena
PCT – trombokrit
PDW – širina distribucije trombocita
PF3 – trombocitni faktor 3
PFA – 100 – analizator funkcije trombocita
PGI₂ – prostaciklin
PIVKA – proteini inducirani nedostatkom vitamina K
PMP – piridoksamin monofosfat
PLT – trombociti
PT – protrombinsko vrijeme
R – reakcijsko vrijeme
rhTF – rekombinantni humani tkivni faktor
RIA – radioimunotest
TCT – trombinsko vrijeme zgrušavanja
TEG – trombelastografija
TF – tkivni faktor
TFPI – tkivni čimbenik koji inhibira aktivaciju protrombina
TGA – test generacije trombina
tPA – tkivni aktivator plazminogena
TT – trombinsko vrijeme
TX-a – tromboksan A₂
UFH – nefrakcionirani heparin
UPA – urokinazni aktivator plazminogena
vWF – von Willebrandov faktor
vWF:Ag – test za mjerenje koncentracije vWF, odnosno vWF antigena
vWF:CB – test koji mjeri sposobnost vezanja vWF na kolagen
vWF:Ro – ristocetin - kofaktor test

POPIS TABLICA I SLIKA

Tablice:

Tablica 1: Interpretacija aktivnosti vWF

Slike:

Slika 1: Prikaz hemocitometra i područja za brojenje trombocita

Slika 2: Shematski prikaz načina mjerenja broja stanica metodom impendancije

Slika 3. Trombocitopenija u razmazu periferne krvi

Slika 4: Shematski prikaz rada automatskog analizatora funkcije trombocita – PFA – 100

Slika 5: Princip rada agregometra

Slika 6: Shematski prikaz rada protočnog citometra

Slika 7: Adhezija trombocita na endotel i uloga vWF

Slika 8. Shematski prikaz sekundarne hemostaze

Slika 9: Prikaz karakteristične kalibracijske krivulje u koagulometrijskom mjerenju

Slika 10: Nastajanje i uloga plazmina u fibrinolizi

Slika 11: Prikazi rezultata osnovnih laboratorijskih testova u dijagnostici poremećaja primarne, sekundarne i tercijarne hemostaze

Slika 12: Prikaz rezultata trombelastografskog mjerenja

Slika 13: Karakteristični prikazi trombelastograma u različitim tipovima poremećaja

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	CILJ RADA.....	3
3.	LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA POREMEĆAJA HEMOSTAZE I FIBRINOLIZE.....	3
3.1.	Laboratorijska dijagnostika poremećaja primarne hemostaze.....	5
3.1.1.	Broj trombocita	5
3.1.2.	Trombocitna antitijela	9
3.1.3.	Vrijeme krvarenja bukalne sluznice	10
3.1.4.	Mjerenja funkcija trombocita.....	10
3.1.5.	Mjerenja transmisije svjetlosti	11
3.1.6.	Protočna citometrija.....	13
3.1.7.	Određivanje koncentracije, aktivnosti i strukture von Willebrandovog faktora (vWF) 14	
3.2.	Laboratorijska dijagnostika poremećaja sekundarne hemostaze	16
3.2.1.	Protrombinsko vrijeme	18
3.2.2.	Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme.....	18
3.2.3.	Aktivirano vrijeme zgrušavanja	19
3.2.4.	Mjerenja aktivnosti faktora zgrušavanja	19
3.2.5.	Mjerenja faktora koagulacije u nedostatku vitamina K	20
3.3.	Mjerenja intenziteta fibrinolize	21
3.3.1.	Razgradni produkti fibrina – FDP.....	21
3.3.2.	D – dimeri.....	22
3.4.	Inhibitori koagulacije.....	23
3.4.1.	Određivanje antitrombina i proteina C	23

3.4.2.	Kompleksi trombina i antitrombina.....	23
3.5.	Globalni hemostatski testovi.....	24
3.5.1.	Trombelastografija.....	24
4.	ZAKLJUČCI	27
5.	LITERATURA.....	28
6.	SAŽETAK.....	34
7.	SUMMARY	35
8.	ŽIVOTOPIS	36

1. UVOD

Poremećaji hemostaze jedni su od najčešćih hematoloških poremećaja s kojima se susrećemo u veterinarskoj medicini. Za kliničara je ključno razumijevanje opće patogeneze i uzroka uključenih u razvoj poremećaja hemostaze. Hemostaza je kompleksan proces koji uključuje vremenski i prostorno regulirane interakcije između stijenke krvnih žila i cirkulirajućih trombocita, tkivnog faktora (TF) povezanog s membranom te prokoagulantnih, antikoagulantnih i fibrinolitičkih plazmatskih proteina (BROOKS i CATALFAMO, 2013). Proces hemostaze može se podijeliti na tri faze: primarna i sekundarna hemostaza te fibrinoliza. Primarna hemostaza uključuje trombocite i von Willebrandov faktor na mjestu vaskularne ozljede, a završava stvaranjem trombocitnog agregata. Sekundarna hemostaza odnosi se na reakcije koagulacijske kaskade što završavaju stvaranjem fibrinsko-stanične mrežice i stabilnog hemostatskog čepa. U procesu fibrinolize, kao treće faze hemostaze, plazmin postupno razgrađuje zreli ugrušak kako bi se ponovno uspostavio normalan protok krvi poslije cijeljenja vaskularne ozljede. Budući da između trombocita, koagulacijskih proteina i stanica koje nose tkivni faktor postoji uska povezanost, klasični model podjele procesa u hemostazi na primarnu i sekundarnu hemostazu zamjenjen je staničnim modelom koagulacije krvi, koji podrazumijeva simultano odvijanje pojedinih faza koagulacije i fibrinolize (BHASKAR, 2016).

Fiziološki, u krvi se nastoji održati balans između antikoagulantnih i prokoagulantnih zbivanja, s težištem prema antikoagulantnim zbivanjima koja održavaju krv tekućom, a zdrave krvne žile osigurati će protok krvi pod visokim tlakom u nepropusnom prostoru. Ako dođe do oštećenja krvne žile, dolazi do prokoagulantne aktivnosti trombocita, što će rezultirati stvaranjem trombina, stvaranjem fibrinskog ugruška i prestankom krvarenja. Trombin će potaknuti aktivaciju antikoagulantnih proteina koji će ograničiti veličinu ugruška te će uslijediti proces fibrinolize koji je odgovoran za razgradnju ugruška i cijeljenje rane (BROOKS i CATALFAMO, 2013).

Trombociti u krvi nastoje smanjiti gubitak krvi adherirajući na endotel krvnih žila, nakupljajući se i potičući novi priljev trombocita na oštećeno područje i stvaranje trombina i fibrina u mikrookolišu koji osigurava brzo nastajanje tromba (GENTRY, 2000). Nadalje, osim veoma važne uloge koju trombociti imaju u hemostazi, važna je i njihova uloga u upalnim procesima i cijeljenju rana putem izravnih međustaničnih interakcija i otpuštanja topljivih medijatora iz aktiviranih trombocita koji mogu mijenjati aktivnost ostalih krvnih stanica i vaskularnog endotela. Može se reći da trombociti u svih vrsta sisavaca imaju jednak biološki odgovor, tj. jednako odgovaraju na oštećenje krvnih žila, upalu i oštećenje drugih tkiva. Cirkulirajući trombociti su u interakciji s vaskularnim endotelom, međusobno ili s drugim krvnim stanicama samo u slučaju oštećenja koje ugrožava integritet krvnih žila (RUGGERI, 1994). Izloženost kolagenih vlakana u oštećenim endotelnim stanicama krvnih žila pri vaskularnoj traumi snažan je poticajni faktor za aktivaciju trombocita. U slučaju manjeg vaskularnog oštećenja, endotelne stanice sintetiziraju i izlučuju von Willebrandov faktor (vWF) te fibrinogen, koji se može skupljati uz staničnu membranu endotelnih stanica, te tako privlače trombocite na mjesto oštećenja. U početku se uz oštećenje trombociti nakupljaju u jednom staničnom sloju, a njihove

stanične membrane konformacijski se mijenjaju, što uzrokuje aktivaciju glikoproteinskih (GP) IIb/IIIa (CD41/CD61) receptora koji imaju dvojni ulogu pri adheziji trombocita na von Willebrandov faktor (vWF) ili fibrinogen (GENTRY, 2000). Sekundarna faza adhezije trombocita podrazumijeva reakcije između trombocita i sekreciju trombocitnih granula (GENTRY, 2000).

Mobiliziranje cirkulirajućih trombocita i njihovo uklopljivanje u novonastali trombocitni "čep" kontroliraju agonisti, poput adenzin difosfata (ADP-a), serotoninina i adrenalina (u primata, mačaka i pasa), što se otpuštaju iz zaliha, te novosintetizirane reaktivne molekule, trombocitnog aktivirajućeg čimbenika (PAF-a) i tromboksana A₂ (TxA₂) iz aktiviranih trombocita. Svi agonisti zajednički djeluju na ubrzano stvaranje ireverzibilnog trombocitnog agregata, tako što će djelovati na privlačenje novih trombocita i poticati njihovu aktivaciju i koheziju s već adheriranim trombocitima (GENTRY, 2000).

Uz početnu adheziju trombocita, aktivirane endotelne stanice na svojoj površini izražavaju transmembranski tkivni faktor (TF). Tkivni faktor, zajedno s cirkulirajućim faktorom VII (fVII), formira proteolitički aktivan kompleks, TF-fVII, koji je poticatelj reakcija koje će rezultirati nastankom trombina. Trombin je univerzalni agonist trombocita koji počinje čitavu kaskadu događanja i promjena na trombocitima, njihovu promjenu oblika, agregaciju, sekreciju granuliranog sadržaja i sintezu reaktivnih činitelja. Trombin uzrokuje konverziju topljivog fibrinogena u netopljive polimere fibrina (ALLEGREZZA-GIULIETTIS i sur., 1991). Fibrinogen i fibrin stabilizirat će agregate i ubrzati nastanak tromba (GENTRY, 2000).

Trombi bogati trombocitima relativno su otporni na fibrinolizu. Prije no što ugrušak može biti otklonjen, plazmin mora biti aktiviran proteolitičkim cijepanjem plazminogenih molekula koje se ugrađuju unutar fibrinskih mrežica tijekom stvaranja tromba. Tkivni aktivator plazminogena (tPA), koji je potreban kao katalizator te pretvorbe, otpušta se iz endotelnih stanica stimuliranih trombinom. Nekoliko proteolitičkih inhibitora otpušta se iz aktiviranih trombocita, uključujući inhibitor aktivatora plazminogena (PAI-1). Inhibitor aktivatora plazminogena potiče stabilizaciju ugruška na mjestu nastanka hemostatskog čepa, tako što djeluje kao inhibitor aktiviranog proteina C (APC), kao i tPA-a. Trombociti izlučuju PAI, nakon čega on osigurava stalno stvaranje trombina, kao i fibrina, te odgađa početak fibrinolize dok tromb nije konsolidiran, a cijeljenje rane nije u poodmakloj fazi. Fiziološki značaj ostalih inhibitora, uključujući inhibitor α_1 -proteaze, α_2 -makroglobulin, C1 inhibitor, α_2 -antiplazmin, itd., u proteolitičkoj aktivnosti unutar krvnog ugruška ili tijekom pojave upale se tek treba razmotriti (NIEWIAROWSKI i sur., 1994).

Plazminogen, koji se sintetizira u jetri, u plazmin, njegov aktivni oblik, transformiraju aktivatori plazminogena, a fibrin također pozitivno utječe na tu transformaciju. Nastali plazmin razgrađuje fibrin do produkata razgradnje fibrinogena. Poprečno povezane molekule fibrina stvaraju faktor XIIIa, a D-dimeri nastaju razgradnjom tih molekula. Prisutnost D-dimera ukazuje na razlaganje fibrinskog ugruška, dok prisutnost produkata razgradnje fibrinogena (FDP) može proizaći od razlaganja fibrinogena, fibrinskih monomera ili fibrina poprečno povezanog molekulskog sastava (MCMICHAEL, 2012).

Tkivni aktivator plazminogena (tPA) i urokinazni aktivator plazminogena (UPA) dva su fiziološka aktivatora plazminogena u sisavaca. Tkivni aktivator najvažniji je aktivator plazminogena unutar unutar krvne žile, a urokinaza izvan nje, odnosno u ekstravaskularnom tkivu. Tkivni aktivator plazminogena izlučuju endotelne stanice kao odgovor na mnoštvo stimulansa, poput bradikinina, histamina, acetilkolina, alfa-adrenergičnih agenasa te faktora aktivacije trombocita (PAF). Enzimatska aktivnost tPA veoma je slaba u odsutnosti fibrina. Urokinazni aktivator plazminogena sintetiziraju stanice slične fibroblastima, epitelne stanice, monociti i endotelne stanice. Za razliku od tPA, UPA može aktivirati plazminogen u odsutnosti fibrina (BOOTH i BACHMAN, 2006).

2. CILJ RADA

S obzirom na to da je proces hemostaze prvi korak prema cijeljenju rane, smatram da je za kliničara vrlo važno znanje o provedbi analitičkog postupka u dijagnostici, razumijevanje dobivenih rezultata, te procjena vrste i intenziteta poremećaja u specifičnim slučajevima, prema čemu se određuje i terapijski postupak uz kojeg će pacijent postići puni oporavak.

3. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA POREMEĆAJA HEMOSTAZE I FIBRINOLIZE

Laboratorijska dijagnostika poremećaja hemostaze i fibrinolize predstavlja važan korak u diferencijalnoj dijagnostici kod pacijenata u početku, tijekom utvrđivanja diferencijalnih dijagnoza, kod pacijenata sa znakovima spontanog krvarenja. U pasa, vlasnik može izraziti sumnju na poremećaje hemostaze ako primijeti spontano krvarenje na životinji. Mačke obično ne krvare spontano, već sumnju na poremećaj hemostaze može izazvati prekomjerno krvarenje iz rane nastale venepunkcijom, kateterizacijom, operacijskim zahvatima ili ako životinja postoperativno prekomjerno krvari. U slučaju nefunkcionalnog primarnog hemostatskog čepa, krv će izlaziti iz površinskih i dubokih krvnih žila tijekom nekoliko sekundi ili minuta dok se ne formira stalni sekundarni hemostatski čep. Uslijed navedenog, klinički se mogu uočiti manja površinska krvarenja koja okružuju krvnu žilu, u obliku petehija, ekhimoza ili krvarenja na sluznicama (epistaksa, hematurija, melena i slično). U slučaju nefunkcionalnog sekundarnog hemostatskog čepa, krvarenje se ne primjećuje neposredno, već nekoliko minuta nakon, npr. venepunkcije, kada pacijent krvari profuzno. Krvarenje je u ovom slučaju odgođeno zbog primarnog trombocitnog čepa koji privremeno zatvara oštećenje na krvnoj žili, no budući da se radi o poremećaju stvaranja fibrina, krv će ponovno istjecati kroz oštećenje na krvnoj žili nakon što primarni hemostatski čep izgubi funkciju. Navedeno rezultira nastankom velikih dubokih krvarenja u obliku velikih hematoma ili krvarenja u tjelesne šupljine (COUTO, 2012).

Uzorkovanje krvi na odgovarajući način za određivanje ukupnog broja trombocita u krvi i koagulacijskog panela treba učiniti što je prije moguće kako bismo, prema rezultatima, znali koje

laboratorijske testove ćemo sljedeće koristiti. Oni će pomoći da razlikujemo krvarenja nastala vaskularnim ozljedama od krvarenja nastalih sistemskim hemostatskim disbalansom (BROOKS i CATALFAMO, 2013). Testovi hemostaze, za razliku od ostalih laboratorijskih testova, zahtijevaju posebne uvjete pri uzorkovanju krvi. Za mjerenje broja trombocita, potrebna je krv uzeta s antikoagulansom kalijevom soli etilendiaminotetraoctene kiseline (K-EDTA). Koagulacijski testovi izvode se na plazmi iz krvi s antikoagulansom, npr. natrijevim citratom ili citratnim puferom. Za ispitivanja agregacije trombocita u punoj krvi, bolje je koristiti krv antikoaguliranu s hirudinom (MISCHKE, 2017).

Za dobivanje citratne plazme, mogu se koristiti komercijalni spremnici. Svaki takav spremnik sadrži određeni volumen (0.11 mol/L) natrijevog citrata ili otopine citratnog pufera, kako bi se osigurao omjer krvi i antikoagulansa 9:1. U slučajevima kada se u spremniku ne nalazi dovoljna količina krvi, moguća su značajno produljena vremena koagulacije, osobito aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTT). Kontrolirano prepunjavanje ili potpunjavanje spremnika indicirano je kada se želi postići primjeren omjer plazme i citratne otopine, tj. kada je hematokrit primjetno povišen ili snižen (omjer plazme i citratne otopine otprilike je 2.25:1 u uzorku s hematokritom od 75%, gdje prepunjenost epruvete od 190% normalnog volumena rezultira primjerenim omjerom) (MISCHKE, 2017).

Uzorkovanje krvi treba biti brzo i nježno (<30 sekundi), kako bi se izbjegla znatnija aktivacija hemostatskog i fibrinolitičkog sustava. Uzorkovati treba oštrom, jednokratnom iglom s primjerenim lumenom (19 G ili 1.1x30 mm za pse). Prve kapi krvi treba odbaciti ili uzorkovati u drugu epruvetu, kako bi se izbjegla kontaminacija uzorka s tkivnim faktorom koji može potaknuti aktivaciju faktora zgrušavanja krvi ili trombocita i uzrokovati dobivanje netočnih rezultata testova. Krv treba pažljivo naslojavati uz stijenku epruvete. Ako se krv sa citratom uzima u brizgalicu, aspiraciju treba pažljivo izvesti, jer prevelik utjecaj vakuuma može također uzrokovati aktivaciju koagulacijskog sustava. Uz navedeno, uzorci za rutinske testove mogu se uzeti putem privremenog venskog katetera, kada su moguća odstupanja u testovima, ali zanemariva, stoga je dobar način uzorkovanja krvi kod kritičnih pacijenata jer eliminira dodatnu trauma na veni, nelagodu i strah koje pacijent osjeća (MISCHKE, 2017).

Kako bi se osiguralo dobro miješanje uzorkovane krvi i antikoagulansa u epruveti (natrijevog citrata) ili brizgatici, epruvetu (ili brizgalicu) treba pažljivo okretati već prilikom uzorkovanja. Kada se uzorkovanje završi, epruvetu treba nastaviti pažljivo okretati i okrenuti nekoliko puta, vodeći pritom računa da ne dođe do hemolize. Dodatak hemolizata in vitro znatno interferira s vremenima zgrušavanja, poput aPTT i TT u psećoj krvnoj plazmi, iako je i učinak hemolizata ograničen i teško je odrediti njegovu najučinkovitiju koncentraciju. Neke studije pokazale su da su razlike u PT i aPTT između hemoliziranih uzoraka i nehemolizirane kontrole gotovo zanemarive, zbog čega se može reći da je nepotrebno odbacivanje hemoliziranih uzoraka za izradu rutinskih testova (MISCHKE, 2017).

Centrifugiranje uzorka i posljedično neposredno odvajanje supernatanta citratne plazme (siromašne trombocitima) koristeći pipetu, trebalo bi učiniti što je prije moguće, najkasnije 2 sata poslije uzorkovanja krvi. Uzorak prije centrifugiranja treba provjeriti da li sadrži ugruške. Uzorak s ugrušcima se odbacuje, a dobar uzorak treba centrifugirati 10 minuta, pri 1.500-2.000 g (pri čemu „g“ predstavlja centrifugalnu silu).

Tijekom 48 sati nakon uzorkovanja minimalne su razlike u rezultatima većine koagulacijskih testova s obzirom na skladištenje uzorka citrirane krvne plazme na sobnoj temperature ili pri 8°C. Poslije 8 i 24 sata, jedina značajna razlika bio je pad koncentracije fibrinogena u uzorku krvne plazme psa skladištenom na sobnoj temperature (24 °C), s 3.2 g/l na 2.9 g/l u tijekom 8 sati, te na 2.3 g/l u 24 sata. Von Willebrandov faktor u plazmi psa također je relativno stabilan tijekom prvih 48 sati skladištenja pri 4 ili 22 °C. S obzirom na navedeno, slanje uzorka citratne plazme noćnom kurirskom službom u specijalizirani laboratorij može se izvesti i ne zahtjeva hlađenje ili zamrzavanje uzorka. No, nije poznato jesu li mačja plazma i patološki uzorci jednako stabilni u svim uvjetima skladištenja, te takve uzorke pune krvi s dodatkom citrate treba odmah centrifugirati i izvesti analize testova čim prije, po mogućnosti 3-4 sata poslije uzorkovanja (MISCHKE, 2017).

Laboratorijski testovi, koje možemo koristiti u dijagnostici poremećaja hemostaze, dijele se na testove poremećaja primarne i sekundarne hemostaze te fibrinolize. Moguće je i mjerenje aktivnosti glavnih inhibitora hemostaze u krvi. U laboratorijske testove poremećaja primarne hemostaze ubrajamo ukupan broj trombocita (PLT), određivanje prisutnosti trombocitnih antitijela, testovi funkcije trombocita, agregometrijska mjerenja, protočna citometrija, mjerenje von Willebrandovog faktora (vWF) te vrijeme krvarenja bukalne sluznice (BMBT). Testovi poremećaja sekundarne hemostaze su protrombinsko vrijeme (PT), aktivirano parcijalno trombotoplastinsko vrijeme (aPTT), aktivirano vrijeme zgrušavanja (ACT), mjerenje faktora koagulacije ovisnim o vitaminu K (PIVKA) te mjerenje aktivnosti pojedinačnih faktora koagulacije krvi (FI- FXII). Aktivnost fibrinolize moguće je mjeriti pomoću FDP i D-dimera. Laboratorijskim analizama moguće je dobiti uvid u aktivnost glavnih inhibitora krvi: antitrombina i proteina C, kao i koncentraciju thrombin – antitrombin kompleksa. Trombelastografija pruža uvid u koagulaciju i fibrinolizu.

3.1. Laboratorijska dijagnostika poremećaja primarne hemostaze

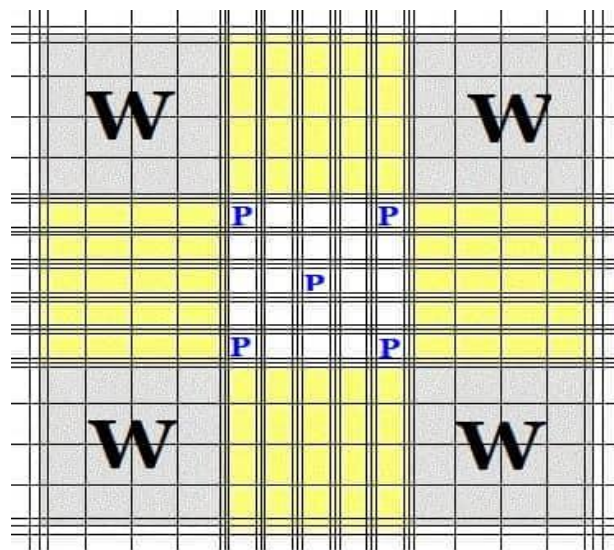
3.1.1. Broj trombocita

Trombocitopenija se često javlja u pasa i mačaka, za razliku od ostalih vrsta domaćih životinja, u kojih je nešto rjeđa, stoga je ukupan broj trombocita prvi dijagnostički test u procjeni poremećaja primarne hemostaze. Trenutno ne postoji neinvazivni test koji precizno razlikuje trombocitopeniju uzrokovanu prekomjernim razaranjem trombocita ili njihovim utroškom, od trombocitopenije uzrokovane smanjenim stvaranjem trombocita (WEISS, 2000). Normalan broj

trombocita u uzorku krvi pasa i mačaka nalazi se u rasponu od $150 - 450 \times 10^3$ trombocita/ μL . Neuobičajeno nizak ukupan broj trombocita čest je laboratorijski artefakt, zbog čega treba odrediti ukupan broj trombocita u razmazu periferne krvi kako bi se isključila trombocitopenija uslijed sljepljivanja trombocita (BROOKS i CATALFAMO, 2013).

Za utvrđivanje broja trombocita u perifernoj cirkulaciji najčešće se upotrebljavaju dvije metode: brojanje trombocita upotrebom hemocitometra (specijalno izrađene mrežice vidljive mikroskopom podijeljene u precizna polja) i automatizirano određivanje broja trombocita upotrebom automatskih analizatora koji koriste metodu impedancije ili laser (JAIN, 1986; DUNCAN i sur., 1994; JAIN, 1993). Određivanje broja trombocita pomoću hemocitometra ima nisku preciznost u usporedbi s automatiziranim metodama, međutim, neki radovi ukazuju na vrlo nisku reproducibilnost i veliku korelaciju rezultata dobivenih upotrebom hemocitometra i automatiziranog mjerenja (WEISER i KOCIBA, 1984).

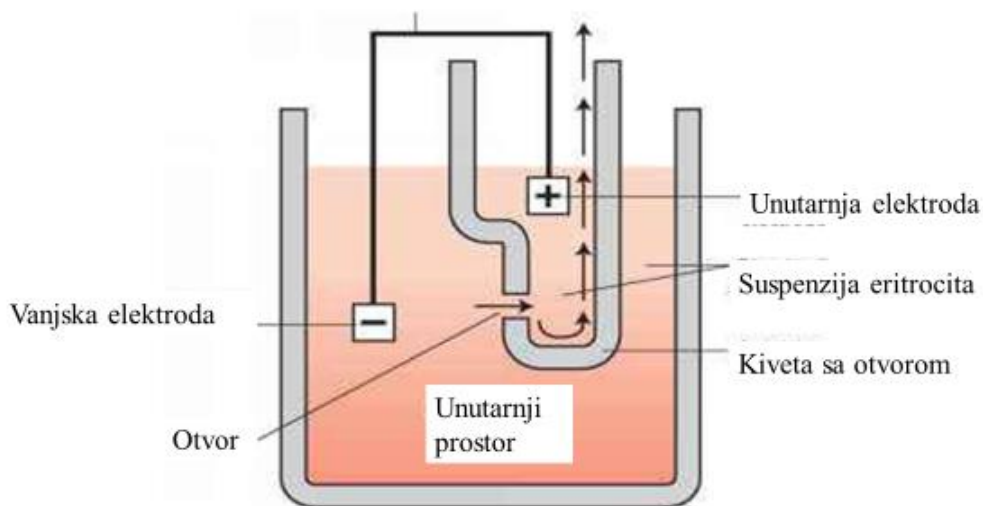
Upotrebom hemocitometra, brojanje trombocita provodi se mikroskopiranjem u 5 označenih polja (P) i množi sa faktorom razrjeđenja, čime se dobiva apsolutni broj trombocita (PALTRINIERI i sur., 2018).



Slika 1: Prikaz hemocitometra i područja za brojenje trombocita (P)

Trombocitopenija može biti i slučajan nalaz u kompletnom hemogramu. Prava trombocitopenija treba se potvrditi prije pristupa drugim dijagnostičkim postupcima te se treba paziti da se koriste ispravni referentni intervali, jer hrtovi, za usporedbu s drugim psima, fiziološki imaju niži ukupan broj trombocita u uzorku periferne krvi. Krvni razmazi izrađuju se nakon dobivanja rezultata zbog potvrde i isključivanja pseudotrombocitopenije. Pseudotrombocitopenija je moguća pojava uslijed sljepljivanja trombocita zbog aktivacije trombocita tijekom ili poslije venepunkcije, zbog antitijela ovisnih o antikoagulansu reaktivnih na glikoprotein IIb/IIIa u prisutnosti etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) i drugih antikoagulansa te hladnih aglutinina (SCHREZENMEIER i sur., 1995). U slučaju takvog sljepljivanja, uzorkovanje treba ponoviti uz korištenje epruvete s citratom. Pseudotrombocitopenija se može javiti i ako su trombociti u uzorku veći od gornje referentne granice za volumen trombocita u automatskom analizatoru, kao što su trombociti pasa pasmine kavalir španijel (SMEDILE i sur., 1997; BROWN i sur., 1994) te se u tom slučaju trombociti prebrojavaju upotrebom mrežice za prebrojavanje stanica.

Automatizirano mjerenje koristi metodu impendancije, u kojoj prolaz korpuskularnih elemenata kroz otvor šalje signal čija je veličina proporcionalna veličini čestice, a broj signala proporcionalan broju čestica. Ovaj način mjerenja često se naziva i Coulterov sistem.

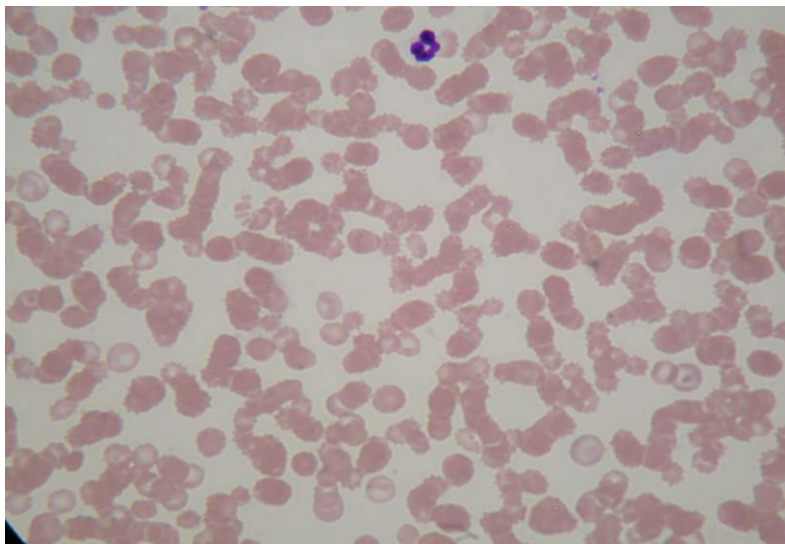


Slika 2: Shematski prikaz načina mjerenja broja stanica metodom impedancije

Najpopularniji instrumenti za utvrđivanje broja trombocita su laser i impedancijski brojač stanica (BOURGES-ABELLA i sur., 2011) no oni ponekad daju netočne rezultate pri mjerenju trombocita u krvi domaćih životinja (SMITH i sur. 2014). Lažna trombocitopenija može se javiti kada instrument ne prepozna trombocite (npr. uslijed makrotrombocitopenije, odnosno pojave aktiviranih trombocita, kada su stanice veće od normalnih) ili uslijed sljepljivanja trombocita. Lažna trombocitoza može se povezati s prisutnošću mikrocytoze ili poikilocytoze, jer se tada mali eritrociti ili fragmenti stanica broje kao trombociti. Nema mnogo podataka o točnosti optičke i impedancijske metode brojanja trombocita u slučajevima trombocitopenije s mikrocytozom, utvrđenom srednjim korpuskularnim volumenom (MCV) eritrocita. Budući da automatizirani brojači u slučajevima mikrocytoze mogu dati netočan ukupan broj trombocita, određivanje pravog ukupnog broja trombocita nužno je kako bi se eliminirale pogreške, osobito u područjima gdje je mikrocytoza učestao nalaz (BOULASSEL i sur., 2015).

Prolazak stanice određenog volumena kroz otvor na unutarnjoj elektrodi uzrokuje električni signal – broj takvih signala jednak je broju stanica, dok jačina signala odgovara volumenu stanica. Spomenutim principom mjeri se prosječni volumen trombocita (MPV). Uz MPV, od dijagnostičkog interesa je i trombokrit (PCT) i širina distribucije trombocita (PDW). Neki automatski analizatori koriste broj i volumen trombocita iz kojih direktno preračunavaju trombokrit, koji predstavlja umnožak spomenute dvije varijable, te predstavlja neki oblik analoga hematokritu kada govorimo o eritrocitnim varijablama. Distribucija trombocita daje uvid u heterogenost u veličini trombocita. Ukoliko su trombociti podjednake veličine, PDW je normalan, a ukoliko je prisutna populacija trombocita koji su međusobno različiti po volumenu, PDW je povišen (SCHWARTZ i sur., 2014).

Trombocitopenija se često javlja u pasa i mačaka, za razliku od ostalih vrsta domaćih životinja, u kojih je nešto rjeđa, stoga je ukupan broj trombocita prvi dijagnostički test u procjeni poremećaja primarne hemostaze (BROOKS i CATALFAMO, 2013). Kao uzroke trombocitopenije u obzir treba uzeti i različite zarazne bolesti. Trombocitopenija se često povezuje s leukopenijom ili neregenerativnom anemijom, ali može se javiti zasebno. Trombocitopenija se može javiti tri do pet dana poslije cijepljenja, a zapažena je u pasa, mačaka i svinja. Trombocitopenije potaknute lijekovima uzrokovane su s nekoliko različitih mehanizama – smanjenim stvaranjem trombocita, povećanom potrošnjom trombocita, sekvestracijom trombocita te pojačanim gubitkom trombocita (JAIN, 1993).



Slika 3. Trombocitopenija u razmazu periferne krvi (Barić Rafaj, osobna zbirka)

3.1.2. Trombocitna antitijela

U identifikaciji trombocitnih antitijela induciranih lijekovima koriste se dva testa: trombocitni faktor 3 (PF3) test i test direktnom megakariocitnom imunofluorescencijom (MDIF). Pri provođenju PF3 testa, uzorkuje se serum pacijenta i inkubira uz dodatak lijeka koji se smatra uzrokom trombocitopenije. Ako serum pacijenta sadrži imunoglobuline koji se vežu za lijek i za homologne trombocite, homologni trombociti otpuštati će povećanu količinu PF3, koji će ubrzati stvaranje ugruška, u usporedbi sa kontrolnim uzorkom (JAIN, 1986). Osjetljivost testa je od 28-80% (LEWIS i MEYERS, 1996). Za izvedbu MDIF testa, određeni broj megakariocita mora biti prisutan u koštanoj srži. Pozitivan test vidljiv je uz dodatak fluorescinom povezanog imunoglobulina specifičnog za vrstu, koji reagira s pacijentovim megakariocitima koji na sebi nose imunoglobulin vezan na lijek (MACKIN, 1995). Varijacije različitih imunoloških testova razvijene su u svrhu detekcije antitijela povezanih s trombocitima. Radioimunotest (RIA) i imunoenzimski (ELISA) test mogu izravno detektirati IgG vezan na trombocite, ili slobodni antitrombocitni IgG u serumu, neizravnom metodom. Izravna metoda mnogo je osjetljivija od

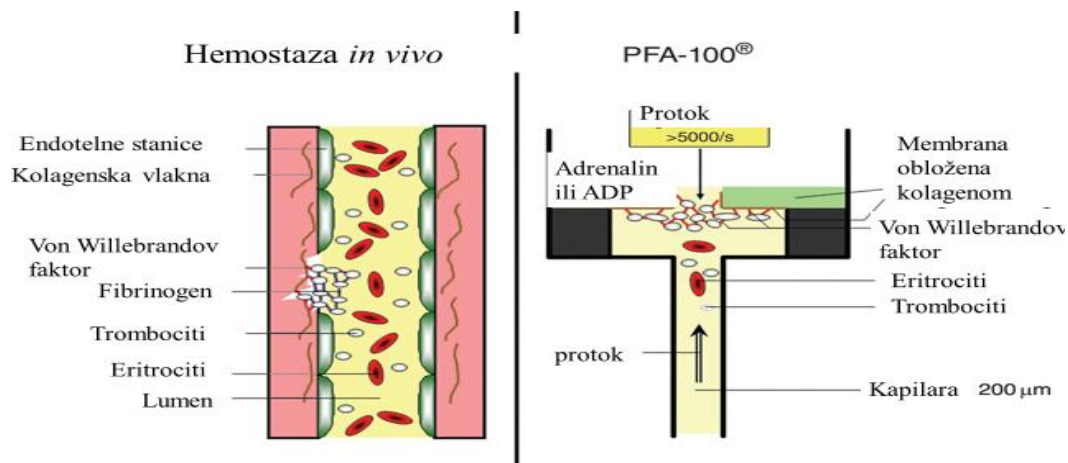
neizravne (LEWIS i MEYERS, 1996). Za detekciju antitijela koja se vežu za trombocite može se koristiti i protočna citometrija. Naravno, prije pristupa tim testovima treba uzeti iscrpnu anamnezu, podatke o vakcinaciji, mjestima kretanja, mogućoj izloženosti erlihiozi, rikeciozi, histoplazmozi ili dirofilariozi, ispitati lokalizaciju krvarenja te pristupiti specifičnim kliničkim pretragama ovisno o organskom sustavu na koje je zahvaćeno krvarenjem. Kao što je već prije spomenuto, treba učiniti direktan razmaz krvi i odrediti broj trombocita, eritrocita i leukocita, učiniti kompletan hemogram, serumski biokemijski profil, analizu urina, koagulacijski profil s testom na razgradne produkte fibrinogena i fibrina (FDP) te aspiraciju koštane srži i biopsiju. Imunološkim testiranjima pristupa se ovisno o dostupnosti testa i hitnosti slučaja. Kod pasa s imunoposredovanom trombocitopenijom, broj trombocita je manji od 50.000/ μL , a često i manje od 10.000/ μL (SCOTT, 1995).

3.1.3. Vrijeme krvarenja bukalne sluznice

Vrijeme krvarenja bukalne sluznice (BMBT) koristi se kao „screening“ test poremećaja primarne hemostaze kod pasa i mačaka. Vrijeme krvarenja bukalne sluznice je in vivo test kojime se mjeri vrijeme prestanka krvarenja iz učinjenog standardnog reza na bukalnoj sluznici. Produženo BMBT (>4 minute) zapaža se kod pacijenata s poremećajima agregacije trombocita i von Willebrandove bolesti, no ponekad i kod pacijenata s anemijom, trombocitopenijom i hiperproteinemijom. Taj test se danas rijetko koristi zbog svoje nespecifičnosti, varijabilnosti i pomanjkanja stvarnih referentnih vrijednosti za kirurška krvarenja (BROOKS i sur., 2013).

3.1.4. Mjerenja funkcija trombocita

Uvid u poremećaje primarne hemostaze moguće je dobiti i mjerenjem trombocitnih funkcija (PFA-100) (JANDREY, 2008), kojima se određuje funkcionalnost trombocita u uzorku pune krvi s dodatkom citrate. Spremnik sistema sadrži membranu obloženu kolagenom i adrenalinom (epinefrinom) - CEPI, ili kolagenom i ADP-om - CADP. Prolaskom krvi protječe kroz mali otvor u membrani, agonisti potiču adheziju trombocita, aktivaciju i agregaciju, dovodeći do začepjenja membrane. Krajnja točka testa označava vrijeme grušanja (u sekundama) i predstavlja prestanak krvarenja (BROOKS i CATALFAMO, 2013).



Slika 4: Shematski prikaz rada automatskog analizatora funkcije trombocita

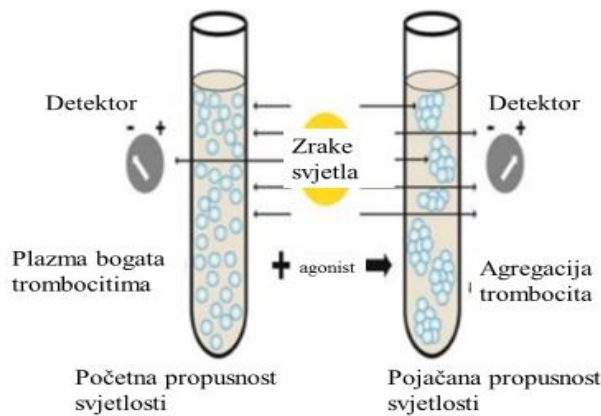
Iako precizniji od BMBT testa, PFA-100 test podložan je preanalitičkim artefaktima, uzrokovanim neprimjerenim antikoagulansom, aktivacijom trombocita tijekom uzorkovanja krvi ili tijekom transporta, te odgodom očitavanja rezultata testa (>4 sata). Također, različiti odgovor trombocita pojedinih vrsta životinja na adrenalin ograničava upotrebu CEPI spremnika u testiranju. Greška u začepljivanju CEPI membrane, što se očituje kao vrijeme grušanja (CT) veće od 300 sekundi, zabilježena je u zdravih pasa i konja s normalnom funkcijom trombocita (CALLAN i GIGER, 2001). Referentni interval CADP CT testa za pse je od 60 - 120 sekundi (CALLAN i GIGER, 2001), a u mačaka od 60 - 180 sekundi (JANDREY i sur., 2008). Produženo vrijeme grušanja CADP testa odgovara dijagnozi von Willebrandove bolesti ili poremećaja agregacije trombocita. Značajno skraćanje CADP CT utvrđeno je kod pasa koji boluju od tipa I von Willebrandove bolesti i liječeni su dezmopresinom (CALLAN i sur., 2005). U humanoj medicini, osjetljivost testa za teški oblik von Willebrandove bolesti je 98%, a za podtipove von Willebrandove bolesti od 85 - 90% (HARRISON, 2005). Analiza funkcije trombocita nije me šruža uvid u poremećaje prokoagulantne aktivnosti trombocita (BROOKS i CATALFAMO, 2013).

Korištenjem analizatora funkcije trombocita (PFA-100) kod pasa u endotoksičnom šoku, opisano je postupno skraćivanje vremena potrebnog za zgrušavanje, unatoč trombocitopeniji (YILMAZ i sur., 2006), dok je kod pasa oboljelih od sepse i sindroma sistemskog upalnog odgovora u prirodnim okolnostima dokazana veća učestalost pojave trombocitno-neutrofilnih agregata (DIRCKS i sur., 2012).

3.1.5. Mjerenja transmisije svjetlosti

Mjerenje propusnosti svjetlosne zrake u ovisnosti o agregaciji stanica u uzorku ("light transmission aggregometry" ili LTA) tradicionalno je zlatni standard za testiranje funkcije trombocita i ostaje pouzdana metoda za dijagnostiku bolesti nasljednog ili stečenog poremećaja

funkcije trombocita i praćenje terapije antitrombocitnim lijekovima (HARRISON, 2005). Cilj testa je odrediti količinu svjetlosti koja prolazi kroz suspenziju trombocita u plazmi ili puferu. Promjene u svjetlosnom signalu elektronički registrira agregometar te se dinamički prikazuju tijekom vremena nakon dodatka trombocitnih agonista. Trombociti na dodatak trombocitnih agonista odgovaraju promjenom oblika, od diskoidnog u nazubljene sfere, što uzrokuje prolazno smanjenje transmisije svjetlosti, nakon čega se transmisija svjetlosti progresivno povećava. Progresivno povećanje transmisije svjetlosti prati stvaranje trombocitnog agregata. Kako trombocitni agregat raste, više svjetlosti prolazi, sve do platoa, koji označava maksimalnu i ireverzibilnu agregaciju trombocita. Reakciju suprotnu ireverzibilnoj agregaciji trombocita nazivamo reverzibilnom agregacijom, u kojoj se trombocitni agregati raspadaju, a transmisija svjetlosti nakon prvotnog rasta pada na početnu razinu. Niska doza ili slaba aktivnost trombocitnih agonista, mogu potaknuti bifazičnu agregaciju, koja će se pojaviti kao rani plato (primarna agregacija) koju prati povećanje transmisije svjetlosti do platoa, predstavljajući sekundarni val ireverzibilnog oblikovanja agregata. Reakcijske mješavine korištene u testu moraju biti miješane stalnom brzinom, kako bi se osiguralo da se trombociti nalaze u ujednačenoj suspenziji i kako bi se olakšao kontakt među trombocitima, radi stvaranja agregata koji je ključan u testu. Koristi se brzina miješanja od 1000 okretaja u minuti (700-1200). Povećanje broja okretaja povećava rizik od oštećivanja trombocita i poticanja spontanog izlučivanja i agregacije (BROOKS i CATALFAMO, 2013).



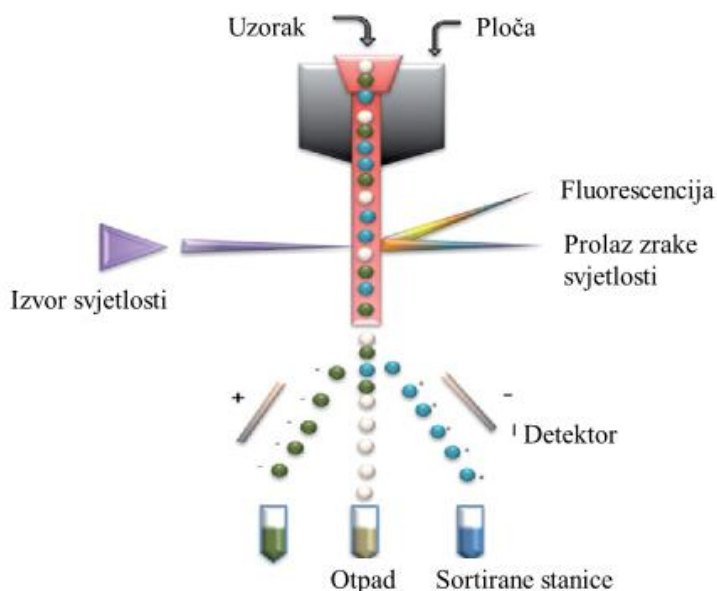
Slika 5: Princip rada agregometra

Rutinski LTA test neosjetljiv je na poremećaje sekrecije trombocita, stoga se LTA testu pridodao lumi - agregometar koji može detektirati spontanu emisiju svjetlosti koja nastaje od otpuštanja adenozin trifosfata (ATP-a) u mediju agregacijske reakcije. ATP koji se otpušta iz agregirajućih trombocita kvantificira se kroz reagiranje s kemiluminiscentnim reagensom. Test se koristi isključivo u specijaliziranim veterinarskim laboratorijima, zbog nužne prilagodbe agonista i kemiluminiscentnih reagensa za pojedinu vrstu životinja (CALLAN i sur., 1998).

Slično rezultatima istraživanja u humanoj medicini, agregometrijska mjerenja uz upotrebu kolagena kao agonista bila su u značajnoj korelaciji s mjerenjima na psima sa sepsom, gdje su autori dokazali su da je trombocitna agregometrija inducirana kolagenom osjetljivija i specifičnija metoda od mjerenja prekursora kalcitonina i C-reaktivnog proteina za donošenje prognoze kod ljudi oboljelih od teške sepse (ADAMZIK i sur., 2012).

3.1.6. Protočna citometrija

Protočna citometrija je laboratorijska metoda putem koje se može ispitati aktiviranost trombocita na jednoj stanici (AULT, 2001). Citometrijski testovi mogu detektirati aktiviranost trombocita prema promjenama u raspršenosti svjetlosti, odnosno fluorescencije. Trombociti se mogu ispitivati u suspenziji trombocita, plazmi bogatoj trombocitima ili diluiranoj punoj krvi. Testovi se mogu prilagoditi za ispitivanje membranskih receptora, bazalnog aktivacijskog statusa ili aktivnog odgovora na različite agoniste (AULT, 2001). Podaci koje možemo dobiti pomoću protočne citometrije uključuju gustoću glikoproteina i liganda na vanjskoj membranskoj površini, ekspresiju proteinskih granula i neoantigena induciranih aktivacijom receptora, promjene u izmjeni iona, status proteinske fosforilacije, permeabilnost citoplazmatske membrane trombocita i mitohondrijskih membrana, sastav lipida vanjske membrane i otpuštanja piridoksamin monofosfata. Najčešće korišteni parametar trombocitne aktivacije u ljudi i životinja je selektin, protein P α -granula na vanjskoj membrani trombocita. Označavanje aneksinom V, koji veže fosfatidilserin, često se koristi za detektiranje prokoagulantne aktivnosti trombocita odnosno poremećaje aktivnosti trombocita (BROOKS i CATALFAMO, 2013).



Slika 6: Shematski prikaz rada protočnog citometra (Adan i sur, 2015)

3.1.7. Određivanje koncentracije, aktivnosti i strukture von Willebrandovog faktora (vWF)

Najčešći nasljedni poremećaj zgrušavanja u pasa i ljudi je von Willebrandova bolest (FAVALORO, 2011). Bolest se može javiti u obliku tri tipa i nekoliko subtipova. Najčešći oblik bolesti je tip I. Tip I je djelomični kvantitativni manjak von Willebrandovog faktora (vWF), snižena koncentracija proteina i izostanak funkcije. Opaža se kod dobermana i drugih pasmina pasa. Tip 2 bolesti karakteriziran je strukturalnim i funkcionalnim (kvalitativnim) defektom, a često je kombiniran s manjkom proteina. U pasa postoji samo subtip 2A, koji se viđa i kod ljudi, a predstavlja specifično manjak vWF multimera visoke molekularne mase. Opaža se kod njemačkih kratkodlakih i oštrodlakih ptičara. Subtip 2B opisan je kao povećani afinitet vezanja von Willebrandovog faktora na glikoprotein Ib (receptor) na membrani trombocita, dok je subtip 2N opisan kao poremećaj vezanja vWF na faktor VIII. Tip 3 bolesti je najteži oblik, a karakteriziran je apsolutnim nedostatkom vWF u plazmi (<1%) (BROOKS i CATALFAMO, 2013), a opaža se kod šetlandskih ovčarskih pasa (RAYMOND, 1990), Chesapeake Bay retrievera (JOHNSON, 1980) te škotskih terijera (VENTA i sur., 2000). Dijagnostika bolesti temelji se na kvantitativnoj i funkcionalnoj analizi vWF (BROOKS i CATALFAMO, 2013).

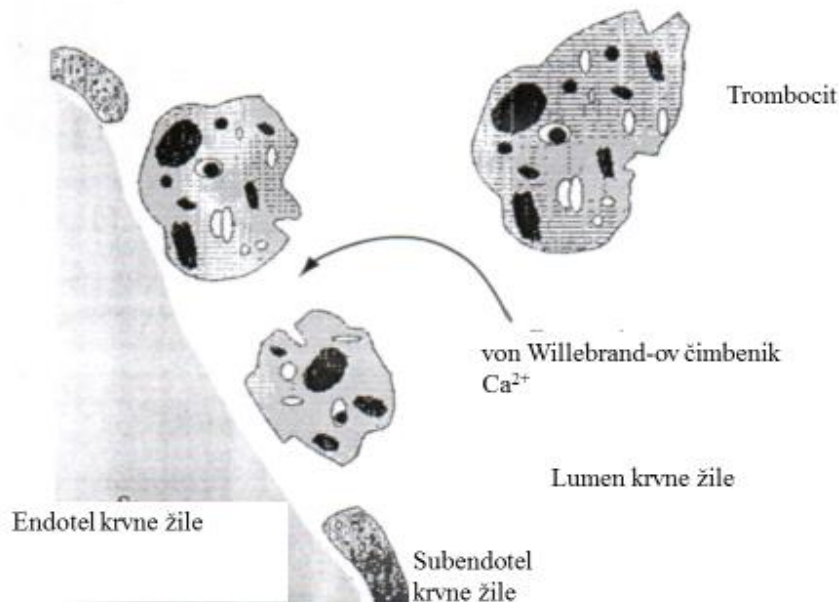
Trombociti pasa sadrže veoma mali postotak vWF (3%, PARKER i sur., 1991) u usporedbi s trombocitima mačaka (WATERS i sur., 1989) ili ljudi (20%).

Postoje kvantitativni, funkcionalni i strukturalni vWF test. Prvi korak u dijagnosticiranju von Willebrandove bolesti je mjerenje koncentracije vWF proteina, odnosno vWF antigena (vWF:Ag). Životinjske vrste razlikuju se u antigenskoj strukturi vWF, što kod laboratorijskog ispitivanja zahtjeva korištenje vrsno specifičnih ili križno-reaktivnih antitijela u ELISA ili imunotestu s lateksom. Rezultati takvog kvantitativnog testa uspoređuju se s referentnim vrijednostima za vrstu (100% ili 100 U/mL vWF:Ag). Općenito, vrijednosti manje od 50% (< 50 U/mL) ukazuju na deficijenciju von Willebrandovog faktora.

Tablica 1: Interpretacija aktivnosti vWF (preuzeto sa Cornell University)

vWf:Ag	Interpretacija
70 to 180%	Normalno
50 to 69%	Granična vrijednost
0 to 49%	vWD
<35%	vWD i rizik krvarenja

Funkcionalnim vWF testom mjeri se sposobnost interakcije vWF s trombocitima, kolagenom ili faktorom VIII. Ristocetin - kofaktor test (vWF:RCo) oslanja se na sposobnost antibiotika ristocetina ili botrocetina – reagensa dobivenog iz zmijskog otrova (READ i sur., 1983), da potakne konformacijske promjene u vWF (koje će povećati sposobnost vezanja vWF na glikoprotein Ib na membrani trombocita (SIXMA i sur., 1991). Iskoristivost vWF:RCo testa na plazmi pasa i mačaka je otežana zbog tendencije ristocetina da uzrokuje stvaranje proteinskih precipitata koji onemogućuju provođenje testa u cjelosti. Funkcionalni testovi kojima se mjeri sposobnost vezanja vWF na kolagen (vWF:CB) u uporabi su za plazmu ljudi (FAVALORO, 2000) i pasa (SABINO i sur., 2006). Pročišćeni goveđi kolagen vezan je na površinu polistirenske mikrotitarske pločice, na što se dodaje plazma životinje, te vWF iz plazme treba vezati na kolagen. Pločica se ispire, kako bi se odstranio nevezani vWF, a vezani vWF detektira se specifičnim monoklonskim antitijelima za vWF, slično kao vWF:Ag. Usporedno se mogu napraviti vWF:Ag i vWF:CB testovi kako bi se razlikovali tip 1 i tip 2A von Willebrandove bolesti. Kod tipa 1, vezivanje vWF za specifično antitijelo kvantitativno je jednako vezivanju vWF za kolagen, a kod tipa 2A omjer vWF:Ag testa i vWF:CB testa veći je od 2. Test kojim se mjeri sposobnost vezanja vWF na kolagen smatra se indikatorom multimerske strukture vWF, jer stupanj vezanja vWF za kolagen ovisi o količini vWF visoke molekulske mase (FAVALORO, 2011).



Slika 7: Adhezija trombocita na endotel i uloga vWF

Strukturalnim vWF testom određuje se proteinska struktura vWF, koja je važna za razumijevanje proteinske aktivnosti i stabilnosti vWF. Njemu se obično pristupa nakon što su učinjeni kvantitativni i funkcionalni vWF test, kako bi se rezultati bolje rastumačili (LEDFO-

KRAEMER, 2010). Za određivanje multimerske strukture vWF, test uzorci podliježu elektroforezi u natrij dodecil sulfat - agarozu gelu, kako bi se postiglo razdvajanje vWF po molekularnoj masi (Western blot). Odvojene grupe proteina tada se premještaju pomoću električne struje na nitrocelulozne ili polivinilidne difluoridne membrane i vizualiziraju se koristeći anti-vWF detektorska antitijela. Multimeri vWF obično su veliki od 500 kDa (dimeri) do više od 20 milijuna kDa. Analizama multimera također se mogu razlikovati kvalitativne promjene u vWF, koje mogu biti dokaz abnormalne funkcije proteina i veće podležnosti proteolizi (FAVALORO, 2011; LEDFORD-KRAEMER, 2010).

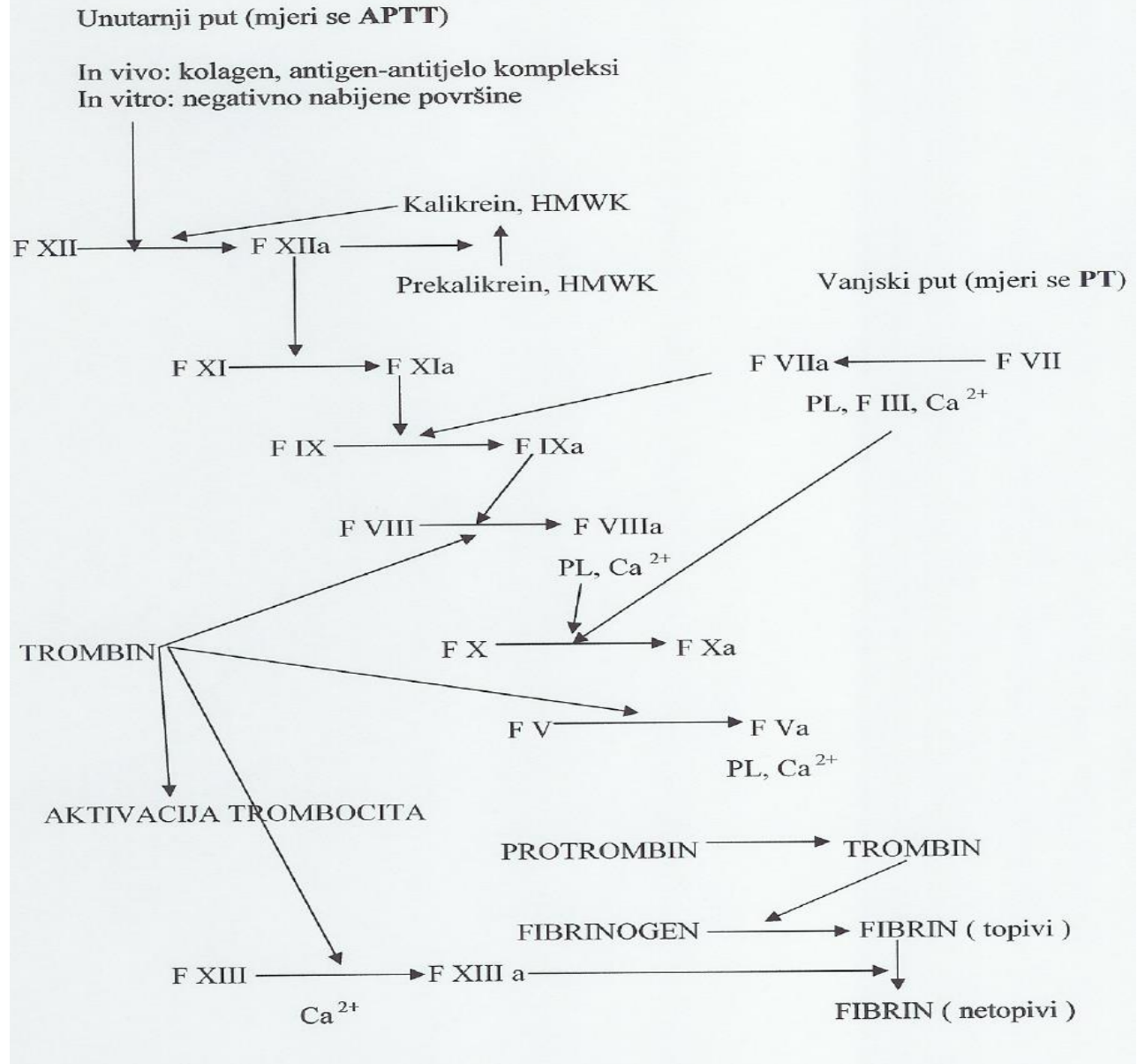
Slučaj naslijeđenog oblika von Willebrandove bolesti opisan je kod labrador retrievera, kod kojeg su izmjerene 5% manje vrijednosti vWF od normalnih, kao moguća posljedica leimiosarkoma (BARIĆ RAFAJ i sur., 2009). Istražujući uzroke trombocitopenije u babeziozi pasa, BARIĆ RAFAJ i sur. utvrdili su poremećaj u multimernoj strukturi vWF i nedostatak prisutnosti visokomolekularnih formi BARIĆ RAFAJ i sur., 2013).

3.2. Laboratorijska dijagnostika poremećaja sekundarne hemostaze

Testovi koji se koriste za dijagnosticiranje poremećaja sekundarne hemostaze većinom su funkcionalni testovi, mjere enzimatsku, koenzimsku ili inhibitornu aktivnost različitih hemostatskih proteina u uzorcima negrušane pune krvi s dodatkom citrata ili plazme. Kinetika stvaranja fibrina i aktivnost između koagulacijskih faktora i inhibitora razlikuju se među životinjskim vrstama. Koagulacijski testovi prilagođeni su na način da različiti reagensi mogu otpočeti koagulacijsku kaskadu unutarnjim ili vanjskim putem (TRIPLETT i sur., 2000). Testovi se tradicionalno izvode s krvnom plazmom, ali je u veterinarskoj medicini dostupan i test koji se može raditi sa punom krvlju (BROOKS i CATALFAMO, 2013).

Koagulacijski testovi koji su danas jednostavni i široko dostupni su protrombinsko (PT) i aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTT). Njima se procjenjuje stanje koagulacijskog sustava u plazmi pacijenta, s iznimkom procjene stvaranja umreženog fibrina ovisnom o faktoru XIII. Protrombinskim i aktiviranim parcijalnim tromboplastinskim vremenom detektiraju se zajednički faktori vanjskog i unutarnjeg puta zgrušavanja, kao i faktori specifični za pojedini put zgrušavanja. Kad su PT i aPTT produljeni, treba učiniti TT test (MISCHKE, 2014).

PLAZMATSKA KOAGULACIJA



Slika 8. Shematski prikaz sekundarne hemostaze
(F I-F XII – faktori foagulacije krvi, Ca²⁺ - ioni kalcija)

3.2.1. Protrombinsko vrijeme

Mjerenje protrombinskog vremena (u sekundama) u plazmi pasa i mačaka uobičajeno se izvodi korištenjem reagenasa koji se koriste u humanoj dijagnostici, zbog čega test zahtjeva prilagodbu ili rezultate tako izvedenih testova mora se tumačiti s obzirom na razlike između vrsta životinja. Protrombinsko vrijeme (PT) predstavlja aktivaciju koagulacije preko vanjskog puta zgrušavanja i mjeri koagulacijske faktore vanjskog i zajedničkog puta zgrušavanja (MISCHKE, 2014). Test otpočinje dodavanjem reagensa koji sadrži tkivni faktor i kalcija na testni uzorak pacijentove plazme (BROOKS i CATALFAMO, 2013) Zgrušavanje započinje dodatkom kalcija i tkivnog tromboplastina, koji zamjenjuje negativno nabijenu površinu fosfolipidnog sloja na stanicama trombocita in vivo. Protrombinsko vrijeme je značajno niže za plazmu pasa i mačaka, nego za ljudsku plazmu, zbog čega je test neosjetljiv na smanjenu aktivnost faktora zgrušavanja. Protrombinsko vrijeme u veterinarskim laboratorijima određuje se na uzorku plazme od 100 μ L, razrijeđenom u omjeru 1:20, i 100 μ L otopine fibrinogena (čime se osigurava stvaranje poželjnog fibrinskog ugruška) koji se inkubira tijekom 2 minute te se na njega doda 100 μ L Ca-tromboplastin reagensa (MISCHKE i sur., 1996; MISCHKE i NOLTE, 1997). Produljenje protrombinskog vremena predstavlja tešku deficijenciju faktora zgrušavanja, zbog toga što faktori moraju pasti za 30% normalne vrijednosti da bi se zabilježilo produljenje PT. Ako je pacijent deficijentan u bilo kojem činitelju vanjskog (faktor VII) puta ili zajedničkog puta (F I - fibrinogen, F II - protrombin, F V i F X), dolazi do produženog vremena zgrušavanja (BROOKS i CATALFAMO, 2013). Protrombinsko vrijeme često je produljeno kod stečene deficijencije vitamina K, bolesti jetre, specifičnih deficijencija pojedinih faktora te DIK-a. Deficijencija faktora VII uzrokuje produljenje PT, bez promjene aPTT i TT. Zbog kratkog poluživota faktora VII, PT je produljen u ranim fazama stečene deficijencije vitamina K (MISCHKE, 2014).

3.2.2. Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

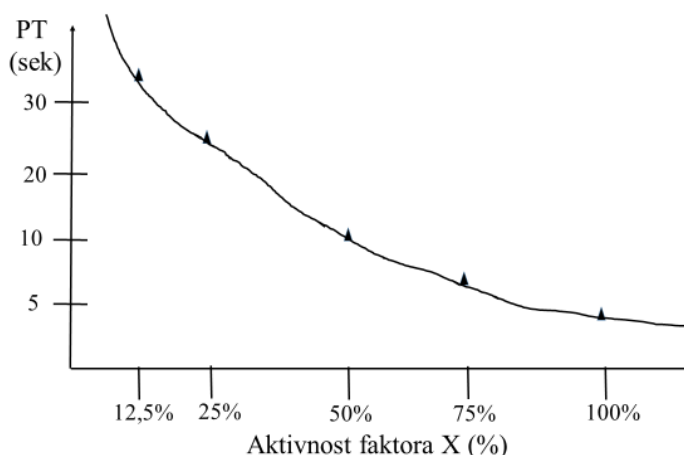
Aktiviranim parcijalnim tromboplastinskim vremenom procjenjuju se unutarnji (faktori VIII, IX, XI, XII, prekalikrein i kininogen visoke molekularne mase) i zajednički put zgrušavanja (fibrinogen, protrombin, faktori V i X), no faktori VII i XIII nisu uključeni u test. Test je osjetljiviji od aktiviranog vremena zgrušavanja (ACT) te na njega ne utječu primarni hemostatski poremećaji. Automatizirani testovi koagulacije omogućuju i testiranje aPTT u uzorku krvi u epruveti s natrijevim citratom. Testiranje aPTT započinje aktivator kontaktnog sustava u kojem fosfolipidi potiču aktivaciju faktora XII i XI preko kalikreina i kininogena visoke molekularne mase (HMWK). Nakon toga se u uzorak ponovno dodaje kalcij da se potakne stvaranje fibrinskog ugruška (DUDEK i sur., 2011).

3.2.3. Aktivirano vrijeme zgrušavanja

Aktivirano vrijeme zgrušavanja (ACT) je jednostavan test za dijagnostiku poremećaja unutaršnjeg i zajedničkog puta zgrušavanja (SEE i sur., 2009.), no nije sasvim pouzdan jer na produljenje ACT-a utječu trombocitopenija, disfunkcija trombocita, hematokrit ili aktivnost plazmatske proteaze (BROOKS i CATALFAMO, 2013).

3.2.4. Mjerenja aktivnosti faktora zgrušavanja

Mjerenja aktivnosti faktora zgrušavanja modificirani su aPTT i PT, koji su modificirani plazmom s nedostatkom pojedinog faktora (TRIPLETT i sur., 2000). Njima se mjeri specifična prokoagulantna aktivnost individualnih faktora i kofaktora zgrušavanja. Test se zasniva na upotrebi komercijalne plazme kojoj nedostaje određeni faktor zgrušavanja. Takvoj plazmi se u procesu mjerenja dodaje pacijentova plazma. Ukoliko pacijentova plazma sadrži normalne koncentracije funkcionalnog faktora koji se mjeri, korigirat će se nedostatak u testnoj plazmi i vrijeme zgrušavanja biti će u okvirima referentnih vrijednosti za određenu vrstu životinje. Ukoliko pacijentu nedostaje faktor koji se mjeri, do korekcije neće doći jer je deficit mjenog faktora zgrušavanja prisutan i u testnoj i u pacijentovoj plazmi, što će rezultirati produljenim vremenom koagulacije. Kalibracijska krivulja izrađuje se serijskim razrjeđivanjima plazme zdravih životinja, a % aktivnosti faktora i odgovarajuće vrijeme zgrušavanja koriste se za izradu standardne krivulje. Prilikom analize aktivnosti faktora kod različitih pacijenata, mjeri se PT i određuje točni % aktivnosti faktora u uzorku.



Slika 9: Prikaz karakteristične kalibracijske krivulje u koagulometrijskom mjerenju

Aktivnost faktora u uzorku treba se usporediti sa standardom za istu vrstu jer vrijeme zgrušavanja varira među vrstama, a usporedba s humanim standardima obično vodi do pretjerano visokih aktivnosti faktora u plazmama životinja. Vrijednosti se bilježe u postocima, U/mL ili

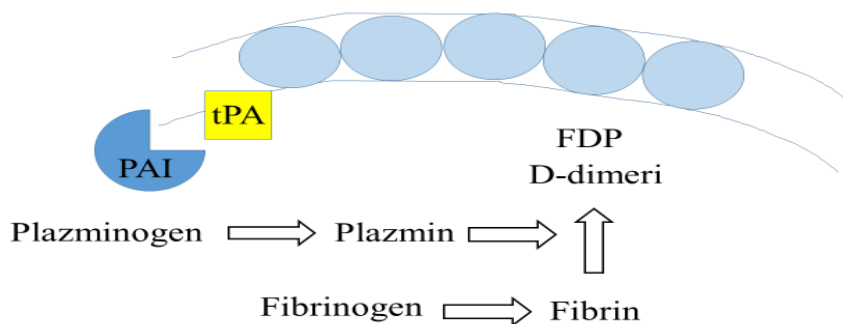
U/dL. Aktivnost faktora veća od 50% znači da nema poremećaja stvaranja fibrina in vivo. Klinička važnost vrijednosti manjih od 50% ovisi o razmjeru bolesti (krvarenja) te koliko faktora zgrušavanja nedostaje (TRIPLETT, 2000). Postoje i kolorimetrijski testovi kojima se može mjeriti prokoagulantna aktivnost nekih faktora, no oni nemaju značenje u veterinarskoj medicini (COLAZZO i sur., 2013). Različiti stupnjevi deficita pojedinih faktora koagulacije ustanovljeni su u babeziozi pasa (BARIĆ RAFAJ i sur., 2013), dok su u slučajevima pretilosti aktivnosti bile povećane te ukazivale na prokoagulantni status životinja (BARIĆ RAFAJ i sur., 2017).

3.2.5. Mjerenja faktora koagulacije u nedostatku vitamina K

Test za proteine inducirane nedostatkom vitamina K (PIVKA test) zapravo je PT test koji koristi razrijeđen uzorak plazme i oslanja se na specifičan tromboplastin s „izmjenjenom“ specifičnošću (OWREN, 1959). Test za PIVKA originalno je osmišljen za praćenje terapije kumadinom kod ljudi, ali se nakon toga zamijenio PT testom zbog dostupnosti i standardizacije PT reagenasa (BOWIE i OWEN, 1991). ROZANSKI i sur. u svojem su istraživanju usporedili aPTT, PT i PIVKA test na uzorku plazme pasa s kliničkim znakovima krvarenja i dokazanim otrovanjem rodenticidom, drugih stečenih koagulopatija i nasljednih koagulopatija. PIVKA test proveli su na 30 μ L plazme na koju je dodano 250 μ L komercijalno dostupnog tromboplastina i otopljeno u 3.2 mmol/L kalcijevog klorida. Izmjereno je vrijeme stvaranja fibrinskog ugruška automatiziranim analizatorom. Svi psi sa stečenim koagulopatijama imali su produljeno PT, aPTT i vrijeme PIVKA testa u usporedbi s kontrolama. Rezultati PT i PIVKA testa bili su u značajnoj korelaciji, dok aPTT nije pokazao korelaciju s PT i PIVKA testom. Produljenje koagulacijskih vremena bilo je značajno više u pasa s otrovanjem rodenticidima, nego u pasa s ostalih koagulopatijama, iako vrlo slično u aPTT rezultatima. Svi psi otrovani rodenticidima imali su rezultat PIVKA testa 3 puta viši (≥ 63 s) od normalnog (isto kao kod PT testa, ≥ 21 s) dok je takav rezultat u pasa s ostalim koagulopatijama razmjerno rijedak. Normalne vrijednosti PT i PIVKA zapažene su kod pasa s hemofilijom A i B, deficijencijom faktora IX ili prekalikreina, dok je aPTT bilo produljeno, iz čega se da zaključiti da bilo koja koagulopatija koja zahvaća vanjski (ekstrinzični) put zgrušavanja uzrokuje produljenje PT i vrijeme PIVKA testa (ROZANSKI i sur., 1999). Test za PIVKA pokazao se najosjetljivijim testom za otrovanja rodenticidima (MOUNT, 1986).

3.3. Mjerenja intenziteta fibrinolize

Testovi koji se koriste u mjerenjima fibrinolitičke aktivnosti bazirani su na činjenici da fibrinoliza otpočinje tako što tkivni aktivator plazminogena (tPA) potiče stvaranje plazmina, koji uzrokuje razgradnju fibrina do produkata razgradnje fibrina (FDP). Inhibitor aktivatora plazminogena (PAI) je vrlo bitan činitelj u fibrinolizi, te antiplazmin (inhibitor proteaze) dalje preuzima ulogu tako što će neutralizirati slobodno cirkulirajući plazmin. Proenzim plazminogen (i njegovi aktivatori i inhibitori) može se kvantitativno i funkcionalno mjeriti (BROOKS i CATALFAMO, 2013).



Slika 10: Nastajanje i uloga plazmina u fibrinolizi (PAI- inhibitor aktivatora plazminogena, tPA – tkivni aktivator plazminogena, FDP – fragmenti razgradnje fibrin)

U dijagnostici poremećaja fibrinolitičke faze hemostaze koristi se test aktivnosti fibrinogena, trombinsko vrijeme, test za produkte nastale degradacijom fibrina te test za D-dimere.

3.3.1. Razgradni produkti fibrina – FDP

Razgradni produkti fibrina (FDP) nastaju djelovanjem plazmina koji cijepa fibrinogen, topljive monomere fibrina i netopljivi umreženi fibrin. Razgradni produkti fibrina ukazuju na aktivaciju plazmina i nisu specifični za razgradnju umreženog fibrina (STOKOL i sur., 1999). Visoki FDP najčešće se veže uz diseminiranu intravaskularnu koagulaciju, osobito ako je popraćen visokim PT, aPTT i padom broja trombocita, aktivnosti antitrombina i koncentracije fibrinogena (STOKOL i sur., 1999). Porast FDP zabilježen je kod pacijenata s krvarenjem na mozgu, otrovanjem varfarinom, bolestima jetre, trombozom, imunoposredovanom hemolitičkom anemijom, neoplazijama, pankreatitisom, dilatacijom – volvulusom želuca, srčanim udarom, teškim unutarnjim krvarenjem, teškom traumom, sepsom, gubitakom proteina zbog nefropatije, hiperadrenokorticisma i kroničnim zatajenjem srca (BOISVERT i sur., 2001). Serumski FDP testovi koriste poliklonska antitijela koja križno reagiraju sa cjelovitim fibrinogenom. Test je lako napraviti i tumačiti, no smatra se skupim i zahtjeva posebne epruvete te inkubaciju uzorka prije

izvedbe (STOKOL i sur., 1999). Plazmatski FDP testovi mogu se koristiti kako bi se zaobišli nedostaci serumskog testa jer koriste monoklonska antitijela koja ne reagiraju križno sa cjelovitim fibrinogenom. Plazmatski testovi su relativno jeftini, zahtjevaju jedan uzorak sa citratom i imaju veću osjetljivost od serumskih testova (BOISVERT i sur., 2001). Lažno pozitivne reakcije zapažene su u zdravih pasa i test je nešto teži za izvođenje (STOKOL, 1999).

3.3.2. D – dimeri

Najčešće korišteni testovi za analizu fibrinolize mjere FDP i terminalne fragmente, D-dimere. Testovi za određivanje koncentracije D-dimera koriste imunološke metode i monoklonska antitijela za epitop D-dimera. Ta antitijela specifična su za umrežene oligomere i ne reagiraju križno s fragmentima nastalima nakon razgradnje fibrinogena ili topljivog neumreženog fibrina (STOKOL, 2003). Izvode se na plazmi uz dodatak citrata, a dostupne metode uključuju aglutinacijske testove (kuglice lateksa, turbidimetrijski ili crvenih krvnih stanica) ili ELISA (STOKOL, 2003). Testovi su prilagođeni biokemijskim automatskom analizatorima.

Prisutstvo fragmenata D-dimera predstavlja djelovanje plazmina na zreli fibrin, a ne na fibrinogen. Nalaz visoke koncentracije FDP-a i D-dimera upućuje na pretjeranu fibrinolizu ili drugi oblik poremećaja fibrinolize te je važan dijagnostički pokazatelj kod diseminirane intravaskularne koagulacije. Kvantitativno određivanje koncentracije D-dimera važno je u dijagnostici plućne tromboembolije kod životinja i ljudi. D-dimeri su umreženi produkti razgradnje netopljivog umreženog fibrina djelovanjem plazmina. D-dimeri imaju poluživot otprilike 5 sati i njima se opisuje trenutnu ili nedavnu fibrinolizu (STOKOL, 2003). D-dimeri mogu biti povišeni tijekom bilo koje bolesti koja uzrokuje nastajanje i razgradnju fibrina, a najčešće s DIK i tromboemboličkim stanjima, no ne smatraju se specifičnima za te bolesti (GRIFFIN i sur., 2003). Kod pasa, D-dimeri su povišeni poslije kirurških zahvata te uslijed imunoposredovane hemolitičke anemije, bolesti jetre i bubrega, zatajenja srca, neoplazija ili unutarnjeg krvarenja (NELSON i ANDREASEN, 2003). D-dimeri su zbog toga pomoćni test koji se kombinira s drugim testovima i dijagnostičkim postupcima (HERRING, 2012).

	VK	TR	vWF	PT	aPTT	D-dim
trombocitopenija	↑	↓	→	→	→	→
trombocitopatija	↑	→	→	→	→	→
vWD	↑	→	↓	→	→	→
trovanje	→	→	→	↑	→↑	→
hemofilija	→	→	→	→	↑	→
DIK	↑	↓	→	↑	↑	↑

Slika 11: Prikazi rezultata osnovnih laboratorijskih testova u dijagnostici poremećaja primarne, sekundarne i tercijarne hemostaze (VK - vrijeme krvarenja, TR – broj trombocita, vWF – von Willebrandov faktor, PT- protrombinsko vrijeme, aPTT – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, D-dim – D- dimeri)

3.4. Inhibitori koagulacije

3.4.1. Određivanje antitrombina i proteina C

Testovi kojima se mjere inhibitori koagulacije su funkcionalni kromogeni testovi za antitrombin (AT III), protein C (PC) (antikoagulacijski proteini koji moduliraju nastajanje i djelovanje trombina) i heparin. U provedbi mjerenja koriste se vrsno specifični standardi i u veterinarskoj medicini u upotrebi su kod pacijenata s rizikom od tromboze, ili kao biomarkeri funkcije jetre. Stečena deficijencija AT III povezuje se s diseminiranom intravaskularnom koagulacijom i bolestima koje uzrokuju gubitak proteina. Deficijencija PC ukazuje na lošu prognozu u pasa sa septičnim peritonitisom i zatajenjem jetre i dobar je pokazatelj kod praćenja terapije portalne hipertenzije.

3.4.2. Kompleksi trombina i antitrombina

Trombin-antitrombin (TAT) kompleks je molekularni kompleks koji se sastoji od trombina i antitrombina (primarnog inhibitora trombina) u omjeru 1:1 (ASAKURA, 2013) i nastaje kao biološki odgovor pri pojavi diseminirane intravaskularne koagulacije (DIK). Povišena

koncentracija TAT kompleksa ukazuje na prekomjerno stvaranje trombina i služi kao marker za koji pokazuje protrombotički status.

Prijašnji podaci o mjerenjima TAT kompleksa kod pasa bazirani su primjeni ELISA metode, u kojoj su se koristila antitijela na humani trombin (MCMICHAEL i sur., 2015; TSUCHIYA i sur., 2009). Za određivanje koncentracije TAT kompleksa koriste se ELISA testovi, a danas su dostupni testovi i sa specifičnim antitijelima za pojedine vrste životinja. Međutim, takve ELISA metode podrazumijevaju analizu većeg broja uzoraka istovremeno, što ih čini nepraktičnima za rutinsku upotrebu (RIMPO i sur., 2018).

U veterinarskoj medicini malo je literature koja se bavi mjerenjima TAT kompleksa. Jedno istraživanje dokazalo je korisnost TAT testa kod procjene protrombotičkih stanja u pasa (RAVANAT i sur., 1995), dok je drugo uključivalo TAT kompleks kao marker protromboze kod pasa s Cushingovim sindromom i dokazalo povišenu razinu TAT kompleksa u pasa oboljelih od malignih tumora (MARUYAMA i sur., 2005). Povećane koncentracije TAT kompleksa u krvi pasa s babezozom utvrđene su prije terapije, a one ukazuju na moguću prisutnost subkliničkog DIK-a u babeziozi (BARIĆ RAFAJ i sur., 2009).

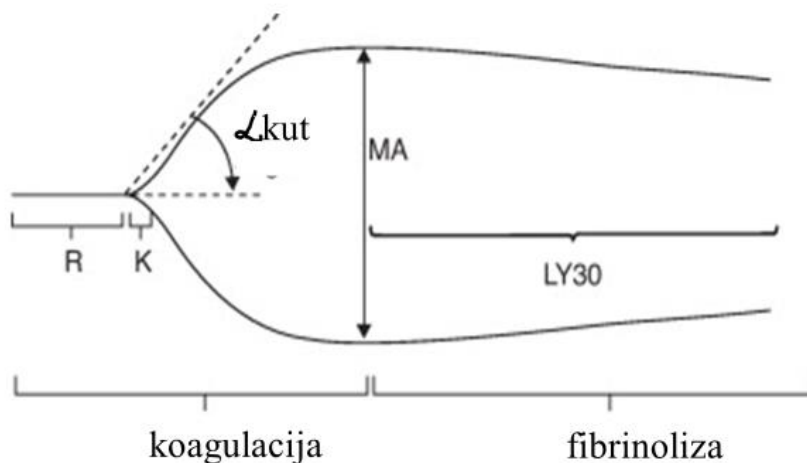
3.5. Globalni hemostatski testovi

3.5.1. Trombelastografija

Trombelastografija (TEG) i rotacijska trombelastometrija su metode kojima se prati proces zgrušavanja krvi *in vitro*, od početka formiranja fibrinskog ugruška do njegove razgradnje. Trombelastografija se pokazala kao vrijedna metoda u veterinarskim klinikama, primarno u liječenju pasa oboljelih od bolesti vezanih uz trombozu (WIINBERG i sur., 2008).

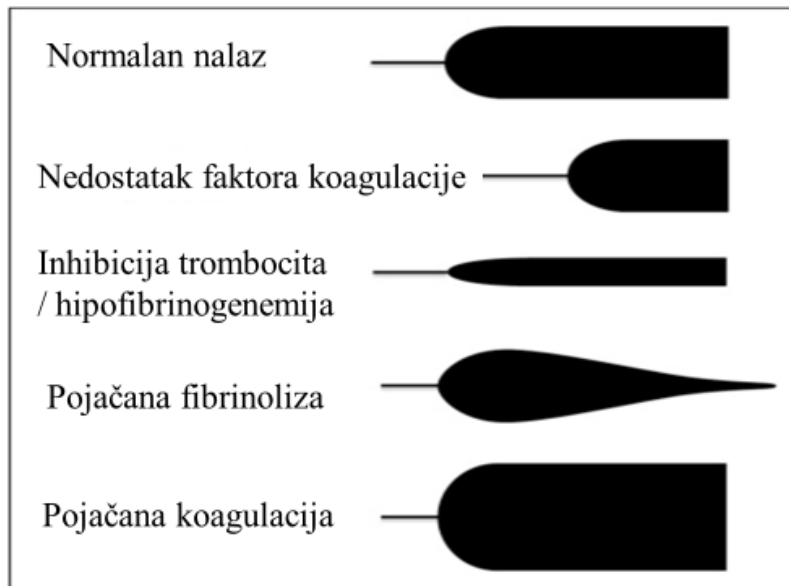
Ova metoda pruža uvid u sve faze hemostaze, koje uključuju inicijaciju, pojačavanje i propagaciju hemostatskog procesa, fibrinolizu, zajedno sa interakcijom trombocita i leukocita sa proteinima koagulacijske kaskade. Iz tog razloga TEG omogućava procjenu tradicionalnih koagulacijskih komponenti plazme zajedno sa celularnim komponentama (WIINBERG i sur., 2008). Posebno dizajnirani program mjeri i prikazuje prokoagulacijske i antikoagulacijske činitelje stvaranja ugruška u krvi, odnosno formacije ugruška i lize (BROOKS i CATALFAMO, 2013). Njima se mjere i stanične komponente i opisuju promjene u čvrstoći i stabilnosti ugruška, koje počinju nakon što završi formiranje fibrina. Parametri koje TEG test daje su reakcijsko vrijeme (R), vrijeme zgrušavanja (K), kut (α), maksimalna amplituda (MA) i indeks lize/razgradnje (LY60). Reakcijsko vrijeme označava vrijeme od početka testa do prvog odstupanja na krivulji, što označava početak stvaranja fibrina. Vrijeme zgrušavanja označava vrijeme potrebno za sretanje od 2 do 20 mm od bazne linije, kut označava je nagib crte povučene od R prema K, maksimalna amplituda označava najširu vertikalnu amplitudu koji TEG bilježi, a predstavlja maksimalnu

čvrstoću ugruška. Indeks razgradnje je TEG amplituda koju nalazimo 60 minuta poslije maksimalne amplitude, a označava trenutnu točku fibrinolize (BROOKS i CATALFAMO, 2013).



Slika 12: Slika 10: Prikaz rezultata trombelastografskog mjerenja (R - reakcijsko vrijeme K-kut, MA- maksimalna amplitura, LY30 – postotak lize tijekom 30 minuta

Prvi izvedbi testova fibrinolize treba paziti na temperaturu krvi te nalaz interpretirati ovisno o broju trombocita, hematokritu i koncentraciji fibrinogena. Trombocitopenija (<50 000), visoki hematokrit i nizak fibrinogen rezultiraju stvaranjem slabih ugrušaka, što se vidi kao produljeno vrijeme zgrušavanja i hipokoagulabilnošću. Suprotno tome, niski hematokrit i hiperfibrinogemija rezultiraju nalazom kratkog vremena formiranja ugruška i hiperkoagulabilnošću. HERRING i sur. ističu da su moguće pogreške u tumačenju rezultata TEG uslijed promjena mase eritrocita, poput policitemije i anemije kada rezultati mogu pokazivati hiper ili hipokoagulabilnost (HERRING, 2012). Uporaba ovog testa je u veterinarskoj medicini tek u razmatranju te oni primjenu nalaze primarno u humanoj medicini pri praćenju terapije transfuzijom, preoperativnom monitoringu pacijenata s koagulopatijama, srčanim premosnicama i slično.



Slika 13: Karakteristični prikazi trombelastograma u različitim tipovima poremećaja

4. ZAKLJUČCI

U veterinarskoj medicini, kao i u humanoj, postoje bolesti vezane za poremećaj sve tri faze hemostaze.

Vrlo je važno pri prvom pristupu pacijentu uzeti opširnu anamnezu i načiniti opsežan klinički pregled, jer ćemo već tada imati prve važne podatke o kojima će ovisiti daljna dijagnostika.

Način uzorkovanja i skladištenja uzorkovane krvi utjecat će na sve dobivene rezultate, koje treba tumačiti zajedno sa svim kliničkim i laboratorijskim podacima.

Laboratorijska dijagnostika poremećaja primarne hemostaze uključuje određivanje broja trombocita, trombocitnih antitijela, vremena krvarenja bukalne sluznice, funkcije trombocita, agregometrijska mjerenja, protočnu citometriju te testove za određivanje koncentracije, aktivnosti i strukture vWF. Poremećaji sekundarne hemostaze dijagnosticiraju se protrombinskim vremenom, aktiviranim parcijalnim trombotoplastinskim vremenom, aktiviranim vremenom zgrušavanja, mjerenjima aktivnosti faktora zgrušavanja, PIVKA testom te testovima generacije trombina. Laboratorijska dijagnostika poremećaja fibrinolize temelji se na određivanju koncentracije razgradnih produkata fibrina (FDP) i D-dimera. Također, u laboratorijskoj dijagnostici koristi se određivanje koncentracije antitrombina i proteina C te trombin-antitrombin kompleksa. Uvid u cjelovit proces hemostaze može se prikazati globalnim hemostatskim testovima, odnosno trombelastografijom.

Laboratorijska dijagnostika poremećaja hemostaze ima svoju širu primjenu i u veterinarskoj medicini te može doprinijeti unaprjeđenju vještina i znanja doktora veterinarske medicine u području hematologije, osobito u dijagnostici poremećaja hemostaze.

5. LITERATURA

ADAMZIK, M., K. GÖRLINGER, J. PETERS, M. HARTMANN (2012): Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis. *Crit. Care.* 16(5), R204.

ALLEGREZZA-GIULIETTIS, A., R. SERRETTI, E. BECCERICA, S. MUTI, G. FERRETTI, C. CERVINI (1991): Platelet release products modulate some aspects of polymorphonuclear leukocyte activation. *J. Cell. Biochem.* 47, 242-250.

AULT, K.A. (2001): The clinical utility of flow cytometry in the study of platelets. *Semin. Hematol.* 38(2), 160-168.

BARIĆ RAFAJ, R., B. ARTUKOVIĆ, K. ŠIMONJI, J. KULEŠ, V. MRLJAK (2009): Das von-Willebrand-Syndrom bei einem Labrador-Retriever mit Leiomyosarkom. *Tierärztl. Umschau* 64, 1 – 9.

BARIĆ RAFAJ, R., J. KULEŠ, A. TVARIJONAVICIUTE, J. CERON, Ž. MIHALJEVIĆ, A. TUMPA, V. MRLJAK (2017): Plasma markers of inflammation and hemostatic and endothelial activity in naturally overweight and obese dogs. *BMC Veterinary Research*, 13:13.

DOI 10.1186/s12917-016-0929-8

BARIĆ RAFAJ, R., J. KULEŠ, J. SELANEC, N. VRKIĆ, V. ZOVKO, M. ZUPANČIĆ, A. TRAMPUŠ BAKIJA, V. MATIJATKO, M. CRNOGAJ, V. MRLJAK (2013): Markers of Coagulation Activation, Endothelial Stimulation, and Inflammation in Dogs with Babesiosis. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 1172-1178.

BHASKAR, A. (2016): Cell based model of haemostasis. *CMI*, 14(2), 53-58.

BOISVERT, A.M., C.L. SWENSON, C.J. HAINES (2001): Serum and plasma latex agglutination tests for detection of fibrin(ogen) degradation products in clinically ill dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 30, 133-136.

BOOTH, N., F. BACHMAN (2006): Plasminogen-plasmin system, in Coleman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ (eds). *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, Philadelphia, PA, Lippincott Williams Wilkins, pp 335-35.

BOULASSEL M.R., R. AL-FARSI, S. AL-HASHMI, H. AL-RIYAMI, H. KHAN, S. AL-KINDI (2015): Accuracy of Platelet counting by Optical and Impedance Methods in Patients with Thrombocytopenia nad Microcytosis. *Sultan Qaboos University Med. J.* 15(4), 463-468.

BOURGES-ABELLA, N.H., T.D. GURY, A. GEFFRÉ, K.C. THIBAUT-DUPREY, A. DAUCHY, C. TRUMEL (2015): Reference intervals, intraindividual and interindividual variability, and reference change values for hematologic variables in laboratory beagles. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 54, 17-24.

BOWIE, E.J.W., C.A. OWEN (1991): Clinical and Laboratory Diagnosis of Hemorrhagic Disorders. In: Disorders of Hemostasis. Ed by Ratnoff OD, Forbes CS. Philadelphia, WB Saunders, pp 48-74.

BROOKS, M.B., J.L. CATALFAMO (2013): Current diagnostic trends in coagulation disorders among dogs and cats. *Vet. Clin. Small Anim.* Elsevier Inc, 7. DOI:10.1016/j.cvsm.2013.07.003

BROOKS, M.B., T. STOKOL, J.L. CATALFAMO (2011): Comparative hemostasis: Animal Models and New Hemostasis Tests. DOI:10.1016/j.cll.2010.10.009. *Clin. Lab. Med.* 31, 139-159.

BROWN, S.J., K.W. SIMPSON, S. BAKER, M.A. SPAGNOLETTI, C.M. ELWOOD (1994): Macrothrombocytosis in cavalier King Charles spaniels. *Vet. Rec.* 135, 281-283.

CALLAN, M.B., F.S. SHOFER, C. WOJENSKI, U. GIGER (1998): Chrono-lume and magnesium potentiate aggregation of canine but not human platelet-rich plasma. *Thromb. Haemost.* 80(1), 176-180

CALLAN, M.B., U. GIGER (2001): Assessment of point-of-care instrument for identification of primary hemostatic disorders in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 62(5), 652-658.

CALLAN, M.B., U. GIGER, J.L. CATALFAMO (2005): Effect of desmopressin on von Willebrand factor multimers in Doberman Pinschers with type 1 von Willebrand disease. *Am. J. Vet. Res.* 66(5), 861-867.

COLLAZO, V., C. ALONSO, G. FRUTOS (2013): Validation of an automated chromogenic assay of potency of factor VIII in commercial concentrates. *Int. J. Lab. Hematol.* 35(1), 38-45.

COUTO, C.G. (2014): Disorders of hemostasis: clinical approach to the bleeding patient. In: Nelson, R. and Couto, C.G.: *Small Animal Internal Medicine*, 5th ed. Mosby, St Louis, 1246.

DIRCKS, B.H., R. MISCHKE, H.J. SCHUBERTH (2012): Platelet- neutrophil aggregate formation in blood samples from dogs with systemic inflammatory disorders. *Am. J. Vet. Res.* 73(7):939-45. DOI: 10.2460/ajvr.73.7.939

DUDEK, M.M., N. KENT, K.M. GUSTAFSSON, T.L. LINDAHL, A.J. KILLARD (2011): Fluorescence-based blood coagulation assay device for measuring activated partial thromboplastin time. *Anal. Chem.* 83, 319-328.

DUNCAN, J.R., K.W. PRASSE, E.A. MAHAFFEY (1994): *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*, 3rd ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 75-93.

FAVALORO, E.J. (2000): Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF: CBA): detection of von Willebrands disease (VWD), and discrimination of VWF subtypes, depends on collagen source. *Thromb. Haemost.* 83(1), 127-135.

FAVALORO, E.J. (2011): Diagnosis and classification of von Willebrand disease: a review of differential utility of various functional von Willebrand factor assays. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 22(7), 553-564.

GENTRY, P.A. (2000): Platelet biology. In: Schalm's Veterinary hematology, 5th ed. 459-463.

GRIFFIN A., M.B. CALLAN, F.S. SHOFER, U. GIGER (2003): Evaluation of a canine D-dimer point-of-care test kit for use in samples obtained from dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and hemorrhage. *Am. J. Vet. Res.* 64, 1562-1569.

HARRISON, P. (2005): Platelet function analysis. *Blood Rev.* 19(2), 111-23.

HERRING, J. (2012): Diagnostic approach to small animal bleeding disorders. *Topics in Compan. and Med.* 27, 76-78.

JAIN, N.C. (1986): Schalm's Veterinary Hematology, 4th ed. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, pp. 20-86.

JAIN, N.C. (1993): The platelet. In: Mundorff GH, ed. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lee & Febiger, 125-131.

JANDREY, K.E., J.W. NORRIS, K.A. MACDONALD, M.D. KITTLESON, F. TABLIN (2008): Platelet function in clinically healthy cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy: analysis using the platelet function analyzer-100. *Vet. Clin. Pathol.* 37(4), 385-8.

JOHNSON, G.S., G.E. LEES, R.E. BENSON, T.K. ROSBOROUGH, W.J. DODDS (1980): A bleeding disease (von Willebrand's disease) in a Chesapeake Bay Retriever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176(11), 1261-1263.

LEDFORD-KRAEMER, M.R. (2010): Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. *Am. J. Hematol.* 85(7), 510-514.

LEWIS, D.C., K.M. MEYERS (1996): Studies of platelet-bound and serum platelet bindable immunoglobulins in dogs with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Exp. Hematol.* 24, 696-701.

MARUYAMA, H., T. WATARI, T. MIURA, M. SAKAI, T. TAKAHASHI, H. KOIE, Y. YAMAYA, K. ASANO, K. EDAMURA, T. SATO, S. TANAKA, A. HASEGAWA, M. TOKURIKI (2005): Plasma thrombinantithrombin complex concentrations in dogs with malignant tumours. *Veterinary record.* 156(26), 839-840.

MCMICHAEL, M. (2012): *New Models of Hemostasis*. *Topics in Compan. An. Med.* 27. University of Illinois, College of Veterinary Medicine, Champaign, IL, USA, 43.

MCMICHAEL, M., M. O'BRIEN, S.A. SMITH (2015): Hypercoagulability in Dogs with Blastomycosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 29(2), 499-504.

- MISCHKE, R., I. NOLTE (1997): Optimisation of prothrombin time measurements in canine plasma. *Am. J. Vet. Res.* 58, 236-241.
- MISCHKE, R. (2014): Laboratory evaluation and interpretation of haemostasis in small animals. Small animal clinic, University of Veterinary Medicine Hannover. *J. Hellenic Vet. Med. Soc.*, 65(3), 165-180.
- MISCHKE, R. (2017): Laboratory evaluation and interpretation of haemostasis in small animals, *J. Hellenic Vet. Med. Soc.* 5-7.
- MISCHKE, R., A. DENIZ, I. NOLTE (1996): Influence of sample predilution on the sensitivity of the prothrombin time in feline plasma. *J. Vet. Med.. A* 43, 155-162.
- MOUNT, M.E. (1986): Proteins Induced by Vitamin K Absence or Antagonism (“PIVKA”). In: *Kirk Current Veterinary Therapy IX*. Ed. by Rwkirk. Philadelphia, WBSaunders, pp 513-515.
- NELSON, O.L., C. ANDREASEN (2003): The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 830-834.
- NIEWIAROWSKI, S., J.C. HOLT, J.J. COOK (1994): Biochemistry and physiology of secreted platelet proteins. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 3rd ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 546.
- OWREN, P.A.: (1959): Thrombotest: A new method for controlling anticoagulant therapy. *Lancet.* 2, 754-758.
- PALMER, R.L. (1984): Laboratory diagnosis of bleeding disorders. Basic screening tests. *Postgrad. Med.* 76, 137-138.
- PALTRINIERI, S., V. PACILETTI, J. ZAMBARBIERI (2018): Analytical variability of estimated platelet counts on canine blood smears. *18. Vet. Clin. Pathol.* 47(2), 197-204.
DOI: 10.1111./vcp.12604
- PARKER, M.T.1., M.A. TURRENTINE, G.S. JOHNSON (1991): Von Willebrand factor in lysates of washed canine platelets. *Am. J. Vet. Res.* 52(1), 119-125.
- RAFAJ BARIĆ, R., V. MATIJATKO, I. KIŠ, N. KUČER, T. ŽIVIČNJAK, N. LEMO, Z. ŽVORC, M. BRKLJAČIĆ, V. MRLJAK (2009): Alterations in some blood coagulation parameters in naturally occurring cases of canine babesiosis. *Acta Vet. Hung.* 57(2), 295-304.
DOI: 10.1556/Avet.57.2009.2.10
- RAVANAT, C., M. FREUND, F. DOL, Y. CADROY, J. ROUSSI, F. INCARDONA, J.P. MAFFRAND, B. BONEU, L. DROUET, C. LEGRAND (1995): Cross-reactivity of human molecular markers for detection of prethrombotic states in various animal species. *Blood coagulation & fibrinolysis.* 6(5), 446-455.

RAYMOND, S.L., D.W. JONES, M.B. BROOKS, W.J. DODDS (1990): Clinical and laboratory features of a severe form of von Willebrand disease in Shetland sheepdogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197(10), 1342-1346.

RIMPO, K., A. TANAKA, M. UKAI, Y. ISHIKAWA, M. HIRABAYASHI, T. SHOYAMA (2018): hrombin – antithrombin complex measurement using a point-of-care testing device for diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs. *Plos ONE* 13(10), e020551.

ROZANSKI, E., K.J. DROBATZ, D. HUGHER, M. SCOTTI, U. GIGER. (2007): Thrombotest (PIVKA) Test Results in 25 Dogs with Acquired and Hereditary Caogulopathies. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 9. 73 – 78.

RUGGERI, Z.M. (1994): New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Semin. Hematol.* 31, 229-239.

SABINO, E.P., H.N. ERB, J.L. CATALFAMO (2006): Development of a collagen-binding activity assay as a screening test for type II von Willebrand disease in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 67(2), 242-249.

SCHREZENMEIER, H., H. MÜLLER, E. GUNSILIUS, H. HEIMOEL, E. SEIFRIED (1995): Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. *Thromb. Haemost.* 73, 506-513.

SCHWARTZ, D., L. SHARKEY, P.J. ARMSTRONG., C. KNUDSON, J. KELLEY (2014): Platelet volume and plateletcrit in dogs with presumed primary immune-mediated thrombocytopenia. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 1575-1579.

SIXMA, J.J., M.E. SCHIPHORST, C.L. VERWEIJ, H. PANNEKOEK (1991): Effect of deletion of the A1 domain of von Willebrand factor on its binding to heparin, collagen and platelets in the presence of ristocetin. *Eur. J. Biochem.* 196(2), 369-375.

SMEDILE, L.E., D.M. HOUSTON, S.M. TAYLOR, K. POST, G.P. SEARCY (1997): Idiopathic asymptomatic thrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels: 11 cases (1983-1993). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 33, 411-415.

SMITH J.R., K.F. SMITH, B.M. BRAINARD. (2014): Platelet parameters from an automated hematology analyzer in dogs with inflammatory clinical diseases. *Vet. J.* 201, 406-411.

STOKOL, T. (2003): Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 33, 1419-1435.

STOKOL, T., M.B. BROOKS, H. ERB, G.E. MAULDIN (1999): Evaluation of kits for the detection of fibrin(ogen) degradation products in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 478-484.

TRIPLETT, D.A. (2000): Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin. Chem.* 46, 1260-1269.

TSUCHIYA, R., Y. AKUTSU, A. IKEGAMI, M. SCOTT, S. NEO, T. ISHIKAWA, M. HISASUE, T. YAMADA (2009): Prothrombotic and inflammatory effects of intravenous administration of human immunoglobulin G in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*. 23(6), 1164-1169.

VENTA, P.J., J. LI, V. YUZBASIYAN-GURKAN, G.J. BREWER, W.D. SCHALL (2000): Mutation causing von Willebrand's disease in Scottish Terriers. *J. Vet. Intern. Med.* 14(1), 10-9.

WATERS, D.C.1., A.H. EATON, K.R. STEIDLEY, D.R. MCCARROLL (1989): Expression of von Willebrand factor in plasma and platelets of cats. *Am. J. Vet. Res.* 50(2), 2014-2020.

WEISER, M.G., G.J. KOCIBA (1984): Platelet concentration and platelet volume distribution in healthy cats. *Am. J. Vet. Res.* 45, 518-522.

YILMAZ, Z., Y.O. ILLCOL, S. TORUN, I.H. ULUS (2006): Intravenous administration of choline or CDP-choline improves platelet count and platelet closure times in endotoxin-treated dogs. *Shock* 2006. 25(1), 73-79.

6. SAŽETAK

Laboratorijska dijagnostika poremećaja hemostaze (diplomski rad)

Studentica: Ana Varjačić

Mentorica: prof.dr.sc. Renata Barić Rafaj

Zavod za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta

Ovaj rad bavi se procesom hemostaze, poremećajima hemostaze i testovima za detekciju poremećaja pojedinih faza hemostaze u nekoliko poglavlja.

Uvod opisuje ulogu pojedinih činitelja u procesu hemostaze. Hemostaza je kompleksan proces koji uključuje vremenski i prostorno regulirane interakcije između stijenke krvnih žila i cirkulirajućih trombocita, tkivnog faktora povezanog s membranom te prokoagulantnih, antikoagulantnih i fibrinolitičkih plazmatskih proteina. Cilj ovog rada je navesti i opisati moguće korake koje kliničar može učiniti da dođe do dijagnoze kod pacijenata s pojavom spontanog krvarenja, kako bi pacijent postigao potpun oporavak. Rasprava se detaljnije bavi poremećajima triju faza hemostaze, gdje za poremećaje svake faze postoje dostupni laboratorijski testovi koji mogu biti presudni u donošenju valjane dijagnoze i pristupanju ciljanoj terapiji bolesti zgrušavanja krvi kod domaćih životinja, ponajprije kućnih ljubimaca.

Stoga, ovaj rad izdvaja i opisuje korisne laboratorijske testove za detekciju poremećaja pojedinih faza hemostaze, ali se stavlja naglasak i na važnost općeg kliničkog pregleda te iskustva doktora veterinarske medicine u prepoznavanju znakova poremećaja prije izvođenja pojedinih testova.

Zaključak diplomskog rada donosi osvrt na rad u cjelini.

KLJUČNE RIJEČI: laboratorijska dijagnostika, hemostaza, fibrinoliza

7. SUMMARY

Laboratory diagnostics of hemostatic disorders

Student: Ana Varjačić

Menthor: prof. dr. sc. Renata Barić Rafaj

The Department of Chemistry and Biochemistry of Veterinary Faculty in Zagreb

This thesis discusses the process of hemostasis, hemostatic disorders and various tests for detection of the disorders of each phase of hemostasis, which is summarized in few chapters.

The introduction discusses the roll of each participant in the hemostatic process. Hemostasis is a complex process which includes timely and spatially regulated interactions between the walls of the blood vessels, circulating platelets, membrane associated tissue factor and procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic plasma proteins. The aim of this thesis is to list and describe possible steps which every clinician can make to accurately diagnose patients with the occurrence of spontaneous bleeding, to help the patient to achieve full recovery. The discussion interprets the three phases of hemostasis in detail, connecting each phase to adequate laboratory diagnostic tests available for the conformation of the suspected disorders, because these tests may be crucial for correctly diagnosing and treating bleeding disorders in domestic animals, small animals respectively.

Hence, this thesis describes useful methods of laboratory testing for the detection of the hemostatic disorders, each used for the disorders of one of the three phases of hemostasis, but emphasises the importance of the clinical examination and every clinical practitioner's experience in recognizing the signs of bleeding disorders, before assessing diagnostic testing.

The thesis conclusion summarizes key points of the thesis.

KEY WORDS: laboratory diagnostics, hemostasis, fibrinolysis

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28. ožujka 1993. u Bjelovaru, gdje sam završila IV. osnovnu školu. Srednjoškolsko obrazovanje nastavila sam u Općoj Gimnaziji Bjelovar i Glazbenoj školi Vatroslava Lisinskog u Bjelovaru na teoretskom smjeru, od 2008. do 2012. godine.

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2012. godine te studij završavam na smjeru kućni ljubimci. Obaveznu stručnu praksu odrađivala sam u Veterinarskoj stanici Bjelovar. Nakon studija težim stjecanju iskustva u liječenju kućnih ljubimaca i egzotičnih životinja. Govorim engleski i njemački jezik.