

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
Fakulta veterinárního lékařství

Ústav fyziologie
Klinická laboratoř pro malá zvířata



**Hodnocení koncentrací aktivátorů a inhibitorů koagulace a fibrinolýzy
u vybraných onemocnění asociovaných s výskytem
diseminované intravaskulární koagulace**

ODBORNÁ PRÁCE

Marie Rybová

Brno 2015

OBSAH

PROHLÁŠENÍ	4
ÚVOD	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
1. DISEMINOVANÁ INTRAVASKULÁRNÍ KOAGULACE.....	8
1.1.Definice	8
1.2.Etiopatogeneze.....	8
1.2.1.Mechanismy alterace koagulace u pacientů s infekcí.....	11
1.2.2.Mechanismy alterace koagulace u pacientů s traumaty	14
1.2.3.Mechanismy alterace koagulace u onkologických pacientů	17
1.3.Laboratorně diagnostické možnosti	19
1.3.1.Diagnostická kritéria	23
VLASTNÍ PRÁCE	27
1. CÍL PRÁCE.....	27
2. MATERIÁL A METODIKA	28
1.1.Materiál.....	28
1.1.1.Odběr krve a zpracování vzorků	30
1.1.2.Kritéria pro zařazení pacientů	34
1.1.3.Kritéria pro diseminovanou intravaskulární koagulaci	34
1.1.4.Statistické zpracování.....	35
2. VÝSLEDKY	36
2.1.Posouzení incidence diseminované intravaskulární koagulace u jednotlivých onemocnění	36
2.2.Porovnání aktivátorů a inhibitorů koagulace a fibrinolýzy u jednotlivých onemocnění a zdravých zvířat	38

2.3.	Zhodnocení tromboelastografie u jednotlivých onemocnění a zdravých zvířat	43
2.4.	Stanovení diagnostické výpovědi hemostazeologických testů pro diagnostiku diseminované intravaskulární koagulace	53
3.	DISKUZE	55
4.	ZÁVĚR	63
5.	SUMMARY	64
	LITERATURA	65
	PODĚKOVÁNÍ	75

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem odbornou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje.

ÚVOD

Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) je závažná, život ohrožující komplikace heterogenní skupiny onemocnění způsobená nadměrnou aktivitou koagulačního a fibrinolytického systému. Příčina vzniku DIC závisí na primárním onemocnění, v patogenezi je obvykle prvním krokem aktivace koagulace. Aktivace koagulace může být způsobena řadou mechanismů - zvýšenou expresí iniciátoru koagulace (např. tkáňového faktoru), úbytkem přirozených inhibitorů koagulace (antitrombinu, proteinu C, inhibitoru tkáňového faktoru) nebo alterací fibrinolýzy (zejména inhibitoru aktivátoru plazminogenu).

Studium alterace koagulace u jednotlivých onemocnění je ve veterinární medicíně v počátcích – rutinní hemostazeologické testy jsou v posledním desetiletí doplňovány komplexními viskoelastickými testy a rovněž stoupá počet validovaných metod, jako např. stanovení aktivity D-dimerů, umožňující rozšíření kritérií diagnostiky DIC. Naproti tomu při studiu DIC představuje problém absence širšího spektra parametrů, případně jejich vázanost na analyzátor či výrobce s obtížnou dosažitelností v naší republice (např. tkáňový faktor, inhibitor aktivátoru plazminogenu).

Studie věnované problematice DIC ve veterinární medicíně jsou aktuálně zaměřené především na diagnostické možnosti tohoto syndromu. Status jednotlivých složek hemokoagulačního systému v DIC u různých onemocnění není známá, a tato studie si proto dává za cíl porovnat hladiny aktivátorů a inhibitorů koagulace a fibrinolýzy u různých skupin onemocnění.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas (activated partial thromboplastin time)
AT	antitrombin
ATK	akutní traumatická koagulopatie
AUC	plocha pod křivkou (area under curve)
BLEE	krvácivé příznaky (bleeding symptom)
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace (disseminated intravascular coagulation)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
FBG	fibrinogen
FDP	fibrin/fibrinogen-degradační produkty
FPA	fibrinogen-fibrinopeptid A
FRG	fragmenty erytrocytů (fragmentation of red blood cells)
GDV	dilatace a volvulus žaludku (gastric dilatation-volvulus)
IL	interleukin
ISTH	International Society of Thrombosis and Haemostasis
JMHW	Japanese Ministry of Health and Welfare
K	čas od počátku koagulace do vytvoření sraženiny definované síly (20 mm)
KMS	Kasabachův-Merritův syndrom
LPS	lipopolysacharid
LY30	procento fibrinolýzy 30 min po dosažení MA
MA	maximální amplituda
PAI	inhibitor aktivátoru plazminogenu (plasminogen activator Inhibitor)
PC	protein C
PT	protrombinový čas (prothrombin time)
R	reakční čas
SF	rozpustný fibrin (soluble fibrin)

SSC	Scientific and Standardization Committee
TAT	trombin-antitrombin komplex
TEG	tromboelastografie
TF	tkáňový faktor
TNF	faktor nekrotizující tumory (tumor necrosis factor)
TT	trombinový čas (thrombin time)
vWF	von Willebrandův faktor

LITERÁRNÍ PŘEHLED

1. DISEMINOVANÁ INTRAVASKULÁRNÍ KOAGULACE

1.1. Definice

Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC), dříve nazývaná konzumpční koagulopatie nebo defibrinační syndrom, je komplexní syndrom zahrnující jednak nadměrnou intravaskulární koagulaci vedoucí k multiorgánové trombóze a jednak sekundární inaktivaci nebo nadměrnou konzumpci trombocytů a koagulačních faktorů vedoucí ke zvýšenému krvácení. (Feldman 1981, Bick a Scates 1992). Tento název je více specifický než dříve používané termíny, neboť označení konzumpční koagulopatie neodrážela degradaci koagulačních faktorů a jiných složek plazmy plazminem a defibrinační syndrom nepoukazoval na degradaci a konzumpci fibrinogenu, ke kterým při DIC rovněž dochází (Ruiz de Gopegui a kol. 1995). Nynější definice navržená International Society of Thrombosis and Haemostasis, ISTH, v roce 2001 popisuje DIC jako z mnoha příčin získaný syndrom a charakterizovaný intravaskulární aktivací koagulace, kterou nelze lokalizovat a která může způsobovat poškození mikrovaskulatury vedoucí ve vážných případech až k orgánové dysfunkci (Taylor a kol. 2001).

1.2. Etiopatogeneze

Za první zdokumentovaný případ DIC se považuje Shneiderova práce z roku 1951, která popisuje snížení hladiny fibrinogenu a mikroskopický nález embolií u pacientky s odloučením placenty. V polovině 20. století bylo DIC spojováno zejména se sepsí a orgánovým selháním, nyní je seznam diagnóz spojených se vznikem a rozvojem DIC značně obsáhlý (tab. 1).

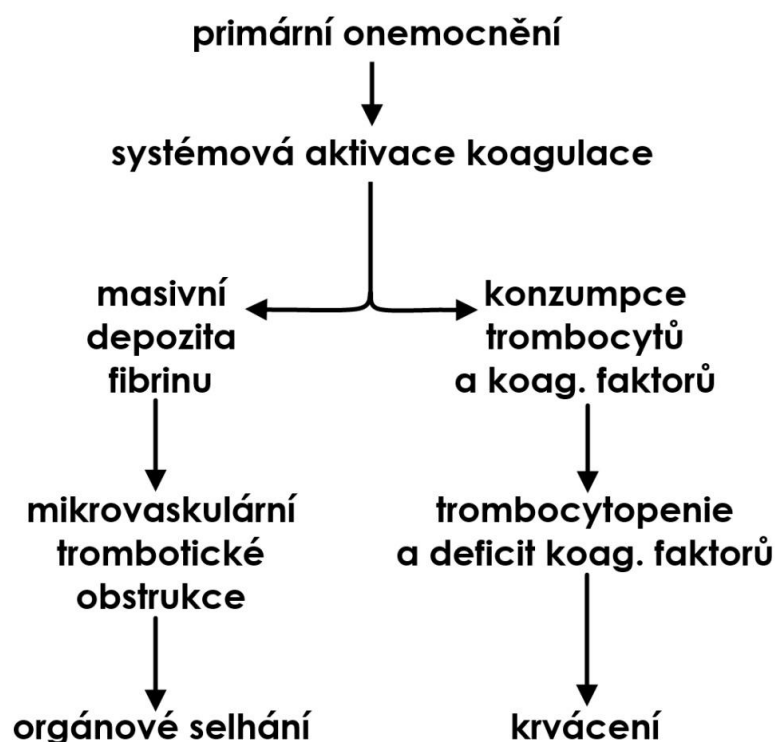
Tabulka 1: Seznam onemocnění asociovaných s DIC (upraveno podle Bruchima a kol. 2008)

Systematická bakteriální infekce/ Seps	Parazitární onemocnění
- G⁻ (endotoxin) - G⁺ (bakteriální mukopolysacharidový povlak, enzymy)	- Babesióza (<i>Babesia canis rosi</i>) - Monocytní ehrlichioza (<i>Ehrlichia canis</i>) a horečka Skalistých hor (<i>Rickettsia rickettsii</i>) - Leishmanióza (<i>Leishmania infantum</i>) - Spirocerkóza (<i>Spirocerca lupi</i>) - Dirofilarióza (<i>Dirofilaria immitis</i>) - Angiostrongylóza (<i>Angiostrongylus vasorum</i>)
Virové infekce	Masivní poškození orgánů
- Parvoviróza - Infekční hepatitida psů - Panleukopenie koček - Infekční peritonitida koček	- Hypertermie, popáleniny - Syndrom dilatace a volvulu žaludku - Trauma hlavy - Tuková embolie - Operace - Těžké mechanické trauma
Neoplazie	Cévní abnormality
- Solidní tumory - Hemangiosarkom - Lymfom - Myeloproliferativní onemocnění - Lymfoidní leukemie - Plicní adenokarcinom	- Aneuryzma - Vaskulitida - Hemangiom
Imunologické poruchy	Ostatní
- Imunitně zprostředkovaná hemolytická anemie - Posttransfuzní hemolytická reakce - Transplantační reakce	- Pankreatitida - Selhání jater - Polycytemie
Reakce na toxiny	
Hadí uštknutí	
Porodnické komplikace	
Pyometra	

Obecně se popisují dva hlavní faktory spuštění DIC. Prvním z nich je systémová zánětová odpověď vedoucí k aktivaci velkého množství cytokinů a následné aktivaci koagulace (např. během sepsy nebo rozsáhlých traumat) a druhým je vyloučení prokoagulačního materiálu do krevního řečiště (např. u neoplazií nebo gynekologických pacientů) (Levi a kol. 1997).

V patogenezi DIC hraje roli několik mechanismů, které se uplatňují současně (obr. 1). Depozice fibrinu vzniká následkem generování trombinu, který je mediován tkáňovým faktorem, a tento proces není dostatečně

vyvážen fyziologickými antikoagulans, jakými jsou např. protein C a antitrombin. Při zvýšené tvorbě fibrinu je zároveň nefunkční i jeho odstraňování fibrinolytickým systémem, což bývá způsobeno zpravidla vysokou hladinou cirkulujícího inhibitoru aktivátoru plazminogenu typu I. Výjimečně může být situace odlišná a DIC se prezentuje primárně zvýšenou fibrinolýzou (Levi a kol. 2004).



Obrázek 1: Schéma aktivace DIC (upraveno podle Levi 2004)

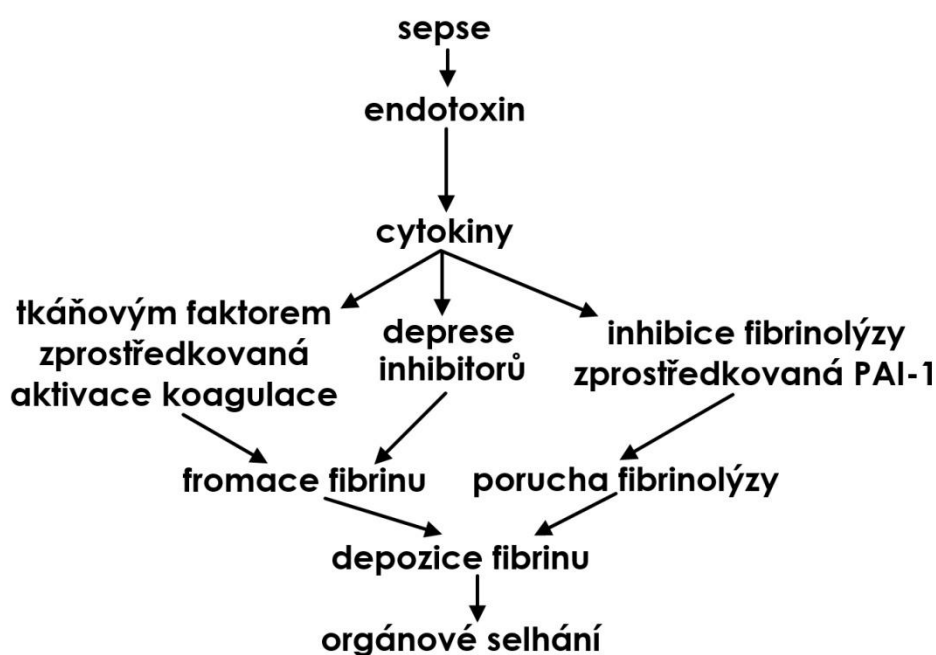
Obecně je patogeneze DIC rozdělena do mechanismů (Levi a kol. 2004):

- nadměrná tvorba trombinu vlivem aktivace tkáňového faktoru,
- dysfunkce antitrombinu, proteinu C a inhibitoru tkáňového faktoru,
- porucha fibrinolýzy vlivem nadměrné aktivity inhibitoru aktivátoru plazminogenu.

Jelikož jsou tyto mechanismy různě aktivovány v závislosti na vyvolané příčině, popisuje následující text mechanismy alterace koagulace u tří skupin onemocnění asociovaných s DIC.

1.2.1. Mechanizmy alterace koagulace u pacientů s infekcí

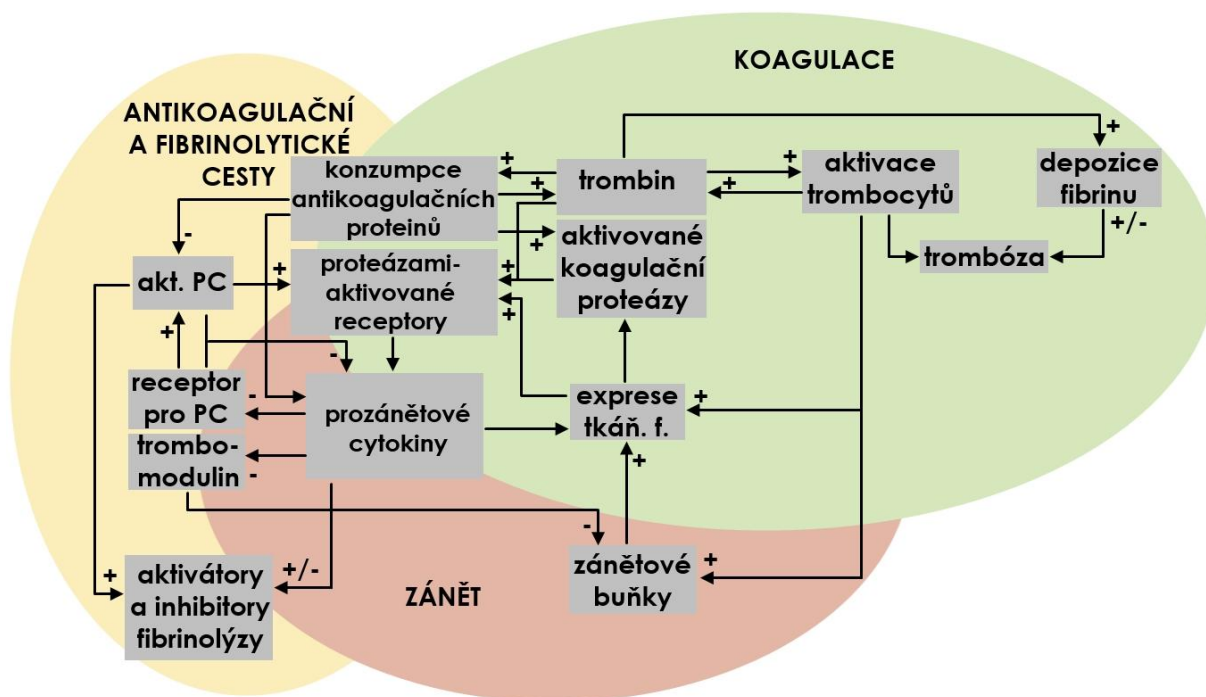
Nejčastější příčinou rozvoje DIC u člověka a pravděpodobně i u zvířat je septikemie, přičemž není rozdíl v incidenci mezi G^- a G^+ bakteriemi. Hlavními faktory spouštějícími DIC jsou membránové komponenty patogenů – lipopolysacharid (LPS) neboli endotoxin a exotoxiny, např. stafylokokový α -toxin (Wheeler a Bernard 1999, Bone 1994, Levi a kol. 1997). Aplikace nízké dávky endotoxinu lidem nebo primátům vedla k silné odpovědi koagulačního systému s vrcholem 3-5 h po aplikaci. Dosavadní studie prokázaly, že tvorba fibrinu byla zprostředkována aktivací velkého množství koagulačního faktoru X, který je prvním faktorem společné cesty, a tudíž mohou být za jeho aktivaci odpovědné složky vnější i vnitřní cesty koagulace. Podle dalších studií bylo zjištěno, že podání protilátky proti tkáňovému faktoru kompletně blokovalo aktivaci koagulace u jedinců s endotoxemií nebo bakteriemií (Taylor a kol. 1991, Levi a kol. 1994). Kromě přímé aktivace koagulace je prokoagulační stav zesílen deplecí přirozených inhibitorů srážení krve (obr. 2). Hlavní inhibitor trombinu a faktoru Xa je rychle spotřebován při generaci fibrinu, což vede k jeho nízkým koncentracím v krvi (Levi a kol. 1997). Současně může docházet k poklesu proteinu C a proteinu S. Pokles hladin trombomodulinu během sepse je pravděpodobně způsoben faktorem nekrotizujícím tumory α ($TNF\alpha$), což vede ke snížení aktivity proteinu C (Nawroth a Stern 1986, Conway a Rosenberg 1988).



Obrázek 2: Schéma iniciace DIC během sepse (upraveno podle Leviho a kol. 1997)

Vysvětlivky: PAI – inhibitor aktivátoru plazminogenu

Taylor a kol. (1987) rovněž prokázali, že terapie aktivovaným proteinem C u primátů snižuje koagulopatii při bakteriemii. Během sepse je zvýšená koncentrace komplementu, na který se protein S váže, což vede k relativnímu deficitu antikoagulačního proteinu S (Taylor 1994). Kromě efektu na koagulaci ovlivňuje sepsa rovněž fibrinolytický systém. U lidí bylo prokázáno, že endotoxemie vede ke zvýšení činnosti aktivátorů plazminogenu (tkáňového i urokinázového), což zvyšuje hladinu plazminu. Přibližně hodinu po zvýšení aktivátorů plazminogenu dochází ke zvýšení hladiny inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 (PAI-1) s následkem kompletní suprese aktivátoru plazminogenu a tvorby plazminu, čímž je fibrinolytický systém blokován po dobu několika hodin (Biemond a kol. 1995). Z hlediska časového sledu událostí je v době maximální tvorby trombinu fibrinolytický systém neúčinný, což vede k značné dysbalanci mezi koagulačním a fibrinolytickým systémem, jejímž výsledkem je stadium prokoagulace. Bylo zjištěno, že blokáda koagulace při endotoxemii nezabrání aktivaci aktivátorů a inhibitorů fibrinolýzy.



Obrázek 3: Schéma propojení mezi koagulací, antikoagulační a fibrinolytickou cestou a zánětem (upraveno podle Leviho 2004)

Vysvětlivky: PC – protein C

Předpokládá se, že efekt endotoxinu na koagulaci a fibrinolýzu je zprostředkován cytokiny (obr. 3). Jelikož je TNF- α prvním cirkulujícím cytokinem po aplikaci endotoxinu (90 min po aplikaci endotoxinu vs. 120 min u interleukinů 6 a 8) (Levi a kol. 1997), předpokládalo se, že je spouštěčem koagulace. Na jednu stranu vede aplikace TNF- α k aktivaci koagulačního systému, jako je tomu při aplikaci endotoxinu, na druhou stranu aplikace protilátek proti TNF nezabránila aktivaci koagulace (van der Poll a kol. 1990, 1994). Následně byl studován interleukin-6 (IL-6), jehož koncentrace je nejvíc konzistentní u pacientů se sepsí. Podání anti-IL-6 vedlo ke kompletní zábraně endotoxinem indukované aktivace koagulace u šimpanzů (van der Poll a kol. 1994a). Bylo ale patrné, že TNF α má klíčovou roli v aktivaci fibrinolýzy, neboť po jeho blokaci došlo k úplné absenci fibrinolytické odpovědi, zatímco blokace IL-6 obdobný efekt neměla (van der Poll a kol. 1994b).

1.2.2. Mechanizmy alterace koagulace u pacientů s traumaty

Další z příčin, které mohou vést k DIC, je těžké trauma. Posttraumatické krvácení je stále jednou z hlavních příčin úmrtí u lidí. Z 30-56 % se jedná o posttraumatická úmrtí před hospitalizací, zatímco krvácení z koagulopatií je jednou z hlavních příčin smrti během prvního dne po traumatu (Kauvar a kol. 2006, Engels a kol. 2011). Klinické a laboratorní nálezy u lidí potvrzují, že poruchy koagulačního systému hrají klíčovou roli v časném (prodloužení času krvácení) i pozdním posttraumatickém úmrtí (rozvoj multiorgánového selhání) (Gando a kol. 2011). Maegele a kol. (2007) prokázali u lidí, že 25-34 % traumatických pacientů je při příjmu hypokoagulačních. Rovněž zjistili, že tato akutní traumatická koagulopatie (ATK) pozitivně koreluje s mírou závažnosti poranění a není závislá na množství přijaté infuzní terapie. Přítomnost ATK zhoršuje resuscitační úsilí, zvyšuje požadavky na podání transfuze, prodlužuje hypoperfuzi tkání a zvyšuje riziko intrakraniálního krvácení a plicního edému při traumatickém poškození mozku či kontuzi plic.

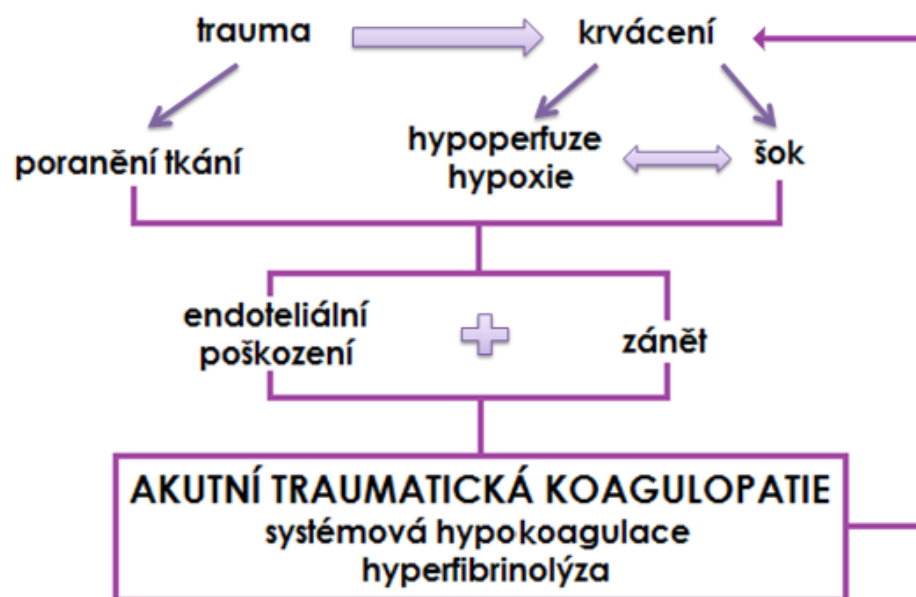
Předpokládalo se, že koagulopatie spojené s traumaty jsou primárně způsobené ztrátou, dysfunkcí nebo dilucí koagulačních faktorů a trombocytů. Ztráta byla přičítána masivnímu krvácení a konzumpci, diluce agresivní infuzní terapii a dysfunkce vlivu metabolické acidózy a hypotermii (Frith a Brohi 2010). V posledních letech však bylo prokázáno, že traumatická koagulopatie má odlišnou patogenezi a vyvíjí se již během půl hodiny, tedy dříve než se uplatní ztráta, diluce či dysfunkce vlivem hypotermie nebo metabolické acidózy (Frith a kol. 2010, Engels a kol. 2011). Existují tři hypotézy patogeneze systémové hypokoagulace a hyperfibrinolýzy: 1) diseminovaná intravaskulární koagulace s fibrinolytickým fenotypem (Johansson a kol. 2011), 2) zvýšená aktivita proteinu C a 3) nadměrná sympatoadrenální odezva vedoucí k poškození endotelu vlivem katecholaminů (Johansson a Ostrowski 2010, Johansson a kol. 2011).

I když je primární charakter DIC hyperkoagulační, následek traumatu je popsán rozdílně, a to následujícím způsobem – po hypokoagulačním stadiu během 24-48 h dochází ke změně na trombotický fenotyp (Johansson a

Ostrowski 2010). V důsledku poškození endotelu (traumatem, hypoxií, ischemií) dochází k masivnímu generování trombinu a následné systémové tvorbě fibrinu (obr. 4). Současně dochází k masivnímu vyplavení tkáňového aktivátoru plazminogenu způsobující konverzi plazminogenu na plazmin. Tyto dva simultánní děje vyústí do posttraumatické hyperfibrinolýzy a hypokoagulace. Po resuscitaci pacienta dochází ke zvýšené expresi inhibitoru aktivátoru plazminogenu (Gando 2009) v porovnání k aktivátoru plazminogenu a rozvoji trombotického stavu.

Druhá hypotéza vychází z teorie, že snížená degradace trombinu a zvýšená aktivita antikoagulačního proteinu trombomodulinu vede k aktivaci proteinu C. Příčinou má být závažná hypoperfuze. I když je trombin znám jako protrombotická substance, vazba trombinu na trombomodulin mění jeho vlastnosti na antikoagulační, a to cestou aktivace proteinu C. Protein C pak inhibuje koagulační faktory Va a Vlla a zároveň snižuje aktivitu inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1, což vede k hypokoagulačnímu a hyperfibrinolytickému stavu (Frith a Brohi 2010, Brohi a kol. 2007, 2008).

Poslední teorie udává vliv endoteliálního poškození následkem vyloučení katecholaminů, jejichž množství je přímo úměrné intenzitě traumatu. Katecholaminy přímo poškozují endoteliální glykokalyx, čímž mění jeho vlastnosti z antitrombotických na protrombotické, což vede k lokální aktivaci koagulace v místě poranění. Ve snaze o zabránění systémové koagulace se organismus snaží vyvážit protrombotický stav endotelií antitrombotickým a fibrinolytickým stavem krve (Johansson a Ostrowski 2010). Za konkrétní zprostředkování mají být odpovědné substance vyloučené z poškozeného glykokalyxu – heparinsulfát, trombomodulin a tkáňový aktivátor plazminogenu.



Obrázek 4: Schéma akutní traumatické koagulopatie (upraveno podle Palmera a Martinové 2014)

I když existuje šest klíčových faktorů v rozvoji AKT – tkáňové poškození, hypoperfuze, systémový zánět, metabolická acidóza, hypotermie a hemodiluce, kvůli diverzitě mezi jednotlivými případy jsou akceptovány pouze dva – tkáňové poškození a hypoperfuze (Johansson a kol. 2011). Tkáňové a vaskulární trauma vede k expozici subendoteliálního kolagenu a tkáňového faktoru cirkulujícímu von Willebrandovu faktoru (vWF) a faktoru VIIa vedoucí k iniciaci koagulace a formace trombinu. Kromě aktivace proteinu C může vaskulární trauma vést k dysfunkci trombomodulinu, antitrombinu, inhibitoru cesty tkáňového faktoru a endoteliálního receptoru proteinu C a k uvolnění velkého množství tkáňového aktivátoru plazminogenu (Palmer a Martinová 2014). Mechanismus iniciace koagulace následkem hypoperfuze není přesně znám – hypoxie a ischemie vede ke zvýšení endoteliálního tkáňového aktivátoru plazminogenu, upregulaci endoteliálních adhezních molekul, indukci *de novo* transkripce tkáňových faktorů z monocytů a vaskulární hladkosvalové buňky. Navíc hypoperfuze prodlužuje clearance trombinu umožňující vyšší dostupnost komplexu trombin-antitrombin (Gando a kol. 2011, Hess a kol. 2008).

Ve veterinární medicíně nebyla k dnešnímu dni publikována prospektivní studie o prevalenci ATK (Palmer a Martinová 2014). Studie provedená Mischkem (2005) hodnotila hemostatické změny u psů se spontánními otevřenými traumaty. U 30 psů byl zaznamenán významný pokles ve všech složkách koagulace (koagulační faktory, antikoagulačních proteinů, trombocytů i plazminogenu) s odpovídajícím prodloužením protrombinového času (PT) a aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT). Stejně jako u lidí bylo u 76 % psů přítomen pokles faktoru V a rozpustný fibrin i fibrin-degradační produkty byly významně zvýšeny. Holowaychuková a kol. (2011) hodnotili přítomnosti koagulopatií u 41 psů s otevřeným nebo penetrujícím zraněním. Z jejich výsledků je patrné, že nepřeživší jedinci a psi s největšími zraněními byli hypokoagulabilní a že tyto koagulopatie pozitivně korelovaly s incidencí krvácení a potřebou transfuze. Konkrétně byla zvýšená přítomnost krvácení spojená se sníženým počtem trombocytů, snížením maximální amplitudy a úhlu α v tromboelastografii, snížením antitrombinu a proteinu C a zvýšením hladin aPTT.

1.2.3. Mechanizmy alterace koagulace u onkologických pacientů

Spojitosť mezi solidními nádory a trombohemoragickými poruchami byla poprvé popsána v roce 1865. V roce 1977 vydali Sack a kol. článek věnovaný této problematice, kde nejčastějším klinickým nálezem byla izolovaná venózní trombóza (62 %), migrující venózní trombóza (53 %) a nadměrné krvácení (41 %) (Sack a kol. 1977). Obecně lze konstatovat, že incidence prokoagulačního stavu je pravděpodobně přítomna u většiny pacientů s pokročilou neoplazií, ačkoli výskyt zjevné formy DIC je mnohem nižší (Levi 2003). Největší prospektivní studie DIC u solidních tumorů pochází z roku 2001 – incidence DIC byla 6,8 %, z toho 59 % pacientů trpělo nadměrným krvácením, 34 % trombózou a 7 % oběma příznaky (Sallah a kol. 2001, Feinstein 2015). Nejvyšší incidence DIC mezi tumory přísluší akutní promyelocytární leukemii, kde je DIC více než u 90 % pacientů (Falangová 1998). U tohoto onemocnění

je rozvoj DIC nejpřímochařejší, ale zároveň výjimečný. Příčinou je enormní fibrinolýza spojená s nízkou hladinou fibrinogenu a masivní konzumpcí plazminogenu a α_2 -antiplazminu (Rodeghiero a Castaman 1994). Hyperfibrinolýza pravděpodobně není způsobena nadměrnou tvorbou plazminu aktivátory plazminogenu (jelikož není jejich hladina zvýšená) nebo působením leukocytární elastázy, ale přítomností receptoru pro annexin II na leukemických buňkách, který urychluje tvorbu plazminu (Levi 2009).

Nádorové buňky solidních tumorů mohou exprimovat různé prokoagulační aktivátory včetně tkáňového faktoru, který reaguje s faktorem VIIa, a vede tak k aktivaci faktorů IX a X a tzv. nádorových prokoagulantů, což jsou cysteinové proteázy schopné aktivovat faktor X (Falangová 1998). Výskyt TF byl prokázán ve vaskulárních endoteliálních buňkách nebo nádorových buňkách karcinomu mléčné žlázy (Rickles a Brenner 2008). Bez ohledu na funkci TF jako kofaktoru srážlivosti krve se předpokládá, že je rovněž zapojen do tvorby metastáz a nádorové angiogeneze (Zhang a kol. 1994). Nádorové prokoagulanty jsou endopeptidázy nacházející se v extraktech nádorových buněk i v plazmě pacientů se solidními tumory. Přesná role nádorových prokoagulantů v patogenezi DIC je nejasná (Levi 2009). Dalším mechanismem, kterým mohou nádorové buňky přispívat k patogenezi DIC, je exprese fibrinolytických proteinů. Navzdory schopnosti mnoha maligních buněk exprimovat aktivátory plazminogenu, jako např. urokinázový a tkáňový typ aktivátoru plazminogenu, vyvolává většina nádorů spíše hypofibrinolytický stav. Vzhledem k tomu, že je DIC obecně charakterizována blokací fibrinolytického systému, zejména z důvodu vysoké hladiny PAI-1, může představovat alternativní mechanismus pro rozvoj DIC u nádorového procesu (Levi 2009).

Prakticky všechny cesty, které se podílejí na vzniku DIC jsou řízeny cytokiny. IL-6 byl identifikován jako jeden z nejdůležitějších prozáněťových cytokinů, který je schopný indukovat expresi TF na buňkách. Mezi další cytokiny podílející se na systémové aktivaci koagulace patří IL-1 β a IL-8. Mezi protizáněťové cytokiny je řazen IL-10, který je schopen DIC inhibovat. Vzhledem k tomu, že mnoho typů nádorů má schopnost syntetizovat a

uvolňovat cytokiny, je pravděpodobné, že na cytokinech závislá modulace koagulace a fibrinolýza hraje významnou roli také v nádorově podmíněném rozvoji DIC (Levi 2009).

1.3. Laboratorně diagnostické možnosti

Doposud neexistuje dostatečně senzitivní a specifický test nebo kombinace testů pro stanovení diagnózy DIC a ve většině případů je považována za diagnostickou přítomnost onemocnění spjatého s DIC s kombinací více laboratorních nálezů (Taylor a kol. 2001, Bick 1996, Levi a kol. 2009). Laboratorní testy umožňují zejména odlišení DIC od jiných hemostatických poruch, jako např. otravy vitaminem K nebo selhání jater, avšak pokud se vyskytují současně, není diferenciací jednoduchá. Na základě testů však lze stanovit závažnost DIC a odpověď na terapii a s tím související prognózu pacienta (Fourrier a kol. 1992). Většina pacientů s DIC má primárně protrombotický stav a pouze mírnou aktivaci fibrinolýzy, avšak existují výjimky s nadměrnou aktivací fibrinolýzy s následkem snížené hladiny fibrinogenu, plazminogenu, faktorů V a VIII a elevací degradačních produktů fibrinu (Fiegl a kol. 1999, Levi a kol. 2000).

Vzhled k aktuálním poznatkům o DIC se pro její diagnostiku zdá být nezbytné stanovení rozpustného fibrinu. Počáteční studie naznačovaly, že elevace rozpustného fibrinu nad referenční mez je diagnostická pro DIC (Bredbacka a kol. 1994). Většina klinických studií udává velmi vysokou senzitivitu (90-100 %), avšak velmi nízkou specifičnost. Dominantním problémem je nedostupnost hodnověrného testu pro kvantifikaci rozpustného fibrinu v plazmě – mezi jednotlivými metodami je značná variace i v humánní medicíně (McCarron a kol. 1999, Horan a Francis 2001). Relativně dostupným testem je stanovení fibrin/fibrinogen-degradačních produktů (FDP). Jeho nevýhodou však je to, že test nerozlišuje mezi produkty křížově spojeného fibrinu a degradací fibrinogenu, která může být překvapivě vysoká (Boisclair a kol. 1990). Novější metody jsou specificky namířeny na detekci antigenů

na degradovaném křížově spojeném fibrinu. D-dimery jsou u pacientů s DIC zvýšeny, avšak podobně jako FDP neumožňují odlišit venózní tromboembolii (Carr a kol. 1989, Levi a kol. 2002).

Dynamika DIC může být hodnocena měřením aktivačních markerů, které jsou vyloučeny při konverzi zymogenů koagulačních faktorů na aktivní proteázu. Jde například o aktivační fragmenty protrombinu F1+2 nebo aktivační peptidy faktorů IX a X (Teitel a kol. 1982, Boisclair a kol. 1990). Oba jsou u pacientů s DIC zvýšeny. Zvýšené koncentrace komplexu trombin-antitrombin mohou odrážet zvýšenou tvorbu trombinu. Trombinem zprostředkovaná konverze fibrinogenu na fibrin pak může být detekována pomocí zvýšených hladin aktivačního peptidu fibrinogenu – fibrinopeptidu A (FPA) (Nossel a kol. 1974). Ačkoliv je elevace těchto parametrů přítomna u pacientů s DIC, a umožňuje tak odlišit i mírnou aktivaci koagulace, není pro DIC specifická a může být do značné míry ovlivněna způsobem odběru krve. Nevýhodou je rovněž nedostupnost testů v rámci rutinní hemostazeologie v humánní medicíně a absence validovaných kitů ve veterinární medicíně.

Počet trombocytů je velmi citlivým testem pro diagnostiku DIC a silně koreluje s markery generování trombinu, jelikož je trombinem indukovaná agregace trombocytů odpovědná za konzumpci destiček (Neame a kol. 1980). Protože je jednorázové stanovení počtu trombocytů nevypovídající, doporučuje se stanovení v intervalech 1-4 hodin – stabilní počet trombocytů naznačuje, že formování trombinu bylo ukončeno. Trombocytopenie sama o sobě není pro DIC diagnostická vzhledem ke spektru onemocnění, která vedou k poklesu jejich počtu (Levi 2002).

Konzumpce koagulačních faktorů vede k jejich nízkým hladinám a jejich aktivita koreluje se závažností DIC. Plazmatické hladiny koagulačního faktoru VIII jsou paradoxně během DIC zvýšeny pravděpodobně kvůli masivnímu vyloučení vWF z endotelu. Měření fibrinogenu bylo široce doporučováno jako vhodný ukazatel pro diagnostiku DIC, avšak ve většině případů není pro diagnózu DIC až tak nápomocný. Fibrinogen je rovněž protein akutní fáze a i navzdory konzumpci během DIC mohou být jeho hladiny po dlouhou dobu nevychýlené. Studie na člověku udávají senzitivitu

nízké hladiny fibrinogenu asi 28 % (Levi a kol. 1999). Plazmatické hladiny fyziologických inhibitorů srážení krve jsou při diagnostice DIC užitečné. Antitrombin je hlavním inhibitorem trombinu a během nadměrné tvorby trombinu v počátku DIC je rychle spotřebován. Obdobně to platí pro protein C (Mesters a kol. 1996).

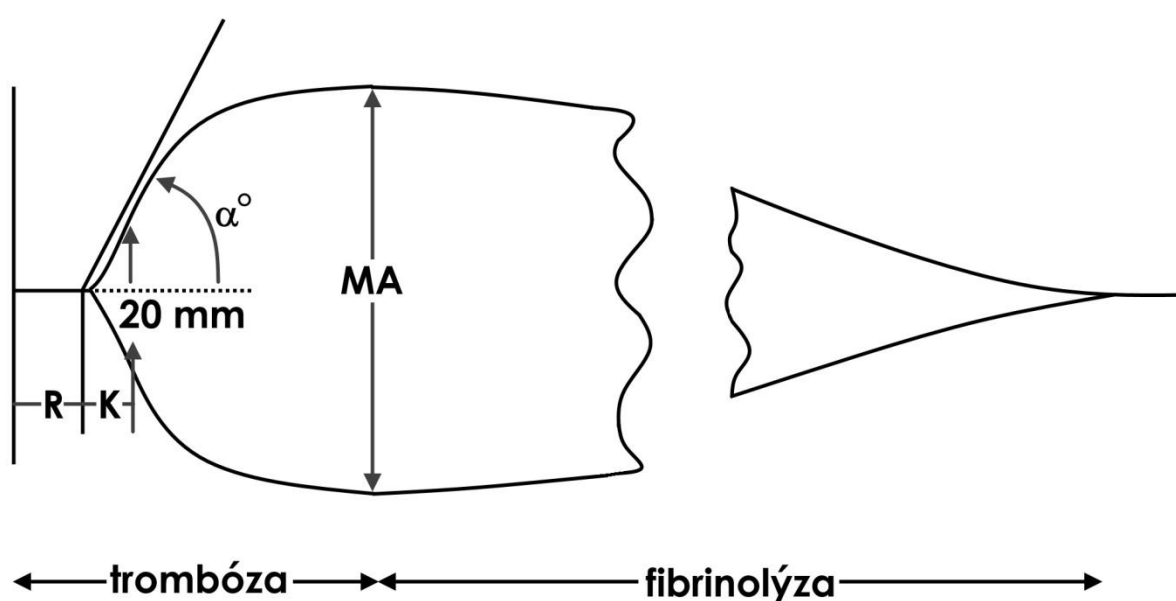
V neposlední řadě je možné využít testy hodnotící nadměrnou fibrinolytickou aktivitu. Navzdory fibrinolytickým procesům se zdá, že degradační produkty fibrinu korelují lépe s tvorbou fibrinu než s jeho degradací. Pro hodnocení fibrinolytické aktivity je vhodné stanovit koncentraci plazminogenu nebo α_2 -antiplazminu – nízké hladiny těchto proteinů ukazují na jejich konzumpci. Vzhledem k relativně nízkým koncentracím α_2 -antiplazminu se tento přístup zdá být vhodnějším ukazatelem dynamiky fibrinolýzy (Wada a kol. 1995). Na druhou stranu je α_2 -antiplazmin vzhledem k jeho nízkým koncentracím náchylný na vyčerpání a inhibice fibrinolýzy může být zprostředkována antitrombinem, α_2 -makroglobulinem, α_1 -antitrypsinem a C_1 -inhibitorem. Zdánlivě nedostatečná fibrinolytická aktivita u pacientů s DIC je přičítána vysokým hladinám inhibitoru aktivátoru plazminogenu typu I, jehož hladiny jsou u lidí s DIC zvýšeny a silně korelují se špatnou prognózou (Levi a kol. 1993, Gando a kol. 1995).

Kromě testování jednotlivých složek koagulace je možné hodnotit celý proces komplexně pomocí viskoelastických testů. Výhodou je, že na rozdíl od rutinních hemostazeologických testů mohou tyto testy lehce odhalit hyperkoagulační stav a posoudit celý proces formování trombu a fibrinolýzy včetně hodnocení síly sraženiny. Tromboelastografie (TEG) byla vyvinuta v roce 1948 a představuje efektivní monitoring srážení krve. Principem je oscilace kalíšku plné krve při teplotě 37°C, kde tvorbu sraženiny měří kovová jehla. Zvýšená tenze jehly je převáděna na elektrický signál, který je na obrazovce zobrazován jako křivka (obr. 5).

Současně se měří zejména tyto parametry:

- *reakční čas (R, [min])* – čas od začátku testu do zahájení formování fibrinu,

- čas K [min] – čas od počátku koagulace do vytvoření sraženiny o definované síle (20 mm),
- úhel α [°] – vyjadřuje odklon TEG křivky od horizontální linie v čase K (hodnotí rychlost vzniku vazeb mezi fibrinovými vlákny a tím pevnost koagula – reprezentuje úroveň fibrinogenu),
- maximální amplituda (MA, [mm]) – odpovídá maximální pevnosti sraženiny,
- LY30 [%] – vyjadřuje podíl fibrinolýzy 30 min po dosažení MA.



Obrázek 5: Schéma tromboelastografie (upraveno podle Thakura a Ahmedy 2012)

Podle studie Wiinberga a kol. (2008), která byla prováděna na 50 psech s DIC, je nejčastějším tromboelastografickým nálezem hyperkoagulace. Navzdory tomu byla hyperkoagulace protektivní ve vztahu k prognóze, kdy psi s hypokoagulačním nálezem měli 2,4× vyšší riziko 28denní mortality oproti jedincům s hyperkoagulačním nálezem.

1.3.1. Diagnostická kritéria

Diagnóza DIC je postavena na základě splnění určitých kritérií. Tato kritéria prodělala v průběhu více než půlstoletí řadu modifikací. V 70. letech 20. století bylo navrženo několik systémů hodnocení DIC, ale kompletní laboratorně diagnostický profil pro DIC byl stanoven až v roce 1979 Japanese Ministry of Health and Welfare (tab. 2). Kritéria umožňovala stanovení diagnózy a skóring DIC na základě probíhající nemoci, klinické manifestace a laboratorních nálezů. Nejčastějšími onemocněními asociovanými s DIC byly leukemie, infekční onemocnění, solidní tumory, gynekologická onemocnění a aortické aneuryzma. Abnormality hemostazeologických vyšetření byly součástí hodnotícího systému a terapie byla považována za úspěšnou na základě zlepšení DIC skóre, laboratorních hodnot a klinického stavu. V roce 1987 proběhla revize diagnostických kritérií a byl přidán poměr PT a další koagulační molekulární markery. Tato kritéria byla v Japonsku brána jako oficiální a byla často používána nebo citována jako diagnostická kritéria pro DIC v Asii, Evropě a Severní Americe (Wada 2004).

Tabulka 2: Různá diagnostická kritéria pro DIC (upraveno podle Wady 2004)

		Trombs	PT	FBG	FDP	TT	aPTT	AT	FRG	BLEE
Colman a kol..	1974	•	•	•	•	•				
Al-Mondhiry	1975	•	•	•	•	•				
Matsuda	1976	•		•	•					
Siegal a kol.	1978	•	•	•	•	•	•			•
JMHW	1979	•	•	•	•			•	•	
Spero a kol..	1980	•		•	•					•
JMHW^a	1988	•	•	•	•					
ISTH/SSC	2001	•	•	•	• ^b					

Vysvětlivky: Trombs – celkový počet trombocytů, PT – protrombinový čas, FBG – fibrinogen, FDP – fibrin/fibrinogen-degradační produkty, TT – trombinový čas, aPTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas, AT – antitrombin, FRG – fragmenty erytrocytů, BLEE – krvácivé příznaky, JMHW – Japanese Ministry of Health and Welfare, ISTH – International Society of Thrombosis and Haemostasis, SSC – Scientific and Standardization Committee

^a Podporující markery: trombinu – trombin-antitrombin komplex (TAT), plasmin-

α_2 -plasmin inhibitor komplex, rozpustný fibrin (SF), D-dimery, změna FDP, trombocytů nebo fibrinogenu

^b Fibrin-související produkty: FDP, D-dimery nebo SF

Celosvětové uplatňování přístupu, který využívá skórování systémové zánětové odpovědi a hodnocení orgánového selhání spojeného se sepsí, podnítilo snahy o standardizaci diagnostických kritérií DIC. V roce 1999 proto byla ustanovena pracovní skupina pro DIC v rámci ISTH. Výsledkem bylo rozdělení DIC na dvě kategorie: tzv. zjevné DIC („overt-DIC“) a skryté DIC („non-overt-DIC“) (Taylor a kol. 2001, Wada 2004).

Kritéria pro zjevnou formu DIC zahrnují laboratorní výsledky, které jsou měřeny většinou nemocnic a nevyžadují náročné přístrojové vybavení. Z laboratorních markerů se hodnotí počet trombocytů, formace fibrinu, protrombinový čas a koncentrace fibrinogenu. Zjevnou formu DIC má ten pacient, který získá více než pět bodů vypočtených z následujícího algoritmu (Taylor a kol. 2001):

1. Má pacient onemocnění, o němž je známo, že je spojené s DIC?

- *ano=0 b. (je však podmínkou pokračování algoritmu)*

2. Výsledky laboratorních testů

- *počet trombocytů:*
 - $>100 \times 10^9/l=0$ b.
 - $50-100 \times 10^9/l=1$ b.
 - $<50 \times 10^9/l=2$ b.
- *zvýšení FDP nebo rozpustného monomeru fibrinu:*
 - $ne=0$ b.
 - $střední=1$ b.
 - $výrazné=2$ b.
- *prodloužený protrombinový čas:*
 - <3 s.=0 b.
 - $3-6$ s.=1 b.
 - >6 s.=2 b.

- *koncentrace fibrinogenu:*
 - $>1 \text{ g/l}=0 \text{ b.}$
 - $<1 \text{ g/l}=1 \text{ b.}$

V případě skryté formy DIC je skórovací systém značně komplikovanější:

1. Má pacient onemocnění, o němž je známo, že je spojené s DIC?

- $\text{ano}=2 \text{ b.}, \text{ne}=0 \text{ b.}$

2. Výsledky laboratorních testů

- *počet trombocytů:* $>100 \times 10^9/\text{l}=0 \text{ b.}, <100 \times 10^9/\text{l}=1 \text{ b.}$
+ stoupá (-1 b.)/klesá (1 b.)/stabilní (0 b.)
- *zvýšení FDP n. rozpustného monomeru fibrinu:* $\text{ne}=0 \text{ b.}, \text{ano}=1 \text{ b.}$
+ stoupá (-1 b.)/klesá (1 b.)/stabilní (0 b.)
- *prodloužení protrombinový čas:* $<3 \text{ s.}=0 \text{ b.}, >3 \text{ s.}=1 \text{ b.}$
+ stoupá (-1 b.)/klesá (1 b.)/stabilní (0 b.)
- *specifické kritéria:* antitrombin – v normě (-1 b.)/nízký (1 b.)
protein C – v normě (-1 b.)/nízký (1 b.)
komplex trombin-antitrombin - v normě (-1 b.)/vysoký (1 b.)

Diagnostická kritéria pro DIC nebyla u psů zatím sjednocena. V minulosti byly klíčové následující podmínky: splnění primárního onemocnění, klinické příznaky a minimálně dva či více pozitivních laboratorních testů. Doposud chybí ve veterinární medicíně standardizace skóringu (typ, počet, mezní hodnoty) a navíc se citlivost laboratorních testů mezidruhově liší. Snížená aktivita antitrombinu a zvýšení FDP nebo D-dimerů patří mezi nejcitlivější testy pro diagnostiku DIC u psů, nikoli však u koček. Stejně tak může být obtížná diagnostika DIC u psů, kteří mají počet trombocytů v normě, navíc například u koček s DIC se trombocytopenie objevuje pouze v ojedinělých případech (Estrin a kol. 2006). Aplikaci modifikovaného ISTH skóre u psů se doposud věnovala pouze jedna studie (Wiinberg a kol. 2006). V této prospektivní studii autoři kombinovali kritéria ze zjevné a skryté formy DIC: 1. Přítomnost

onemocnění spojeného s DIC? Ano=2 b., Ne=0 b., 2. Kritéria: počet trombocytů $<100 \times 10^9/l = 1$ b., PT prodloužený >20 % oproti kontrole=1 b., D-dimery $>0,5$ mg/l=1 b. a aktivita antitrombinu <80 % oproti kontrole=1 b, přičemž zisk 5 bodů byl diagnostický pro přítomnost DIC. Tento systém porovnávali s tradičním hodnocením, které spočívalo ve splnění 3 a více kritérií. Při porovnání obou systémů měl modifikovaný ISTH systém vyšší specifičnost i vzhledem k mortalitě pacientů. Stejní autoři (Wiinberg a kol. 2010) vytvořili také model skórování DIC, který při mezní hodnotě $>0,401$ dosahoval senzitivitu 91 % a specifičnost 90 %; plocha pod křivkou (area under curve, AUC) měla hodnotu 0,958. Vzorec pro výpočet rizika DIC byl následovný:

$$\text{Logit} = 15,99 - 0,14 * [\text{fibrinogen}] - 2,52 * [\text{PT}] - 2,13 * [\text{aPTT}] + 0,28 * ([\text{aPTT}] * [\text{PT}]) + (5,41, \text{ pokud jsou D-dimery } >0,5 \text{ mg/l})$$

Kontroverzí v systému hodnocení DIC je počet trombocytů, protože v tomto případě je více směrodatná míra jejich poklesu než jejich aktuální celkový počet, avšak ta u většiny pacientů není známa. Právě navrhovaný model Wiinberga a kol. (2010) počet trombocytů nezohledňuje. Značnou nevýhodou je skutečnost, že model je použitelný pouze na metody stanovení hemostazeologických testů, které byly použity v jejich studii (Mischke 2010).

VLASTNÍ PRÁCE

1. CÍL PRÁCE

Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) je závažná komplikace řady onemocnění spojená s nadměrnou aktivitou koagulačního a fibrinolytického systému. Příčina vzniku DIC závisí na primárním onemocnění, v patogenezi je vždy prvním krokem aktivace koagulace. Ta může být způsobena zvýšenou expresí iniciátoru koagulace – tkáňového faktoru, úbytkem přirozených inhibitorů koagulace (antitrombinu, proteinu C, inhibitoru tkáňového faktoru) nebo alterací fibrinolýzy (zvýšení inhibitoru aktivátoru plazminogenu). Studie věnované DIC ve veterinární medicíně jsou zaměřené především na diagnostické možnosti tohoto syndromu. Role jednotlivých složek hemokoagulačního systému pro iniciaci DIC u různých onemocnění není známá, a tato studie si proto dává za cíl porovnat hladiny aktivátorů a inhibitorů koagulace a fibrinolýzy u různých skupin onemocnění, se kterými je vznik DIC spojen.

Cílem práce bylo:

- Posouzení incidence DIC u vybraných onemocnění
- Porovnání aktivátorů a inhibitorů koagulace a fibrinolýzy u jednotlivých onemocnění a zdravých zvířat
- Zhodnocení diagnostické výpovědi parametrů získaných metodou tromboelastografie u pacientů a zdravých zvířat
- Stanovení diagnostické výpovědi hemostazeologických testů pro diagnostiku DIC

2. MATERIÁL A METODIKA

1.1. Materiál

Celkem bylo do studie zahrnuto 40 psů (24 samic, 16 samců) přijatých na Kliniku chorob psů a koček Fakulty veterinárního lékařství VFU Brno. Jedinci byli zastoupeni 33 plemeny (tab. 2) s průměrnou hmotností 34 kg (min-max, 5,5-85,0 kg) a průměrným věkem 7,8 let (9 měsíců – 15,6 let). Zvířata byla podle onemocnění rozdělena do tří skupin: pacienti se septickým onemocněním („sepsa“), traumatizovaní pacienti („trauma“) a onkologičtí pacienti („onkologie“). Ve skupině sepsy bylo 12 psů, z toho 11 s pyometrou a jeden se septickou peritonitidou. Ve skupině traumata bylo 19 jedinců z toho 15 se syndromem dilatace a volvulu žaludku a 4 polytraumatizovaní pacienti po úrazu. Skupinu onkologických pacientů tvořilo 9 jedinců, z toho 7 jedinců s hemangiosarkomem a 2 s lymfomem.

Kontrolní skupinu tvořilo 50 klinicky zdravých jedinců (24 samic, 26 samců) následujících plemen: border kolie (n=6), labradorský retriever (n=5), anglický bulteriér (n=3), německý ovčák (n=3), zlatý retriever (n=4), doberman, německý boxer, francouzský buldoček, chodský pes (n=2), dlouhosrstá kolie, americký pitbulteriér, anglický springeršpaněl, český fousek, flat coated retriever, hovawart, kanárská doga, leonberger, Nova Scotia duck tolling retriever, pointer, rhodéský ridgeback, rotvajler, samojed, stafordširský bulteriér, střední knírač, velký švýcarský salašnický pes, vipet (n=1) a čtyři kříženci. Průměrná hmotnost psů v kontrolní skupině byla 25,7 kg (10 – 52 kg), věk 3,5 let (8 měsíců – 8 let).

Tabulka 2: Charakteristika pacientů

Č.	Plemeno	Věk [měs.]	Hmotnost [kg]	Pohlaví	Diagnóza
1	americký pitbulteriér	144	27,00	♂	lymfom
2	flat coated retrívr	121	30,5	♀ kastr.	hemangiosarkom
3	zlatý retrívr	156	37,00	♀ kastr.	hemangiosarkom
4	knírač malý	160	6,50	♀ kastr.	lymfom
5	bavorský barvář	133	23,00	♂	hemangiosarkom
6	flat coated retrívr	135	39,00	♂	hemangiosarkom
7	francouzský buldoček	73	14,40	♂	hemangiosarkom
8	bígl	175	12,00	♀	hemangiosarkom
9	sibiřský husky	126	29,50	♂	hemangiosarkom
10	neapolský mastin	31	63,00	♂	GDV
11	rhodéský ridgeback	94	40,00	♀ kastr.	GDV
12	akita inu	82	32,00	♂	GDV
13	něm. ohař krátkosrstý	120	31,00	♀	GDV
14	dobrman	72	38,00	♂	GDV
15	irský vlkodav	41	85,00	♀	GDV
16	gordonsetr	65	30,00	♀ kastr.	GDV
17	výmarský ohař	49	39,00	♂	GDV
18	rotvajler	72	35,00	♂	autoúraz
19	berský salašnický pes	25	40,00	♀	GDV
20	Jack Russell teriér	40	6,20	♂	autoúraz
21	německý ovčák	72	37,00	♂	GDV
22	německý ovčák	101	61,00	♂	GDV
23	jezevčík	111	7,40	♀	sřet s divočákem
24	akita inu	118	29,30	♂	GDV
25	čínský chocholatý pes	9	5,50	♂	autoúraz
26	hovawart	152	29,60	♀ kastr.	GDV
27	irský vlkodav	50	63,00	♀	GDV
28	bernardýn	82	56,00	♀	GDV
29	jezevčík	26	9,90	♀	pyometra
30	labradorský retrívr	72	35,40	♀	pyometra
31	německý ovčák	113	39,50	♀	pyometra
32	americký buldok	141	38,50	♀	pyometra
33	šeltie	146	11,35	♀	pyometra
34	cane corso	58	30,00	♀	pyometra
35	búrský buldok	36	68,00	♀	pyometra
36	kavkazský pasteř. pes	108	63,00	♂	sept. peritonitida
37	foxteriér	84	8,00	♀	pyometra
38	tibetská doga	58	44,00	♀	pyometra
39	německý vlčí špic	187	17,60	♀	pyometra
40	rotvajler	102	47,50	♀ kastr.	pyometra

Vysvětlivky: červeně – skupina onkologie, modře – skupina trauma, oranžově –

skupina sepse, GDV – dilatace a volvulus žaludku

1.1.1. Odběr krve a zpracování vzorků

Od všech probandů byla odebrána krev z *vena jugularis* nebo *vena cephalica accessoria*. Pro hematologické vyšetření bylo odebráno 0,5 ml krve do zkumavky s obsahem kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA, Dispolab, s.r.o., Česká republika). Krev o objemu 4 ml byla odebrána do zkumavky s citrátem (Dispolab, s.r.o., Česká republika), byla rozdělena - 2 ml pro tromboelastografii a 2 ml pro hemostazeologické vyšetření. Pro získání krevního séra byly odebrány 3 ml krve do zkumavek s obsahem granul pro urychlení srážení krve (Dispolab, s.r.o., Česká republika).

1.1.1.1. Hematologické vyšetření

Hematologické vyšetření (celkový počet leukocytů, erytrocytů a trombocytů, hladina hemoglobinu, hematokrit, střední objem erytrocytu, střední obsah hemoglobinu v erytrocytu, střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech) bylo provedeno do 10 min od odběru 0,5 ml krve do zkumavky s obsahem EDTA (Dispolab, s.r.o., Česká republika) na automatickém hematologickém analyzátoru (Celltac Alpha, Nihon Kohden, Japonsko). Krevní nátěry byly obarveny panopticky (Hemacolor, Dispolab s.r.o., Česká republika)

1.1.1.2. Rutinní hemostazeologické vyšetření

První část citrátované krve (2 ml) byla ihned centrifugována při 3000 otáčkách/min po dobu 15 min a uskladněna při -70 °C do doby analýzy (maximálně 2 týdny). Ze vzorků citrátové plazmy byl stanoven aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT), protrombinový čas (PT) a hladina fibrinogenu (FBG) na dvoukanálovém analyzátoru (Coatron M2, Tecco, Německo).

Měření protrombinového času (Quickův test)

Pro měření protrombinového času (PT) byla měřicí kyveta temperována na teplotu 37 °C po dobu jedné min souběžně s kyvetou obsahující reagensii Tromboplastin-S (Dialab, s.r.o., Česká republika) a kyveta s plazmou probanda. Následně bylo do měřicí kyvety aplikováno 25 µl krevní plazmy a po uplynutí inkubační doby 30 s bylo přidáno 50 µl reagensie Tromboplastin-S. Měření bylo ukončeno vytvořením fibrinového vlákna.

Měření aktivovaného parciálního tromboplastinového času

Pro měření aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT) byla měřicí kyveta souběžně s kyvetami obsahujícími reagensie aPTT-EA (Dialab, s.r.o., Česká republika), 0,025M CaCl₂ (Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika) a plazmu temperována na 37 °C po dobu jedné min. Následně bylo do měřicí kyvety aplikováno 25 µl krevní plazmy a 25 µl reagensie aPTT-S. Směs byla inkubována po dobu 3 min. Po aplikaci 25 µl roztoku 0,025M CaCl₂ byl měřen aPTT. Měření bylo ukončeno vytvořením fibrinového vlákna.

Měření koncentrace fibrinogenu

Pro měření koncentrace fibrinogenu (FBG) byla měřicí kyveta a kyveta s plazmou temperována na 37 °C po dobu jedné min, následně do ní bylo aplikováno 50 µl ředěné krevní plazmy (ředění plazmy probanda 1:10–50 µl plazmy a 450 µl fyziologického roztoku nebo imidazolového pufru; směs dobře promíchána). Plazma byla inkubována po dobu 90 s a následně bylo přidáno 50 µl reagensie 100 NIH Trombin (bovinní trombin, 100 NIH U/ml, Dialab, s.r.o., Česká republika) bez předchozí temperance. Přidáním reagensie se začal měřit čas a měření bylo ukončeno vytvořením fibrinového vlákna. Přístroj odečte z kalibrační křivky množství FBG v plazmě.

1.1.1.3. Speciální hemostazeologické vyšetření

Druhá polovina citrátové krve (2 ml) byla bez předchozí centrifugace přímo využita na tromboelastografii. Ze vzorků citrátové krevní plazmy, stočené pro účely rutinního hemostazeologického vyšetření, byly následně stanoveny fibrin/fibrinogen-degradační produkty (FDP), koncentrace D-dimerů a aktivita antitrombinu (AT). Z krevního séra bylo provedeno stanovení tkáňového faktoru (TF), plazminogenu a inhibitoru aktivátoru plazminogenu (PAI) ELISA metodou podle pokynů výrobce.

Tromboelastografie

Pro účely tromboelastografie byly použity 2 ml citrátové krve. Stanovení bylo provedeno do 2 h po odběru. Do ampulky s modifikátorem (kaolin) se přidal 1 ml citrátové krve a obsah se promíchal. Do kyvety založené v analyzátoru (Thrombelastograph, TEG 5000, USA) bylo napipetováno 360 μ l krve z ampulky s modifikátorem (kaolin) a bylo přidáno 20 μ l 0,2 M CaCl_2 . Analyzátozem bylo měřeno 5 (R, K, úhel α , MA a LY30) základních parametrů koagulační formace a jejího rozpadu. Reakční čas (R) vymezuje rozmezí od spuštění analyzátoru do vytvoření prvního fibrinového vlákna. Dále se měří čas od zahájení formování koagula (K) až po dosažení jeho určité pevnosti. Úhel α udává dynamiku vývoje koagula. Maximální amplituda (MA) je měřítkem maximálního napětí nebo pevnosti koagula. LY30 je míra snížení MA po 30 min od dosažení jeho maximální hodnoty. Analýza probíhá minimálně po dobu 30 min od dosažení maximální amplitudy. Po celou dobu analýzy je nutné eliminovat jakékoli otřesy v okolí analyzátoru.

Měření koncentrace fibrin/fibrinogen-degradačních produktů

Fibrin/fibrinogen-degradační produkty (FDP) byly stanoveny latexaglutinační metodou (Diagnostica Stago, s.a.s., Francie). V prvním kroku je nutné citrátovou plazmu ředit 1:2 (50 μ l plazmy a 50 μ l glycinového pufru) a 1:8 (50 μ l plazmy a 350 μ l glycinového pufru). Na destičku se nanese do prvního oválu 20 μ l z titru 1:2 a do druhého 20 μ l z titru 1:8. Do třetího oválu je

napipetována negativní kontrola a do čtvrtého pozitivní kontrola. Do každého oválu je přidáno po 20 µl antigenu (suspenzi latexových částic s navázanou myší monoklonální protilátkou proti lidským FDP). K promíchání každého kroužku bylo použito speciální míchadlo na každou jamku zvlášť. Na závěr se s destičkou jemně krouživě pohybuje po dobu 3 min. V pozitivní kontrole a vzorku se vytvoří makroskopické aglutinace.

Měření koncentrace D-dimerů

D-dimery byly měřeny pomocí přístroje NycoCard Reader II (Nycocard, Axis-Shield PoC AS, Norsko). Do kruhové plastické kazety se středovou jamkou s mikroporézní membránou, kde je navázaná monoklonální anti-D-dimer protilátka, bylo aplikováno 50 µl promývacího roztoku (hovězí sérový albumin s detergenty, Nyco Card, D-Dimer Single Test, Norsko). Do jamky se poté aplikovalo 50 µl citrátové plazmy, následně bylo aplikováno 50 µl konjugátu (mikročásticemi zlata značené anti-D-dimery, Nyco Card, D-Dimer Single Test, Norsko). V posledním aplikačním kroku bylo pro vymytí přebytečného konjugačního činidla opětovně napipetováno 50 µl promývacího roztoku. Po nasáknutí promývacího roztoku bylo do 2 min provedeno NycoCard Reader II kvantitativní měření.

Stanovení aktivity antitrombinu

Aktivita antitrombinu byla stanovena z citrátové plazmy na Oddělení klinické hematologie FN, Brno-Bohunice chromogenní metodou (Stachrom AT III, Diagnostica Stago, s.a.s., Francie).

Stanovení hladin tkáňového faktoru (TF), plazminogenu a inhibitoru aktivátoru plazminogenu (PAI)

Z krevního séra bylo provedeno stanovení tkáňového faktoru (Canine Tissue Factor ELISA Kit, CUSABIO, Německo), plazminogenu (Plazminogen Dog ELISA Kit, Abcam, Francie) a inhibitoru aktivátoru plazminogenu (Dog plasminogen activator inhibitor 1 (SERPINE1) ELISA Kit, CUSABIO, Německo) ELISA metodou podle pokynů výrobce.

Absorbance byla měřena při 450 nm pomocí ELISA readeru (ELX808 Absorbance Microplate Reader, Bio Tele instruments, Inc., Highland park, Spojené státy americké). Zpracování kalibrační křivky a výpočet koncentrací ředěných vzorků byl proveden pomocí počítačového programu (Gen 5.0, BioTek Instruments, Inc., Highland park, Spojené státy americké).

1.1.2. Kritéria pro zařazení pacientů

Do studie byli zařazeni pacienti se třemi skupinami onemocnění. Do skupiny onkologie byli zařazeni psi s cytologicky nebo histologicky potvrzeným nálezem onkologického onemocnění při první prezentaci na veterinárním pracovišti. Do skupiny traumat byli zařazeni jedinci s chirurgicky potvrzenou dilatací a volvulem žaludku nebo s masivním traumatem následkem úrazu. Do skupiny sepse byli zařazeni jedinci s cytologicky potvrzenou bakteriální infekcí splňující kritéria sepse (Hauptman a kol. 1997).

1.1.3. Kritéria pro diseminovanou intravaskulární koagulaci

Zvířata byla na základě hematologického a hemostazeologického vyšetření rozdělena na DIC pozitivní a DIC negativní. Jedinci byli považováni za DIC pozitivní, pokud splnili minimálně 4 kritéria z následujících: snížený počet trombocytů ($<200 \times 10^9/l$), prodloužený protrombinový čas (>13 s), prodloužený aktivovaný parciální tromboplastinový čas ($>19,5$ s), snížená koncentrace fibrinogenu ($<1,5$ g/l), zvýšená koncentrace D-dimerů ($>0,3$ mg/l) nebo snížená aktivita antitrombinu (<105 %).

Tato kritéria byla modifikována podle Machidy a kol. (2010) a přizpůsobena výsledkům kontrolních psů.

1.1.4. Statistické zpracování

Pro vyhodnocení dat a stanovení diagnostické výpovědi byl použit program Statistica 6.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, USA) a MedCalc (MedCalc software bvba, Belgie). Porovnání mezi skupinami bylo provedeno pomocí Mannova-Whitneyova testu, stanovení diagnostické výpovědi pomocí receiver operating characteristics (ROC) křivky. Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$.

2. VÝSLEDKY

2.1. Posouzení incidence diseminované intravaskulární koagulace u jednotlivých onemocnění

Diagnostická kritéria pro DIC použitá v této práci (kap. 2.1.2.) byla upravena na základě výsledků kontrolních jedinců (tab. 3).

Tabulka 3: Hodnoty hemostazeologických testů u kontrolní skupiny

Parametr	Jednotky	Medián	Min	Max
Trombs	$\times 10^9/l$	274,0	104	463
PT	s	9,7	8,5	11,1
aPTT	s	19,7	15,1	23,7
FBG	g/l	1,40	0,59	2,49
D-dimery	mg/l	0,1	0,1	0,4
AT	%	126,5	105,0	138,0

Vysvětlivky: Trombs – celkový počet trombocytů, PT – protrombinový čas, aPTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas, FBG – fibrinogen, AT – antitrombin

V tabulce 4 jsou uvedeny výsledky vyšetření pacientů, u kterých bylo žlutě vyznačeno splněné kritérium pro DIC. Onkologická skupina byla co do počtu splněných kritérií nejpočetnější. Pět z devíti onkologických pacientů (56 %) splňovalo kritéria pro DIC. Ve skupině trauma byli tři pacienti se splněnými kritérii (16 %). Nejméně splněných kritérií bylo ve skupině sepse, a to pouze u pacienta se septickou peritonitidou (11 %).

Tabulka 4: Splnění kritérií pro DIC

Číslo	Trombs [×10 ⁹ /l]	PT [s]	aPTT [s]	FBG [g/l]	D-dimery [mg/l]	AT [%]	N ⁺
1	111	11,1	19,9	5,0	0,4	141	3
2	225	10,0	23,3	1,8	2,6	124	2
3	393	8,7	20,3	0,1	0,3	75	3
4	294	13,2	20,5	2,5	0,4	135	3
5	74	12,4	28,6	2,2	0,6	80	4
6	82	14,3	30,9	2,3	3,1	75	5
7	50	12,2	21,2	0,1	2,7	101	5
8	132	14,8	29,0	2,8	0,7	68	5
9	43	12,2	23,4	0,3	4,9	57	5
10	301	10,4	20,8	1,7	0,8	132	2
11	298	10,5	21,7	2,0	0,4	137	2
12	89	12,6	32,6	1,0	0,4	121	4
13	312	10,5	20,9	2,0	0,4	129	2
14	325	10,7	21,7	1,1	0,1	136	2
15	93	11,4	19,8	0,2	0,1	110	3
16	130	14,8	26,2	0,7	1,6	106	5
17	121	10,9	18,4	0,6	0,7	131	3
18	222	11,5	27,3	2,5	2,2	128	2
19	209	9,7	21,7	1,4	0,6	109	3
20	173	9,5	17,4	0,8	0,2	136	1
21	179	11,6	27,7	1,1	0,4	90	5
22	211	10,9	22,0	1,4	0,4	114	3
23	232	9,0	14,9	1,9	0,7	138	1
24	329	12,0	26,5	2,1	0,2	141	1
25	189	8,0	12,2	1,7	0,3	131	1
26	201	11,3	20,9	1,3	0,2	122	2
27	117	10,2	16,4	0,9	0,3	108	2
28	223	11,3	20,8	0,8	0,1	129	2
29	232	11,1	22,9	5,3	0,2	127	1
30	388	9,7	21,0	2,0	0,2	113	1
31	329	10,5	25,6	3,8	0,2	117	1
32	420	10,6	22,0	4,3	0,2	116	1
33	348	10,0	19,9	2,6	1,4	139	2
34	294	12,9	22,4	5,0	0,2	120	1
35	224	9,1	17,7	5,2	0,4	102	2
36	31	15,0	21,0	0,4	0,7	111	5
37	151	11,0	22,6	4,5	7,2	137	3
38	290	13,5	19,7	2,7	0,3	134	2
39	187	10,1	29,7	3,0	0,1	127	2
40	512	9,4	22,0	2,8	0,2	123	1

Vysvětlivky: červeně – skupina onkologie, modře – skupina trauma, oranžově –

skupina sepse, žlutě - splnění kritérií DIC u jednotlivých pacientů, Trombs – celkový počet trombocytů, PT – protrombinový čas, aPTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas, FBG – fibrinogen, AT – antitrombin, N⁺ – počet splněných parametrů pro DIC, odstíny šedé podle počtu splněných parametrů

2.2. Porovnání aktivátorů a inhibitorů koagulace a fibrinolýzy u jednotlivých onemocnění a zdravých zvířat

Výsledky aktivit antitrombinu, koncentrací tkáňového faktoru, plazminogenu a inhibitoru aktivátoru plazminogenu kontrolní skupiny jsou zobrazeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Hodnoty vybraných aktivátorů a inhibitorů koagulace u kontrolní skupiny

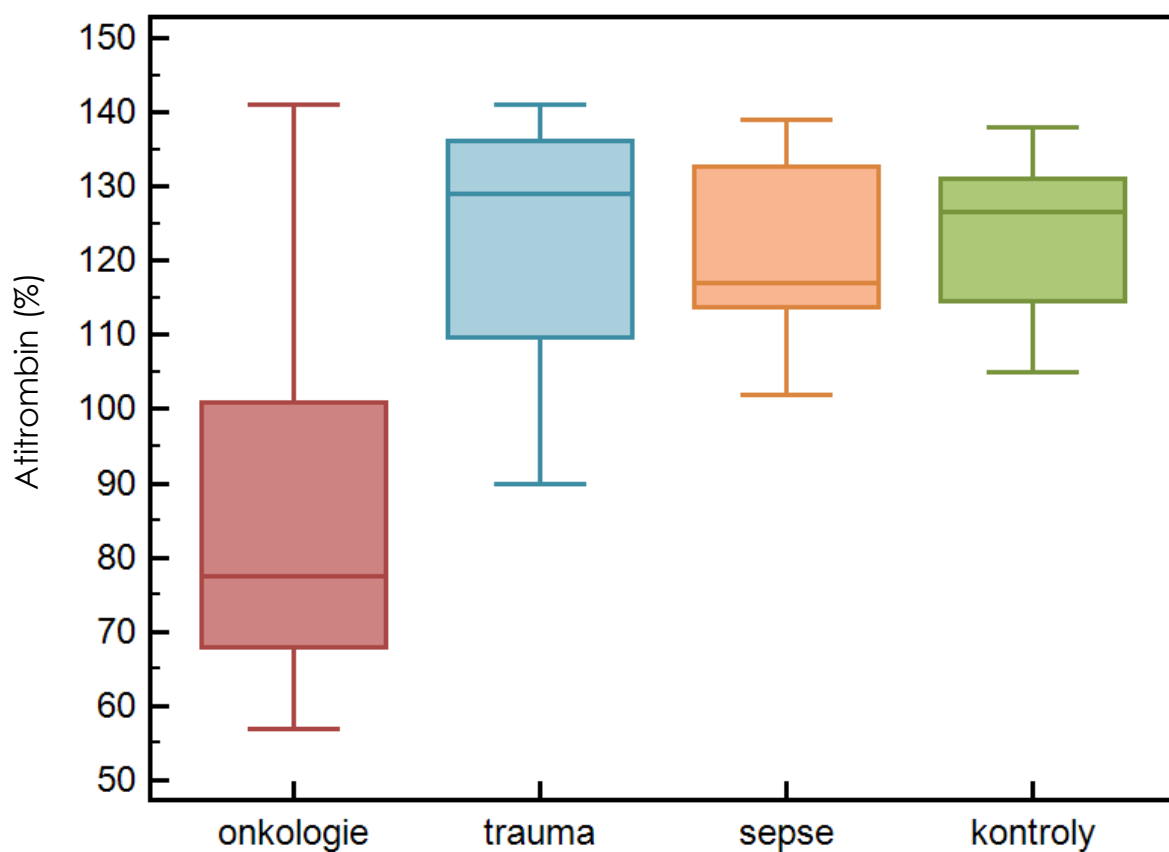
Parametr	Jednotky	Medián	Min	Max
AT	%	126,5	105,0	138,0
TF	pg/ml	0,000	0,000	430,172
Plazminogen	pg/ml	37,6	2,9	68,3
PAI	pg/ml	31,6	25,1	41,8

Vysvětlivky: AT – antitrombin, TF – tkáňový faktor, PAI - inhibitor aktivátoru plazminogenu

Aktivita antitrombinu (AT)

Aktivita AT (graf 1) byla signifikantně nižší ve skupině onkologie oproti skupině kontrolní ($p=0,015$), skupině sepse ($p=0,046$) a skupině trauma ($0,025$). Mezi ostatními skupinami signifikantní rozdíl nebyl.

Graf 1: Srovnání aktivity antitrombinu u jednotlivých skupin

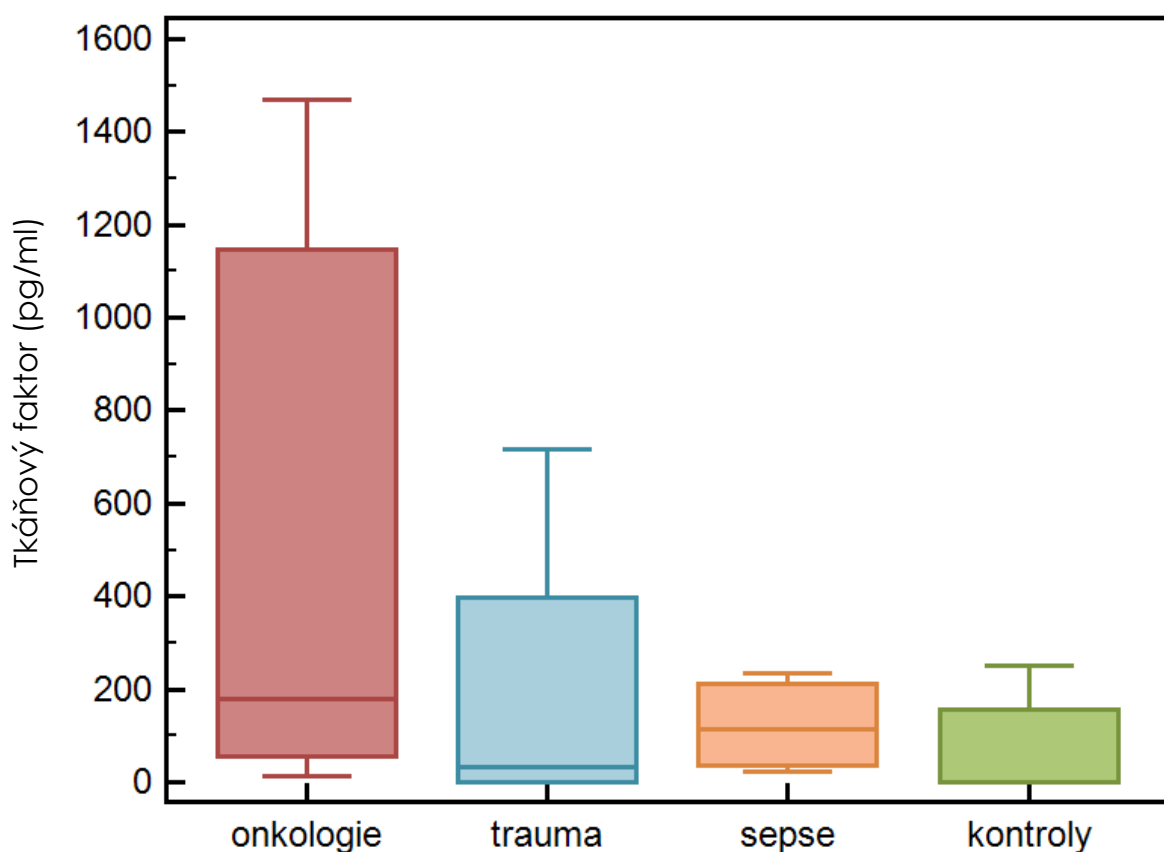


Vysvětlivky: Krabicový diagram znázorňuje 25% a 75% kvartil, úsečka ve čtverci medián a koncové úsečky minimální a maximální hodnotu po vyloučení extrémních hodnot.

Koncentrace tkáňového faktoru (TF)

Koncentrace TF (graf 2) byla signifikantně vyšší ve skupině sepse ($p=0,039$) oproti kontrolní skupině. Ve skupině onkologie byla pozorována tendence ($p=0,094$) k vyšším hladinám TF oproti kontrolní skupině. Mezi ostatními skupinami signifikantní rozdíl nebyl.

Graf 2: Srovnání koncentrace tkáňového faktoru u jednotlivých skupin

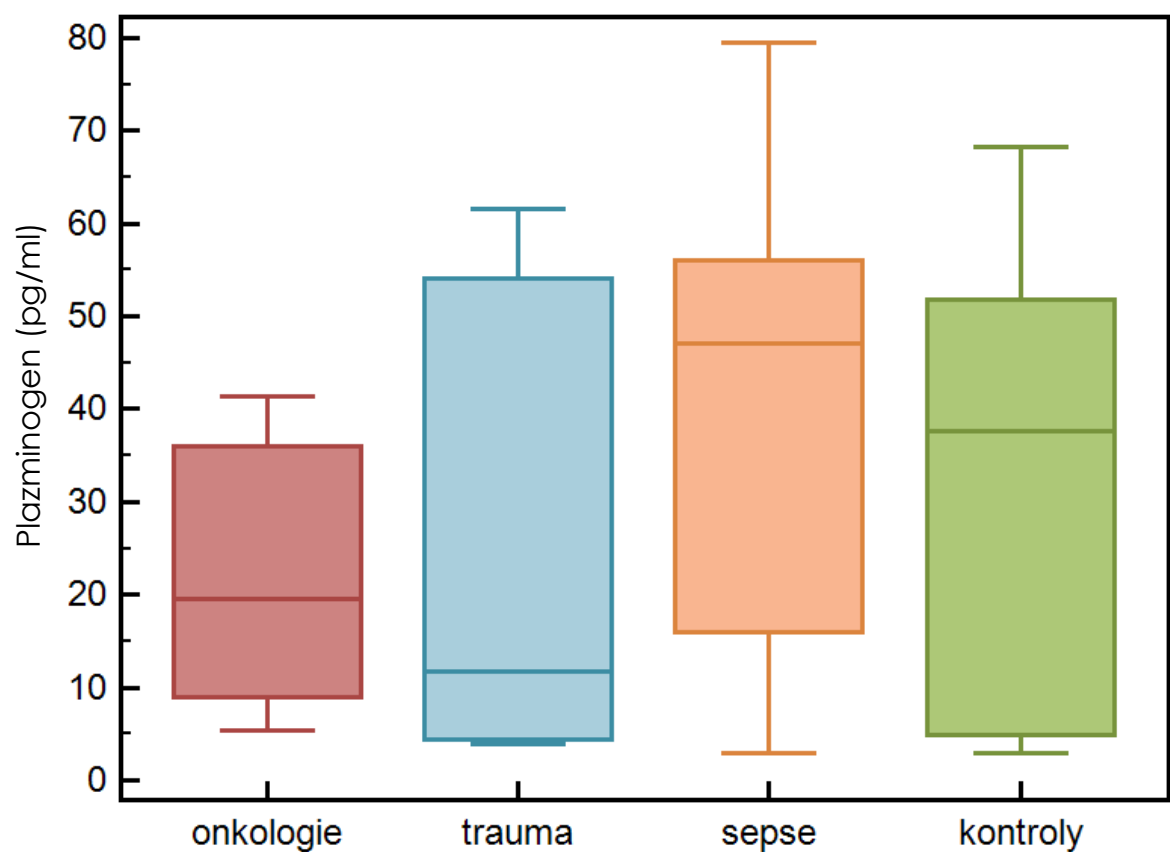


Vysvětlivky: Krabicový diagram znázorňuje 25% a 75% kvartil, úsečka ve čtverci medián a koncové úsečky minimální a maximální hodnotu po vyloučení extrémních hodnot.

Koncentrace plazminogenu

V koncentraci plazminogenu (graf 3) nebyl žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami.

Graf 3: Srovnání koncentrace plazminogenu u jednotlivých skupin

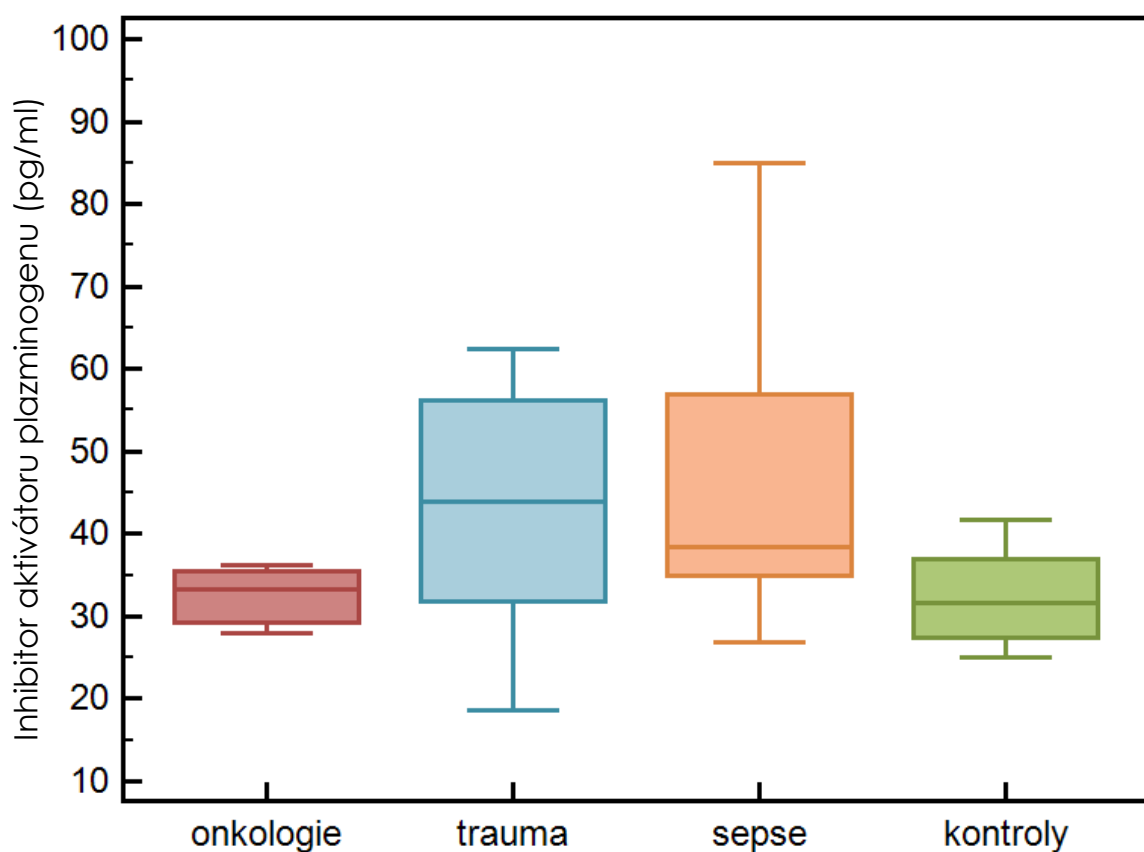


Vysvětlivky: Krabicový diagram znázorňuje 25% a 75% kvartil, úsečka ve čtverci medián a koncové úsečky minimální a maximální hodnotu po vyloučení extrémních hodnot.

Koncentrace inhibitoru aktivátoru plazminogenu (PAI)

V koncentraci PAI (graf 4) byl signifikantní rozdíl mezi skupinou sepse a kontrolní skupinou ($p=0,009$), skupinou onkologie ($p=0,025$) a skupinou trauma ($p=0,017$). Mezi kontrolní skupinou a skupinou trauma ($p=0,053$) byla patrná tendence k odlišným hodnotám. Mezi ostatními skupinami signifikantní rozdíl nebyl.

Graf 4: Srovnání koncentrace inhibitoru aktivátoru plazminogenu u jednotlivých skupin



Vysvětlivky: Krabicový diagram znázorňuje 25% a 75% kvartil, úsečka ve čtverci medián a koncové úsečky minimální a maximální hodnotu po vyloučení extrémních hodnot.

2.3. Zhodnocení tromboelastografie u jednotlivých onemocnění a zdravých zvířat

Srovnání pěti (R, K, úhel α , MA a LY30) základních tromboelastografických parametrů koagulační formace a jejího rozpadu u jednotlivých skupin je v tabulce 6, konkrétní hodnoty pacientů s DIC jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 6: Hodnoty základních tromboelastografických parametrů u jednotlivých skupin

Parametr	Funkce	Onkologie	Trauma	Sepse	Kontroly	DIC
R [min]	medián	2,15	2,8	3,2	3,4	3,8
	min	0,8	1,6	2,3	0,6	0,8
	max	6,8	4,5	7,5	7,2	6,8
K [min]	medián	1,5	2,2	1,2	2,1	2,4
	min	0,8	1,4	0,9	0,8	0,8
	max	15,9	6,9	4,0	3,6	15,9
Úhel α [°]	medián	66,7	62,8	75,0	64,2	60,2
	min	20,8	40,3	48,5	43,9	20,8
	max	80,7	71,9	78,6	76,9	80,7
MA [mm]	medián	53,8	50,1	65,1	48,8	50,1
	min	16,2	32,1	35,9	29,2	16,2
	max	69,1	63,9	78,6	67,2	69,6
LY30 [%]	medián	0,0	0,0	0,8	4,5	0,0
	min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	max	1,6	11,4	13,6	13,4	0,2

Vysvětlivky: R – reakční čas, K – čas od zahájení formování koagula, až po dosažení jeho určité pevnosti, MA – maximální amplituda, LY30 – míra snížení MA po 30 minutách

Tabulka 7: Tromboelastografické hodnoty u pacientů s DIC

Pacient	R [min]	K [min]	Úhel α [°]	MA[mm]	LY30 [%]
Onkologie 5	4,2	2,2	61,3	53,4	0,2
Onkologie 6	0,8	0,8	80,7	69,6	0,1
Onkologie 7	4,2	15,9	30,3	22,2	0,0
Onkologie 8	1,3	0,9	79,0	58,6	0,0
Onkologie 9	6,8	N/A	20,8	16,2	0,0
Trauma 12	3,5	6,9	40,3	32,1	0,0
Trauma 16	2,0	1,8	68,5	52,6	0,0
Trauma 21	4,3	2,6	58,8	50,1	0,0

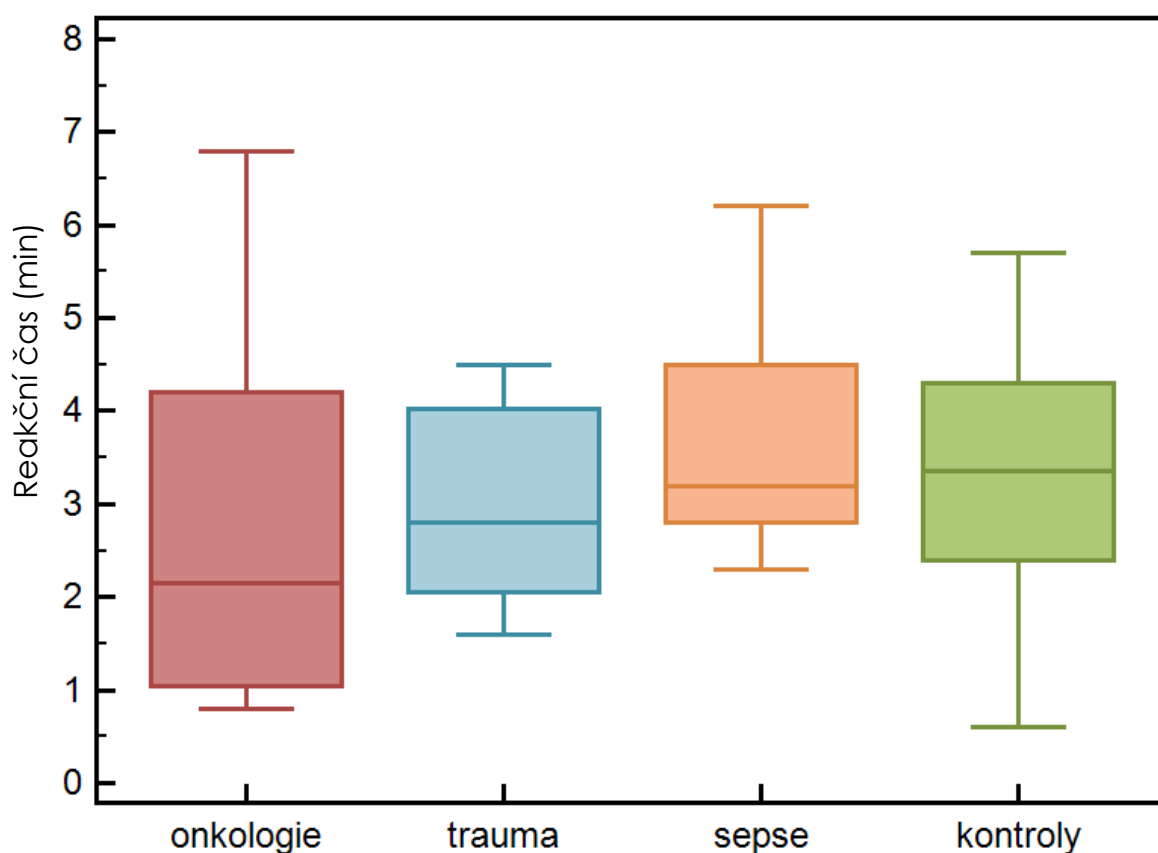
Sepse 36	3,8	4,0	60,2	35,9	0,0
-----------------	-----	-----	------	------	-----

Vysvětlivky: R – reakční čas, K – čas od zahájení formování koagula, až po dosažení jeho určité pevnosti, MA – maximální amplituda, LY30 – míra snížení MA po 30 minutách, N/A – nedosažení určité (amplituda 20 mm) pevnosti koagula

Reakční čas (R)

V hodnotách R (graf 5) nebyl žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami.

Graf 5: Srovnání reakčních časů u jednotlivých skupin

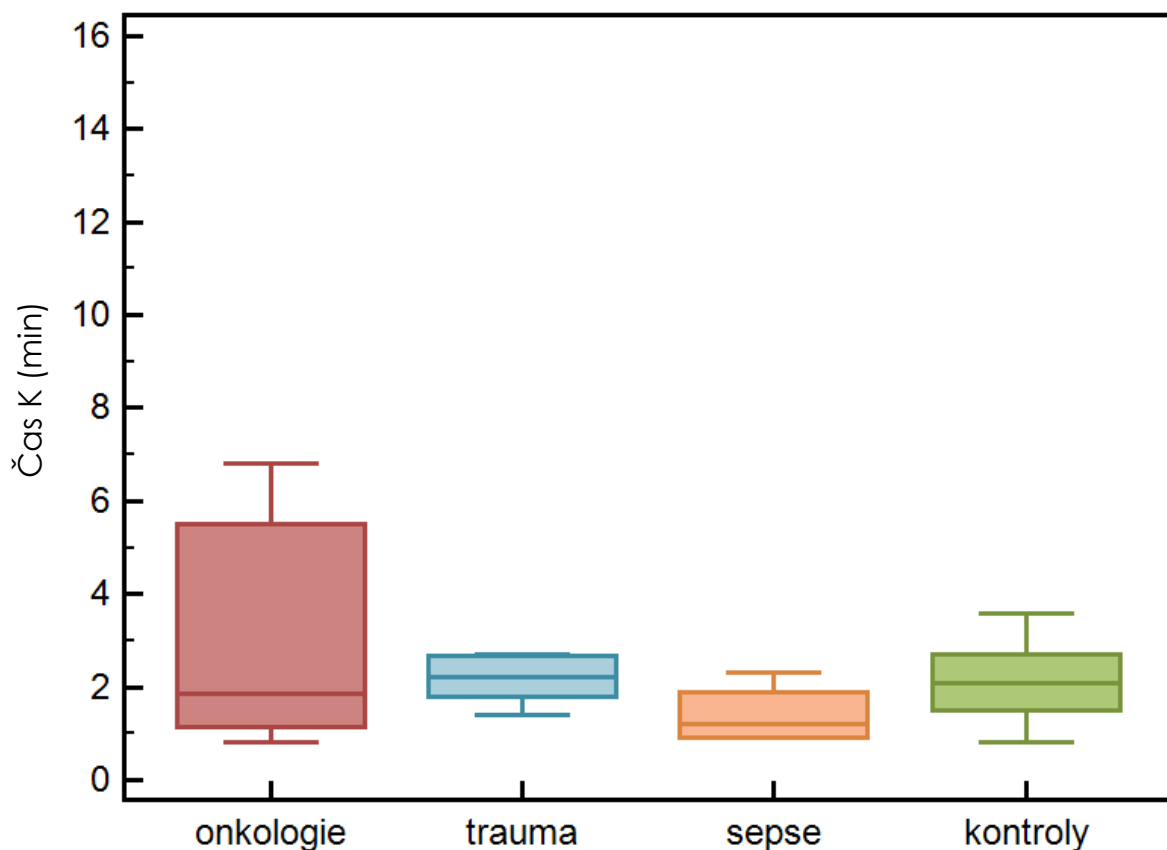


Vysvětlivky: Krabicový diagram znázorňuje 25% a 75% kvartil, úsečka ve čtverci medián a koncové úsečky minimální a maximální hodnotu po vyloučení extrémních hodnot.

Čas K

Pacienti s traumaty měli signifikantně kratší čas K (graf 6) oproti skupině sepse ($p=0,007$). Signifikantní rozdíl byl rovněž mezi kontrolní skupinou a skupinou sepse ($p=0,010$). Mezi ostatními skupinami signifikantní rozdíl nebyl.

Graf 6: Srovnání časů K u jednotlivých skupin

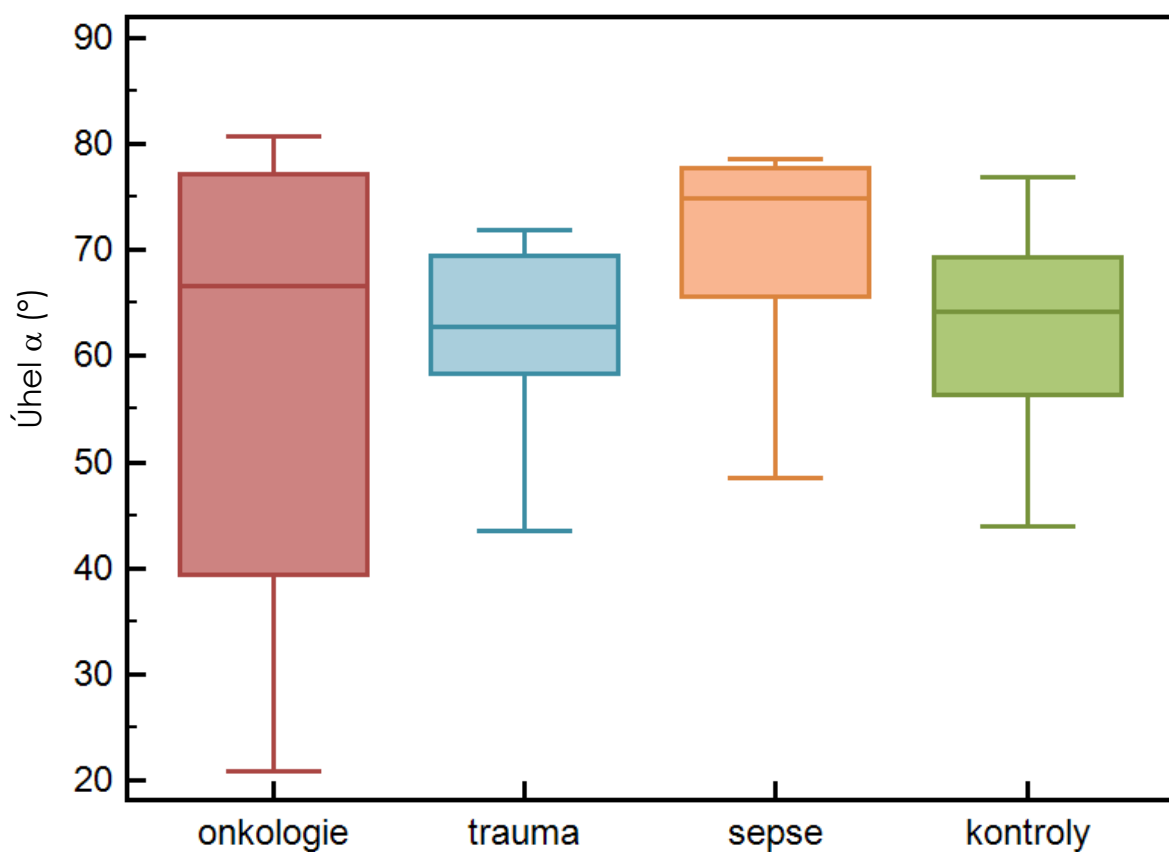


Vysvětlivky: Krabicový diagram znázorňuje 25% a 75% kvartil, úsečka ve čtverci medián a koncové úsečky minimální a maximální hodnotu po vyloučení extrémních hodnot.

Úhel α

Úhel α (graf 7) měli pacienti se sepsí signifikantně vyšší než kontrolní jedinci ($p=0,002$) a jedinci s traumaty ($p=0,007$). Mezi ostatními skupinami signifikantní rozdíl nebyl.

Graf 7: Srovnání úhlu α u jednotlivých skupin

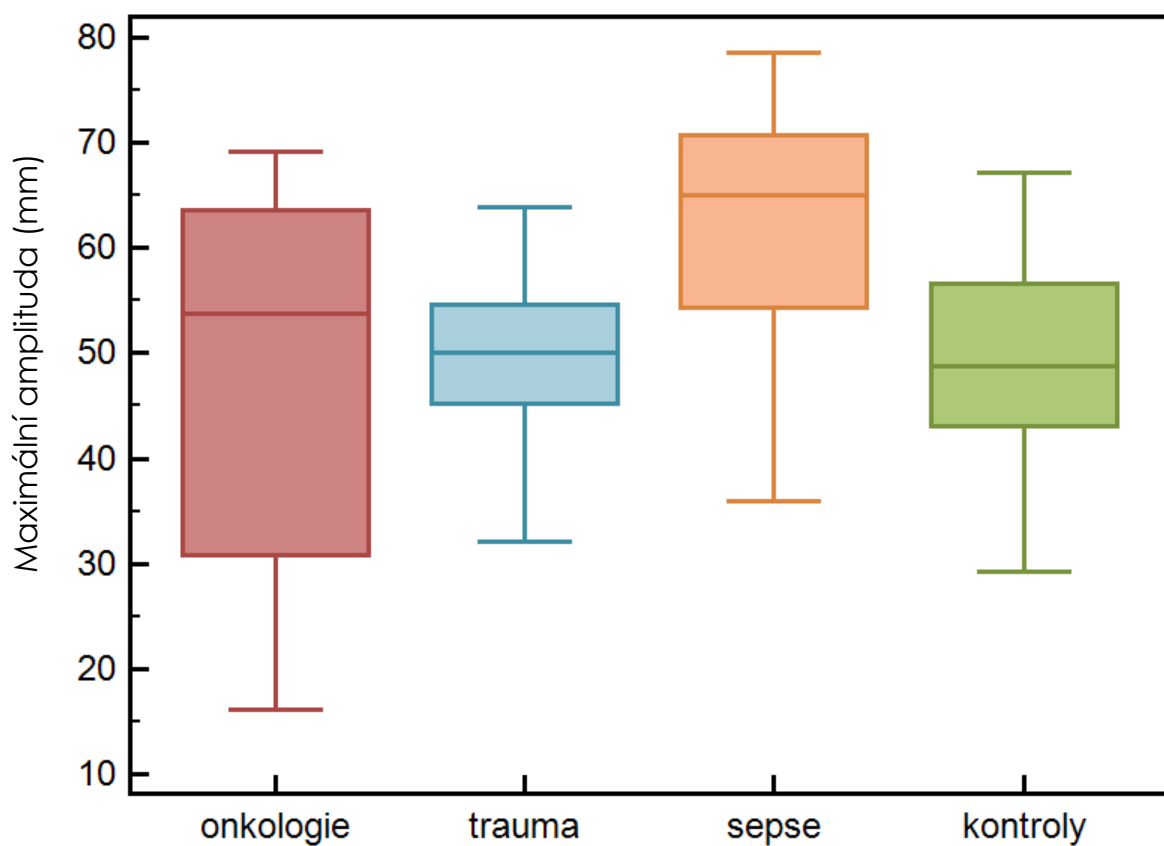


Vysvětlivky: Krabicový diagram znázorňuje 25% a 75% kvartil, úsečka ve čtverci medián a koncové úsečky minimální a maximální hodnotu po vyloučení extrémních hodnot.

Maximální amplituda (MA)

V míře MA (graf 8) byl vysoce signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou sepse ($p=0,002$). Signifikantní rozdíl byl mezi skupinou trauma a skupinou sepse ($p=0,012$). Mezi skupinou onkologie a skupinou sepse ($p=0,089$) byla patrná tendence k odlišným hodnotám. Mezi ostatními skupinami signifikantní rozdíl nebyl.

Graf 8: Srovnání míry maximální amplitudy u jednotlivých skupin

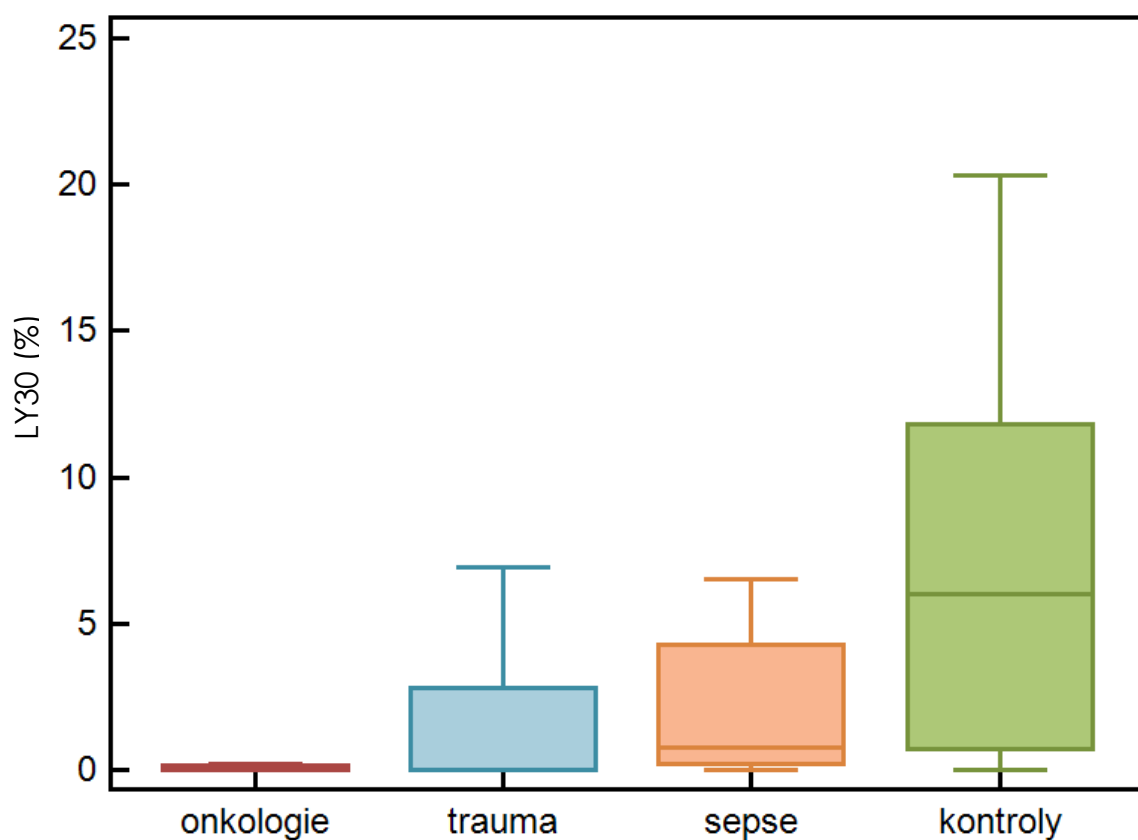


Vysvětlivky: Krabicový diagram znázorňuje 25% a 75% kvartil, úsečka ve čtverci medián a koncové úsečky minimální a maximální hodnotu po vyloučení extrémních hodnot.

LY30

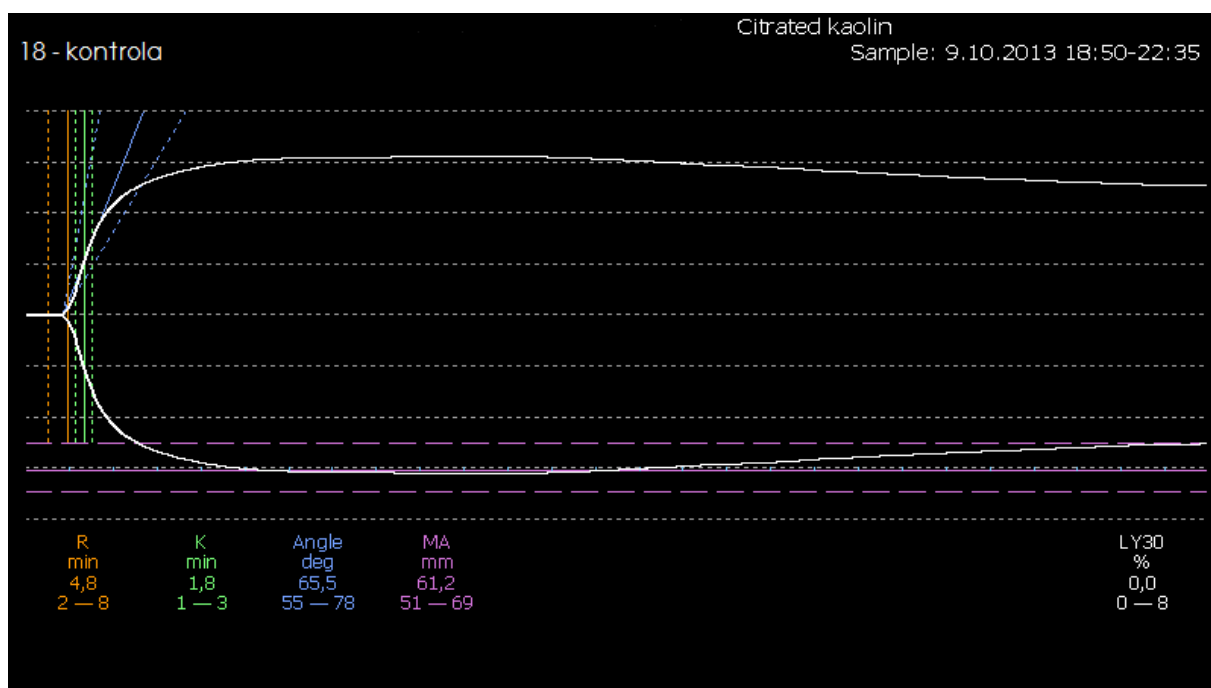
V hodnotách LY30 (graf 9) byl vysoce signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou onkologie ($p=0,004$) a mezi kontrolní skupinou a skupinou trauma (0,002). Mezi kontrolní skupinou a skupinou sepse ($p=0,064$) a mezi skupinou onkologie a skupinou sepse (0,059) byla patrná tendence k odlišným hodnotám. Mezi ostatními skupinami signifikantní rozdíl nebyl.

Graf 9: Srovnání LY30 u jednotlivých skupin



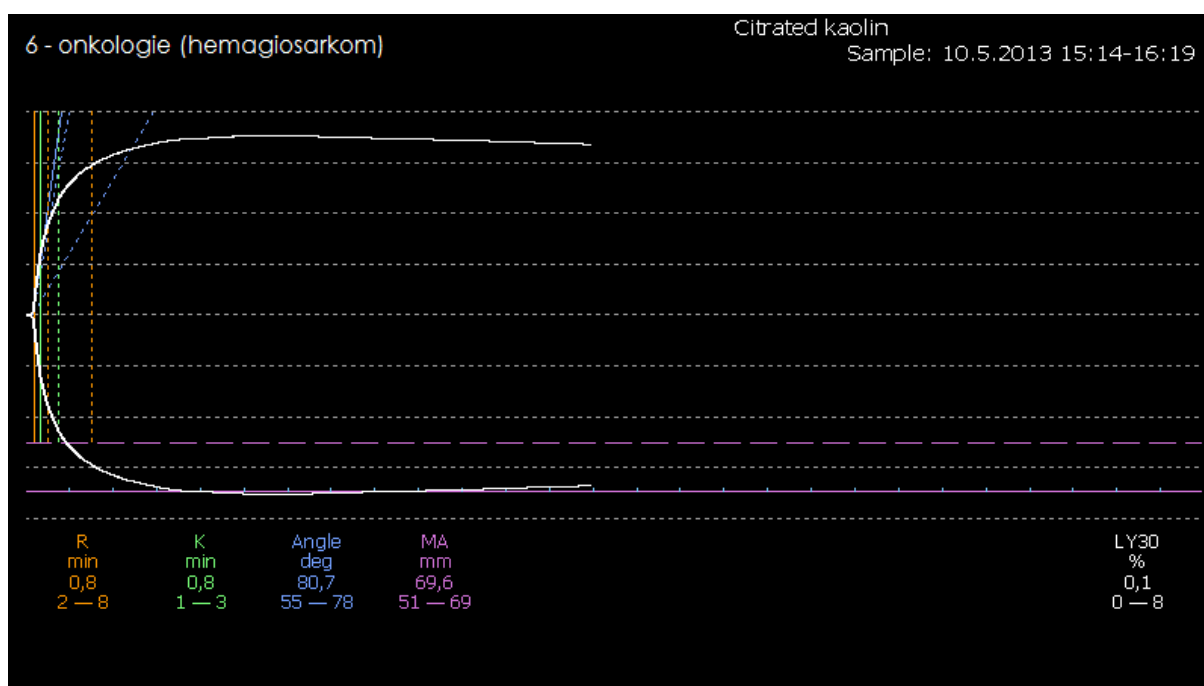
Vysvětlivky: Krabicový diagram znázorňuje 25% a 75% kvartil, úsečka ve čtverci medián a koncové úsečky minimální a maximální hodnotu po vyloučení extrémních hodnot.

Tromboelastografické křivky u vybraných jedinců



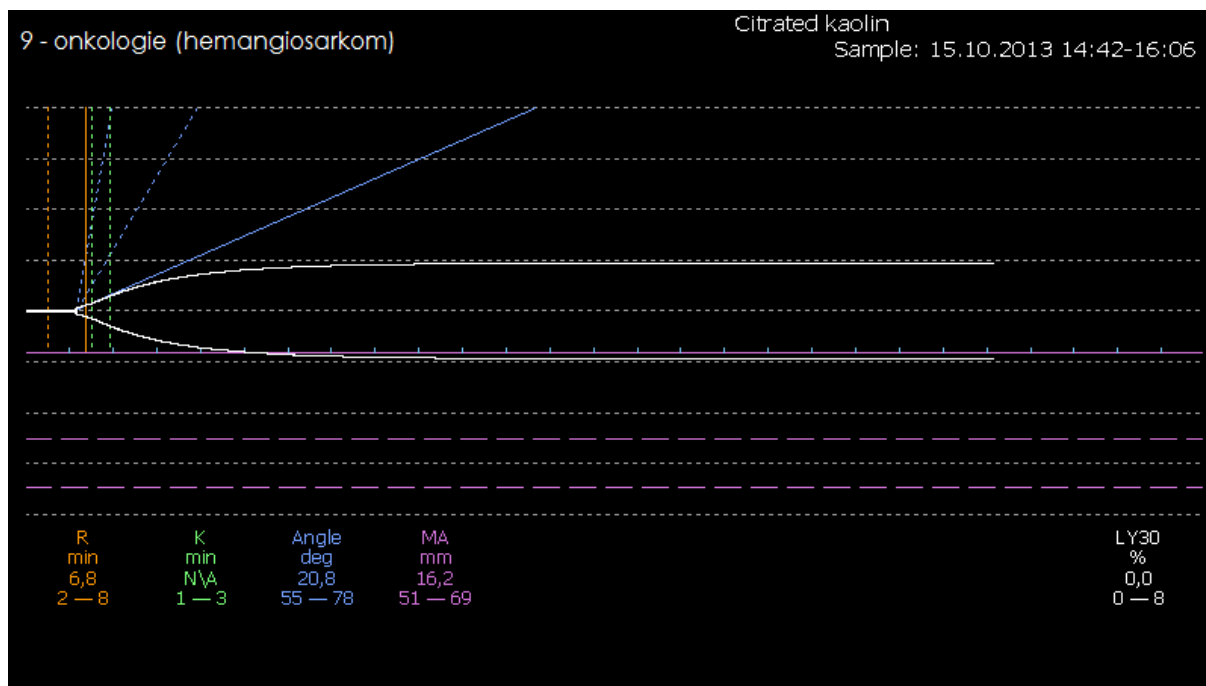
Obrázek 6: Normální tromboelastografická křivka u kontrolního jedince s pořadovým číslem 18

Vysvětlivky: R – reakční čas, K – čas od zahájení formování koagula až po dosažení jeho určité pevnosti, Angle (=úhel α) – hodnocení pevnosti koagula, MA – maximální amplituda, LY30 – míra snížení MA po 30 minutách



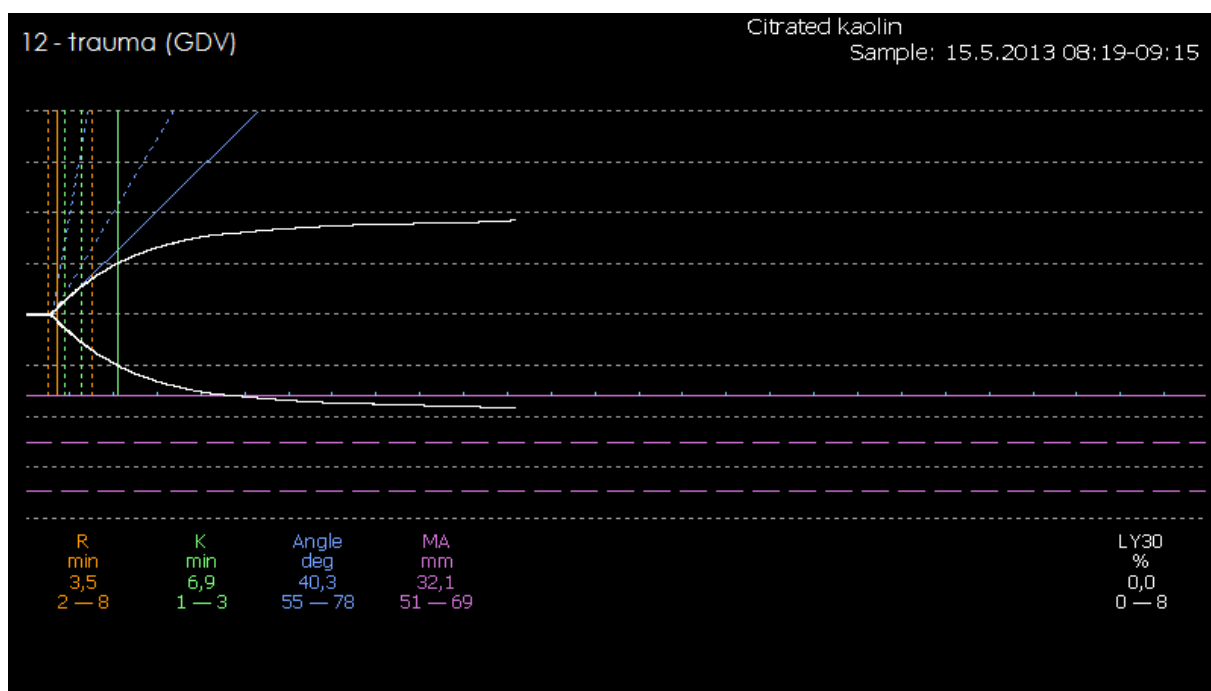
Obrázek 7: Tromboelastografie u pacienta ze skupiny onkologie (hemangiosarkom) s pořadovým číslem 6. Vyjadřuje trombocytární a enzymatickou hyperkoaguolabilitu signifikantní pro hyperkoagulaci s tendencí pro rozvoj DIC

Vysvětlivky: R – reakční čas, K – čas od zahájení formování koagula až po dosažení jeho určité pevnosti, Angle (=úhel α) – hodnocení pevnosti koagula, MA – maximální amplituda, LY30 – míra snížení MA po 30 minutách



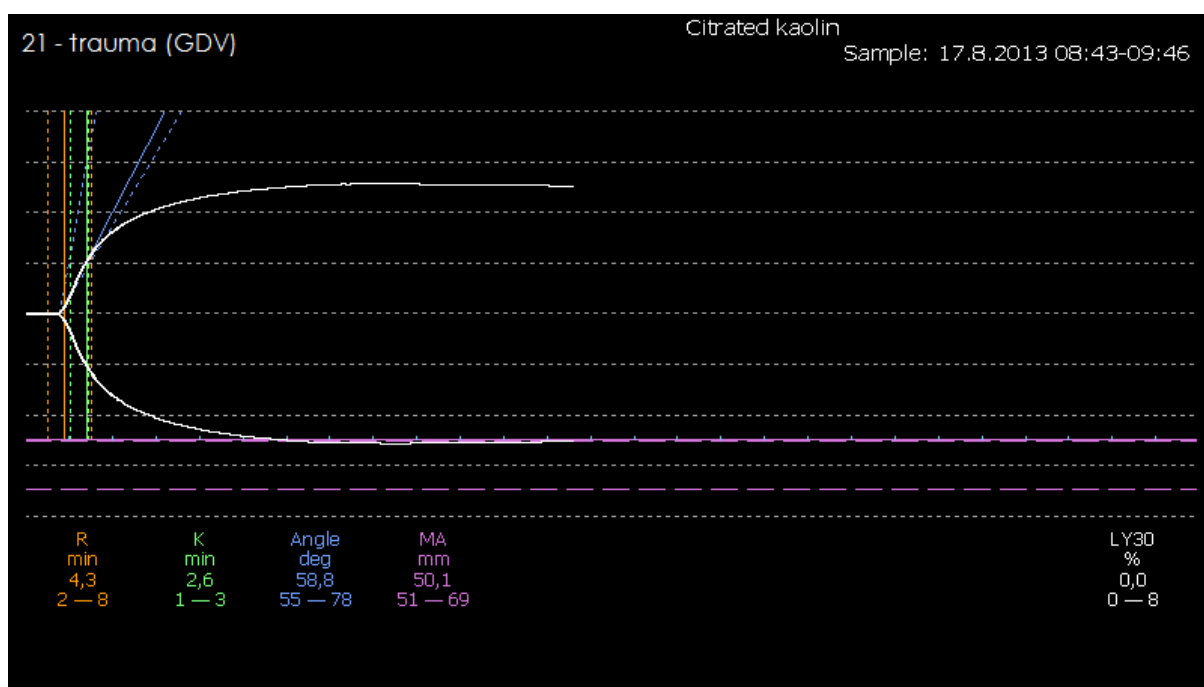
Obrázek 8: Tromboelastografie u pacienta ze skupiny onkologie (hemangiosarkom) s pořadovým číslem 9. Vyjadřuje nízký počet trombocytů a hladinu srážecích faktorů signifikantní pro hypokoagulaci s tendencí pro rozvoj DIC

Vysvětlivky: R – reakční čas, K – čas od zahájení formování koagula až po dosažení jeho určité pevnosti, Angle (=úhel α) – hodnocení pevnosti koagula, MA – maximální amplituda, LY30 – míra snížení MA po 30 minutách, N/A – nedosažení určité (amplituda 20 mm) pevnosti koagula



Obrázek 9: Tromboelastografie u pacienta ze skupiny trauma (GDV) s pořadovým číslem 12. Vyjadřuje nízkou hladinu fibrinogenu signifikantní pro hypokoagulaci s tendencí pro rozvoj DIC

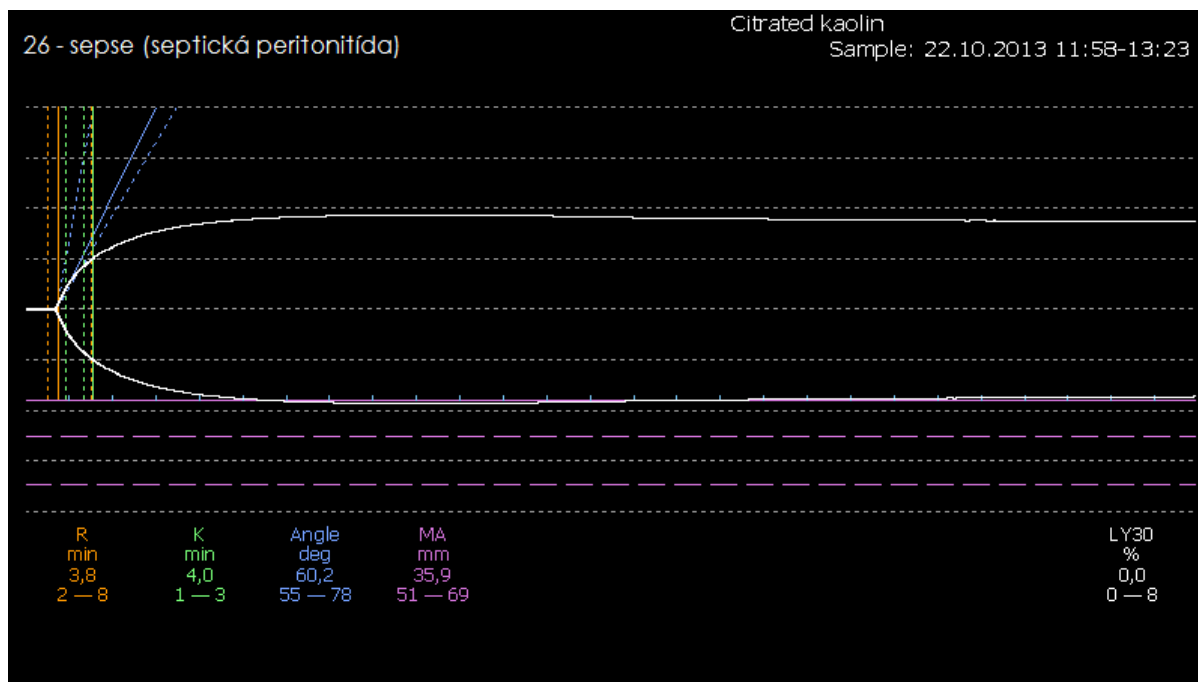
Vysvětlivky: GDV – dilatace a volvulus žaludku, R – reakční čas, K – čas od zahájení formování koagula až po dosažení jeho určité pevnosti, Angle (=úhel α) – hodnocení pevnosti koagula, MA – maximální amplituda, LY30 – míra snížení MA po 30 minutách



Obrázek 10: Tromboelastografie u pacienta ze skupiny trauma (GDV) s pořadovým

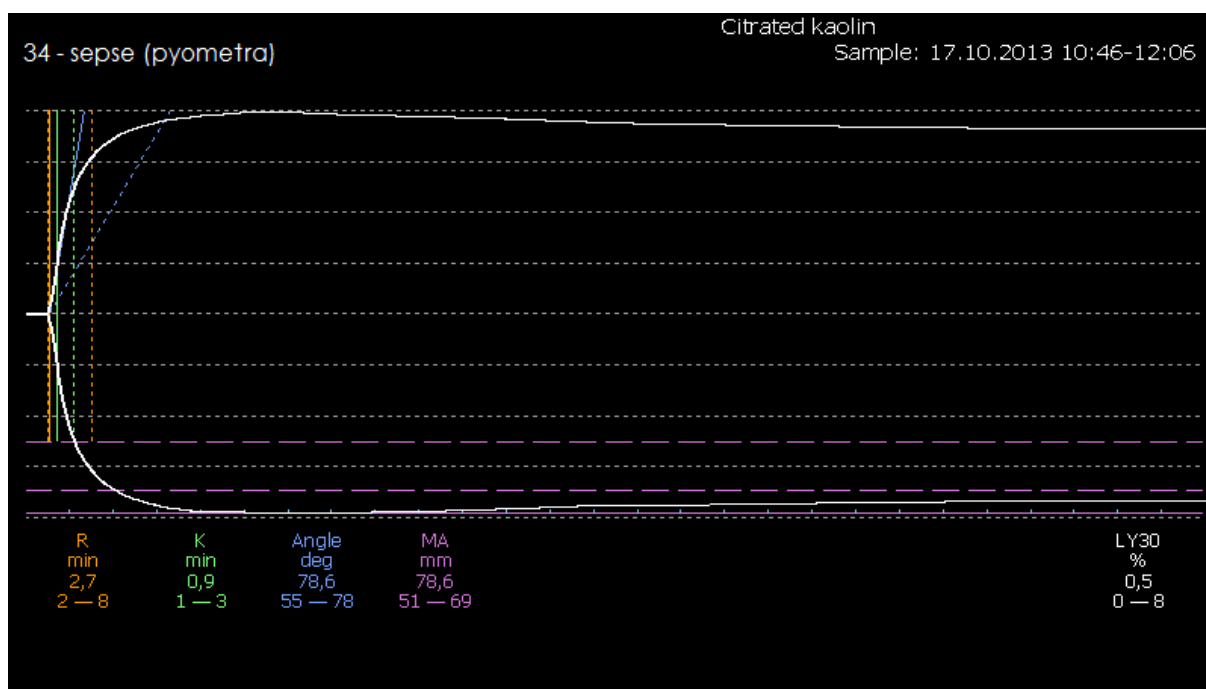
číslem 21. Vyjadřuje nízký počet funkčních destiček signifikantní pro hypokoagulaci s tendencí pro rozvoj DIC

Vysvětlivky: GDV – dilatace a volvulus žaludku, R – reakční čas, K – čas od zahájení formování koagula až po dosažení jeho určité pevnosti, Angle (=úhel α) – hodnocení pevnosti koagula, MA – maximální amplituda, LY30 – míra snížení MA po 30 minutách



Obrázek 11: Tromboelastografie u pacienta ze skupiny sepse (septická peritonitída) s pořadovým číslem 26. Vyjadřuje nízký počet funkčních destiček signifikantní pro hypokoagulaci s tendencí pro rozvoj DIC

Vysvětlivky: R – reakční čas, K – čas od zahájení formování koagula až po dosažení jeho určité pevnosti, Angle (=úhel α) – hodnocení pevnosti koagula, MA – maximální amplituda, LY30 – míra snížení MA po 30 minutách



Obrázek 12: Tromboelastografie u pacienta ze skupiny sepse (pyometra) s pořadovým číslem 36. Vyjadřuje trombocytární hyperkoagulabilitu signifikantní pro hyperkoagulaci s tendencí pro rozvoj DIC

Vysvětlivky: R – reakční čas, K – čas od zahájení formování koagula až po dosažení jeho určité pevnosti, Angle (=úhel α) – hodnocení pevnosti koagula, MA – maximální amplituda, LY30 – míra snížení MA po 30 minutách)

2.4. Stanovení diagnostické výpovědi hemostazeologických testů pro diagnostiku diseminované intravaskulární koagulace

Pomocí statistického programu byly vyhodnoceny diagnostické výpovědi jednotlivých hemostazeologických testů pro stanovení DIC (tab. 8). V naší studii měl nejvyšší hodnotu plochy pod křivkou antitrombin (0,958), dále pak protrombinový čas (0,953) a potom celkový počet trombocytů (0,942). Vysoká signifikance ($p < 0,0001$) byla dosažena stejně u antitrombinu, protrombinového času, celkového počtu trombocytů, inhibitoru aktivátoru plazminogenu a LY30, vysoká významnost byla dále prokázána u aktivovaného parciálního tromboplastinového času ($p = 0,0001$), D-dimerů ($p = 0,008$) a maximální amplitudy ($p = 0,0008$).

Tabulka 8: Statistické zhodnocení jednotlivých parametrů ve vztahu k DIC

Parametr	Jednotky	Mezní hodnota	Senzitivita [%]	Specifita [%]	Plocha pod křivkou	Významnost
Trombs	×10 ⁹ /l	≤179	100,0	82,1	0,942	p<0,0001
PT	s	>11,5	100,0	89,7	0,953	p<0,0001
aPTT	s	>23,3	75,0	86,2	0,834	p=0,0001
FBG	g/l	≤1,1	75,0	79,3	0,761	p=0,0110
D-dimery	mg/l	>0,3	100,0	40,9	0,741	p=0,0080
AT	%	≤106	100,0	90,0	0,958	p<0,0001
TF	pg/ml	>143,084	66,7	70,0	0,617	p=0,4431
Plazminogen	pg/ml	>14,4	83,3	47,6	0,532	p=0,7822
PAI	pg/ml	≤36,2	81,0	83,3	0,841	p<0,0001
R	min	>3,2	75,0	70,4	0,660	p=0,2074
K	min	>1,7	85,7	55,6	0,725	p=0,0726
Úhel α	°	≤61,3	75,0	74,1	0,745	p=0,0415
MA	mm	≤53,4	87,5	63,0	0,801	p=0,0008
LY30	%	≤0,2	100,0	55,6	0,782	p<0,0001

Vysvětlivky: Trombs – celkový počet trombocytů, PT – protrombinový čas, aPTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas, FBG – fibrinogen, AT – antitrombin, TF – tkáňový faktor, PAI - inhibitor aktivátoru plazminogenu R – reakční čas, K – čas od zahájení formování koagula až po dosažení jeho určité pevnosti, úhel α – hodnocení pevnosti koagula, MA – maximální amplituda, LY30 – míra snížení MA po 30 minutách

3. DISKUZE

Cílem této práce bylo porovnat hladiny aktivátorů a inhibitorů koagulace a fibrinolýzy u různých skupin onemocnění predilekčních pro vznik DIC, stanovit diagnostickou výpověď hemostazeologických testů pro včasnou diagnostiku DIC a zhodnotit metodu tromboelastografie v rámci jednotlivých onemocnění.

Mezi diagnostické testy běžně dostupné ve veterinární medicíně pro posouzení aktivity koagulace patří stanovení počtu trombocytů, koncentrace fibrinogenu, protrombinového času a aktivovaného parciálního trombotoplastinového času. Za nadstandardní, avšak v souladu s rozvojem veterinární medicíny stále častěji vyhledávané metody považujeme detekci antitrombinu, D-dimerů a fibrin-degradačních produktů. Zatím pouze v oblasti vědy a výzkumu figuruje stanovení koncentrací tkáňového faktoru, plazminogenu a inhibitoru aktivátoru plazminogenu. V zahraničí se využívá také tromboelastografie, která se v České republice uplatňuje za tímto účelem pouze výjimečně.

Prvním krokem v realizaci naší práce bylo vyšetření klinicky zdravých jedinců a nastavení kritérií, která byla upravena podle Machidy a kol. (2010), pro jednotlivé parametry na posouzení výskytu DIC. Na základě těchto hodnot jsme určovali stupeň pravděpodobnosti výskytu DIC u každého jedince i pro každou skupinu zvlášť. Pro klasifikaci DIC pozitivního jedince bylo zapotřebí splnění alespoň čtyř ze šesti kritérií (snížený počet trombocytů, prodloužené PT a aPTT, snížená koncentrace fibrinogenu, zvýšená koncentrace D-dimerů nebo snížená aktivita AT). U všech pacientů bylo vždy alespoň jedno kritérium splněno. Stejný systém (avšak s FDP místo D-dimerů) zvolili i Maruyami a kol. (2004). Na rozdíl od předchozí práce na našem pracovišti (Macháčková 2012), v níž figurovaly v kritériích FDP, nám šarže jinak validované (Štokolová a kol. 2010) humánní latexaglutinační metody pro stanovení FDP plazma křížově se vzorky psů nereagovala. Nově zakoupená šarže vykazovala pozitivitu, avšak předchozí vzorky již byly pro opakovanou analýzu nevhodné, a tak jsme nemohli výsledky FDP v naší

studii uplatnit. Na rozdíl od již zmiňované práce jsme do kritérií zařadili D-dimery a AT. V práci Machidy a kol. (2010) byly navíc hodnoceny schistocyty, které jsou u DIC pozitivních zvířecích pacientů diskutabilním nálezem. Podle některých autorů (Ho a kol. 2005, Machida a kol. 2010) patří přítomnost schistocytů do pozitivních kritérií pacientů s DIC, jiní autoři (Levi a Cate 1999) považují výskyt schistocytů charakteristický pro mikroangiopatickou hemolytickou anémii. Jiná studie (Bicka 1988) nepřikládá nálezu schistocytů v periferní krvi zvířat takovou váhu jako v humánní medicíně a i z tohoto důvodu jsme do našich kritérií tento kontroverzní parametr nezařadili.

Skupina s nejvyšším počtem DIC pozitivních jedinců byla skupina onkologických pacientů. Pět z devíti onkologických pacientů (56 %) bylo DIC pozitivní, z nichž čtyři jedinci s hemangiosarkomem splňovali hned pět kritérií. Onkologická onemocnění jsou jedna z mála skupin, jimž byla věnována pozornost v souvislosti s hemostatickými abnormalitami (O'Keefeová a kol. 1987, Hargisová a Feldman 1991, Hammer a kol. 1991, Maruyama a kol. 2004). Souhrnná studie Maruyamy a kol. (2004) udává incidenci DIC u heterogenní skupiny psů s maligními tumory (n=208) 9,6 %, přičemž všichni DIC pozitivní jedinci měli solidní tumory a nikoliv hematologické onemocnění. V rámci skupin solidních tumorů byla incidence 12,2 %, podobně jak je tomu v humánní medicíně (10,9 %, Okajima a kol. 2000). Nejčastějším tumorem spojeným s DIC byl hemangiosarkom, dále karcinom mléčné žlázy a adenokarcinom plic a nosu. Incidence DIC u psů s hemangiosarkomem byla 46,7 %, v naší studii byla DIC potvrzena u 57,1 % psů s hemangiosarkomem. Ze všech stanovovaných parametrů byla nejčastěji patrná alterace aktivity AT, a to u třetiny pacientů s tumory, v rámci skupiny DIC však hladina AT byla snížena pouze u 25 % jedinců a nejčastější anomálií bylo prodloužení aPTT u téměř 70 % psů (Maruyama a kol. 2004). V naší studii bylo prodloužení aPTT přítomno u všech pacientů s onkologickým onemocněním a hladina AT byla snížena až u dvou třetin pacientů. Alterací koagulace u hemangiosarkomu se zabývaly dvě studie (Hargisová a Feldman 1991, Hammer a kol. 1991). Hargisová a Feldman (1991) potvrdili u 70 % pacientů s hemostatickými abnormalitami přítomnost trombů v hemangiosarkomu (n=10), z toho tři

pacienti měli laboratorní nálezy konzistentní s DIC. Podrobnější rozbor přináší studie Hammera a kol. (1991) na třiceti šesti psech s hemangiosarkomem. Polovina pacientů byla diagnostikována s laboratorním nálezem DIC. Nejčastějším nálezem v jejich práci byla trombocytopenie - u 75 % jedinců, my jsme ji zjistili u 71 % psů. Autoři nestanovovali koncentraci AT. Hemangiosarkom představuje u lidí, na rozdíl od psů, vzácné onkologické onemocnění (Tsuchiya a kol. 2014). Sarkomy tvoří pouze 1 % malignit u dospělých a angiosarkomy z nich pouze 2-5 %. Navíc je výskyt koagulopatií u sarkomů ojedinělý (4 %). Sporadické studie popisují výskyt konzumpčních koagulopatií u angiosarkomů jako varianty tzv. Kasabachova-Merritova syndromu (KMS), který je volně definován jako trombocytopenická konzumpční koagulopatie spojená s vaskulární neoplazií nebo malformací (Kelly 2010). Farid a kol. (2014) studovali výskyt DIC u 42 pacientů s angiosarkomem – DIC byla přítomna u 17 % jedinců. Obecně se předpokládá, že endoteliální defekty hemangiomu u KMS způsobují aktivaci trombocytů, formování trombů, konzumpci koagulačních faktorů a zvýšenou fibrinolýzu. Studie se značenými trombocyty prokázaly konzumpci destiček a fibrinogenu v rámci tumoru (Warrell a kol. 1983). Jelikož je hemangiosarkom u lidí vzácná neoplazie, není mechanismus vzniku DIC při něm objasněn.

Skupina pacientů s traumaty zahrnovala 16 % pacientů s DIC, všechny s dilatací a volvulem žaludku (GDV). Důvodem zařazení pacientů s GDV do této skupiny je patogeneze onemocnění. Jelikož dochází k hypoperfuzi a destrukci tkání, jde o onemocnění primárně neinfekční. Ve veterinární medicíně doposud není studie hodnotící incidenci DIC po traumatech. První studie hodnotící výskyt DIC u psů s GDV pochází z našeho pracoviště (Uhríková a kol. 2013). Ze skupiny 22 psů nesplnil kritéria DIC ani jeden z pacientů. Příčinou rozdílného výsledku může být výměna FDP za stanovení D-dimerů v rámci diagnostických kritérií. Rovněž jsme přidali do kritérií aktivitu AT, čímž se snížilo množství splněných parametrů z 80 % (4/5) na 67 % (4/6). Pouze dva jedinci měli aktivitu AT nízkou a zároveň splňovali další 4 kritéria, tudíž rozšíření kritérií o aktivitu AT diagnostickou senzitivitu nezvýšilo.

Nejmenší počet pacientů se splněnými kritérii byl ve skupině sepse, a to

pouze u pacienta se septickou peritonitidou (11%). Doposud nebyla publikována studie hodnotící výskyt DIC u pyometry nebo septických pacientů. Na našem pracovišti byla zaznamenána incidence DIC u pyometry pouze 5 % (Ramešová a kol. 2015). U lidí se sepsí byla stanovena v jedné studii prevalence manifestní DIC 31 % a skryté DIC 13 % (Oh a kol. 2010), jednalo se však o heterogenní skupinu pacientů s infekcí respiračního nebo močového traktu, s hepatobiliární infekcí nebo infekcí doprovázející tumory.

Pro porovnání jednotlivých aktivátorů a inhibitorů koagulace a fibrinolýzy je k dispozici pouze limitované množství studií. V nich je aktivita antitrombinu jedním z nejlépe prostudovaných parametrů, zejména z důvodu relativně široké dostupnosti tohoto stanovení. V naší studii měli pouze pacienti ve skupině onkologie signifikantně nižší hladinu antitrombinu oproti všem ostatním skupinám. To již bylo potvrzeno v rámci výskytu DIC, kde dvě třetiny pacientů s onkologickým onemocněním vykazovaly tuto tendenci. V rámci ostatních skupin bylo snížení aktivity AT ojedinělé – pouze u dvou pacientů s GDV a jednoho pacienta s pyometrou. Pokles aktivity antitrombinu u traumatických pacientů zaznamenal i Mischke (2005), u těchto pacientů byla průměrná aktivita 83 %, tj. nižší než v naší skupině pacientů. Naproti tomu Holowaychuková a kol. (2014) zaznamenali průměrné aktivity AT po akutním traumatu vyšší – u přeživších jedinců 97 % a nepřeživších 80 %. Kuzi a kol. (2010) hodnotili AT jako diagnostický a prognostický ukazatel u 149 psů s různými onemocněními. Nejčastější příčinou poklesu aktivity AT byla DIC, i když nebylo přesně specifikováno o jaká onemocnění vedoucí k DIC se jednalo. De Laforcadová a kol. (2008) u dvanácti psů se sepsí detekovali snížené aktivity antitrombinu s mediánem 49 %, což je hodnota nižší, než jaké dosáhl kterýkoliv náš pacient. Bentleyová a kol. (2013) našli snížené aktivity AT u většiny (93 %, resp. 98 %) pacientů se septickou peritonitidou. Naproti tomu při studiu aktivit antitrombinu u karcinomů mléčné žlázy mělo snížené hodnoty jen 5 % jedinců (Stockhaus a kol. 1999). Je otázkou, zda jsou snížené hodnoty AT příčinou, či následkem DIC, obdobně jak je tomu u dalších parametrů.

U septických pacientů a pacientů s onkologickými onemocněními

vykazovala hladina tkáňového faktoru oproti kontrolní skupině zvýšenou tendenci. Tkáňový faktor je považován za hlavního iniciátora koagulace u septických pacientů, jelikož při jeho blokaci dochází ke kompletní inhibici koagulace při endotoxemii nebo bakteriemi (Levi a kol. 1994). U nádorů je zase známo, že exprimují různé pro-koagulační molekuly včetně tkáňového faktoru (Falangová 1998). Expres tkáňového faktoru byla potvrzena i na karcinomu mléčné žlázy u psů (Štokolová a kol. 2011), kde navíc míra exprese koreluje s poklesem hladin antitrombinu a plazminogenu (Andreassenová a kol. 2014). Kromě nádoru mléčné žlázy byla expres tkáňového faktoru potvrzena i na buněčných liniích tumorů pankreatu, plic, prostaty, kostí a měkkých tkání (Štokolová a kol. 2011).

V hodnotách plazminogenu nebyly mezi skupinami signifikantní rozdíly. Naproti tomu Mischke (2005) zaznamenal u psů s traumaty signifikantní pokles aktivity plazminogenu, kdy pacienti měli hodnoty přibližně poloviční oproti kontrolním psům. Pokles hladin plazminogenu byl přítomen i na experimentálním modelu sepse u psů (Aasen a kol. 1978) a u poloviny pacientů DIC v heterogenní skupině onemocnění (Feldman a kol. 1981).

Inhibitor aktivátoru plazminogenu měl hodnoty signifikantně vyšší ve skupině sepse oproti všem ostatním skupinám. Tento parametr byl u psů zkoumán pouze v souvislosti s karcinomem mléčné žlázy, kde postižení jedinci měli hladiny PAI nižší oproti kontrolní skupině (Vilar Saavedra a kol. 2011). Elevace ve skupině sepse může korelovat s nálezy v humánní medicíně, kde dochází k elevaci PAI v návaznosti na zvýšení hladiny aktivátorů plazminogenu (Biemond a kol. 1995).

Tromboelastografické vyšetření hodnotí komplexní proces koagulace a fibrinolýzy ve vzorku plné krve a poskytuje spektrum údajů ve vztahu k rychlosti koagulace a fibrinolýzy a pevnosti krevní zátky. Na našem pracovišti prováděl první vyšetření metodou rotační tromboelastografie Michejda (2004). V naší práci byly pozorovány nejvýraznější změny v rámci všech pacientů ve skupině sepse. Tito jedinci měli signifikantně delší čas K, větší úhel α , výrazně vyšší maximální amplitudu a nižší LY30. Tyto výsledky jsou nejednoznačné –

pro hyperkoagulabilitu svědčí větší úhel α a vyšší MA, zatímco delší čas K a nižší LY30 je znakem hypokoagulability. Podle klasických kritérií odpovídal diagnóze DIC pouze pacient se septickou peritonitidou, jenž měl delší čas K a nižší MA svědčící pro hypokoagulabilitu. Z ostatních pacientů měl jeden pacient prodloužené R a K ukazující spíš na nedostatek koagulačních faktorů. Čtyři jedinci měli větší úhel α , většinou s vyšší MA, což je charakteristické pro hyperkoagulační stav. Jeden pacient měl pouze extrémně zvýšené LY30, poukazující na hyperfibrinolýzu. Tyto výsledky jsou v rozporu s experimentálními studiemi na psech vykazujícími snížení MA a zmenšení úhlu α po aplikaci lipopolysacharidu (Eralp a kol. 2011). V podstatě podobné výsledky zaznamenali Bentleyová a kol. (2013) u psů se septickou peritonitií, kde přeživší jedinci měli vyšší stupeň hyperkoagulability oproti nepřeživším. Pozoruhodné však je, že nepřeživší jedinci měli hodnoty úhlu α a MA v normě.

U onkologických pacientů byla nalezena pouze nižší hodnota LY30 poukazující na hyperfibrinolýzu. Navíc měli onkologičtí pacienti nižší MA oproti skupině septických pacientů, což naznačuje hypokoagulabilitu. Více než polovina onkologických pacientů byla diagnostikována jako DIC pozitivní. Z toho jeden neměl výraznou alteraci TEG, dva měli větší úhel α a vyšší MA, naznačující hyperkoagulační stav a dva jedinci měli prodloužený čas K, malý úhel α , nízkou MA a nulové LY30, svědčící pro hypokoagulabilitu. Kromě toho měl pacient s lymfomem bez DIC vyšší MA. Andreasenová a kol. (2012) našli abnormální profil TEG u 70 % psů s neoplazií. Z toho bylo 66 % hyperkoagulabilních, 4 % hypokoagulabilních a 21 % normokoagulabilních. Jednalo se o heterogenní skupinu pacientů s karcinomy, sarkomy, mastocytomy a lymfomy. Doposud nebyla provedena studie hodnotící TEG u pacientů s hemangiosarkomem, pouze Vilar Saavedra a Hosoya (2011) publikovali kazuistiku hemangiosarkomu. Pes měl prodloužený čas K, nižší úhel α , nižší MA a zvýšená LY30, naznačující hypokoagulační stav s hyperfibrinolýzou.

Holowaychuková a kol. (2014) hodnotili TEG u psů s akutním traumatem (n=56). Nepřeživší jedinci měli signifikantně menší úhel α a nižší MA oproti přeživším jedincům. V porovnání s naší skupinou byly hodnoty všech

sledovaných parametrů mírně nižší. Naši pacienti měli kratší čas R než obě skupiny v jejich studii, čas K odpovídal přeživším jedincům (kdežto nepřeživší měli 2× vyšší), úhel α odpovídal přeživším jedincům (nepřeživší měli přibližně o 10° nižší), MA odpovídala spíše nepřeživším (přeživší měli o přibližně 10 mm nižší) a LY30 bylo podobné jako u přeživších jedinců (nepřeživší měli LY30 vyšší). Hodnoty nepřeživších pacientů odrážejí nízkou hladinu fibrinogenu, dysfunkci trombocytů a hyperfibrinolýzu (Holowaychuková a kol. 2014). U našich traumatických pacientů jsme našli oproti kontrolním jedincům nižší LY30 naznačující hypofibrinolýzu. Příčinou hypofibrinolýzy by mohl být vzestup inhibitoru aktivátoru plazminogenu, ten však byl signifikantně vyšší pouze ve skupině sepsy. Navíc korelace mezi LY30 a koncentrací PAI byla nízká a pozitivní ($r=0,23$, data nejsou zobrazena). Dále měli pacienti s traumatem nižší hodnoty času K, úhlu α a MA oproti septické skupině, tyto parametry odrážejí nižší hladinu fibrinogenu a hypofunkci trombocytů, což značí spíš hypokoagulační stav. Při hodnocení jednotlivých pacientů měli tři psi čas K delší než kontrolní jedinci a dva psi (stejní) úhel α menší než kontrolní jedinci, což je charakteristické pro hypokoagulaci. Jeden z těchto pacientů byl diagnostikován jako DIC pozitivní. Naproti tomu dva psi označení jako DIC pozitivní měli hodnoty TEG parametrů v rozmezí kontrolních jedinců.

Posledním bodem cíle práce bylo stanovení diagnostické výpovědi měřených parametrů pro DIC v rámci všech pacientů. Největší výpovědní hodnotu vykazoval AT. Při mezní hodnotě <106 % vykazoval senzitivitu 100 % a specifčnost 90 %. Z TEG ukazatelů měla nejvyšší výpověď maximální amplituda - mezní hodnota <53,4 mm vykazovala senzitivitu 88 % a specifčnost 63 %. Různé studie uvádějí různé výsledky diagnostických výpovědí podle použitých parametrů (Machida a kol. 2010, Bateman a kol. 1999). Maximální amplituda měla například nejvyšší diagnostickou výpověď v rámci TEG parametrů pro stanovení prognózy u septických pacientů ve studii Bentleyové a kol. (2013).

Na závěr je nutné zmínit limity studie. Počet psů v jednotlivých skupinách je relativně nízký a všechny skupiny jsou co do etiologie onemocnění mírně heterogenní. Imunoanalýzy byly provedeny na soupravách určených pro psy, které avšak nebyly doposud validovány. Benefitem studie by bylo klinické hodnocení pacienta s posouzením míry krvácení, jelikož však pacienti měli různé ošetřující lékaře, nebylo možné toto pozorování objektivizovat. Tyto nedostatky jsme se snažili kompenzovat při provádění studie: všechny hemostazeologické testy byly provedeny řešitelkou odborné práce pro minimalizaci variability v jejich provedení, vzorky byly uchovávány do analýzy při -70 °C v uzamčeném mrazicím boxu, i když pro dané časové období by bylo postačujících -20 °C.

4. ZÁVĚR

Cílem odborné práce bylo posouzení výskytu DIC u vybraných onemocnění, porovnání aktivátorů a inhibitorů koagulace a fibrinolýzy, zhodnocení tromboelastografie u jednotlivých skupin onemocnění asociovaných s DIC (traumata, onkologická onemocnění, sepse) a stanovení diagnostické výpovědi hemostazeologických testů pro diagnostiku DIC.

Nejvyšší výskyt DIC byl ve skupině onkologických pacientů (56 %), dále ve skupině pacientů s traumaty a nejméně ve skupině septických pacientů (11 %).

Aktivita antitrombinu byla signifikantně nižší ve skupině onkologických pacientů oproti ostatním skupinám onemocnění. Koncentrace tkáňového faktoru byla vyšší ve skupině septických pacientů oproti kontrolní skupině. V koncentraci plazminogenu nebyl signifikantní rozdíl mezi skupinami. Inhibitor aktivátoru plazminogenu byl signifikantně vyšší ve skupině septických pacientů oproti ostatním skupinám onemocnění.

V hodnocení tromboelastografie měly skupiny pacientů s traumaty a pacientů se sepsí kratší čas K, skupina septických pacientů měla větší úhel α , resp. MA oproti kontrolní skupině, resp. všem skupinám onemocnění. Hodnoty LY30 byly signifikantně nižší ve skupinách traumata a sepse.

Nejvyšší diagnostickou výpověď pro DIC má stanovení antitrombinu, z tromboelastografických parametrů MA.

5. SUMMARY

Disseminated intravascular coagulation is frequent disorder in various diseases leading to thrombosis or increased bleeding. Pathogenesis and the role of different pro- and anticoagulants and fibrinolytics is not well described in human as well as veterinary medicine. The aim of this study was to determinate incidence of DIC, to compare activators and inhibitors of coagulation and fibrinolysis, evaluation of thromboelastography and determination of diagnostic importance of coagulation tests in patients with oncological disease (n=9), trauma (n=19) and sepsis (n=12).

The highest incidence of DIC was in group oncology, 56 %, followed by group trauma and sepsis. Antithrombin activity was significantly lower in group oncology in comparison to other groups. Tissue factor concentration was higher in septic patients in comparison to control dogs. There was no difference in plasminogen concentration among groups. Plasminogen aktivátor inhibitor was significantly higher in groups sepsis than in other groups. In thromboelastography, traumatic and septic patients had shorter time K, septic patients had increased α angle and maximal amplitude in comparison to control group. LY30 was significantly lower in traumatic patients and sepsis. The highest diagnostic value for DIC diagnosis had antithrombin, from thromboelastography parameters maximal amplitude.

This study had proved different coagulation disorders in patients with diseases associated with DIC.

LITERATURA

AASEN AO, OHLSSON K, LARSBRAATEN M, AMUNDSEN E, 1978: Changes in plasminogen levels, plasmin activity and activity of antiplasmins during endotoxin shock in dogs. *Eur Surg Res*, 10(1): 63-72.

AL-MONDHIRY H, 1975 Disseminated intravascular coagulation: experience in a major cancer center. *Thromb Diath Haemorrh*, 34: 181-193.

ANDREASEN EVA BARTHOLIN, TRANHOLM M, WIINBERG B, MARKUSSEN B, KRISTENSEN AT, 2012: Haemostatic alterations in a group of canine cancer patients are associated with cancer type and disease progression. *Acta Vet Scand*, 54: 3.

ANDREASEN EVA BARTHOLIN, NIELSEN OL, TRANHOLM M, KNUDSEN T, KRISTENSEN AT, 2014: Expression of tissue factor in canine mammary tumours and correlation with grade, stage and markers of haemostasis and inflammation. *Vet Comp Oncol*.

BATEMAN SW, MATHEWS KA, ABRAMS-OGG AC, LUMSDEN JH, JOHNSTONE IB, HILLERS TK, FOSTER RA, 1999: Diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs admitted to an intensive care unit. *J Am Vet Med Assoc*, 215(6): 798-804.

BENTLEY ADREINNE M, MAYHEW PD, CULP WT, OTTO CM, 2013: Alterations in the hemostatic profiles of dogs with naturally occurring septic peritonitis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 23(1): 14-22.

BICK RL, 1988: Disseminated intravascular coagulation and related syndromes: a clinical review. *Semin Thromb Hemost*, 14(4): 299-338.

BICK RL, SCATES SM, 1992: Disseminated Intravascular Coagulation. *Laboratory Medicine*, 23(3): p161-165

BICK RL, 1996: Disseminated intravascular coagulation: objective clinical and laboratory diagnosis, treatment, and assessment of therapeutic response. *Semin Thromb Hemost*, 22: 69-88.

BIEMOND BJ, LEVI M, TEN CATE H, VAN DER POLL T, BÜLLER HR, HACK CE, TEN CATE JW, 1995: Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor I release during experimental endotoxaemia in chimpanzees: effect

of interventions in the cytokine and coagulation cascades. Clin Sci, 88: 587-594.

BOISCLAIR MD, IRELAND H, LANE DA, 1990: Assessment of hypercoagulable states by measurement of activation fragments and peptides. Blood Reviews, 4: 25-40.

BONE RC, 1994: Gram-positive organisms and sepsis. Archives of Internal Medicine, 154(1): 26-34.

BREDBACKA S, BLOMBACK M, WIMAN B, 1994: Soluble fibrin: a predictor for the development and outcome of multiple organ failure. Am J Hematol, 46: 289-294

BROHI K, COHEN MJ, DAVENPORT RA, 2007: Acute coagulopathy of trauma: mechanism, identification and effect. Curr Opin Crit Care, 13: 680-685.

BROHI K, COHEN MJ, GANTER MT, SCHULTZ MJ, LEVI M, MACKERSIE RC, PITTET JF, 2008: Acute coagulopathy of trauma: hypoperfusion induces systemic anticoagulation and hyperfibrinolysis. J Trauma, 64: 1211-1217.

BRUCHIM Y, AROCH I, SARAGUSTY J, WANER T, 2008: Disseminated Intravascular Coagulation. Compendium Continuing Education Practising Veterinarians, 30(10).

CARR JM, MCKINNEY M, MCDONAGH J, 1989: Diagnosis of disseminated intravascular coagulation. Role of D-dimer. Am J Clin Pathol, 91: 280-287.

COLMAN RT, ROBBY SJ, MINNA JD, 1974: Disseminated intravascular coagulation (DIC): an approach. Am J Med, 52: 679-689.

CONWAY EM, ROSENBERG RD, 1988: Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. Mol Cell Biol 8: 5588-5592

DE LAFORCADE ARMELLE M, ROZANSKI EA, FREEMAN LM, LI W, 2008: Serial evaluation of protein C and antithrombin in dogs with sepsis. J Vet Intern Med, 22(1): 26-30.

ENGELS PT, REZENDE-NETO JB, AL MAHROOS M, SCARPELINI S, RIZOLI SB, TIEN HC, 2011: The natural history of trauma-related coagulopathy: implications for treatment. J Trauma, 71(5 Suppl 1): S448-S455.

ERALP O, YILMAZ Z, FAILING K, MORITZ A, BAUER N, 2011: Effect of experimental endotoxemia on thrombelastography parameters, secondary and tertiary hemostasis in dogs. *J Vet Intern Med*, 25(3): 524-531.

ESTRIN MA, WEHAUSEN CE, JESSEN CR, LEE JA, 2006: Disseminated Intravascular Coagulation in Cats. *J Vet Intern Med*, 20: 1334-1339

FALANGA ANNA, 1998: Mechanisms of hypercoagulation in malignancy and during chemotherapy. *Haemostasis*, 28(Suppl. 3): 50-60.

FARID M, AHN L, BROHL A, CIOFFI A, MAKI RG, 2014: Consumptive coagulopathy in angiosarcoma: a recurrent phenomenon? *Sarcoma*. 617102.

FEINSTEIN DI, 2015: Disseminated intravascular coagulation in patients with solid tumors. *Oncology (Williston Park)*, 29(2): 96-102.

FELDMAN BF, 1981: Disseminated intravascular coagulation. *Compend Contin Educ, Pract Vet*, 3: 46-54.

FELDMAN BF, MADEWEL BR, O'NEILL S, 1981: Disseminated intravascular coagulation: antithrombin, plasminogen, and coagulation abnormalities in 41 dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 179:151-154.

FIEGL M, WELTERMANN A, STINDL R, FONATSCH C, LECHNER K, GISSLINGER H, 1999: Massive disseminated intravascular coagulation and hyperfibrinolysis in alveolar rhabdomyosarcoma: case report and review of the literature. *Ann Hematol*, 78: 335-338.

FOURRIER F, CHOPIN C, GOUDEMAND J, HENDRYCX S, CARON C, RIME A, MAREY A, LESTAVEL P, 1992: Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest*, 101(3): 816-823.

FRITH D, GOSLINGS JC, GAARDER C, M. MAEGELE, COHEN MJ, ALLARD S, JOHANSSON PI, STANWORTH S, THIEMERMANN C, BROHI K, 2010: Definition and drivers of acute traumatic coagulopathy: clinical and experimental investigations. *J Thromb Haemost*, 8(9): 1919-1925.

FRITH D, BROHI K, 2010: The acute coagulopathy of trauma shock: clinical relevance. *Surgeon*, 8(3):159-163.

GANDO S, NAKANISHI Y, TEDO I, 1995: Cytokines and plasminogen activator inhibitor-1 in posttrauma disseminated intravascular coagulation:

relationship to multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*, 23: 1835-1842.

GANDO S, 2009: Acute coagulopathy of trauma shock and coagulopathy of trauma: a rebuttal. You are now going down the wrong path. *J Trauma*, 67: 381-383.

GANDO S, SAWAMURA A, HAYAKAWA M, 2011: Trauma, shock, and disseminated intravascular coagulation: lessons from the classical literature. *Ann Surg*, 254: 10-19.

HAMMER AS, COUTO CG, SWARDSON C, GETZY D, 1991: Hemostatic abnormalities in dogs with hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med*, 5(1): 11-14.

HARGIS ANN M, FELDMAN BF, 1991: Evaluation of hemostatic defects secondary to vascular tumors in dogs: 11 cases (1983-1988). *J Am Vet Med Assoc*, 198(5): 891-894.

HESS JR, BROHI K, DUTTON RP, HAUSER CJ, HOLCOMB JB, KLUGER Y, MACKWAY-JONES K, PARR MJ, RIZOLI SB, YUKIOKA T, HOYT DB, BOUILLON B, 2008: The coagulopathy of trauma: a review of mechanisms. *J Trauma*, 65(4): 748-754.

HO LW, KAM PCA, THONG CL, 2005: Disseminated intravascular coagulation. *Current Anaesthesia & Critical Care*, 16: 151-161.

HOLLOWAYCHUK MARIE, HANEL R, O'KEEFE K, ROGERS L, MONTEITH G, WOOD D, 2011: Prognostic value of coagulation parameters in dogs following trauma. *J Vet Emerg Crit Care*, 21(S1): S1

HORAN JT, FRANCIS CW, 2001: Fibrin degradation products, fibrin monomer and soluble fibrin in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost*, 27: 657-666.

JOHANSSON PI, OSTROWSKI SR, 2010: Acute coagulopathy of trauma: balancing progressive catecholamine induced endothelial activation and damage by fluid phase anticoagulation. *Med Hypotheses*, 75: 564-567.

JOHANSSON PI, SØRENSEN AM, PERNER A, Welling KL, Wanscher M, Larsen CF, Ostrowski SR, 2011: Disseminated intravascular coagulation or acute coagulopathy of trauma shock early after trauma? An observational study. *Crit Care*, 15: R272.

KAUVAR DS, LEFERING R, WADE CE, 2006: Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. *J Trauma*, 60(6 Suppl): S3-S11.

KELLY M, 2010: Kasabach-merritt phenomenon. *Pediatric Clinics of North America*, 57(5): 1085-1089.

KUZI S, SEGEV G, HARUVI E, AROCH I, 2010: Plasma antithrombin activity as a diagnostic and prognostic indicator in dogs: a retrospective study of 149 dogs. *J Vet Intern Med*, 24(3): 587-596.

LEVI M, ROEM D, KAMP AM, DE BOER J, HACK CE, TEN CATE J, 1993: Assessment of the relative contribution of different protease inhibitors to the inhibition of plasmin in vivo. *Thromb Haemost*, 69: 141-146.

LEVI M, TEN CATE H, BAUER KA, VAN DER POLL T, EDGINGTON TS, BÜLLER HR, VAN DEVENTER SJ, HACK CE, WOUTER TEN CATE J, ROSENBERG RD, 1994: Inhibition of endotoxin-induced activation of coagulation and fibrinolysis by pentoxifyllin or by a monoclonal anti-tissue factor antibody in a chimpanzee model. *J Clin Invest*, 93: 114-120.

LEVI M, VAN DER POLL T, TEN CATE H, VAN DEVENTER SJH, 1997: The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *Eur J Clin Invest*, 27(1): 3-9.

LEVI M, TEN CATE H, VAN DER POLL T, 1999: Disseminated intravascular coagulation: state of the art. *Thromb Haemost*, 82: 695-705.

LEVI M, VAN DER POLL T, DE JONGE E, TEN CATE H, 2000: Relative insufficiency of fibrinolysis in disseminated intravascular coagulation. *Sepsis*, 3: 103-109.

LEVI M, DE JONGE E, MEIJER J, 2002: The diagnosis of disseminated intravascular coagulation. *Blood Reviews*, 16: 217-223.

LEVI M, 2003: Cancer and thrombosis. *Clin Adv Hematol Oncol*, 1: 668-671.

LEVI M, 2004: Current understanding of disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol*, 124(5): 567-576.

LEVI M, 2009: Disseminated intravascular coagulation in cancer patients. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 22: 129-136.

MACHÁČKOVÁ KATEŘINA, 2012: Dynamika vybraných hemostazeologických testů při syndromu dilatace a volvulu žaludku psů. Odborná práce, 52 stran.

MACHIDA T, KOKUBU H, MATSUDA K, MIYOSHI K, UCHIDA E 2010: Clinical use of D-dimer measurement for the diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs. J Vet Med Sci, 72: 1301-1306.

MAEGELE M, LEFERING R, YUCEL N, TJARDES T, RIXEN D, PAFFRATH T, SIMANSKI C, NEUGEBAUER E, BOUILLON B, 2007: Early coagulopathy in multiple injury: an analysis from the German Trauma Registry on 8724 patients. Injury, 38: 298-304.

MARUYAMA H, MIURA T, SAKAI M, KOIE H, YAMAYA Y, SHIBUYA H, SATO T, WATARI T, TAKEUCHI A, TOKURIKI M, HASEGAWA A, 2004: The incidence of disseminated intravascular coagulation in dogs with malignant tumor. J Vet Med Sci, 66(5): 573-575.

MATSUDA T, 1976: Disseminated intravascular coagulation (DIC). Rinsho Ketsueki, 17(11): 1139-1152. [cross-reference]

MCCARRON BI, MARDER VJ, FRANCIS CW, 1999: Reactivity of soluble fibrin assays with plasminic degradation products of fibrin and in patients receiving fibrinolytic therapy. Thromb Haemost, 82: 1722-1729.

MESTERS RM, MANNUCCI PM, COPPOLA R, KELLER T, OSTERMANN H, KIENAST J, 1996: Factor VIIa and antithrombin III activity during severe sepsis and septic shock in neutropenic patients. Blood, 88(3): 881-886.

MICHEJDA A, 2004: ROTEG – analyzátor krevní koagulace z plné krve. Odborná práce, 58 stran.

MISCHKE R, 2005: Acute haemostatic changes in accidentally traumatised dogs. Vet J, 169: 60-64.

MISCHKE R, 2010: Disseminated intravascular coagulation in dogs: Are scoring systems of value? The Veterinary Journal, 185: 243-244.

NAWROTH PP, STERN DM, 1986: Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. J Exp Med, 163: 740-745.

NEAME PB, KELTON JG, WALKER IR, STEWART IO, NOSSEL HL, HIRSH J, 1980: Thrombocytopenia in septicemia: the role of disseminated intravascular

coagulation. *Blood*, 56: 88-92.

NOSSEL HL, YUDELMAN I, CANFIELD RE, BUTLER VP JR , SPANONDIS K, WILNER GD, QURESHI GD, 1974: Measurement of fibrinopeptide A in human blood. *J Clin Invest*, 54: 43-53.

OKAJIMA K, SAKAMOTO Y, UCHIBA M, 2000: Heterogeneity in the incidence and clinical manifestations of disseminated intravascular coagulation: a study of 204 cases. *Am J Hematol*, 65(3): 215-222.

O'KEEFE DEBORAH A, COUTO CG, BURKE-SCHWARTZ C, JACOBS RM, 1987: Systemic mastocytosis in 16 dogs. *J Vet Intern Med*, 1(2): 75-80.

OH D, JANG MJ, LEE SJ, CHONG SY, KANG MS, WADA H, 2010: Evaluation of modified non-overt DIC criteria on the prediction of poor outcome in patients with sepsis. *Thromb Res*, 126(1): 18-23.

PALMER L, MARTIN LINDA, 2014: Traumatic coagulopathy--part 1: Pathophysiology and diagnosis, *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 24(1): 63-74.

RAMEŠOVÁ ALICE, MACHÁČKOVÁ K, BARTOŠKOVÁ A, NOVOTNÝ R, RYBOVÁ M, UHRÍKOVÁ I, 2015: Incidence of disseminated intravascular coagulation in bitches with pyometra. 1st International scientific conference of the veterinary medicine students, s. 29.

RICKLES FR, BRENNER B, 2008: Tissue factor and cancer. *Semin Thromb Hemost*, 34: 143-145.

RODEGHIERO F, CASTAMAN G, 1994: The pathophysiology and treatment of hemorrhagic syndrome of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*, 8(Suppl. 2): S20-26.

RUIZ DE GOPEGUI R, SULIMAN HB, FELDMAN BF, 1995: Disseminated intravascular coagulation: present and future perspective. *Comparative Haematology International* 5: 213-216.

SACK GH, LEVIN J, BELL WR, 1977: Trousseau's syndrome and other manifestations of chronic disseminated coagulopathy in patients with neoplasms. *Medicine*, 56: 1-37

SALLAH S, WAN JY, NGUYEN NP, HANRAHAN LR, SIGOUNAS G, 2001: Disseminated intravascular coagulation in solid tumors: clinical and

pathological study. *Thromb Haemost*, 86: 828-833.

SCHNEIDER CL, 1951: Fibrin embolism (disseminated intravascular coagulation) with defibrination as one of the end results during placenta abruptio. *Surg Gynecol Obstet*, 92(1): 27-34.

SIEGAL T, SELIGSOHN U, AGHAI E, MODAN M, 1978: Clinical and laboratory aspects of disseminated intravascular coagulation (DIC): a study of 118 cases. *Thromb Haemost* 39: 122-134.

SPERO JA, LEWIS JH, HASIBA U, 1980: Disseminated intravascular coagulation. Findings in 346 patients. *Thromb Haemost*, 43: 28-33.

STOCKHAUS C, KOHN B, RUDOLPH R, BRUNNBERG L, GIGER U, 1999: Correlation of haemostatic abnormalities with tumour stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. *J Small Anim Pract*, 40(7): 326-331.

STOKOL TRACY, BROOKS MB, ERB HN, MAULDIN GE, 1999: Evaluation of kits for the detection of fibrin(ogen) degradation products in dogs. *J Vet Intern Med*, 13: 478-484.

STOKOL TRACY, DADDONA JL, MUBAYED LS, TRIMPERT J, KANG S, 2011: Evaluation of tissue factor expression in canine tumor cells. *Am J Vet Res*, 72(8): 1097-1106.

TAYLOR FB JR, CHANG A JR, ESMON CT, D'ANGELO A, VIGANO-D'ANGELO S, BLICK KE, 1987: Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest*, 79: 918-925.

TAYLOR FB JR, CHANG A, RUF W, MORRISSEY JH, HINSHAW L, CATLETT R, BLICK K, EDGINGTON TS, 1991: Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock*, 33: 127-134.

TAYLOR FB JR, 1994: Studies on the inflammatory-coagulant axis in the baboon response to *E. coli*: regulatory roles of proteins C, S, C4bBP and of inhibitors of tissue factor. *Prog Clin Biol Res*, 388: 175-194.

TAYLOR FB JR, TOH CH, HOOTS WK, WADA H, LEVI M, 2001: Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation, *Thromb Haemost*, 86(5): 1327-1330

TEITEL JM, BAUER KA, LAU HK, ROSENBERG RD, 1982: Studies of the

prothrombin activation pathway utilizing radioimmunoassays for the F2/F1 + 2 fragment and thrombin–antithrombin complex. *Blood*, 59: 1086-1097.

THAKUR M, AHMED AB, 2012: A Review of Thromboelastography. *Int J Periop Ultrasound Appl Technol* 1(1): 25-29.

TSUCHIYA T, GRAY TL, GATTO NT, FOREST T, MACHOTKA SV, TROTH SP, PRAHALADA S, 2014: Spontaneous epithelioid hemangiosarcoma in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Comp Med*, 64(4): 309-313.

UHRÍKOVÁ IVANA, MACHÁČKOVÁ K, RAUŠEROVÁ L, ŘEHÁKOVÁ K, DOUBEK J, 2013: Disseminated intravascular coagulation in dogs with gastric dilatation-volvulus syndrome. *Veterinární medicína* 58(11): 587-590.

VAN DER POLL T, BÜLLER HR, TEN CATE H, WORTEL CH, BAUER KA, VAN DEVENTER SJH, HACK CE, SAUERWEIN HP, ROSENBERG RD, TEN CATE JW, 1990: Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med*, 322: 1622-1627.

VAN DER POLL T, LEVI M, HACK CE, TEN CATE H, VAN DEVENTER SJ, EERENBERG AJ, DE GROOT ER, JANSEN J, GALLATI H, BÜLLER HR, TEN CATE JW, AARDEN LA, 1994a: Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med*, 179: 1253-1259.

VAN DER POLL T, LEVI M, VAN DEVENTER SJH, TEN CATE H, HAAGMANS BL, BIEMOND BJ, BÜLLER HR, HACK CE, TEN CATE JW, 1994b: Differential effects of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees. *Blood*, 83: 446-451.

VILAR SAAVEDRA P, LARA GARCÍA A, ZALDÍVAR LÓPEZ S, COUTO G, 2011: Hemostatic abnormalities in dogs with carcinoma: a thromboelastographic characterization of hypercoagulability. *Vet J*, 190(2): e78-83.

VILAR SAAVEDRA P, HOSOYA K, 2011: Thromboelastographic profile for a dog with hypocoagulable and hyperfibrinolytic phase of disseminated intravascular coagulopathy. *J Small Anim Pract*, 52(12): 656-659.

WADA H, WAKITA Y, NAKASE T, SHIMURA M, HIYOYAMA K, NAGAYA S, MORI Y, SHIKU H, 1995: Outcome of disseminated intravascular coagulation in

relation to the score when treatment was begun. Mie DIC Study Group. *Thromb Haemost*, 74: 848-852.

WADA H, 2004: Disseminated intravascular coagulation, *Clinica Chimica Acta*, 344: 13-21.

WARRELL RPJ, KEMPIN SJ, BENUA RS, 1983: Intratumoral consumption of indium-111 labeled platelets in a patient with hemangiomatosis and intravascular coagulation (Kasabach–Merritt syndrome) *Cancer*, 52: 2256.

WHEELER AP, BERNARD GR, 1999: Treating patients with severe sepsis, *New England Journal of Medicine*, 340: 207-214.

WIINBERG B, JENSEN AL, ROJKJAER R, JOHANSSON P, KRISTENSEN AT, 2006: Prospective pilot study on performance and prognostic value of a new human, ISTH-based scoring system for identifying non-overt disseminated intravascular coagulation in dogs [abstract]. *J Vet InternMed*, 20: 765.

WIINBERG B, JENSEN AL, JOHANSSON PI, ROZANSKI E, TRANHOLM M, KRISTENSEN AT, 2008: Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation. *J Vet Intern Med*, 22(2): 357-365.

WIINBERG B, JENSEN AL, JOHANSSON PI, KJELGAARD-HANSEN M, ROZANSKI E, TRANHOLM M, KRISTENSEN AT, 2010: Development of a model based scoring system for diagnosis of canine disseminated intravascular coagulation with independent assessment of sensitivity and specificity, *The Veterinary Journal*, 185: 292-298.

ZHANG Y, DENG Y, LUTHER T, MULLER M, ZIEGLER R, WALDHERR R, STER DM, NAWROTH PP, 1994: Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest*, 94: 1320-1327.

PODĚKOVÁNÍ

Na úplný závěr bych ráda poděkovala všem, kteří se jakýmkoli způsobem podíleli na vzniku této odborné práce. Především mým školitelům, prof. MVDr. Jaroslavu Doubkovi, CSc. a MVDr. Ivaně Uhríkové, Ph.D. za nabídnuté téma, pomoc a spolupráci při získávání a hodnocení výsledků a za cenné rady a připomínky při psaní textu. MVDr. Leoně Raušerové, Ph.D. a doktorům z oddělení gynekologie a porodnictví Kliniky chorob psů a koček za poskytnutí vzorků od pacientů a majitelům za ochotu a spolupráci při získávání vzorků za účelem vytvoření kontrolní skupiny. Personálu Klinické laboratoře pro malá zvířata za vytvoření podmínek pro provedení analýz. V neposlední řadě děkuji své rodině, zejména mým rodičům, za podporu během celého studia, při kterém jsem tuto práci mohla vytvořit.