

Wskaźniki układu krzepnięcia u kóz

PRZEMYSŁAW SOBIECH, ZYGMUNT KULETA, ANDRZEJ POMIANOWSKI,
ARTUR STOPYRA, SYLWIA LEW

Zespół Chorób Wewnętrznych Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn

Sobiech P., Kuleta Z., Pomianowski A., Stopyra A., Lew S.

Coagulation parameters in goats

Summary

The aim of the study was to estimate coagulation parameters during pregnancy and parturition in goats. Examinations were carried out on 20 Polish White goats, and blood was obtained five times from the jugular vein: before insemination, in the second, fourth and fifth months of pregnancy and 24 hours following parturition. TT and AT III did not change significantly during the entire experiment, however PT and APTT were significantly prolonged following parturition and increased levels of fibrinogen and D-dimer were noted.

Keywords: coagulation, pregnancy, goats

Badanie układu krzepnięcia i wykrywanie jego zaburzeń od dawna stosowane było w medycynie ludzkiej w celu określenia homeostazy ustroju. Stwierdzone podczas poronień u kobiet zaburzenia układu krzepnięcia były rezultatem przedwczesnego odklejenia się łożyska (21). Podobne zmiany wskaźników krzepnięcia wykazano u krów podczas porodu, przy zapaleniach wymienia i w stanach niestrawności (11, 19). U cieląt noworodków zmiany tego typu związane były najczęściej z rozwojem schorzeń układu oddechowego (10).

Głównymi parametrami określającymi stan układu krzepnięcia są: czas protrombinowy (PT), czas aktywowanej tromboplastyny częściowej (APTT), czas trombinowy (TT), fibrynogen, D-dimer i antytrombina III. Czas protrombinowy jest wskaźnikiem świadczącym o stanie zewnątrzpochodnego układu aktywacji trombin, natomiast czas aktywowanej tromboplastyny częściowej (czas kaolinowo-kefalinowy) jest miarą sprawności wewnątrzpochodnego układu aktywacji protrombin (9). Czas trombinowy jest miarą zdolności przechodzenia fibrynogenu w fibrynę. Fibrynogen, którego syntezę indukują m.in. cytokiny i glikokortykoidy, jest białkiem odgrywającym główną rolę w procesie zlepienia płytek krwi (9).

D-dimer należy do najmniejszych i specyficznych produktów rozpadu włókniaka i wzrost jego stężenia w osoczu jest wynikiem aktywacji układu fibrynolizy oraz generowania plazminy (18).

Celem pracy było określenie zmienności wskaźników krzepnięcia u kóz w okresie ciąży i porodu.

Materiał i metody

Badania wykonano na 20 kozach rasy polskiej białej uszlachetnionej, w wieku 3-5 lat, będących w okresie

utrzymania alkiej. Krew do badań pobierano pięciokrotnie, pierwsze badanie zostało wykonane przed zapłodnieniem zwierząt, następne w drugim, czwartym i piątym miesiącu ciąży, ostatnie badanie wykonano 24 godziny po porodzie. Badane kozy były klinicznie zdrowe i wolne od ekto- i endopasożytów. Wykoty przebiegły bez komplikacji, siłami natury, dwanaście kóz urodziło jedno kózle, natomiast u ośmiu wystąpiły porody bliźniacze. W ciągu sześciu godzin od porodu u wszystkich zwierząt nastąpiło wyparcie łożyska.

Krew do badań pobierano z żyły jarzmowej, w godzinach przedpołudniowych, po rannym odpasie i wydoju zwierząt. Pobierano ją do plastikowych probówek z 3,2% cytrynianem sodu w stosunku 1 : 9, bezpośrednio po pobraniu krew dokładnie wymieszano, a następnie odwirowano przez 10 minut z prędkością 2000 obr./minutę w celu uzyskania osocza. W osoczu oznaczano metodą chromometryczną, mierząc zmianę gęstości optycznej, następujące wskaźniki: czas trombinowy (TT), czas protrombinowy (PT), czas kaolino-kefalinowy – tj. czas aktywowanej tromboplastyny częściowej (APTT) i fibrynogen. Poziom D-dimerów i aktywność antytrombin III oznaczono metodą z substratem chromogennym, wykorzystując kinetykę reakcji kolorymetrycznej przy długości fali 405 nm. Wszystkie oznaczenia wykonano na aparacie koagulologicznym Coag-Chrom 3003 firmy Bio-Ksel, wykorzystując gotowe zestawy tej samej firmy.

Wyniki badań poddano opracowaniu statystycznemu za pomocą testu Newmana-Keulusa przy użyciu programu Statistica 6.0.

Wyniki i omówienie

Czas trombinowy u wszystkich zwierząt w trakcie doświadczenia pozostawał na podobnym poziomie, najwyższe wartości osiągnął w pierwszym badaniu, najniższe w oznaczeniu 24 godziny po porodzie, lecz

zmiany te nie były statystycznie istotne i mieściły się w granicach norm przyjętych za referencyjne dla gatunku (6, 23) (tab. 1). Czas trombinowy jest miarą przechodzenia fibrynogenu w fibrynę i nie zależy od zewnątrz- i wewnątrzpochodnego układu aktywacji protrombiny. Wpływ na ten wskaźnik mają: poziom fibrynogenu, aktywność inhibitorów krzepnięcia, sprawność polimeryzacji i stabilizacji fibryny oraz obecność produktów jej degradacji (3). Badania prowadzone u przeżuwaczy wykazały wydłużenie TT w przypadku wystąpienia syndromu wewnętrznego wykrzepiania (DIC) stwierdzanego w schorzeniach o różnej etiologii (12). Nieznaczne skrócenie czasu trombinowego notowane u kóz w ostatnim badaniu (24 h po porodzie) można tłumaczyć wpływem wysiłku związanego z aktem porodu i tworzeniem się większych ilości trombiny we krwi. Podobne spostrzeżenia poczynili Heusewieser i wsp. (11) badający wskaźniki krzepnięcia u bydła w okresie okołoporodowym.

Czas protrombinowy w pierwszych czterech pobraniach był podobny u wszystkich zwierząt, natomiast w ostatniej próbie wzrósł w sposób statystycznie istotny (tab. 1). Czas protrombinowy jest miarą sprawności zewnątrzpochodnego układu aktywacji trombiny i zależy od czynników V, VII, X oraz poziomu protrombiny i fibrynogenu (9). Fizjologiczne stężenie protrombiny w osoczu znacznie przekracza stężenie niezbędne do szybkiego krzepnięcia i dlatego istnieje wiele mechanizmów przeciwdziałających nadmiernemu narastaniu czopu hemostatycznego i rozwojowi zakrzepu po uszkodzeniu naczynia. Szybkość aktywacji krzepnięcia jest uzależniona od miejsca inicjacji i łatwiej zachodzi na powierzchni komórek niż w płynnym osoczu (14). Na fosfolipidach błon komórkowych powstają kompleksy IXa–VIIa–X (aktywacja czynnika X oraz protrombinazy) oraz Xa–Va–II (aktywacja trombiny). Reakcje te zachodzą głównie na fosfolipidach płytek, które uległy adhezji w miejscu uszkodzenia ściany naczyniowej. Prawidłowy przebieg reakcji tworzenia kompleksów wymaga obecności witaminy K, czynników VII, IX, X, białek C i S oraz karboksylowanych reszt kwasu glutaminowego niezbędnych do wiązania jonów wapnia przez czynniki zależne od witaminy K (1). Obserwowany po porodzie u badanych kóz istotny wzrost czasu protrombinowego może odzwierciedlać nasiloną degradację czynników krzepnięcia, związaną z koagulacją krwi na skutek wydalania łożyska. Podobne obserwacje zostały poczynione u kobiet i u krów, ale dokładny mechanizm zmian nie został do końca wyjaśniony (8, 11).

Podobnie do czasu protrombinowego kształtowała się długość czasu aktywowanej tromboplastyny tkan-

Tab. 1. Wartości parametrów koagulologicznych badanych kóz (n = 20, $\bar{x} \pm s$)

Numer badania	TT (s)	PT (s)	APTT (s)	Fibrynogen (g/l)	D-Dimer (μg/l)	AT III (%)
1	17,61 ± 3,29	15,43 ± 1,76	31,61 ± 5,15	3,48 ± 0,54	372,51 ± 42,21	97,57 ± 10,54
2	16,95 ± 2,54	15,69 ± 2,01	32,42 ± 4,56	3,21 ± 0,35	315,11 ± 39,22	98,21 ± 9,32
3	17,32 ± 4,01	15,94 ± 1,54	32,23 ± 6,43	3,15 ± 0,31	391,36 ± 49,28	102,73 ± 11,87
4	16,49 ± 2,78	15,79 ± 1,65	33,73 ± 5,87	3,91 ± 0,43	399,57 ± 52,33	102,41 ± 10,76
5	16,21 ± 3,15	20,96* ± 1,83	37,69* ± 6,89	5,33** ± 0,59	549,21* ± 48,25	96,13 ± 9,15

Objaśnienia: * – różnice statystycznie istotne dla $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

kowej (APTT). W pierwszych czterech pobraniach u wszystkich zwierząt wartość tego wskaźnika była podobna, by w ostatniej próbie ulec istotnemu wydłużeniu (tab. 1). APTT jest miarą sprawności wewnątrzpochodnego układu aktywacji trombiny i zależy od zawartości w osoczu czynników V, VIII, IX, X, XI, XII, a także protrombiny i fibrynogenu. Wydłużenie APTT obserwowano w stanach niedoborów witaminy K (15) i w dysfunkcjach wątroby (2). W badaniach prowadzonych w okresie okołoporodowym u bydła (11) w pierwszych kilku godzinach po porodzie stwierdzano skrócenie czasu aktywowanej tromboplastyny tkankowej – wiązało to się z rozwojem nadkrzepliwości, natomiast już 24 godziny po porodzie wskaźnik ten ulegał wyraźnemu wydłużeniu, wskazując na niedokrzepliwość. Obserwowane u kóz wydłużenie APTT w ciągu 24 godzin po porodzie może wskazywać na stan niedokrzepliwości i jednocześnie być objawem zmian czynnościowych wątroby związanych z jej nadmiernym obciążeniem w okresie okołoporodowym.

Stężenie fibrynogenu w badanym osoczu w okresie trwania doświadczenia było wyrównane, wzrosło jedynie istotnie w ostatnim pobraniu (tab. 1). Fibrynogen, zbudowany z dwóch podjednostek zawierających trzy łańcuchy polipeptydowe połączone wiązaniami dwusiarczkowymi, jest końcowym produktem krzepnięcia. Synteza fibrynogenu zachodzi głównie w wątrobie, chociaż powstaje on także w układzie siateczkowo-śródbłonkowym (16). W dojrzałych płytkach krwi znajduje się w ziarnistościach α , skąd, wraz z innymi białkami, we wtórnej fazie ich agregacji uwalniany jest do krwi. Odgrywa główną rolę w zlepianiu płytek, a jego synteza jest indukowana przez cytokiny i glukokortykoidy (4). Zaliczany jest także do białek ostrej fazy, dlatego też znaczny wzrost zawartości fibrynogenu we krwi pojawia się w stanach stresu i w przypadku procesów zapalnych (7, 17). Biosynteza fibrynogenu przebiega na zasadzie sprzężenia zwrotnego, w zależności od poziomu produktów jego rozpadu oraz interleukin wytwarzanych przez uczynnione makrofagi (24). W procesach zakrzepowych dochodzi do jego kumulacji i zmniejszenia zawartości w osoczu. Obserwowany w badaniach własnych w miarę stabilny poziom fibrynogenu przed zapłodnieniem i w trakcie rozwoju ciąży u kóz świadczy o zachowaniu równo-

wagi pomiędzy jego syntezą a procesami fibrynolizy, natomiast istotny wzrost zawartości tego białka po porodzie może wskazywać na reakcję ostrej fazy związanej z odpowiedzią na stres porodowy i obciążeniem organizmu wysiłkiem. Podobne obserwacje poczynili inni autorzy, badający wskaźniki krzepnięcia w okresie okołoporodowym u bydła (11).

Zawartość D-dimeru, podobnie jak innych badanych wskaźników, uległa istotnej zmianie dopiero w ostatnim pobraniu (tab. 1). Parametr ten należy do tzw. pozostałości po rozpadzie fibrynogenu. Pod wpływem działania plazminy na fibrynogen i fibrynę powstają produkty rozpadu fibrynogenu, dzielące się na fragmenty wczesne (X, Y) oraz późne (D, E). Największe znaczenie diagnostyczne spośród nich mają dimery D (13). Produkty rozpadu fibryny i fibrynogenu wywierają niekorzystny wpływ na hemostazę poprzez hamowanie funkcji hemostatycznych płytek, hamowanie generacji tromboplastyny w osoczu lub hamowanie procesu polimeryzacji i stabilizacji włókniaka, co w efekcie może prowadzić do wytwarzania niepełnowartościowego skrzepu (13). Obserwowany u badanych zwierząt po porodzie istotny wzrost w osoczu poziomu D-dimeru wskazuje na wzmożony proces fibrynolizy związany z uaktywnieniem zarówno wewnątrzpochodnej, jak i zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia. Badania u ludzi wykazały, że na wzrost tego parametru mogą wpływać stany zapalne toczące się w organizmie, zmiany krwotoczne, chroniczne schorzenia wątroby lub procesy nowotworzenia, natomiast nie potwierdzono podobnych tendencji zmian u przeżuwaczy (20).

Aktywność antytrombiny III w przebiegu całego doświadczenia była w miarę wyrównana, nastąpił tylko nieznaczny jej spadek w ostatnim badaniu (tab. 1). AT III należy do szeregu inhibitorów krzepnięcia, spośród których najważniejsze to: kofaktor II heparyny (HC II), białko C i S oraz α_2 -makroglobulina. Antytrombina III jest glikoproteiną złożoną z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, syntetyzowaną w wątrobie, w komórkach śródbłonna, megakariocytach i płytkach krwi (5). Białko to należy do proteaz serynowych, tzw. serpin, czyli białek inaktywujących trombinę. Jest ona najważniejszym fizjologicznym inhibitorem trombiny i tworzy z nią kompleks w stosunku 1 : 1, który następnie zostaje usunięty z krwi krążącej przez układ makrofagów (5). Wzrost aktywności AT III wykazano po porodzie u kobiet (8), u ludzi z zaburzeniami serca i układu naczyniowego, co wskazywało na stan nadkrzepliwości (22). Badania wykonane u bydła wykazały natomiast nieznaczny spadek tego parametru w trakcie porodu i świadczyły o tym, że występujący w takim przypadku stan niedokrzepliwości nie jest związany z inaktywacją antytrombiny III (11). Obserwowana w badaniach własnych u kóz nieistotnie zmniejszona aktywność AT III w ostatnim pobraniu jest potwierdzeniem tej tezy.

Reasumując należy stwierdzić, że w trakcie przebiegu ciąży u kóz nie następuje istotna zmiana wskaźników krzepnięcia, natomiast 24 h po porodzie występuje nieznaczny stan niedokrzepliwości związany ze stresem i wysiłkiem porodowym. Na podstawie uzyskanych wyników badań kóz zachodzi potrzeba podjęcia dalszych obserwacji dotyczących zmienności wskaźników krzepnięcia w pierwszych godzinach po porodzie, gdyż takich badań u tego gatunku zwierząt do tej pory nie prowadzono.

Piśmiennictwo

1. Andrew M., Paes B., Johnston M.: Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. *Am. J. Ped. Hematol/Oncol.* 1990, 12, 95-104.
2. Badylak S. F., Van Fleet J. F.: Alterations of prothrombin time and activated thromboplastin time in dogs with hepatic disease. *Am. J. Vet. Res.* 1981, 42, 2053-2056.
3. Bick R. L., Murano G.: Physiology of hemostasis. *Clin. Lab. Med.* 1994, 14, 677-707.
4. Brown L. F., Lanir N., McDonagh J., Tognazzi K., Dvorak A. M., Dvorak H. F.: Fibroblast migration in fibrin gel matrices. *Am. J. Pathol.* 1993, 135, 647-655.
5. Dąbrowska J., Wiśniewski E.: Antytrombina III – podstawowy inhibitor krzepnięcia krwi. *Medycyna Wet.* 1993, 49, 395-396.
6. Eya K., Tatsumi E., Taenaka Y.: Development of a membrane oxygenator for long-term respiratory support and its experimental evaluation in prolonged ECMO. *Am. Soc. Artif. Int. Organ J.* 1996, 42, 832-836.
7. Fernandez A., Ramos J. J., Saez T., Sanz M. C., Verde M. T.: Changes in the coagulation profile of lambs itoxicated with aflatoxin in their feed. *Vet. Res. Com.* 1995, 26, 180-184.
8. Franchini M.: Haemostasis in pregnancy. *Thromb. Haemost.* 2006, 95, 401-413.
9. Gentry P. A.: Comparative aspects of blood coagulation. *Vet. J.* 2004, 168, 238-251.
10. Gentry P. A., Ross M. L., Hayatcheybi H.: Competency of blood coagulation in newborn calf. *Res. Vet. Sci.* 1994, 57, 336-342.
11. Heusewieser W., Kautni J., Biesel M., Grunert E.: Coagulation profile of dairy cattle in the periparturient period. *J. Vet. Med. A.* 1990, 37, 8-15.
12. Irmak K., Turgut K.: Disseminated intravascular coagulation in cattle with abomasal displacement. *Vet. Res. Com.* 2005, 29, 61-68.
13. Jarzębska J.: Znaczenie D-Dimerów w diagnostyce zaburzeń hemostazy. BioMerieux, Warszawa 1998.
14. Mann K. G., Nesheim M. E., Lawson L. H.: Surface dependent hemostasis. *Semin. Hematol.* 1992, 29, 213-226.
15. Mason D. J., Abrams-Ogg A., Allen D., Gentry P. A., Gadd K. R.: Vitamin-K-dependent coagulopathy in a black Labrador Retriever. *J. Vet. Int. Med.* 2002, 16, 485-488.
16. Moresson M. W.: The roles of fibrinogen and fibrin in hemostasis. *Semin. Hematol.* 1992, 29, 176-180.
17. O'Brien D. J., Robinson A. B., Gray J. S., O'Reilly P. F.: Haematology and blood biochemistry during the course of psoroptic scabies in sheep. *Vet. Res. Com.* 1995, 19, 39-48.
18. Sandholm M., Vidovic A., Puotunen-Reinert A., Sankari S., Nyholm K., Rita H.: D-Dimer improves the prognostic value of combined clinical and laboratory data in equine gastrointestinal colic. *Acta Vet. Scand.* 1995, 36, 255-261.
19. Schlerka G., Baumgartner W., Trenti F.: Blood coagulation profile of healthy pregnant and non-pregnant cows and cows with disease. *Proc. 18th World Buiatric Congress, Bologna 1994*, s. 1277.
20. Smith B. P.: Large animal internal medicine. Mosby, Philadelphia 1990, 1068-1084.
21. Stirling Y., Woolf L., North W., Seghatchian M. J., Meade T. W.: Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb. Haemost.* 1984, 52, 176-182.
22. Sykes T. C. F., Fegan C., Mosquera D.: Trombophilia, polymorphism and vascular disease. *J. Clin. Pathol.: Molecular Pathol.* 2000, 53, 300-306.
23. Taenaka Y., Matsuda T., Eya K., Tatsumi E.: Influences of ventricular assist device pumping on blood coagulation. *Am. Soc. Artif. Int. Organ J.* 1989, 35, 396-398.
24. Vogels M. T. E., Cantoni L., Carelli M., Sironi M., Ghezzi P., Van Der Meer J. W. M.: Role of acute-phase proteins in interleukin-1 induced non-specific resistance to bacterial infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993, 37, 2527-2533.

Adres autora: dr wet. Przemysław Sobiech, ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn; e-mail: psobiech@uwm.edu.pl