

Université de Montréal

**Mesure de la génération de thrombine et son application
pour la surveillance pharmacothérapeutique de
l'héparine de faible poids moléculaire chez le chien**

par

CAROLYN GARA-BOIVIN

Département de pathologie et de microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en
vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires, option pathologie

Juillet 2013

© Carolyn Gara-Boivin, 2013

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé :

**Mesure de la génération de thrombine et son application pour la
surveillance pharmacothérapeutique de l'héparine de faible
poids moléculaire chez le chien**

présenté par :

Carolyn Gara-Boivin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Mariela A. Segura, présidente-rapporteuse

Dr Christian Bédard, directeur de recherche

Dre Marilyn Dunn, co-directrice

Dr Jean-Pierre Lavoie, membre du jury

RÉSUMÉ

Chez le chien, la daltéparine est un anticoagulant utilisé pour la prévention et le traitement de la thrombose. La surveillance thérapeutique de la daltéparine par l'activité anti-facteur Xa (FXa) n'est pas un test fonctionnel. Cette étude avait pour but d'étudier l'emploi de la génération de thrombine (GT) pour évaluer les effets *in vitro* de la daltéparine sur du plasma canin, ainsi que pour détecter les effets pharmacodynamiques de la daltéparine administrée chez des chiens sains. Premièrement, les paramètres normaux de la GT ont été établis à partir du plasma de 25 beagles et 11 chiens sains de clients. Ensuite, des pools de plasma canin fortifié avec de la daltéparine, à dose croissante, ont été analysés selon la GT, l'activité anti-FXa et selon le temps de thromboplastine partielle activée (aPTT). Finalement, 24 beagles sains répartis au hasard dans 4 groupes ont reçu soit une dose sous-cutanée (SC) de 50U/kg, 100U/kg ou 150U/kg de daltéparine ou un placebo. Du plasma pauvre en plaquettes (PPP) a été récolté pendant 24 heures et analysé selon la GT, l'anti-FXa et l'aPPT. *In vitro*, la daltéparine a démontré un effet anticoagulant sur la GT qui était concentration-dépendant. Les tests de GT et anti-FXa étaient plus sensibles aux effets de la daltéparine que l'aPPT. L'étude pharmacodynamique a démontré que le temps, la dose ainsi qu'une interaction temps*dose avaient un effet significatif sur les paramètres de GT et anti-FXa. La GT peut mesurer les effets pharmacodynamiques de la daltéparine à des doses variées chez des chiens sains.

Mots-clés : daltéparine, héparine de faibles poids moléculaire, génération de thrombine, anti-FXa, anticoagulation, pharmacodynamie, chiens, *in vitro*

ABSTRACT

Dalteparin is an anticoagulant used to prevent and treat thrombotic disorders in dogs. Measurement of anti-factor Xa (FXa) activity is currently used for monitoring therapy, but remains a non-functional test. The aim of this study was to investigate if a thrombin generation (TG) assay could be used for the *in vitro* evaluation of the effects of dalteparin on canine plasma, as well as for monitoring the pharmacodynamic effects of dalteparin administration in healthy dogs. Normal TG parameters were assessed in plasma from 25 adult beagles and 11 client-owned healthy dogs. Pooled plasma was spiked with dalteparin to obtain 9 final increasing concentrations. TG, anti-FXa activity and activated partial thromboplastin time (aPTT) were measured for each concentration. 24 healthy beagles were randomized across four equal groups. A single SC dose of 50 U/kg, 100 U/kg or 150 U/kg of dalteparin was given and compared to a placebo group. Platelet poor plasma (PPP) was collected over 24 hours and assayed by TG, anti-FXa activity and aPTT. *In vitro* results showed that dalteparin exerted a concentration-dependent anticoagulant effect on TG parameters and TG and anti-FXa activity were more sensitive than aPTT to detect these effects. The pharmacodynamics study showed a time, dose and time*dose interaction that significantly affected TG and anti-FXa parameters. TG can be employed to measure the pharmacodynamics effects of dalteparin at different doses in healthy dogs.

Keywords: dalteparin, low-molecular-weight-heparin, thrombin generation, anti-FXa, anticoagulation, pharmacodynamics, dogs, *in vitro*

TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLES DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTES D'ABRÉVIATIONS.....	xii
DÉDICACE.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	4
1. La thrombose veineuse.....	5
1.1. Incidence.....	6
1.2. Pathophysiologie.....	8
1.2.1. Formation du thrombus veineux.....	8
1.2.2. La coagulation.....	9
1.2.3. Composition des thrombi.....	14
1.2.4. Les microparticules.....	15
1.3. Clinique.....	18
1.3.1. Circonstances et facteurs de risque.....	18
1.3.2. Signes cliniques et diagnostic.....	18

2. L'héparine de faible poids moléculaire.....	21
2.1. Historique.....	21
2.2. Mécanisme d'action	22
2.3. Une pharmacocinétique avantageuse	26
2.4. Pharmacocinétique chez les chiens.....	27
2.5. Indications cliniques	28
2.6. Dosage.....	29
3. Surveillance de laboratoire lors de traitements à l'héparine de faible poids moléculaire.....	31
3.1. La surveillance	31
3.2. Tests standard de la coagulation pour la surveillance.....	32
3.3. La mesure de l'activité anti-FXa.....	33
3.4. Les limites de l'activité anti-FXa comme outil de surveillance	34
3.5. Les tests permettant l'évaluation globale de la coagulation	36
4. La Génération de Thrombine	38
4.1. Mesure de la génération de thrombine.....	39
5. But du projet.....	44
6. Hypothèses de la recherche.....	44
 CHAPITRE 2: ARTICLES	 45
ARTICLE 1	46
Abstract	48

Introduction	50
Material and Methods	51
Data Analysis	55
Results	56
Discussion	57
Footnotes	62
References	63
Tables	67
Figures	69
ARTICLE 2	73
Abstract	75
Introduction	76
Material and Methods	78
Data analysis	80
Results	81
Discussion	84
Footnotes	91
References	92
Tables	96
Figures	97

CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION	102
DISCUSSION GÉNÉRALE	103
CONCLUSION	112
BIBLIOGRAPHIE	114

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Paramètres et interprétation du thrombogramme	41
---	----

ARTICLE 1 :

Table I-I. Number, sex, age range, weight range, breeds, and number of dogs per breed of the groups of dogs used in this study.....	67
--	----

Table I-II. Thrombin generation values in healthy client-owned dogs and research beagles .	68
---	----

ARTICLE 2 :

Table II-I. Maximal anticoagulation levels achieved for ETP and anti-FXa	96
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Modèle cellulaire de la coagulation : la phase d'initiation.....	11
Figure 2. Modèle cellulaire de la coagulation : la phase d'amplification.....	12
Figure 3. Modèle cellulaire de la coagulation : la phase de propagation.....	13
Figure 4. Inactivation du Facteur Xa ou de la thrombine par l'antithrombine liée par l'héparine standard ou l'héparine de faible poids moléculaire.....	24
Figure 5. Tracé de la génération de thrombine par le « Calibrated Automated Thrombogramme».....	40

ARTICLE 1 :

Figure 1.1. Scatter plot of thrombin generation parameters for healthy client-owned dogs and healthy beagles.....	69
Figure 1.2. Thrombograms obtained for serial dilutions of dalteparin.....	70
Figure 1.3. Plot of the predicted function for endogenous thrombin time (ETP) versus concentration of dalteparin <i>in vitro</i>	71
Figure 1.4. <i>In vitro</i> plasma dalteparin concentration required for doubling or for halving the baseline value coagulation parameters.	72

ARTICLE 2 :

Figure 2.1. Time course of mean total thrombin generated (ETP) after a single SC dose of dalteparin97

Figure 2.2. Time course of mean anti-FXa activity after a single SC dose of dalteparin.....98

Figure 2.3. Endogenous thrombin potential (ETP) obtained in individual beagle dogs after a single SC dose of dalteparin99

Figure 2.4. Individual return to baseline times calculated for ETP and anti-FXa for each dosing group.100

Figure 2.5. Inhibition of ETP relative to baseline value, as a function of anti-FXa activity in beagle dogs treated with SC dalteparin.....101

LISTES D'ABRÉVIATIONS

aPTT: temps de thromboplastine
partielle activée / activated partial
thromboplastin time

AT: antithrombine

CAT: Calibrated Automated
Thrombogram

ETP: potentiel endogène de
thrombine/endogenous thrombin
potential

F: facteur (de coagulation)

FT: facteur tissulaire

F4P: facteur 4 plaquettaire

GT: génération de thrombine/TG :
thrombin generation

HFPM: héparine de faible poids
moléculaire

MP: microparticules

PPP: plasma pauvre en
plaquettes/platelet poor plasma

PAR: protease activated receptor

PT: temps de prothrombine

PSGL-1: P-selectine-ligand-2

TEG: thromboélastographie

TEP: thromboembolies pulmonaires

TEV: thromboembolies veineuses

TFPI: «tissue factor pathway inhibitor»

TIH: thrombocytopénie induite par
l'héparin

ARTICLES

AIC: Akaike information criterion of
goodness of fit

AT: antithrombin

CAL: calibrator

CAT: Calibrated Automated
Thrombogram

CTI: corn trypsin inhibitor

ETP: endogenous thrombin potential

F: (coagulation) factor

LMWH: low molecular weight heparin

PPP: Platelet-poor plasma

TEG: thromboelastography

TG: thrombin generation

TF: tissue factor

UH: unfractionated heparin

DÉDICACE

À mes parents et à ma sœur,

À Geneviève,

À la mémoire de mes grands-parents

REMERCIEMENTS

Au Dr Christian Bédard, mon directeur de recherche, pour m’avoir donné l’opportunité de réaliser ce projet de recherche et pour sa patience, son soutien et son amitié depuis plusieurs années.

Au Dr Jérôme Del Castillo, pour ces nombreuses heures de travail, analyses statistiques et conseil précieux tout au long de la réalisation de ce projet.

Au Dre Marilyn Dunn pour son aide et support à la réalisation de ce projet, ainsi que son amitié au long du projet.

Aux Dre Mariela A. Segura et Dr Jean-Pierre Lavoie, pour m’avoir fait l’honneur d’accepter de faire partie de mon jury de maîtrise.

À Maxim Moreau, pour son aide avec des analyses statistiques et techniques.

À Geneviève Hébert, pour sa compréhension et support pendant de nombreuses heures de travaux.

À mes amis ainsi que ma mère, qui m’ont accompagnée tout au long de ce parcours et qui n’ont pas cessé de me soutenir moralement et de m’encourager.

INTRODUCTION

En 1676, Wiseman décrit pour la première fois la formation pathologique d'un caillot sanguin menant à une thrombose veineuse.¹ Étonnamment, trois cents années plus tard, la thrombose veineuse maintient toujours sa place comme problème médical grave tant chez les petits animaux²⁻⁵, que chez les humains.⁶ Chez les chiens, les désordres thrombotiques sont des complications fréquentes de maladies systémiques, de traumatismes ou résultant de l'utilisation de corticostéroïdes, par exemple.⁷ La daltéparine, une héparine de faible poids moléculaire (HFPM) faisant partie d'une grande famille d'anticoagulants, fut élaborée dans les années 1970.⁸ La daltéparine est présentement utilisée chez les chiens pour la prévention de thromboses, remplaçant l'héparine standard depuis quelques années.⁹

Nous verrons en effet dans la première partie de ce mémoire que la compréhension de la pathophysiologie de la thrombose veineuse, les mesures diagnostiques, les anticoagulants – notamment l'héparine de faible poids moléculaire – ainsi que les tests de surveillance lors de traitements sont encore peu maîtrisés à l'heure actuelle.

Quoique l'activité anti-facteur Xa (FXa) soit considérée comme un test de référence¹⁰ pour la surveillance pharmacothérapeutique des anticoagulants, une revue de la littérature fait ressortir de nombreuses lacunes et de multiples problèmes reliés à cette méthode ainsi qu'aux autres tests d'évaluation de la coagulation. L'obstacle principal de la mesure de l'activité anti-FXa demeure qu'il ne s'agit pas d'un test fonctionnel de la coagulation, mais qu'elle reflète simplement la concentration de l'HFPM dans le sang.^{11,12}

Aucune information sur l'effet de la daltéparine sur le système de la coagulation de l'animal n'est fournie. De ce fait, les traitements thérapeutiques avec la daltéparine chez les animaux sont, au mieux, empiriques puisqu'ils sont basés sur la pharmacocinétique et la littérature traitant de la santé humaine. Le manque d'études sur les effets pharmacodynamiques de cet anticoagulant chez le chien peut avoir des conséquences graves: la mort par thrombose ou des saignements.

En recherche humaine, il existe depuis quelques années, des tests pour analyser la coagulation d'une manière plus globale et fonctionnelle. Entre autres, le *Calibrated Automated Thrombogram* (CAT) est un test qui met l'emphasis sur l'activité enzymatique de la thrombine et sur son rôle clé dans la coagulation. Ce test mesure le potentiel de la génération de thrombine (GT) dans le plasma des patients.¹³ La thrombine, l'enzyme nécessaire à la formation du fibrinogène, est le produit de toutes les interactions et amplifications des facteurs de coagulations, lorsqu'ils sont activés.¹⁴ Cette approche donne une vue globale de l'état de coagulation du patient et pourrait s'avérer utile pour détecter l'effet de la daltéparine chez les chiens.

Notre hypothèse d'étude était que le CAT serait sensible aux effets de la daltéparine, à différentes doses thérapeutiques, chez les chiens et qu'il pourrait être utilisé comme outil de surveillance pharmacothérapeutique. Afin d'étayer cette hypothèse, notre premier objectif était d'établir des valeurs normales pour les paramètres de la GT en utilisant le CAT. De plus, dans le but de vérifier la sensibilité du CAT à la daltéparine et la faisabilité de ce projet, notre deuxième objectif était de mener une étude *in vitro* utilisant

des concentrations croissantes de daltéparine dans du plasma canin. Ces deux objectifs sont présentés dans le premier article de ce mémoire. Le deuxième article décrit notre étude pharmacodynamique suivant l'administration de daltéparine, à trois différentes doses thérapeutiques, chez des chiens sains. Les résultats de la surveillance par la GT et les tests de coagulation standards sont analysés et discutés.

CHAPITRE 1: RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. La thrombose veineuse

Lors de brèche vasculaire, la formation d'un caillot sanguin est une fonction normale et souhaitable du système de coagulation. En état physiologique, l'hémostase maintient un équilibre harmonieux entre de nombreux processus hémostatiques et garde le sang dans un état fluide.¹⁵ La thrombose est donc considérée comme le résultat d'une activation inappropriée de la coagulation lors de déséquilibres entre les propriétés anticoagulantes et procoagulantes sanguines normales, menant à des conséquences graves sur la santé.¹⁶ La première description détaillée scientifique de la thrombose veineuse a eu lieu en 1676 par Wiseman qui a décrit chez une femme, suite à l'accouchement, la présence d'une enflure et douleur allant de la hanche droite jusqu'au genou, sans inflammation ou décoloration. Wiseman fut le premier à conjecturer que la formation d'un thrombus était causée par une altération dans la circulation sanguine.¹ La thrombose veineuse profonde est un caillot sanguin qui se produit dans une veine profonde alors qu'une thromboembolie pulmonaire est la conséquence d'un caillot sanguin qui se forme et qui se détache d'une veine pour finalement se loger dans les artères pulmonaires. Depuis, son traitement ainsi que sa prévention ont fait l'objet d'une multitude de recherches non seulement chez l'humain,¹⁷⁻²¹ mais aussi chez les animaux.^{9,22-24} Malgré tout, la thrombose veineuse demeure une complication hémostatique fréquente, souvent imprévisible et parfois mortelle.

1.1. Incidence

Plusieurs études ont été menées afin d'observer l'épidémiologie des thromboembolies veineuses (TEV) aux États-Unis et en Europe. Selon ces rapport, une à deux personnes sur 1000 sont nouvellement affectées chaque année aux États-Unis.^{18,25} Un tiers de ces cas sont atteints d'une embolie pulmonaire et l'autre deux tiers d'une thrombose veineuse profonde.²⁵ En 2004, l'utilisation d'un modèle épidémiologique a permis d'estimer à plus d'un million le nombre de TEV par année à travers la France, l'Allemagne, l'Italie, l'Espagne, la Suède et l'Angleterre avec un taux de mortalité de 12 %.²⁶ Selon Cohen, Agneli et coll. (2007), de nombreux cas ainsi que plusieurs décès auraient pu être prévenus avec l'utilisation de traitements appropriés. En conséquence, la TEV est la troisième cause de décès reliée aux maladies cardio-vasculaires, derrière son analogue artériel, le thrombus artériel. Ce dernier étant responsable de nombreux infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux.²⁷

Depuis quelques années, une attention particulière a été attribuée aux maladies vétérinaires associées à une augmentation des risques de complications thrombotiques, quoiqu'il y ait toujours absence de grandes études épidémiologiques vétérinaires. L'incidence précise des TEV chez les animaux est aussi plus difficile à déterminer en raison des signes qui peuvent être peu spécifiques. Dans une étude rétrospective, seulement 38 % des 29 chiens ayant reçu un diagnostic de thromboembolies pulmonaires (TEP) à la nécropsie étaient suspectés de souffrir de TEP ante-mortem.² D'ailleurs, certaines méthodes diagnostiques ante mortem et non invasives démontrent effectivement

une faible sensibilité pour la détection de la TEV.²⁸ La validation de nouvelles techniques pour la détection de facteurs de risque pour les TEV est devenue un domaine actif de la recherche vétérinaire actuelle.²⁹⁻³¹

Chez les chiens atteints d'anémie hémolytique à médiation immunitaire, les thromboembolies sont une cause majeure de mortalité³² avec une incidence à la nécropsie variant de 32-80 % selon les études.^{3,24} De plus, 22 % des chiens qui souffrent d'une néphropathie avec perte de protéines auraient également des thromboembolies.³³ Ces chiffres sont probablement sous-estimés étant donné la lyse rapide des thrombus qui rend leur détection difficile post-mortem. Dans une étude expérimentale chez le chien, 50 % des thrombi étaient lysés en moins de 3 heures après le décès.³⁴ Chez le chien, les thrombi seraient lysés beaucoup plus rapidement que chez les humains, probablement en raison d'une activité plus importante de l'activateur du plasminogène, une enzyme protéolytique initiant la fibrinolyse. Ce dernier est sécrété par l'endothélium pulmonaire et contrairement aux humains, est retrouvé au niveau de plaquettes canines. Les plaquettes humaines expriment notamment l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène.³⁵

Des études rétrospectives récentes ont démontré l'importance des TEV en médecine vétérinaire. Plusieurs cas de thrombose veineuse porte⁴ et splénique³⁶ ont été rapportés chez le chien, ainsi que la présence de thrombose veineuse chez d'autres espèces domestiques telles que le chat,^{5,37} le cheval^{38,39} et la vache.⁴⁰ L'observation fréquente de thromboembolies à la nécropsie suggère une prévalence supérieure à celle préalablement soupçonnée.⁴¹ Malgré l'intérêt accru des chercheurs et cliniciens

vétérinaires pour les TEV, nous devons souvent nous appuyer sur la littérature humaine afin de rationaliser la pathophysiologie, les causes sous-jacentes ainsi que les choix thérapeutiques.

1.2. Pathophysiologie

1.2.1. Formation du thrombus veineux

Malgré la présence importante, voire grandissante, des TEV chez les humains et les animaux, la pathophysiologie n'est toujours pas entièrement élucidée. En effet, un des plus grands pas vers la compréhension de la pathophysiologie remonte à plus de 150 ans quand, en 1856, Rudolph Virchow propose les déterminants majeurs de la thrombose. Il conclut que les thrombus se produisent en présence de trois facteurs : 1- l'hypercoagulabilité, 2- l'altération du flux sanguin et 3- la présence de lésions à l'endothélium vasculaire. Ces trois éléments constituent ce que l'on appelle la triade de Virchow.⁴² Elle est encore considérée comme un bon modèle permettant d'expliquer la formation de thrombose veineuse. Malgré que les mécanismes au niveau moléculaire et cellulaire demeurent obscurs et parfois contestés,⁴³ elle explique, du moins en partie, les maladies qui prédisposent à la formation de thromboembolie. Par exemples, certaines maladies qui prédisposent à la thrombose veineuse causent des dommages vasculaires endothéliaux (néoplasie, maladies cardiaques, maladies rénales) et d'autres de la stase sanguine (maladies cardiaques, néoplasie). Par ailleurs, certaines maladies sont responsables d'un changement de la composition sanguine (hypercoagulabilité), causant

soit une augmentation des facteurs procoagulants ou une diminution des facteurs anticoagulants (maladies rénales).⁴⁴ Quand le système régulateur de l'hémostase devient accablé par un processus pathologique, une quantité excessive de thrombine se forme, initiant la coagulation et la formation de thrombi.⁴⁵ Les caillots sanguins peuvent ensuite se déloger, prendre la circulation sanguine, et s'installer au niveau de la vascularisation pulmonaire, la veine porte, la veine cave, l'aorte, le cœur, les artères rénales et cérébrales, la veine fémorale et les vaisseaux de la microcirculation. Peu importe la localisation, l'absence d'apport sanguin dans les régions atteintes peut avoir des conséquences désastreuses.⁴¹

1.2.2. La coagulation

Classiquement, l'hémostase était simplifiée en divisant les mécanismes en hémostase primaire et en hémostase secondaire. Brièvement, l'hémostase primaire implique les interactions entre les plaquettes, le facteur von Willebrand et l'endothélium vasculaire, dans le but de former un bouchon plaquettaire. L'hémostase secondaire permet de stabiliser ce bouchon plaquettaire en solidifiant les liens entre les plaquettes avec de la fibrine. Ceci est le résultat d'une cascade de coagulation, divisée auparavant en voie extrinsèque et intrinsèque. Cette cascade est composée de protéase synthétisée majoritairement dans le foie, dont le but ultime est de transformer le fibrinogène en fibrine.⁴⁶

Notre nouvelle compréhension de l'hémostase incorpore le rôle primordial de la thrombine dans la coagulation. Ce modèle plus récent met l'accent sur le rôle central que joue la thrombine dans les mécanismes d'hémostase, de thrombose et de fibrinolyse. Ce concept, nommé le modèle cellulaire de la coagulation, repose aussi sur l'intégration de cellules qui interagissent et qui portent des récepteurs spécifiques pour les facteurs de coagulation. Ce modèle implique la présence de ces facteurs au site de la brèche vasculaire.⁴⁷ Il comprend l'hémostase primaire, l'hémostase secondaire ainsi que la cascade de coagulation en voie extrinsèque et intrinsèque. Nous réalisons que les séquences se font de manière plutôt simultanée avec une interaction de toutes les composantes à la fois, maintenant attribués à trois étapes; l'initiation, l'amplification et la propagation de la formation du thrombus.⁴⁸

1.2.2.1. L'Initiation

L'initiation de la coagulation est déclenchée par l'exposition du facteur tissulaire (FT) au FVIIa circulant (Fig. 1). Les cellules exprimant le FT sont généralement localisées à l'extérieur du système vasculaire, ce qui prévient l'initiation de la coagulation en absence de bris vasculaire.⁴⁹ Certaines cellules en circulation (monocytes ou cellules tumorales) ainsi que certaines microparticules provenant de cellules peuvent exprimer le FT à leur surface membranaire. Cependant, normalement le FT est crypté ou non actif.⁴⁷ Il y a 1 % du facteur VII qui circule dans sa forme active (FVIIa) dans le sang et qui se lie rapidement au FT exposé lors de brèche vasculaire. Le complexe FT-FVIIa active d'autre FVII en FVIIa, permettant davantage la formation du complexe FT-FVIIa. Ce complexe

active une petite quantité de FIX et FX. Le FXa généré par le FT-FVIIa peut activer une petite quantité de FV en FVa et le FXa se lie au FVa pour former le complexe prothrombinase (FXa-FVa). Ce complexe clive la prothrombine (FII) et génère une petite quantité de thrombine (FIIa). Tout le FXa qui se dissocie de la surface membranaire est rapidement inactivé par le TFPI (tissue factor pathway inhibitor) ou par l'antithrombine. Toutefois, la petite quantité de FIXa formé n'est pas inactivé par le TFPI et peut se déplacer et se loger à la surface de plaquettes avoisinantes, pour participer à la phase d'amplification.⁵⁰ La formation de la petite quantité de thrombine est le point essentiel de cette phase, car cette thrombine est responsable en grande partie de la phase d'amplification de la coagulation.

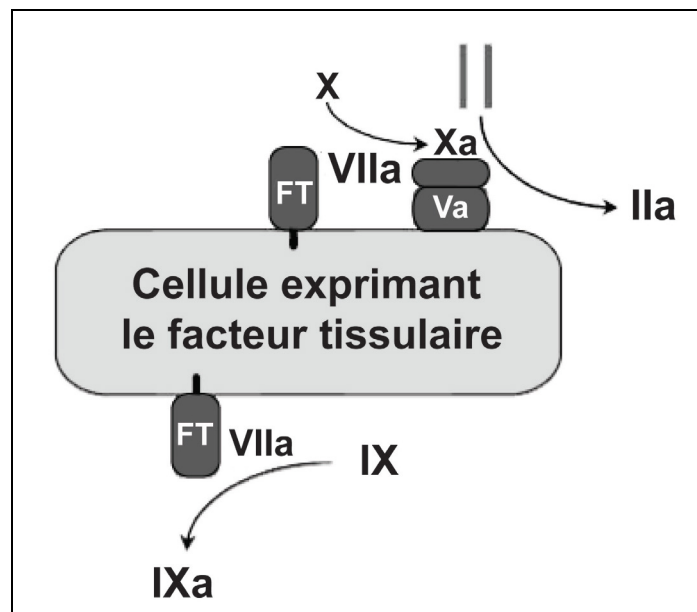


Figure 1. Modèle cellulaire de la coagulation : la phase d'initiation (adapté de Hoffman, M. (2003). "A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa." Blood Rev 17 Suppl 1: S1-5.)

1.2.2.2. L'amplification

Lorsque la thrombine est générée à la surface des cellules exprimant le FT, il se détache et devient disponible pour activer les plaquettes qui se trouvent aussi au niveau de la brèche vasculaire. L'activation des plaquettes comprend des changements au niveau de la surface causant des transformations structurelles et un réarrangement des phospholipides, le tout créant une surface procoagulante. De plus, cette activation stimule la sécrétion de granules contenant des protéines, entre autres du FV supplémentaire, qui contribue à la coagulation. Ensuite, à la surface plaquettaire, les molécules de thrombine activent le FXI en FXIa, le FV en FVa et permet la séparation du facteur von Willebrand du FVIII ce qui l'active en FVIIIa (Fig 2.).^{47,48}

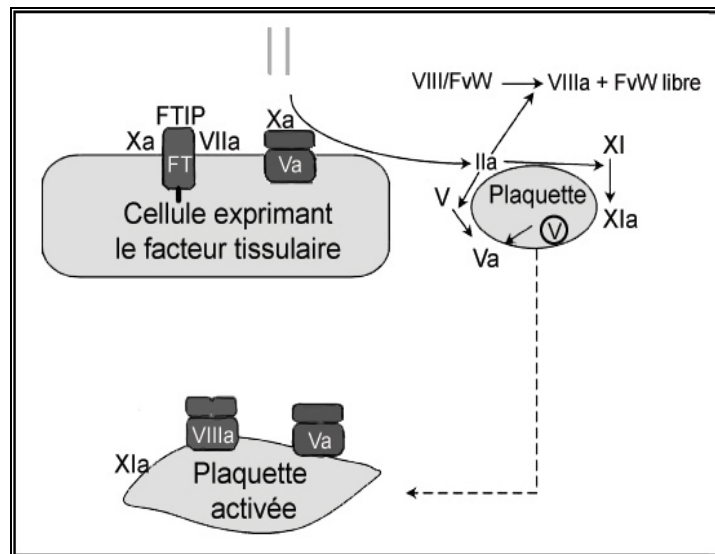


Figure 2. Modèle cellulaire de la coagulation : la phase d'amplification (adapté de Hoffman, M. (2003). "A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa." Blood Rev 17 Suppl 1: S1-5.)

1.2.2.3. La propagation

Suivant l'activation des facteurs de coagulation durant la phase d'initiation et d'amplification, c'est à la surface des plaquettes que le FIXa (formé lors de l'initiation et maintenant déplacé au niveau des plaquettes) se combine au FVIIIa pour former le complexe tenase intrinsèque (FIXa-FVIIIa). La tenase active rapidement le FX en FXa qui pourra se lier ensuite au FVa et former le complexe prothombinase.⁴⁷ C'est également à la surface des plaquettes que la prothombinase accélère la vitesse de génération de thrombine (FIIa). Cette accélération crée une explosion de la génération de thrombine à plus de 300 000 fois la quantité de thrombine qui est générée dans la phase d'initiation.¹⁴

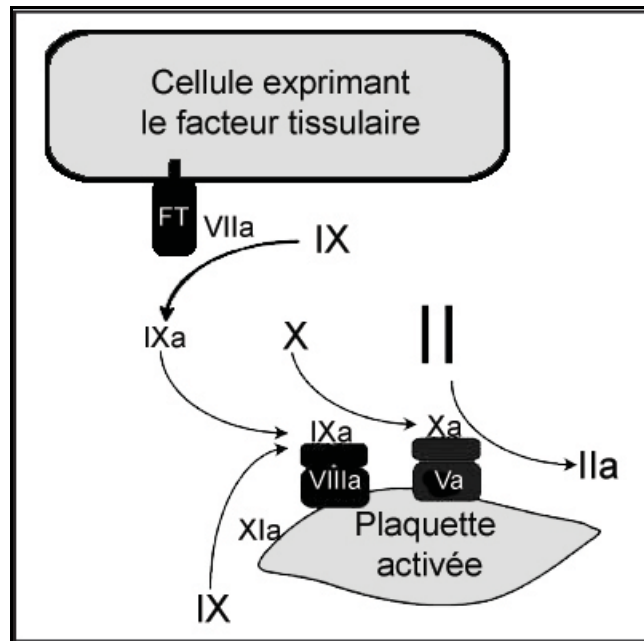


Figure 3. Modèle cellulaire de la coagulation : la phase de propagation (adapté de Hoffman, M. (2003). "A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa." Blood Rev 17 Suppl 1: S1-5.)

De plus, la thrombine active le FXIII (facteur de la stabilisation de la fibrine) en FXIIIa et transforme le fibrinogène en fibrine qui se polymérise. Le caillot de fibrine se forme quand seulement 2-5 % de la thrombine est formée. La génération de thrombine, quant à elle, continue après le début de la formation du thrombus.^{14,51}

1.2.2.4. La phase de neutralisation

Les inhibiteurs naturels de la coagulation tels que la thrombomoduline, la protéine C active, son cofacteur la protéine S ainsi que l'antithrombine, inhibent les sérines protéases et interviennent donc dans la régulation de la thrombine par la diminution de sa génération et inhibant de son activité. Un fonctionnement déficient des inhibiteurs naturels conduit à une génération de thrombine excessive.⁵¹

1.2.3. Composition des thrombi

Mackman et coll. (2008) ont décrit que les thrombi blancs étaient riches en plaquettes et se formaient dans les artères.²⁷ De plus, il est noté que les plaquettes seraient l'élément sanguin qui se retrouve le plus près des parois endothéliales lors de thrombi artériels.⁵² La relation entre un défaut mural d'un vaisseau sanguin et la formation d'un thrombus blanc est mise en évidence lors de la formation de thrombi artériels, à la suite de la rupture de plaques athérosclérotiques.⁵³

En revanche, les thrombi formés dans les veines (thrombi rouges) sont plutôt riches en fibrine et contiennent des globules rouges en amas. De plus, ce sont les régions riches en fibrine auxquelles s'attachent les thrombi à la paroi des vaisseaux, alors que les régions riches en plaquettes sont localisées à distance du site d'ancrage du thrombus.⁵⁴ Ceci suggère que l'activation de la coagulation précède l'activation et l'agrégation plaquettaire durant la formation de thromboses veineuses. Ces observations témoignent du modèle cellulaire de la coagulation et permettent une meilleure compréhension quant à l'inefficacité des drogues antiplaquettaires lors de TEV.⁴²

Toutefois, Lopez et coll. (2004) posent une question pertinente quant au mécanisme de l'initiation de thrombose veineuse : si les thromboses artérielles surviennent chez l'humain à la suite de dommages endothéliaux tels que lors d'une rupture de plaques athérosclérotiques, comment s'amorce la coagulation dans une veine intacte? La réponse pathophysiologique se retrouve possiblement dans la découverte récente de microparticules.

1.2.4. Les microparticules

Giesen et coll. (1999) ont été les premiers à démontrer la présence de microparticules (MP) intactes et fonctionnelles dans le sang d'individus normaux.⁵⁵ Les microparticules sont de petits fragments membranaires relâchés lors de l'activation ou de l'apoptose cellulaire⁵⁶ et varient en taille de 0.1-1 μm de diamètre.⁴⁷ Elles peuvent provenir des leucocytes, de cellules endothéliales, des plaquettes et des érythrocytes.⁵⁷

Leurs origines cellulaires, quant à elles, varient selon la maladie sous-jacente. Les microparticules provenant des cellules endothéliales, des monocytes, voire des cellules cancéreuses, contiennent un initiateur important de la coagulation : le facteur tissulaire. La majorité du FT en circulation est présent sous la forme de microparticules et il peut être détecté dans la paroi des vaisseaux ainsi que dans le sang.⁵⁸ Les maladies cardiovasculaires, le diabète, le cancer et l'endotoxémie peuvent occasionner des augmentations du FT associé aux MP.⁵⁹ Une étude prospective récente a mis en évidence une augmentation du FT associé aux MP chez des humains avec des thrombi veineux récurrents, démontrant ainsi la possibilité de la contribution des MP dans la pathogénie des TEV.⁶⁰

Le groupe de Falati⁶¹ a étudié le FT provenant de MP associé leucocytes en circulation, dans un modèle murin. Le but de cette étude était de démontrer le rôle du FT venant des MP dans la formation de thromboses artérielles. Le groupe de chercheurs aurait réussi à mettre en évidence une interaction entre la P-selectine ligand-1 (PSGL-1) située sur les microparticules et la P-selectine sur les plaquettes activées. Ceci était suivi d'une fusion des microparticules avec les plaquettes et un transfert du FT venant de microparticules sur la membrane des plaquettes, par une voie dépendante du PSGL-1 et de la phosphatidylsérine. Le résultat final était l'augmentation de l'activité FT-VIIa, la génération de thrombine et la déposition de fibrine.

Lopez et coll. (2004) suggèrent que comme avec les plaquettes activées, les microparticules contenant du FT peuvent interagir avec l'endothélium. Similairement aux

plaquettes, les cellules endothéliales possèdent une grande quantité de P-selectine entreposée dans leurs granules intracellulaires. Les cellules peuvent exprimer la molécule de P-selectine à leur surface lors d'activation, fournissant ainsi un point d'arrimage pour le FT parvenant des MP. À l'image des plaquettes, les cellules endothéliales activées ont aussi la capacité d'exprimer à leur surface la phosphatidylsérine, permettant ainsi la fusion des microparticules et le transfert du FT. L'initiation de la coagulation, la génération de thrombine et ensuite de fibrine pourraient donc se faire sur la surface endothéliale sans nécessairement la présence d'une brèche vasculaire.⁴² L'observation que l'endothélium peut produire une surface catalytique qui est aussi efficace que les plaquettes activées, ainsi permettant la coagulation,⁶² supporte cette hypothèse.

Ceci étant dit, les études concernant les microparticules sont pour la plupart limitées à des études humaines ou des modèles d'animaux. Jusqu'à date, seulement deux études ont été publiées en médecine vétérinaire portant sur la mesure des microparticules, dont l'origine est plaquettaire.^{63,64} Chez les animaux, la majorité des travaux sont effectués chez la souris et le rat.⁶⁵⁻⁶⁷ Considérant les différences significatives qu'on observe entre les profils de coagulation chez différentes espèces,⁶⁸ d'autres études sont nécessaires afin de mieux saisir la pathophysiologie des thromboses chez les animaux. De plus, certaines causes de thrombose chez les humains, tel que la présence d'anticorps antiphospholipidiques, ne semblent pas être impliquées chez les animaux domestiques.⁶⁹

Finalement, même s'il y a présence d'une littérature extensive démontrant l'implication de microparticules au sein de diverses pathologies, les méthodes analytiques

présentent plusieurs limites et ne sont pas pour l'instant standardisées.^{70,71} Étant donné leur implication potentielle dans la pathophysiologie des thromboembolies veineuses, le développement de techniques normalisées et validées doit être envisagé.

1.3. Clinique

1.3.1. Circonstances et facteurs de risque

Chez les petits animaux, les maladies thrombotiques sont des complications retrouvées en grande majorité à la suite de pathologies telles que les néoplasmes, l'hyperadrénocorticisme, les néphropathies glomérulaires et amyloïdes, les maladies cardiaques, l'anémie hémolytique à médiation immunitaire, la septicémie, la coagulation intravasculaire disséminée, la pancréatite sévère, la dirofilariose, etc.⁷ Ces maladies mènent à un état hypercoagulable qui prédispose à la formation de thromboembolies veineuses.²⁹ D'autres facteurs tels que des cathéters veineux, des chirurgies et l'administration de corticoïdes ont également été reconnus comme facteurs de risques.⁷²

1.3.2. Signes cliniques et diagnostic

Les signes cliniques sont variables, imprévisibles et souvent non spécifiques. Tel que mentionné, la thrombose peut passer inaperçue ou au contraire, mener rapidement au décès. Ce qui complique la détection de thrombose est habituellement l'image clinique de

la maladie sous-jacente. Lors de thromboembolies pulmonaires, les signes cliniques les plus communs incluent la toux, la cyanose, la syncope et la mort subite.⁷²

Chez les animaux, la confirmation du diagnostic de la thrombose repose principalement sur l'imagerie médicale, notamment une observation directe à l'échographie.^{4,5,40} Un thrombus cause typiquement une augmentation de l'échogénicité dans la lumière du vaisseau ainsi qu'une interruption du flux sanguin.³⁶ Dans une étude chez 33 chiens, 64–87 % des thrombi de la veine porte ont pu être diagnostiqués par échographie, la variation étant proportionnelle à l'expérience du manipulateur.⁴ Une région radio-opaque alvéolaire en périphérie des poumons serait le changement radiographique le plus commun chez le chien atteint de thromboembolies pulmonaires.⁷³ La résonance magnétique serait un outil efficace pour la détection de thrombus, mais étant dispendieuse, et requérant une anesthésie générale, cette technique est souvent réservée à des modèles animaux.⁷⁴

Lors de suspicion de thromboembolies pulmonaires, certains tests complémentaires peuvent être utiles pour orienter le diagnostic. Une étude sur les TEP chez les chiens a démontré que 80 % de ceux-ci présentaient de l'hypoxémie, 47 % de l'hypocapnie et 100% avait une augmentation du gradient alvéolaire-artériel sur leur gaz sanguin.² Une étude par Nelson et Andreason en 2003 a démontré l'utilité des D-dimères (produit de la dégradation de la fibrine réticulée et spécifique au processus de la coagulation et de la fibrinolyse) pour identifier les chiens atteints de thromboembolies.²⁸ La mesure de l'antithrombine serait plutôt utile pour prédire le risque de mortalité que pour poser un

diagnostic. Chez le chien, une activité de l'antithrombine de <60 % de la valeur normale porte un risque modéré de mortalité associée à la thrombose. Par contre, la mesure de l'antithrombine comme la seule méthode pour établir un pronostic n'est pas recommandée⁷⁵

Un état d'hypercoagulabilité peut être détecté par des tests qui fournissent une évaluation plus globale de la coagulation. La thromboélastographie, un test qui mesure les propriétés viscoélastiques de la formation du caillot, a été récemment validée chez le chien.⁷⁶ Les peptides d'activation (fragment de prothrombine F 1.2) et les complexes d'inhibiteurs enzymatiques (thrombines-antithrombine, TAT) sont des méthodes souvent utilisées en médecine humaine, mais peu rapportées en médecine vétérinaire.⁷⁷ Chez les petits animaux et les humains respectivement, l'angiographie pulmonaire sélective et l'angiographie avec tomодensitométrie, sont les tests de référence pour la détection de thromboembolies.⁷²

Dans tous les cas de thromboembolies (diagnostiqués, suspects ou en thromboprophylaxie), les héparines sont très souvent utilisées comme traitement pharmacologique, autant chez les animaux que chez les humains.⁹

2. L'héparine de faible poids moléculaire

Les héparines appartiennent au groupe de médicaments dont le rôle est de freiner le processus de coagulation du sang. L'héparine standard est composée de glycoaminoglycans qui consiste en de chaînes de résidus de D-glucosamine et d'acide uronique alternant. C'est un polysaccharide sulfaté extrait de la muqueuse intestinale de porc dont la masse moléculaire varie de 5 000 à 30 000 daltons.⁷⁸ L'héparine de faible poids moléculaire (HFPM) est composée de fragments d'héparine standard produite par une dépolymérisation enzymatique ou chimique. Les chaînes résultantes n'ont qu'un tiers de la taille de l'héparine standard, avec un poids moléculaire moyen de 5000 daltons.⁷⁹

2.1. Historique

L'héparine a été découverte par accident par McLean en 1916, suivi de la découverte que cet anticoagulant nécessitait l'antithrombine comme cofacteur en 1939.^{1,8} Durant les années 1930, les premières études in vivo sur les animaux ont été effectuées suivies de très près d'essais chez les humains. Ceci a été suivi par l'élaboration d'une variété d'héparines de faible poids moléculaire dans les années 1970 et 1980.⁸ À cette époque, le Dr Johnson avait clairement démontré que les HFPM pouvaient atteindre des niveaux plasmatiques d'activité anti-FXa (un test corrélé à la concentration sanguine de l'HFPM) beaucoup plus élevés et prolongés que l'héparine standard.⁸⁰ Depuis plus de 30 ans, l'héparine standard et l'HFPM sont utilisées comme anticoagulant en médecine humaine, avec un remplacement graduel de l'héparine standard par l'HFPM, à cause de

ces avantages pharmacocinétiques.⁷⁹ L'HFPM est maintenant recommandée en traitement ainsi qu'en prophylaxie pour de nombreuses maladies, telles que les TEV, les chirurgies orthopédiques, les traumatismes, le cancer et des conditions prédisposant à un état hypercoagulable.⁷⁸ De ce fait, l'efficacité du traitement avec l'HFPM chez les humains est bien documentée.^{21,81}

En médecine vétérinaire, les indications pour l'utilisation de l'HFPM sont similaires à celles de la médecine humaine et son utilisation, autant pour le traitement des thromboses que pour la prophylaxie, augmente parmi les praticiens.^{9,82,83} Toutefois, la littérature contient peu d'information traitant de l'efficacité, de l'innocuité ainsi que du suivi des patients traités pour les thromboembolies avec l'HFPM. La mise au point de nouveaux anticoagulants tels que les inhibiteurs directs du FXa⁸⁴ ou de la thrombine⁸⁵ est actuellement un domaine très actif de recherche, mais leurs efficacités cliniques, dosages et recommandations sont encore limités. La standardisation de leur utilisation tant en médecine humaine⁸⁶ qu'en médecine vétérinaire⁸⁷ est donc loin d'être obtenue.

2.2. Mécanisme d'action

L'HFPM se lie à l'AT (antérieurement appelée antithrombine III) pour inhiber les enzymes de la coagulation. L'AT est une protéine fabriquée par le foie qui joue le rôle d'inhibiteur physiologique de la coagulation. Une région spécifique de pentasaccharide sur la chaîne d'HFPM permet une liaison et l'activation de l'AT. Cette activation crée un changement de conformation de l'AT et accélère son inhibition des facteurs de

coagulation, notamment le facteur Xa et IIa (thrombine), qui sont les plus sensibles à l'inhibition par l'AT.^{88,89} Il est établi que les espèces moléculaires dont la taille est supérieure à 5 400 daltons inhibent à la fois les facteurs Xa et IIa, ce qui requiert une chaîne d'au moins 18 saccharides en longueur. Par contre, les chaînes dont la taille est inférieure à 5 400 daltons inhibent exclusivement le facteur Xa. Il en résulte une inhibition moindre de la thrombine. Le complexe HFPM-antithrombine possède aussi un léger effet inhibiteur sur les facteurs IXa, XIa et XIIa.⁹⁰

Puisque plus de la moitié des fragments d'HFPM possèdent moins de 18 saccharides, le ratio d'activité anti-FXa à anti-FIIa peut varier de 4:1 à 2:1 selon les différents types d'HFPM, ainsi que selon la variabilité dans la longueur des chaînes qui la composent. La daltéparine (Fragmin®) présente un ratio anti-FXa:anti-FIIa de 2,2:1.⁹¹ À l'inverse, l'héparine standard compte un ratio d'activité anti-FXa:anti-FIIa de 1:1 en raison de la présence d'une majorité de longues chaînes pouvant inhiber la thrombine (Fig 4).⁷⁹

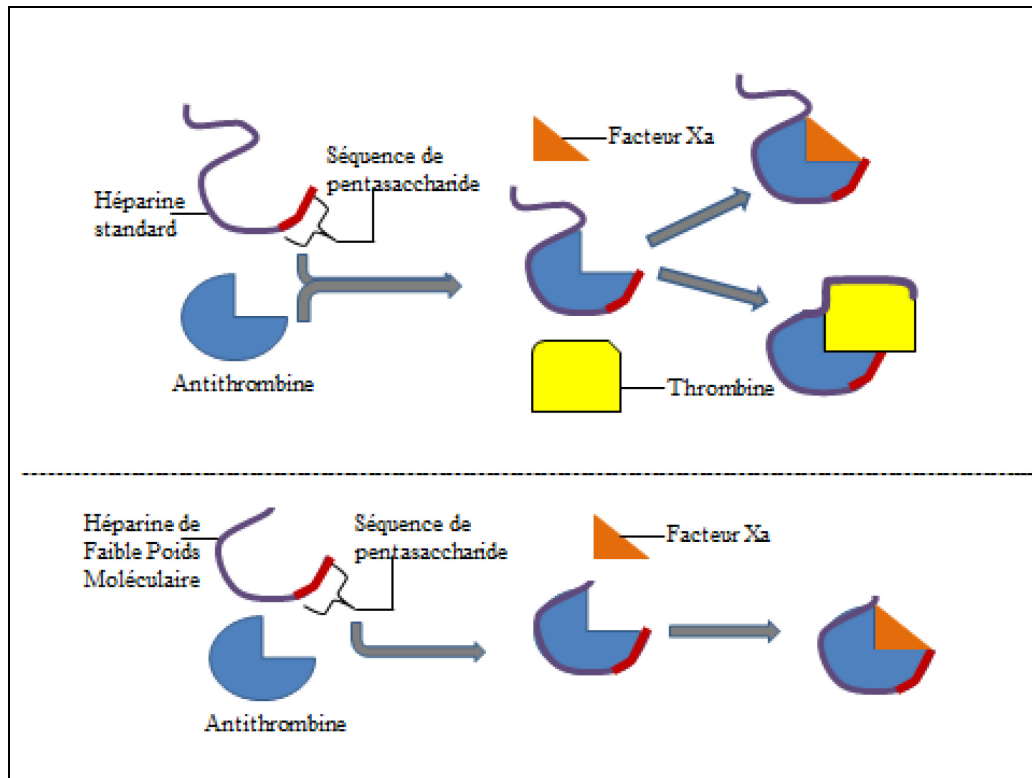


Figure 4. Inactivation du Facteur Xa ou de la thrombine par l'antithrombine liée par l'héparine standard ou l'héparine de faible poids moléculaire.

L'HFPM agit aussi en augmentant l'activité du « *tissue factor pathway inhibitor* » (TFPI) en favorisant sa relâche par les cellules endothéliales.⁹² Ce facteur est un anticoagulant physiologique qui agit en formant un complexe et en inactivant le facteur Xa. Ensuite, le complexe Xa-TFPI se lie au complexe membranaire FT-VIIa pour former un complexe quadrimoléculaire qui neutralise l'action du FVIIa.⁹³ Rappelons que le complexe FT-VIIa est responsable de l'activation de la coagulation. La régulation de cette activité est essentielle pour limiter la coagulation et maintenir un équilibre hémostatique.⁹⁴⁻⁹⁶

L'effet anticoagulant de l'HFPM est moins affecté par certains facteurs sanguins comparativement à l'héparine standard. Par exemple, le facteur 4 plaquettaire (F4P), ou facteur antihéparinique, est une protéine composée de 70 acides aminés qui neutralise l'activité anticoagulante de l'héparine. Elle est relâchée par les granules alpha des plaquettes lors de l'activation et de l'agrégation plaquettaire.⁹⁷ Cette neutralisation est plus marquée pour l'héparine standard que pour l'HFPM.⁹⁸ De plus, le F4P est responsable de la thrombocytopenie induite par l'héparine (TIH), une complication grave chez l'humain. C'est une pathologie relativement commune d'origine immune: le F4P, en raison de sa forte affinité avec l'héparine standard, forme un complexe avec l'héparine à la surface des plaquettes et se retrouve la cible d'auto-anticorps développés en réponse au traitement. Cette complication crée une thrombocytopenie importante, suivie d'un risque élevé de thromboses, conséquences d'une activation impliquant les plaquettes ainsi que les cellules endothéliales.⁹⁹ Elle survient chez les patients traités par l'héparine standard, les HFPM étant beaucoup moins fréquemment associées à la TIH.¹⁰⁰⁻¹⁰²

Actuellement, la TIH n'est pas rapportée en médecine vétérinaire. Toutefois un processus immun semblable affectant les globules rouges chez les chevaux est noté.^{103,104} L'héparine standard agirait comme un haptène anti-érythrocytaire menant à une agglutination des érythrocytes et une anémie chez les chevaux.¹⁰⁵

2.3. Une pharmacocinétique avantageuse

Grâce à ses caractéristiques pharmacocinétiques, l'HFPM comporte de nombreux avantages lorsqu'on la compare à l'héparine standard. Tout d'abord, contrairement à cette dernière, l'HFPM ne se lie pas de manière non spécifique aux protéines plasmatiques,¹⁰⁶ ce qui contribue à une meilleure biodisponibilité et à un effet plus prévisible.¹⁰⁷ Aussi, l'HFPM a une affinité moindre avec le facteur von Willebrand, ce qui pourrait contribuer à une réduction des saignements cliniques tout en préservant le même effet anticoagulant que l'héparine standard.²² De plus, la clairance de l'héparine standard peut avoir lieu selon deux méthodes : premièrement, par un mécanisme saturable à la suite de la liaison des chaînes de haut poids moléculaire aux protéines plasmatiques et aux cellules endothéliales, résultant en une dépolymérisation par les macrophages et une clairance d'ordre zéro qui est rapide. La deuxième est un mécanisme non saturable, une élimination rénale des chaînes de plus faible poids moléculaires, accumulés suite à la dépolymérisation des chaînes plus longues. Puisque l'HFPM démontre une absence de cette liaison aux cellules endothéliales ainsi qu'aux macrophages et aux protéines, la clairance rénale est de premier ordre. Conséquemment, l'HFPM a une demi-vie qui est de 2 à 4 fois plus longue que celle de l'héparine standard.^{78,90} Enfin, des études expérimentales chez les animaux ainsi que des études cliniques chez l'humain ont démontré que l'HFPM occasionne moins de saignements que l'héparine standard pour un effet anti-thrombotique semblable.^{78,108} D'autres avantages associés à l'utilisation de l'HFPM chez les humains sont une diminution du risque d'ostéoporose, une réduction de l'incidence de la thrombocytopénie

induite par l'héparine comme déjà décrit plus haut et utilisation plus sécuritaire lors de la grossesse.¹⁰⁷

2.4. Pharmacocinétique chez les chiens

La pharmacocinétique des HPFM a été étudiée chez le chien en santé. Premièrement, la tinzaparine et la nadroparine ont été utilisées à titre expérimental et semblent avoir une pharmacocinétique semblable à celle des humains.^{109,110} Des injections sous-cutanées répétées d'une dose élevée de daltéparine n'a eu aucun effet cumulatif chez le chien sain. Ce résultat était attribué à sa faible affinité aux protéines plasmatiques et aux cellules endothéliales.¹¹ Plus particulièrement chez les chiens, la daltéparine a un volume de distribution de 50-70 mL/kg, une biodisponibilité de 104 % et une demi-vie de 123 minutes lorsqu'administrée par voie sous-cutanée.¹¹¹ Ces constatations contrastent avec des études chez l'humain où l'on note une demi-vie de 3 à 6 heures suivant une injection sous-cutanée.¹¹² L'énoxaparine a un volume de distribution de 90 mL/kg et une demi-vie proximale (la demi-vie de la phase de distribution) et terminale (la demi-vie de la phase d'élimination) de 0,9 et 5,10 heures respectivement, à la suite de multiples injections par voie sous-cutanée à une dose de 0,8 mg/kg aux 6 heures.¹¹³ Ces données supportent le fait que les différentes HPFM ne peuvent être comparées entre elles puisque la distribution de leurs poids moléculaires est trop variée, ce qui peut mener à des profils anticoagulants très différents. De plus, chez les humains, l'énoxaparine a une demi-vie plus longue que l'héparine standard. Cependant, dans l'étude de Lunsford et coll. (2009), la demi-vie

terminale¹ de l'énoxaparine était similaire à celle rapportée avec l'héparine standard chez le chien.^{113,114} Ceci démontre que l'extrapolation de la pharmacocinétique de l'HFPM chez l'humain n'est pas appropriée pour les chiens. L'énoxaparine a aussi été utilisée dans des études expérimentales avec le chien comme modèle.^{23,115,116} Par contre, dans ces études, l'héparine était administré de façon intraveineuse alors que la voie sous-cutanée est la méthode de choix en clinique vétérinaire.

2.5. Indications cliniques

En médecine vétérinaire, la daltéparine est indiquée pour la prophylaxie ainsi que le traitement de thromboses veineuses profondes et d'embolies pulmonaires chez le chien.¹¹⁷ Toutefois, les conséquences de son efficacité n'ont pas été démontrées étant donné le faible nombre d'études cliniques contrôlées. Les recommandations actuelles sont pour la plupart tirées d'études effectuées chez l'humain. Son utilisation est conseillée pour les maladies mentionnées précédemment ainsi que lors de trauma, de cancers, de procédures neurochirurgicales, de chirurgies orthopédiques, d'infarctus du myocarde et dans plusieurs autres conditions.^{78,89} Les indications cliniques de la daltéparine et de l'héparine standard chez les animaux sont similaires, quoique l'utilisation de la daltéparine permet une thérapie prophylactique à l'extérieur de l'environnement d'un hôpital.^{9,117}

¹ Ce terme définit la demi-vie de la dernière pente de concentration qui est visible sur une courbe temps/concentration. Cette dernière pente peut correspondre à une pente d'élimination ou une pente de redistribution. La vraie pente d'élimination peut être sous la limite des concentrations plasmatiques mesurables. (Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma terminal half life. J Vet Pharmacol Ther. 2004 Dec;27(6):427-39.

2.6. Dosage

Le dosage recommandé pour l'administration de la daltéparine est basé sur l'activité anti-FXa atteinte chez le patient. La mesure de l'activité anti-FXa est un test chromogénique utilisé pour mesurer l'inhibition du facteur de coagulation Xa notamment par l'héparine standard ainsi que l'HFPM.^{10,118} Le plasma du patient est incubé avec du facteur Xa bovin, un substrat chromogénique de FXa, en plus de l'addition d'un excès d'AT exogène. Par conséquent, lors de thérapies avec l'HFPM, l'héparine devient le facteur limitant de la réaction plasmatique. La mesure de l'inhibition du FXa est représentée par un changement de couleur inversement proportionnel au niveau d'HFPM dans le sang.¹¹⁹ Donc, l'activité anti-FXa est un marqueur de la concentration plasmatique de l'HFPM.

Une activité anti-FXa entre 0,2 et 0,4 U/mL est suggérée pour la thromboprophylaxie et des valeurs de 0,4 à 1,0 U/mL sont plutôt recommandées lors de thromboses actives.^{79,88} Quoique ces conseils soient extrapolés d'études humaines, il est suggéré que ces valeurs sont également nécessaires chez les animaux pour la prévention des thromboses.¹²⁰ Il existe quelques études chez le chien qui ont examiné le dosage d'HFPM nécessaire afin d'atteindre les recommandations d'activité anti-FXa humaines.^{10,11,113,120}

Le dosage présentement conseillé chez le chien est de 150 U/kg, sous-cutané, trois fois par jour.¹¹⁷ Mischke et coll. ont démontré que l'administration de cette dose, à

cette fréquence, chez des chiens en santé pouvait atteindre un niveau thérapeutique d'activité anti-FXa allant de 0,2 à 1,0 U/mL sans risque de saignement clinique.¹¹ Une deuxième étude portant sur 6 chiens malades recevant 150 U/kg, deux fois par jour a aussi démontré qu'il était possible d'arriver aux niveaux thérapeutiques recommandés d'activité anti-FXa. Les chercheurs ont pu arriver à des niveaux d'anti-FXa de 0,6 à 1,1 U/mL, 3 heures suivant l'administration de l'HFPM.¹²⁰ Selon les manufacturiers, le moment optimal pour mesurer l'activité maximale chez les humains est dans les 2 à 4 heures suivant l'administration de la daltéparine.⁹¹ Toutefois, dans l'étude de Dunn et coll., l'activité anti-FXa était plus basse que la zone thérapeutique 12 heures suivant l'administration. Selon Mestre et coll., un effet de protection contre la thrombose est possible chez les chiens lorsqu'une activité anti-FXa de 0,55 U/mL est atteinte.¹²¹ De plus, un modèle expérimental de la CIVD chez le chien a démontré qu'une activité anti-FXa entre $0,62 \pm 0,08$ et $0,9 \pm 0,07$ U/mL était nécessaire pour diminuer la consommation des facteurs de coagulations.¹²² Selon les expériences chez les chiens sains, des activités anti-FXa dans les valeurs recommandées ne font preuve d'aucun saignement clinique.

3. Surveillance de laboratoire lors de traitements à

l'héparine de faible poids moléculaire

3.1. La surveillance

Depuis l'introduction de l'HFPM dans l'environnement hospitalier humain, la nécessité d'une surveillance de laboratoire lors de son utilisation est controversée.^{12,123-127} Comparativement à l'héparine standard, qui requiert absolument une vérification, l'HFPM offre une pharmacocinétique plus prévisible. Chez l'humain, une inspection de l'utilisation de l'HFPM est considérée par certains comme non nécessaire.^{78,124} Plusieurs études cliniques chez les humains ont donc été exécutées à dosage fixe et sans contrôle.¹²⁸

À l'inverse, le Collège Américain de Pathologie recommande la surveillance de laboratoire dans certaines situations particulières. Dans ces cas, l'utilisation de l'activité anti-FXa est conseillée.¹²⁹ Cette recommandation est plus particulièrement nécessaire chez les patients avec une maladie rénale chronique, les femmes enceintes, les enfants et les patients obèses ou de très faible poids. Certains auteurs, comme Harenberg, ajoutent que la surveillance est essentielle chez des patients requérant des traitements à long terme et pour lesquels il est primordial de prévenir un excès ou une carence du niveau d'anticoagulation.¹²³ Cet argument prend toute son importance lorsqu'on réalise que chez les chiens, les maladies thrombotiques sont généralement secondaires à une maladie chronique sous-jacente. L'âge ainsi que le poids des différentes races de chiens pourraient

aussi avoir un effet majeur sur la pharmacocinétique. Ce dernier point est observé chez les humains plus âgés pour qui la majorité des hémorragies se manifestent à la suite d'un traitement^{130,131} et chez les enfants pesant moins de 5 kg, qui requièrent un dosage plus élevé afin d'atteindre les mêmes niveaux thérapeutiques d'anti-FXa.¹⁰⁸ D'ailleurs, lors de saignements, avant une chirurgie invasive ou lors d'un état critique, il est important de déterminer si l'effet de l'anticoagulant persiste.^{132,133} La plupart des études cliniques qui ne supportent pas l'utilisation d'une méthode de surveillance excluaient en grande partie tous les patients « non standards » pour qui la relation dose à effet ne s'appliquait pas.¹³⁴ De plus, au début des études cliniques portant sur l'HFPM chez les humains, une surveillance s'avérait nécessaire afin d'établir une corrélation entre la dose administrée et le résultat clinique obtenu en terme d'hémorragie ou de thrombose.¹²⁶ À défaut d'expériences cliniques prospectives en médecine vétérinaire, on peut conclure qu'on en est encore en exploration de dosage et que la surveillance lors de l'utilisation de l'HFPM est impérative.

3.2. Tests standard de la coagulation pour la surveillance

Les tests traditionnels de la coagulation tels que le temps de prothrombine (PT) et le temps de thromboplastine partielle activée (aPTT) sont utiles pour le diagnostic de déficits importants de facteurs de coagulation, mais sont inutiles pour détecter l'état hypocoagulable recherché lors d'un traitement avec l'HFPM.^{124,135} Ceci a aussi été démontré dans des études canines, et ce, même lorsque les valeurs d'anti-FXa dépassaient 0,8 U/mL^{10,11} Les méthodes classiques ne démontraient peu ou pas d'augmentation de

temps de coagulation avec l'HFPM, contrairement à l'héparine, pour lequel l'aPTT est standardisée pour sa surveillance, compte tenu de son mécanisme d'action et de son effet sur la thrombine.⁷⁸ Selon Mischke, l'influence de l'HFPM sur l'aPTT chez le chien est encore plus faible que chez l'humain. Mischke dénonce aussi l'utilisation du temps de thrombine à cet effet, notant un faible changement pour des concentrations élevées d'anti-FXa. Finalement, ces tests standards évaluent seulement la première phase de la coagulation. Ils utilisent l'apparition de traces de fibrine comme point limite du test quand seulement 5 % de la thrombine totale est générée.¹⁴

3.3. La mesure de l'activité anti-FXa

Tel que nous l'avons déjà mentionné, la mesure de l'activité anti-FXa est le test de référence pour surveiller l'effet anticoagulant de l'HFPM. Il est disponible de manière routinière dans les hôpitaux humains et a été validé chez des chiens en santé ayant reçu de la daltéparine et de l'énoxaparine.^{113,136} Récemment, l'effet de la daltéparine, sur l'activité anti-FXa a été évaluée chez des chiens ayant des maladies associées à un risque thrombotique. Suivant l'administration d'une dose de 100U/kg, aucun des chiens dans l'étude n'a pu atteindre le niveau d'anti-FXa thérapeutique recommandé. D'un autre côté, aucun de ces chiens n'a développé de thromboses cliniques.¹³⁷ Chez les humains, nous ne savons pas si une persistance de l'inhibition du FXa est nécessaire pour maintenir un effet anticoagulant protecteur.¹³⁸

3.4. Les limites de l'activité anti-FXa comme outil de surveillance

La mesure de l'activité anti-Xa est discutable. Puisqu'il ne s'agit pas d'un test fonctionnel, nous ne pouvons connaître sa corrélation avec une activité anti-thrombotique, le risque de saignement ou la récurrence de thromboembolies. À cet effet, il y a de nombreuses raisons décrites dans la littérature limitant l'utilité de ce test de référence comme outil de surveillance.

En médecine humaine, lorsqu'une surveillance était requise suivant un traitement à l'HFPM, la méthode principale était la mesure de l'activité anti-FXa. Par conséquent, de nombreuses limites reliées à l'utilisation de cette méthode à des fins de surveillance ainsi qu'à l'interprétation des résultats ont pu être observées.¹³⁹⁻¹⁴² Le Comité Scientifique de Standardisation de la Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase a émis de manière officielle les considérations à prendre en compte:

- L'activité anti-FXa et anti-FIIa représente la quantité d'héparine présente et non la fonction anti-thrombotique de l'HFPM. La même concentration d'héparine peut avoir des effets variés dans des plasmas et chez des patients différents.
- Les activités anti-FXa et anti-FIIa varient selon la préparation et le type d'HFPM, et l'activité anti-FIIa semble être l'action la plus importante basée sur des études cinétiques.
- Il y a une mauvaise comparabilité entre les différents tests anti-FXa chromogéniques disponibles sur le marché commercial.

- Le moment choisi pour le prélèvement de sang relatif à la dose administrée est décisif pour l'interprétation des résultats.¹⁴³

De plus, Hemker et coll. suggèrent que l'activité anti-FXa des HFPM est surestimée au double de la vraie valeur. Cette surestimation serait due aux effets du calcium qui n'ont pas été pris en compte lors de la standardisation et de la calibration de la technique utilisant l'héparine standard.¹⁴⁴ Néanmoins, l'activité anti-FXa n'est pas le reflet de l'anticoagulation dans son entièreté puisque l'HFPM exerce également un effet significatif sur la fonction des plaquettes et sur la relâche du TFPI par les cellules endothéliales.⁹⁵ Le TFPI est responsable du tiers de l'effet anticoagulant des héparines,¹⁴⁵ un effet qui n'est pas pris en considération par la méthode de référence.

L'activité anti-FXa ne permet que l'évaluation de la pharmacocinétique de l'HFPM, un reflet de la concentration active de la molécule d'héparine qui survient au site d'action. Les réponses variables rapportées chez les patients reposent aussi sur la pharmacodynamie qui est tout aussi variable d'un patient à l'autre. Il devient donc clair que la surveillance d'un traitement à l'HFPM à l'aide d'un test fonctionnel, qui représente l'hémostase de manière globale, permettrait de prédire plus efficacement l'effet d'un traitement avec un anticoagulant.

On reconnaît qu'il y a un nombre important de protéines qui influencent la coagulation. Ce n'est donc pas par la mesure d'un facteur précis que nous pouvons apprécier l'effet cumulatif de toutes leurs interactions. En effet, c'est le résultat net de

toutes ces interactions, associé aux influences externes (tels qu'un anticoagulant), qui détermine le phénotype ou la capacité fonctionnelle de la coagulation à un moment donné. C'est donc l'identification du phénotype de coagulation de l'animal, en tant qu'hypo ou hypercoagulable, qu'il devient essentiel de reconnaître afin d'éviter des saignements ou une thrombose.¹⁴⁶ Ce dernier point est surtout important lors de l'utilisation de médicaments divers, lors d'un état critique et souvent en urgence où il est important d'évaluer de manière objective la fonction hémostatique. Deux tests pouvant répondre à ces critères sont actuellement disponibles : la thromboélastographie et la mesure de la génération de thrombine.

3.5. Les tests permettant l'évaluation globale de la coagulation

La thromboélastographie (TEG® Haemoscope Corp.) mesure les propriétés viscoélastiques de la formation du caillot.¹⁴⁷ La TEG évalue l'initiation, l'amplification et la propagation de l'hémostase ainsi que la fibrinolyse. De plus, la TEG tient compte du rôle des plaquettes ainsi que de tous les facteurs de coagulation. La technique est exécutée sur sang entier citraté qui est ensuite recalcifié.¹⁴⁸ Pour accélérer la formation du caillot, l'échantillon peut être activé avec de la célite, de la thrombine, du facteur tissulaire ou du kaolin.¹⁴⁹ Depuis les années 1980, la TEG est utilisée en médecine humaine pour guider la prise de décision d'une transfusion sanguine et pour prédire les risques d'hémorragies pré ou post-opératoires.^{150,151} Son utilisation a été récemment validée chez le chien,⁷⁶ le chat¹⁵²

et le cheval.¹⁵³ La TEG est utilisée présentement pour évaluer l'effet de l'héparine standard chez des chiens sains,¹⁵⁴ de l'énoxaparine chez des chats¹⁵² et la daltéparine chez le chien^{155,156}.

Puisque la TEG est exécutée sur du sang entier, plusieurs limites s'imposent à l'interprétation des résultats. Premièrement, les résultats sont affectés par l'hématocrite^{148,157} ainsi que l'hémolyse.¹⁵⁸ De plus, comme Wagg et coll. l'ont démontré dans une étude chez des chiens malades, la TEG serait dépendante de la concentration du fibrinogène et de la polymérisation de la fibrine.¹⁵⁹ Lors de la surveillance de l'anticoagulation chez des chiens malades, on devrait observer une diminution de la coagulabilité à la TEG. Toutefois ceci pourrait être masquée ou affectée par une augmentation du fibrinogène. Le fibrinogène est une protéine positive de la phase aiguë qui est souvent augmenté lors de l'inflammation ou de maladies sous-jacentes à la thrombose.¹⁶⁰ Finalement, le test doit être exécuté dans les 30 minutes suivant la ponction veineuse et ne permet donc pas la congélation ou l'envoi à un laboratoire de référence.

Au contraire, la mesure de la génération de thrombine (GT), un test qui évalue aussi la coagulation de manière globale, se fait dans du plasma pauvre ou riche en plaquettes et est indépendante de la concentration de fibrinogène, de la polymérisation de la fibrine et de la fibrinolyse.^{13,161} Enfin, l'utilisation du plasma pauvre en plaquettes (PPP) permet la congélation de l'échantillon, et donc de procéder à plusieurs analyses à la fois,¹⁶² ainsi que la possibilité de faire l'évaluation de la coagulation à une date ultérieure.

De plus, il est connu que l'enzyme clé de la cascade de coagulation est la thrombine et que cette protéine est responsable de la conversion du fibrinogène en fibrine.¹⁶³ La thrombine est également un puissant activateur plaquettaire.¹⁶⁴ Ainsi, les anticoagulants exercent leur action en diminuant la GT par trois méthodes : soit en réduisant la conversion de prothrombine, soit par l'inhibition directe ou indirecte de la thrombine.^{165,166} La mesure de la GT dans le plasma permet donc d'estimer le risque hémorragique (diminution de la génération de thrombine) et thrombotique (augmentation de la génération de thrombine) du patient.^{167,168}

4. La Génération de Thrombine

Des réactions amplifient et ralentissent simultanément la GT. La combinaison de ces deux phénomènes détermine la génération de thrombine finale.¹⁶⁹ La vitesse de génération, la quantité de thrombine formée et la durée de son action dans le sang sont des déterminants du phénotype de la coagulation.¹⁷⁰ Une génération diminuée de thrombine favorise les saignements, tandis qu'une génération excessive déplace l'équilibre hémostatique vers un état hypercoagulable qui prédispose à la thrombose.^{51,165,167} La génération de la thrombine est donc le point focal de l'hémostase et de la thrombose, et son évaluation devient primordiale, surtout lors de l'utilisation d'anticoagulants.

4.1. Mesure de la génération de thrombine

La quantification de la thrombine générée au cours de la coagulation a été évaluée pour la première fois dans les années 1950.^{171,172} La technique utilisée à ce moment était laborieuse et non standardisée. À l'époque, les chercheurs utilisaient un échantillon de plasma qu'ils ajoutaient à une solution de fibrinogène à des intervalles déterminés, pour établir le temps de formation du caillot. C'est Hemker et son groupe qui ont modernisé la technique en 1986 avec l'utilisation d'un substrat chromogène lent.¹⁷³ Il a pu modifier le processus en permettant l'enregistrement continu de la génération de thrombine et l'automatisation de la méthode.¹³ La méthode automatisée permet de déterminer la cinétique de formation de la thrombine en réponse à une stimulation dans du plasma. Le remplacement du substrat chromogénique par un substrat fluorogénique a permis la mise au point d'une méthode réalisable avec du plasma riche ou pauvre en plaquettes.^{161,162}

L'idée de Hemker et ces ajustements ont permis la création d'un analyseur (*Calibrated Automated Thrombogram*, CAT®), développé par la société Thrombinoscope et qui est maintenant commercialisé par Stago. C'est un test qui permet de suivre, en temps réel et par fluorimétrie, la GT après activation de la coagulation. À l'aide du fluoromètre, une courbe est produite qui représente graphiquement la GT dans le sang suite à une stimulation, ressemblant à ce qui se produit physiologiquement dans le corps. Une très faible concentration de facteur tissulaire est utilisée pour déclencher la réaction. Les détails techniques de l'analyse seront discutés dans la section dédiée aux matériaux et méthodes des deux articles qui suivent. Le paramètre d'intérêt majeur de cette méthode d'analyse est

le potentiel de thrombine endogène (« *endogenous thrombin potential* » (ETP)), qui représente la quantité globale de thrombine qui a été activée au cours de la réaction. Le résultat s'exprime par l'aire sous la courbe en nM*minute. Une courbe de génération de thrombine est présentée (Fig. 3) et l'interprétation des paramètres se trouve au Tableau I.

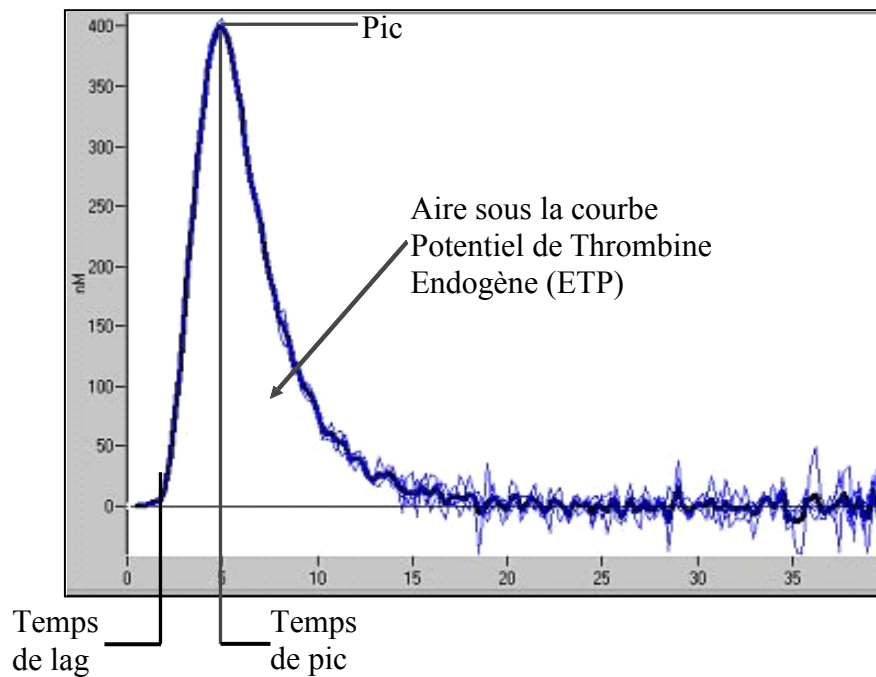


Figure 5. Tracé de la génération de thrombine par le « *Calibrated Automated Thrombogram* ».

Tableau I. Paramètres et interprétation du thrombogramme

Paramètre	Description	Unités	Interprétation
« Endogenous thrombin potential » (ETP) ou potentiel de thrombine endogène	Aire sous la courbe	nM*min	Quantité globale de thrombine générée
Temps Lag ou « Lag Time »	Temps jusqu'à la formation de 10 nM de thrombine	Min	Représente la phase d'initiation de la coagulation
Pic ou « Peak »	Hauteur maximale de la courbe de thrombine	nM	Concentration maximale de thrombine
Temps de Pic ou « time to Peak »	Temps auquel la concentration maximale de thrombine est atteinte	Min	Durée totale de la phase fortement procoagulante de la réaction qui comprend l'initiation, l'amplification et la propagation

L'explosion de la thrombine lors de l'activation de la coagulation suivie par son inhibition naturelle dure approximativement 20 minutes chez l'homme et génère chez les témoins des quantités d'à peu près 1800 nM de thrombine par minute.¹³

Chez les humains, de nombreuses études utilisant la GT ont été effectuées depuis la dernière décennie. Entre autres, on retrouve des études chez des patients souffrant d'hémophilie,^{174,175} de thrombophilie,^{174,176} et chez les patients à risque de récurrence de thrombose veineuse.¹⁷⁷ L'effet des plaquettes sur la GT¹⁷⁸ ainsi que l'effet d'une déficience en facteurs de coagulation sur la GT¹⁷⁹ ont aussi été étudiés.

En pharmacologie, on constate que tout composé qui inhibe la génération de thrombine a un effet anti-thrombotique. Une inhibition d'environ 40 à 60 % de l'ETP par un anticoagulant est considérée comme étant une inhibition efficace mais qui ne causera pas de saignements cliniques.¹⁶⁶ Notamment, l'administration de la daltéparine chez des humains à une dose standard de 120 U/kg en sous-cutanée diminue la GT de 77 %. Ce dosage était relié à une activité anti-FXa de 0,79 IU/mL. *In vitro*, l'IC₅₀ (l'inhibition de 50 %) de la GT rapportait une activité anti-FXa de 0,07 IU/mL lors de l'addition de la daltéparine à un pool plasmatique pauvre en plaquettes.¹⁸⁰

Le CAT peut être un guide pour trouver un dosage approprié et surveiller l'effet d'ancien et de nouveau anticoagulant.¹⁶⁶ Étonnamment, une étude chez des humains sains utilisant de l'héparine standard et différents HFPM a démontré que la même dose d'un même anticoagulant peut inhiber jusqu'à deux fois plus la GT chez une personne par

rapport à une autre.¹⁸¹ La GT pourrait donc permettre d'ajuster la dose aux besoins individuels, ce qui améliorerait significativement les résultats cliniques de l'utilisation de l'HFPM.

Il n'y a que quelques études portant sur l'utilisation de la GT chez les animaux. On note la création d'un protocole chez les souris,¹⁸² la détection de l'hypercoagulabilité chez des chiens sains suivant un traitement à la prednisone,³¹ les effets de l'hyperadrénocorticisme sur la GT,¹⁸³ un article et un résumé scientifique portant sur les microparticules chez le chien et le cheval,^{63,64} ainsi qu'un résumé utilisant la GT pour détecter l'hypercoagulabilité chez des chiens souffrant de diverses maladies.¹⁸⁴ Une étude exécutée dans notre laboratoire de coagulation, à la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, a démontré que la GT permet un suivi de l'effet de l'héparine standard chez le chien.¹⁸⁵ Étant donné le remplacement imminent de l'héparine standard par l'HFPM en clinique, notamment pour l'usage hors clinique, l'incidence accrue et la gravité des conséquences des thromboses veineuses, ainsi que la nécessité d'un test fonctionnel qui évalue la coagulation d'une manière plus globale, un grand besoin se manifeste pour des études sur l'utilisation de la GT comme outil de surveillance pharmacothérapeutique de l'HFPM chez les chiens sont essentielles.

5. But du projet

Le but de notre projet était de déterminer si les paramètres du CAT, notamment l'ETP, pourraient être utilisés pour surveiller les effets pharmacothérapeutiques chez des chiens recevant de la daltéparine. Plus précisément, le premier objectif était d'établir des valeurs normales des paramètres du CAT chez des chiens en santé. Le deuxième objectif était de déterminer une relation dose-effet *in vitro* de la daltéparine sur les paramètres du CAT. Finalement, le dernier objectif était d'effectuer une étude pharmacodynamique chez des chiens recevant une des trois doses de daltéparine, d'en vérifier les effets sur la GT, et de les comparer avec les résultats obtenus à partir des tests standards de coagulation.

6. Hypothèses de la recherche

Notre hypothèse est que le CAT permettra la détermination de la relation concentration-réponse de la daltéparine sur la génération de thrombine lorsque l'anticoagulant est ajouté de manière *in vitro* dans du plasma canin. Notre deuxième hypothèse est que le paramètre ETP du CAT permettra le suivi pharmacodynamique de la daltéparine, administrée à différentes doses de manière sous-cutanée à des chiens sains.

CHAPITRE 2: ARTICLES

ARTICLE 1

In vitro effects of dalteparin on thrombin generation in canine plasma.

Carolyn Gara-Boivin¹, Jérôme R.E. del Castillo², Marilyn E. Dunn³, Christian Bédard¹

From the Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire. ¹Department of Pathology and Microbiology, ²GREPAQ – Department of Veterinary Biomedicine, and ³Department of Clinical Sciences.

Short title: *In vitro* dalteparin effects on TG

Keywords: Low molecular weight heparin, coagulation, endogenous thrombin potential, pharmacodynamics

Abbreviations: CAT: Calibrated Automated Thrombogram, ETP: endogenous thrombin potential, LMWH: low molecular weight heparin, PPP: platelet-poor plasma, TEG: thromboelastography, TG: thrombin generation, TF: tissue factor, UH: unfractionated heparin

Correspondence: Carolyn Gara-Boivin

Department of Pathology and Microbiology, Faculté de Médecine Vétérinaire,
Université de Montréal, C.P. 5000 Saint-Hyacinthe, QC, Canada J2S 7C6

Submitted for publication to: Journal of Veterinary Clinical Pathology

This work was completed in the clinical pathology laboratory of the Service de
Diagnostic of the Université de Montréal in Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

This study was supported by the Morris Animal Foundation.

Abstract

Background: the Calibrated Automated Thrombogram (CAT) is a functional thrombin generation (TG) assay that may provide a new approach for monitoring anticoagulant therapy in dogs. The effects of dalteparin on TG parameters in dogs are unknown.

Hypothesis/Objectives: Objectives were to establish normal TG parameter ranges in dogs and measure the *in vitro* TG parameters on canine pooled platelet-poor plasma (PPP) spiked at different dalteparin concentrations.

Animals: Twenty-five adult beagle dogs and 11 client-owned healthy dogs were used for obtaining normal TG values. Twenty-four adult beagles and 45 client-owned dogs were studied for the *in vitro* dalteparin concentration-response determination.

Methods: Blood samples for 36 dogs were processed individually for TG values. Pooled PPP was prepared and aliquots were spiked *in vitro* with dalteparin to obtain 9 final concentrations of increasing anti-factor Xa (anti-FXa) activity. Activated partial thromboplastin time (aPTT), tissue factor induced TG and anti-FXa activity were measured for each concentration. Data were analyzed with ADAPT v.5, using various nonlinear regression models for stimulatory or inhibitory effects.

Results: TG ranges of normal dogs were established. *In vitro* dalteparin resulted in a concentration-dependent decrease in endogenous thrombin potential (ETP) in pooled plasma. Concentrations of dalteparin above 0.6 U/mL completely inhibited TG. The concentration of dalteparin that reduced the ETP value by 50% (IC₅₀) was 0.289 U/mL.

Conclusions and clinical importance: The CAT assay can be employed to measure the effects of dalteparin in canine plasma, resulting in significant dose-dependent decreases in ETP, prompting further in vivo investigations.

Introduction

Low-molecular weight heparin (LMWH) is used in the treatment and prophylaxis of thromboembolic diseases in dogs.¹⁻³ LMWH therapy is monitored by evaluating anti-factor Xa (anti-FXa) activity measured by chromogenic substrate.^{4,5} Human hospitals routinely perform this test that appears to also reliably evaluate canine anti-FXa activity.^{6,7} The plasma activity of anti-FXa is considered the gold standard for monitoring dalteparin therapy.^{8,9} However, a poor correlation between anti-FXa plasma activity and heparin's antithrombotic efficacy or risk of bleeding complications has been shown^{10,11} revealing possible limitations of the anti-FXa assay for monitoring therapy.¹² Furthermore, direct extrapolation of LMWH dosage regimens can be challenging due to differences in LMWH pharmaceutical preparations,¹³ species differences in pharmacokinetics¹⁴ and blood clotting factor activities that vary in species.⁶

Global functional coagulation tests that assess the impact of all plasmatic elements for clot formation in a more physiologic setting are of increasing interest for monitoring therapy. Recently, thromboelastography (TEG) has been used to monitor LMWH therapy *in vitro*¹⁵ as well as in a small number of healthy cats and dogs.^{16,17} However, TEG assays are executed on whole blood and must be performed within 30 minutes of sampling precluding freezing or shipment to a reference laboratory when equipment is not available. Furthermore, anemia which is common amongst ill animals, artifactually affects TEG tracings¹⁸ and TEG clot strength is positively correlated with fibrinogen, a positive acute

phase protein,¹⁹ which could potentially alter tracings in ill animals receiving LMWH therapy.

Among alternate functional tests, the measurement of TG has been shown to be a suitable method to study the effects of anticoagulants in humans.²⁰⁻²² The Calibrated Automated Thrombogram (CAT) is an assay that permits direct measurement of TG in platelet poor plasma (PPP), that is independent of fibrinogen concentration.²³ Measurement of TG could be a useful tool for monitoring LMWH therapy in animals. Recently, this test was validated for unfractionated heparin in dogs.²⁴ Therefore, the aim of this study was to document the usefulness of the CAT at monitoring the effects of *in vitro* heparinization of canine plasma. We hypothesize that the CAT may allow the determination of the concentration-response relationship of dalteparin on TG. The objectives of this study were to first establish a range of normal TG parameters in PPP from clinically healthy, untreated dogs and to establish *in vitro* TG in normal canine PPP fortified with dalteparin at increasing concentrations.

Material and Methods

Animals

Adult beagle dogs (N=25) from the University of Montreal's teaching and research colony were used for the experiments in fulfilment of the two objectives, which were approved by the institutional bioethics committee. In addition, 11 client-owned healthy dogs with informed owner consent were used for the determination of normal TG values,

and another 45 client-owned dogs with informed owner consent were used for the in vitro dalteparin concentration-response determination. All dogs included in the study were considered healthy based on medical history, normal physical examination, routine hematological, biochemical, and hemostatic tests. Dogs were excluded from the study if their medical records had mention of having received a steroidal or nonsteroidal anti-inflammatory drug, anticoagulant, surgery or other treatment that might influence coagulation in the 2 months prior to the beginning of the study. The demographic characteristics of the dog groups are presented in Table I-I.

Study design

Establishment of range of normal TG parameters

A single blood sample was taken from each of the 36 dogs (25 beagles from the institutional colony and 11 client-owned dogs), processed individually to obtain PPP and used for TG analysis as detailed below.

Dalteparin in vitro concentration-response relationship

Two pools of PPP were prepared from the 24 beagles and from the 45 client-owned dogs respectively. Animals contributed equally to the volume of their respective PPP pool, which were supplemented with dalteparin^a at different concentrations. A stock solution was prepared by diluting 0.2 mL of the original dalteparin solution with 9.80 mL of physiological saline to obtain a 200 U/mL anti-FXa activity. Serial dilutions of the stock solution were added to the plasma pool in order in order to obtain nine dalteparin dilutions with increasing anti-FXa activity: 0 (blank assay), 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 and 2.0

U/mL. Dilutions were used to establish the sensitivity of the CAT method to LMWH. For each dilution, TG, anti-FXa activity and aPTT were measured. All samples were analysed immediately after spiking.

Blood sampling and processing

Blood from client-owned dogs was collected by clean jugular venipuncture using a 21G needle system^b attached to a 2.7 mL evacuated tube containing 3.2% sodium citrate^c in a 9:1 blood: anticoagulant ratio for coagulation assays. Blood was collected from the beagles prior to their use for another study. Their blood was collected using a 5 Fr indwelling jugular catheter^d that was placed under mild sedation with reversal after completion of the procedure.^e This sedation procedure was shown to produce statistically non-significant effects on the tested coagulation parameters (data not shown). The first 3 mL of blood collected from the catheters were discarded before harvesting 3mL for the assays. The catheter was then flushed with 5mL of 0.9% NaCl to prevent clotting.

Platelet-poor plasma was prepared immediately after collection, by centrifugation at 2500g for 10 minutes at 7°C. The supernatant fraction was collected and immediately stored in 1.5mL aliquots^f at -80°C, and analyzed within 6 months. Thawing was carried out in a preheated water bath at 37°C shortly before analysis.

Coagulation assays

Thrombin generation analyses

The CAT assay uses a fluorogenic thrombin substrate and measures TG by comparing the fluorescence in plasma during clotting after tissue factor (TF) activation to the fluorescence of a reference thrombin calibrator. Briefly, TG was measured according to the assay described by Hemker et al.²⁵ Each experiment required paired readings from first a well in which TG took place and from a second well in which the thrombin calibrator (Cal) was added. The calibrator is thrombin- α 2-macroglobulin complex that is used for each individual plasma to correct for donor-to-donor differences in color of plasma, inner filter effect and substrate consumption. A total of 80 μ l of PPP was added in each well (TG and Cal). In addition 20 μ l of the buffer solution containing the trigger agents (providing a final concentration of 5pM of TF and 4 μ M of phospholipids) was added to the TG well, and 20 μ l of the thrombin calibrator to the Cal wells. Thrombin generation was initiated by adding to the TG and Cal wells 20 μ l of a HEPES buffer (pH 7.35) solution containing calcium (CaCl₂) in a HEPES buffer (pH 7.35) and the fluorescent substrate. Fluorescence was measured in specific fluorescence plates^g with an automated fluorometric plate reader^h connected to a dedicated softwareⁱ. This software converts the signal to molar concentrations of thrombin, and calculates the ETP (nM·min), Lag time (min), Peak plasma thrombin concentration (nM) and time to peak (ttPeak, min) of TG. Velocity-rate-index (Rate index; nM·min⁻¹) of thrombin generation was calculated using the formula Rate index = Peak · (ttPeak - lag time)⁻¹ as previously described.²⁶ Briefly, ETP represents the area under the TG curve and denotes the total amount of thrombin generated, Lag time is the delay in minutes before initial generation of the thrombin curve, Peak represents the maximal thrombin concentration achieved, time to Peak is the time

when the highest concentration of thrombin is reached and Rate index represents the mean rate of TG during the propagation phase.

Anti-FXa and aPTT assay

Chromogenic anti-FXa activity and aPTT assays were performed using an automated coagulation analyzer^j using their respective reagents.^{k,l}

Data Analysis

Normal TG parameters

A statistical graphics software^m was used to generate descriptive statistics and boxplots for examining the distributions of ETP, Peak, ttPeak, Lag time and Rate index as a function of dog origin (client-owned vs. institutional colony). Afterwards, the equivalence of their respective average values was determined statisticallyⁿ with two one-sided t-tests for ratios of means, using a 0.10 α -level. The groups were considered equivalent if the 90% confidence interval (90% C.I.) of the ratio of means was entirely comprised between 0.8 and 1.25.²⁷

Dalteparin in vitro concentration-response relationship

The changes in aPTT and TG parameters as a function of dalteparin concentration were analyzed simultaneously with a pharmacokinetic/pharmacodynamic systems analysis software^o using the maximum-likelihood expectation maximization algorithm with importance sampling methods.²⁸ The sigmoid Hill model for stimulatory responses was used to fit the increases in aPTT, ttPeak or Lag-time, and the sigmoid Hill model for

inhibitory responses was used to fit the decreases in ETP, Peak, or Rate index. The software was programmed in order to estimate the in vitro dalteparin concentrations required to double (C_{doubling}) or halve (C_{halving}) the baseline values of the TG parameters, anti-FXa activity and aPTT, as described in.²⁹ These estimates, and their associated 95% confidence intervals, were used to compare the sensitivities of the TG parameters, anti-FXa activity and of aPTT to the effects of dalteparin.

Results

Thrombin generation in healthy dogs

Thrombin generation values of all normal dogs are reported in Table I-II. Testing of TG parameters for equivalence between beagles and client-owned dogs was inconclusive, as the 90% confidence intervals of the ratios of mean TG Lag time (ratio = 1.18; 90% C.I. = [1.0375; 1.3369]), ETP (ratio = 1.30; 90% C.I. = [1.1736; 1.4296]), and Peak (ratio = 1.19; 90% C.I. = [1.0681; 1.3265]) exceeded the 1.25 boundary. Only ttPeak showed equivalence for these two dog groups, as its estimated ratio and associated 90% C.I. (1.10; [0.9882, 1.2143]) lied within the 0.8 – 1.25 boundaries. Fig.1.1 depicts the variability of TG parameters within each group. TG intra-assay and inter-assay variations established in our laboratory²⁴ are :7.1% and 12.9% for ETP, 5.2% and 10.8% for peak, 8.1% and 22.1% for lag time, and 0% and 9.5% for ttpeak respectively

Dalteparin in vitro concentration-effect relationships

The addition of dalteparin to the two PPP pools resulted in very similar concentration-dependent decreases in the amount of thrombin generated and the graph of the beagle pool is shown (Fig 1.2). For both PPP pools, anti-FXa activity increased linearly with dalteparin concentration and showed high r^2 values (≥ 0.99 for both pools). Concentrations of dalteparin above 0.6 U/mL resulted in complete inhibition of thrombin generation. The concentration of dalteparin that reduced the ETP value by 50% (IC_{50}) was 0.289 U/mL (95% C.I. [0.287, 0.290]; Fig 1.3). Comparison of the $C_{doubling}$ and $C_{halving}$ of coagulation parameters revealed that anti-FXa, Peak, Rate Index and ETP were most sensitive to the *in vitro* effect of dalteparin, and aPPT was the least sensitive and precise (Fig.1.4).

Discussion

This study used the CAT assay to assess the effect of dalteparin therapy in canine plasma, and our results show that the drug effectively inhibited *in vitro* thrombin generation.

The normal ETP range in healthy dogs established in this study was approximately 5.6 times lower than in human subjects,²⁵ and thus species specific reference ranges for TG parameters must be obtained. The observed differences in ETP, Peak, and lag time between healthy beagles and client-owned dogs precluded a definitive conclusion about their equivalence. Although blood collection method in beagles differed from client owned

dogs, an increase in ETP would be more probable in the beagles based on contact activation when collecting through a jugular vein catheter system. Since beagles showed a decrease in thrombin generation, the observed difference is not likely secondary to the sampling method. A variation based on race and/or age could explain this difference, as the mean age of beagles was 2.1 years versus 7.1 years in client owned animals. Young age is associated with lower thrombin generation in humans.³⁰ Additionally, a variation in nutritional status could play a role as a lipid-rich diet was found to increase ETP in healthy rats, independently of coagulation factors.³¹ Further investigation of variations of CAT parameters based on demographics and diet of healthy dogs should be investigated.

Our *in vitro* concentration-response study revealed that approximately twice as much dalteparin is required to halve the ETP in canine PPP (i.e. IC₅₀) as compared with unfractionated heparin, as measure by the CAT. Furthermore, dalteparin requires a higher anti-FXa concentration than unfractionated heparin to completely inhibit TG in canine plasma.²⁴ Contrary to indirect anti-factor X inhibitors such as fondaparinux³² (a synthetic analogue of the pentasaccharide sequence of heparin), which does not achieve complete inhibition of TG, dalteparin was able to completely inhibit TG with concentrations of ≥ 0.6 U/mL. This concentration is in accordance with *in vitro* reported inhibition of TEG tracings using dalteparin, in the absence heparinase, both in dogs and humans.^{15,33} Dalteparin's lower potency in ETP inhibition compared to UH appears to be in relation to its decreased anti-IIa activity, as this finding is in agreement with previous observations in human studies,^{32,34} however further investigations are required to elaborate these findings.

Similarly, the IC₅₀ of dalteparin in canine PPP is approximately 4.8 times greater than in human PPP when measured *in vitro*,³⁵ although wide inter-individual variability and ranges with dalteparin have been reported.^{32,22} The differences in effect of dalteparin on TG in canine as compared to human PPP remain to be explained, but may involve both the amount of coagulation factors and the structure of AT in canine and human blood, because the concentration-response relationships of Peak and ETP begin at lower values in canine as compared to human PPP, and their respective IC₅₀ and sigmoidicity factors visibly differ.

As in people, for the TG assay, Peak, Rate index and ETP were most sensitive to the *in vitro* effect of dalteparin.^{22,36} In general, the peak is more sensitive to variations in the thrombin generation mechanism but less robust because it is derived from the first derivative of the product-time curve, whereas ETP is the most robust variable. The Rate index (steepness of slope of the TG curve) is a second derivative of that curve and generally less robust and more sensitive.³⁷ Dalteparin, and nadroparin (similar anti-Xa:anti-IIa ratio) were shown to have no significant effect on lag time in two *in vitro* human studies using PPP^{35,36} supporting our finding as a parameter with decreased sensitivity to the effect of dalteparin in canine plasma. Interestingly, a study using platelet rich plasma found a dose dependent increase on lag time following the *in vitro* addition of dalteparin.²² This could potentially be explained by the presence of platelets in that study: in PRP, bulk thrombin generation awaits the feedback activation of the platelets, as it provides the necessary procoagulant phospholipids and hence has a slow lag time.³⁷ However, the effects of platelets on lag time have been disputed and also shown not to be

affected when compared to PPP.²⁶ Additional data are required to determine which parameters of the TG assay are most appropriate for the anticoagulant effect of dalteparin: either quantity (Peak, ETP) or time (lag time or ttPeak). A previous report showed good correlation between Anti-FXa activity and TG parameters *in vitro*³⁸, which was supported by similar sensitivity in our study. Further investigations are needed to determine whether these observations will persist *in vivo*. As previously reported,^{8,20} aPTT was shown here to be the least sensitive in coagulation assays for the detection of the effects of dalteparin. The large error bar associated with aPTT likely is the result of an estimated Cdoubling that is close to the highest tested dalteparin concentration, and additional higher dilutions would have been necessary for more precise statistical analysis of this parameter.

This study has some limitations. All data were obtained *in vitro*, therefore *in vivo* studies are required to evaluate the clinical relevance of these results. Particularly, a closed system can give results that over-estimate the concentration of dalteparin³⁵ as there is no removal of the enzymes or the anticoagulant from the system. Thrombin generation was only measured in PPP and, therefore, platelet contribution was not assessed. However the supplemented 4 μ M of phospholipids results in a threshold effect for all parameters and gives similar results to that obtained in platelet rich plasma at similar physiologic TF concentration.³⁹ Moreover, it has been shown that TG parameters are not influenced by variations of platelet concentrations from 50×10^9 to $400 \times 10^9/l$,³⁹ and therefore residual platelet count is believed to be negligible in the observed variation between dogs. The contribution of contact activation pathway was not assessed, however, butterfly needles, which increase contact activation, were not used throughout the study; instead a collection

method of blood samples directly into vacutainer citrated tubes was used. Finally, one of the assay's limitations is the intra-lab and inter-lab variation which makes comparison of studies difficult to analyse.⁴⁰ Standardization of this technique is ongoing.^{39,41}

In conclusion, the present study reported normal ranges of CAT parameters in different demographics of healthy dogs. Furthermore, this study showed that dalteparin exerted an *in vitro* concentration-dependent anticoagulant effect on TG parameters. TG and anti-factor Xa activity were more sensitive parameters than aPTT to detect the anticoagulant activity of dalteparin, with TG being completely suppressed in PPP. The clinical utility of this data requires further investigation.

Footnotes

- a. Fragmin®, Pfizer, Kirkland, Canada. Anti-FXa activity of 10 000 U/mL
- b. Monject, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, MA, USA
- c. Vacutainer, 0.3mL, 0.109M, Becton, Dickinson and Company
- d. Arrow International, Reading, PA, USA
- e. Torbugesic, 0.2 mg/kg SC (Fort Dodge, Overland Park, USA); Dormitor 10µg/kg SC (Pfizer Animal Health, Kirkland, Canada); Antisedan 0.1 mg/kg IM (Pfizer Animal Health, Kirkland, Canada).
- f. Screw cap Micro Tube 2mL, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co
- g. Immulon 2 HB, Thermo Fisher Scientific*
- h. Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific*
- i. Thrombogram-Thrombinoscope. Synapse BV, Maastricht, the Netherlands
- j. STACompact Coagulation Analyzer, Diagnostica Stago, Asnières, France.
- k. STARotachrom Heparin 4, Asnières, France.
- l. Dade® Actin® FS, Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Newark, USA.
- m. Prism, version 5. Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, U.S.A.
- n. SAS for Windows, 9.3 version. SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.
- o. Adapt, version 5. Biomedical Simulation Resource, San Diego, California, U.S.A.

References

1. Scott KC, Hansen BD, DeFrancesco TC. Coagulation effects of low molecular weight heparin compared with heparin in dogs considered to be at risk for clinically significant venous thrombosis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009;19:74-80.
2. Smith SA. Antithrombotic therapy. *Topics in companion animal medicine* 2012;27:88-94.
3. Lunsford KV, Mackin AJ. Thromboembolic therapies in dogs and cats: an evidence-based approach. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007;37:579-609.
4. Hirsh J, Warkentin TE, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 1998;114:489S-510S.
5. Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. *N Engl J Med* 1997;337:688-698.
6. Mischke R, Grebe S, Jacobs C, et al. Amidolytic heparin activity and values for several hemostatic variables after repeated subcutaneous administration of high doses of a low molecular weight heparin in healthy dogs. *Am J Vet Res* 2001;62:595-598.
7. Brooks MB. Evaluation of a chromogenic assay to measure the factor Xa inhibitory activity of unfractionated heparin in canine plasma. *Vet Clin Pathol* 2004;33:208-214.
8. Mischke R, Grebe S. The correlation between plasma anti-factor Xa activity and haemostatic tests in healthy dogs, following the administration of a low molecular weight heparin. *Res Vet Sci* 2000;69:241-247.
9. Lunsford KV, Mackin AJ, Langston VC, et al. Pharmacokinetics of subcutaneous low molecular weight heparin (enoxaparin) in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2009;45:261-267.
10. Leizorovicz A, Bara L, Samama MM, et al. Factor Xa inhibition: correlation between the plasma levels of anti-Xa activity and occurrence of thrombosis and haemorrhage. *Haemostasis* 1993;23 Suppl 1:89-98.
11. Kitchen S, Iampietro R, Woolley AM, et al. Anti Xa monitoring during treatment with low molecular weight heparin or danaparoid: inter-assay variability. *Thromb Haemost* 1999;82:1289-1293.
12. Greaves M. Limitations of the laboratory monitoring of heparin therapy. *Scientific and Standardization Committee Communications: on behalf of the Control of*

Anticoagulation Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 2002;87:163-164.

13. Samama MM, Gerotziafas GT. Comparative pharmacokinetics of LMWHs. *Semin Thromb Hemost* 2000;26 Suppl 1:31-38.

14. Grebe S, Jacobs C, Kietzmann M, et al. [Pharmacokinetics of low-molecular-weight heparins Fragmin D in dogs]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2000;113:103-107.

15. Jessen LR, Wiinberg B, Jensen AL, et al. In vitro heparinization of canine whole blood with low molecular weight heparin (dalteparin) significantly and dose-dependently prolongs heparinase-modified tissue factor-activated thromboelastography parameters and prothrombinase-induced clotting time. *Vet Clin Pathol* 2008;37:363-372.

16. Alwood AJ, Downend AB, Brooks MB, et al. Anticoagulant effects of low-molecular-weight heparins in healthy cats. *J Vet Intern Med* 2007;21:378-387.

17. Brainard BM, Koenig A, Babski DM, et al. Viscoelastic pharmacodynamics after dalteparin administration to healthy dogs. *Am J Vet Res* 2012;73:1577-1582.

18. Smith SA, McMichael M, Galligan A, et al. Clot formation in canine whole blood as measured by rotational thromboelastometry is influenced by sample handling and coagulation activator. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010;21:692-702.

19. Wagg CR, Boysen SR, Bedard C. Thrombelastography in dogs admitted to an intensive care unit. *Vet Clin Pathol* 2009;38:453-461.

20. al Dieri R, Alban S, Beguin S, et al. Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. *J Thromb Haemost* 2004;2:1395-1401.

21. Robert S, Ghiotto J, Pirotte B, et al. Is thrombin generation the new rapid, reliable and relevant pharmacological tool for the development of anticoagulant drugs? *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2009;59:160-166.

22. Petros S, Siegemund T, Siegemund A, et al. The effect of different anticoagulants on thrombin generation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006;17:131-137.

23. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:249-253.

24. Allegret V, Dunn M, Bedard C. Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs by measuring thrombin generation. *Vet Clin Pathol* 2011;40:24-31.

25. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:4-15.
26. Gerotziapas GT, Petropoulou AD, Verdy E, et al. Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2007;5:955-962.
27. Patterson SD, Jones B. Bioequivalence and statistics in clinical pharmacology. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 2006; 374 p.
28. D'Argenio DZ, Schumitzky A, Wang X. ADAPT 5 user's guide: pharmacokinetic/pharmacodynamic systems analysis software. Los Angeles, CA, U.S.A.: Biomedical Simulations Resource; 2009.
29. Conversy B, Blais MC, Dunn M, et al. Rivaroxaban exerts in vitro anticoagulant effects in healthy dogs. *Vet J* 2013; 198(2): 437-443.
30. Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, et al. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost* 2006;95:772-775.
31. Sanchez C, Poggi M, Morange PE, et al. Diet modulates endogenous thrombin generation, a biological estimate of thrombosis risk, independently of the metabolic status. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2394-2404.
32. Hacquard M, Perrin J, Lelievre N, et al. Inter-individual variability of effect of 7 low molecular weight antithrombin-dependent anticoagulants studied in vitro with calibrated automated thrombography. *Thromb Res* 2011;127:29-34.
33. Zmuda K, Neofotistos D, Ts'ao CH. Effects of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and heparinoid on thromboelastographic assay of blood coagulation. *Am J Clin Pathol* 2000;113:725-731.
34. Beguin S, Welzel D, Al Dieri R, et al. Conjectures and refutations on the mode of action of heparins. The limited importance of anti-factor xa activity as a pharmaceutical mechanism and a yardstick for therapy. *Haemostasis* 1999;29:170-178.
35. Bostrom SL, Hansson GF, Kjaer M, et al. Effects of melagatran, the active form of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran, and dalteparin on the endogenous thrombin potential in venous blood from healthy male subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:457-462.
36. Rossetto V, Spiezia L, Dabrilili P, et al. Effect on thrombin generation of the "in vitro" addition of low-dose LMWH to plasma of healthy pregnant and nonpregnant women. *Clin Appl Thromb Hemost* 2012;18:331-333.

37. Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: what have we learned? *Blood Rev* 2012;26:197-203.
38. Tay L, Aboud M, Ward CM, et al. Comparative study of low molecular weight heparin monitoring by anti-Xa levels, overall haemostasis potential and calibrated automated thrombogram assays. *J Thromb Haemost* 2007;5:abstract number:P-T-097.
39. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, et al. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thrombosis journal* 2005;3:16.
40. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, et al. Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study. *Br J Haematol* 2007;139:303-309.
41. Dargaud Y, Wolberg AS, Luddington R, et al. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study. *Thromb Res* 2012;130:929-934.

Tables

Table I-I. Number, sex, age range, weight range, breeds, and number of dogs per breed of the groups of dogs used in this study.

Group	Nb	Sex	Age (yr) mean [range]	Weight (kg) mean [range]	Breed (nb)	Used in objective#
Institutional colony	25	20 F 5 M	2.1 [0.5 to 5]	11.0 [7,5 to 17.3]	Beagle (25), (24)	1, 2
Client-owned	11	7 F (1 intact) 4 M (1 intact)	7.1 [4.1 to 9.5]	34.7 [22.2 to 61.5]	Labrador Retriever (3)	1
					German Sheppard (2)	1
					Golden retriever (1)	1
					Great Dane (1)	1
					Boxer (1)	1
					Border Collie (1)	1
					Terrier (1)	1
					Mixed breed (1)	1

Legend: F, female; M, male; Objective #1, determination of normal thrombin generation values; Objective #2, *in vitro* concentration-effect relationships of dalteparin on coagulation and thrombin generation parameters

Table I-II. Thrombin generation pooled values (range, mean, and SD as calculated from the best fitting statistical distribution) in healthy client-owned dogs and research beagles

Variable	Unit	Distribution	Mean [SD]	Range
ETP	nM·min	Lognormal	321.1 [70.9]	216.3, 465.0
Lag time	Min	Lognormal	1.18 [0.37]	0.84, 1.67
Peak	nM	Lognormal	128.2 [25.7]	79.9, 178.7
ttPeak	S	Lognormal	2.86 [0.60]	2.20, 4.22
Rate index	nM·min ⁻¹	Normal	45.5 [13.6]	20.5, 75.7

Figures

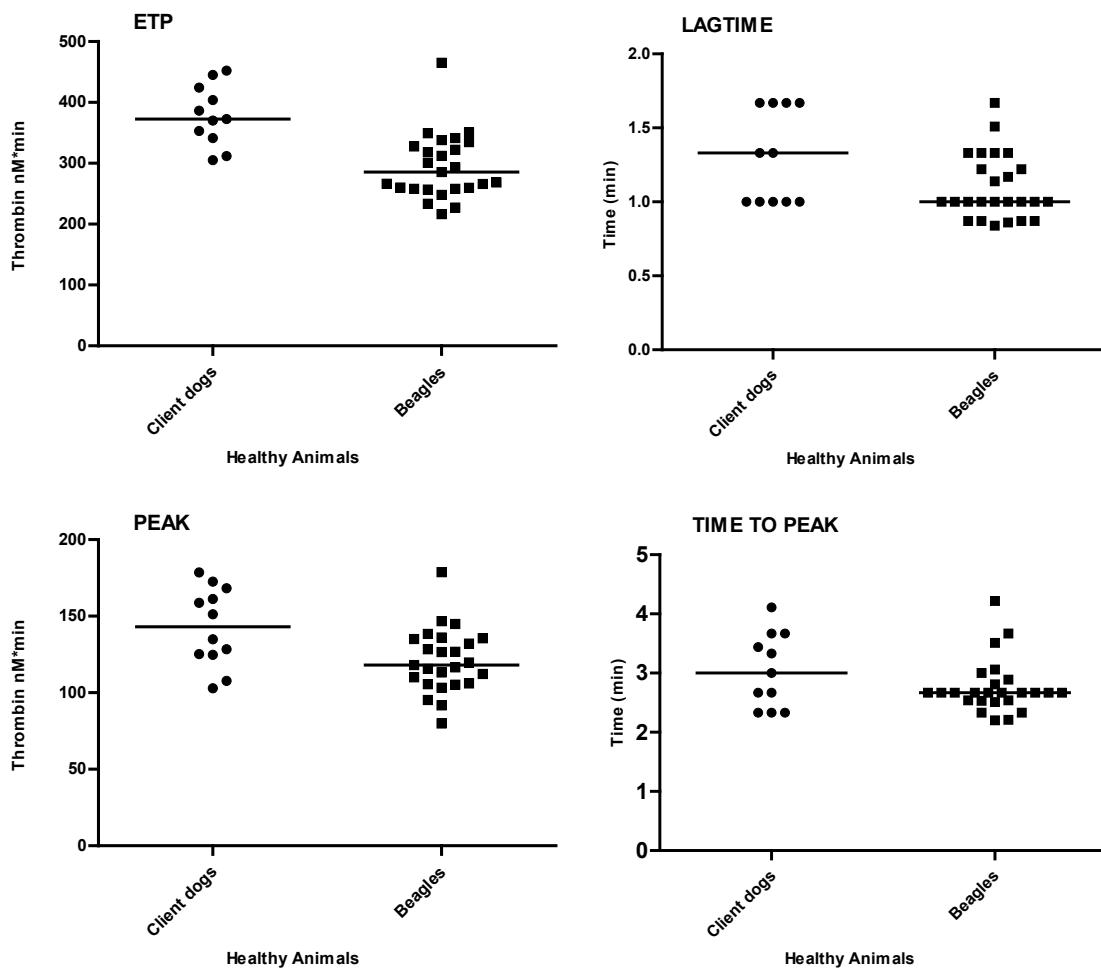


Figure 1.1. Scatter plot of thrombin generation parameters for healthy client-owned dogs and healthy beagles prior to subcutaneous dalteparin administration. Solid horizontal lines represent medians for each group.

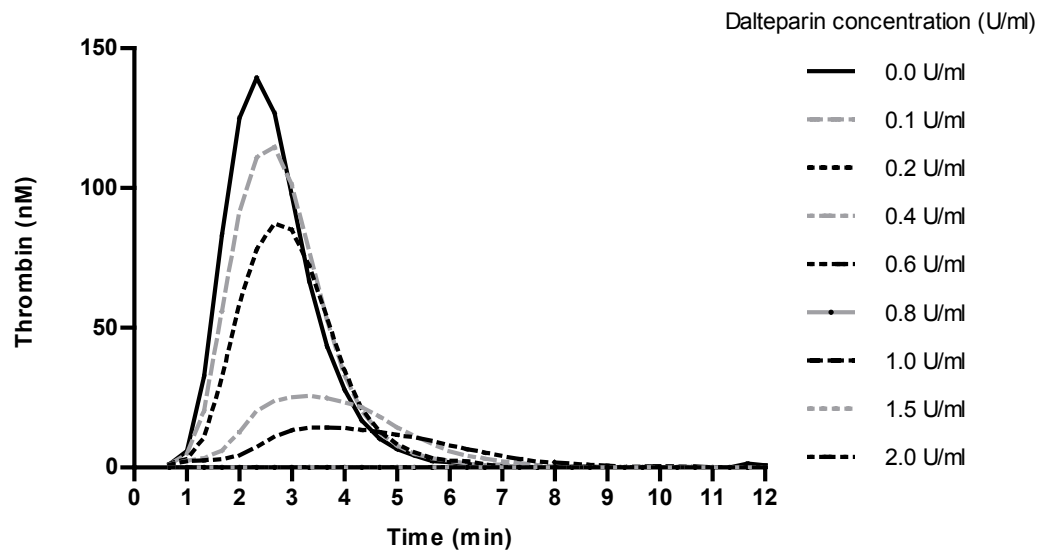


Figure 1.2. Thrombograms obtained for serial dilutions of dalteparin. With increasing concentration of dalteparin, thrombin generation is markedly decreased. Concentrations of dalteparin above 0.6 U/mL resulted in complete inhibition of thrombin generation.

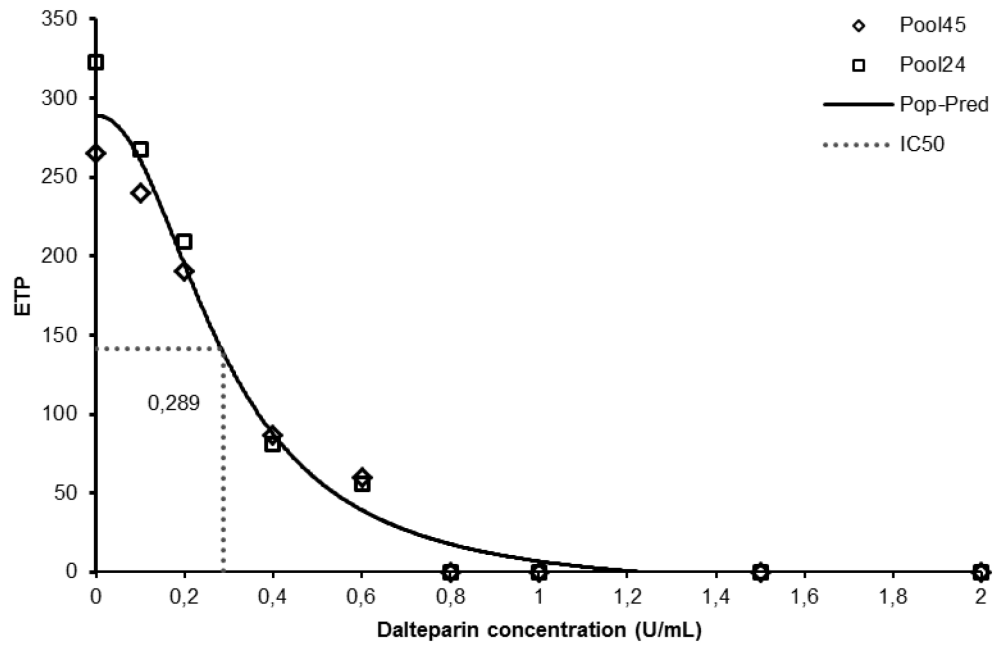


Figure 1.3. Plot of the predicted function for endogenous thrombin time (ETP) versus concentration of dalteparin *in vitro*. The broken lines (—) from the two axes intercept at the estimated IC50 value for dalteparin. ETP values are shown as triangles (pool 45) and diamonds (pool 24).

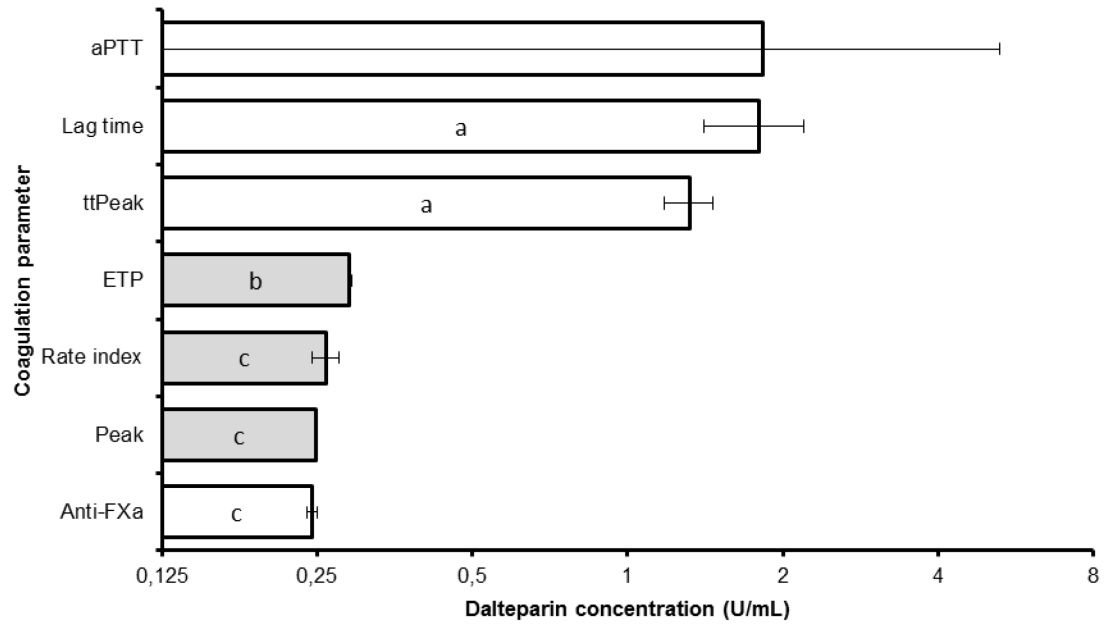


Figure 1.4. *In vitro* plasma dalteparin concentration required for doubling aPTT, Anti-FXa activity, thrombin generation Lag time and time to Peak (white boxes) or for halving the baseline value of thrombin generation ETP, Rate index and Peak (shaded boxes). Error bars represent the boundaries of the 95% confidence intervals, and boxes with different letters significantly differ ($p < 0.05$).

ARTICLE 2

Effect of dalteparin administration on thrombin generation kinetics in healthy dogs

Carolyn Gara-Boivin¹, Jérôme R.E. del Castillo², Marilyn E. Dunn³, Christian Bédard¹

From the Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire. ¹Department of Pathology and Microbiology, ²GREPAQ – Department of Veterinary Biomedicine, and ³Department of Clinical Sciences.

Short Title

Thrombin generation in dalteparin exposed dogs

Keywords: Low molecular weight heparin, coagulation, endogenous thrombin potential, pharmacodynamics

Abbreviations: AIC: Akaike information criterion of goodness of fit, AT: antithrombin,

CAT: Calibrated Automated Thrombogram, ETP: endogenous thrombin potential,

LMWH: low-molecular weight heparin, PPP: Platelet-poor plasma, TG: thrombin generation, TF: tissue factor, UH: unfractionated heparin

Correspondence: Carolyn Gara-Boivin

Department of Pathology and Microbiology, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000 Saint-Hyacinthe, QC, Canada J2S 7C6

Submitted for publication to: Journal of Veterinary Clinical Pathology

This work was completed in the clinical pathology laboratory of the Service de Diagnostic of the Université de Montréal in Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

This study was supported by the Morris Animal Foundation.

Results of this study were presented in abstract form at the Annual Congress of the American College of Veterinary Internal Medicine, Denver, CO, USA, June 2011

Acknowledgements

The authors would like to thank Sandrine Cros and Anik Cormier from the Université de Montréal and from the Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine (Montréal), respectively, for their involvement in performing the coagulation assays; Maxim Moreau for technical help.

Conflict of Interest: Authors disclose no conflict of interest.

Abstract

Background: Dalteparin is used to prevent thrombotic complications in dogs. Measurement of anti-factor Xa (FXa) is currently used for monitoring therapy, but remains a non-functional test. The Calibrated Automated Thrombogram (CAT) could be a suitable approach for functional monitoring.

Hypothesis/Objectives: We hypothesized that the CAT would detect decreased endogenous thrombin potential (ETP) in healthy dogs receiving dalteparin.

Animals: Twenty-four healthy adult Beagles were randomized across four equal groups.

Methods: A single SC dose of 50 U/kg, 100 U/kg or 150 U/kg of dalteparin was given and compared to a placebo group. Platelet poor plasma (PPP) was collected over a 24 hour period. Data was analysed with a repeated-measures general linear mixed model.

Results: Time, dose and time-dose interaction significantly affected ETP ($p < 0.0001$ for all effects), peak ($p < 0.0001$ for all effects), rate index ($p < 0.0006$ for all effects) and anti-FXa activity ($p < 0.0001$ for all effects). No significant time trend was detected in the control group. Dogs receiving the 100U/kg dalteparin SC injection showed the most homogeneous response of ETP inhibition amongst treated groups. The % inhibition of ETP from baseline increased nonlinearly as a function of anti-FXa activity $r^2 = 0,82$.

Conclusions and clinical importance: The CAT assay can be employed to measure the effects of dalteparin at different doses in healthy dogs, showing sensitivity to time and dose-dependent changes in ETP and other thrombin generation parameters.

Further investigation of the CAT as a tool for monitoring LMWH therapy in dogs is warranted.

Introduction

In small animals, thrombotic disorders are frequent complications of acquired systemic diseases, trauma or secondary to corticosteroid administration.¹⁻³ Anticoagulation with low-molecular-weight heparin (LMWH) is used to prevent thrombotic complications in dogs.^{2,4} Because of its preferential inhibition of activated factor X (FXa) over activated factor II (FIIa; thrombin), and the relative insensitivity of most activated partial thromboplastin time (aPTT) reagents to LMWH at standard doses,^{5,6} anti-FXa activity is used for monitoring.^{7,8} However, anti-FXa activity is not a functional test: the anti-FXa activity represents the amount of heparin present but not necessarily the antithrombotic function of LMWH in different plasmas and patients. Consequently, anti-FXa levels are not a good predictor of bleeding during treatment with LMWH and may not correlate with the risk of thromboembolism recurrence.^{9,10} This is because measuring anti-FXa activity for the monitoring and adjustment of LMWH therapy has several limitations.¹¹ Firstly, results of anti-FXa activity will differ because of variable anti-FIIa inhibition between LMWH preparations and depending on the assay used in a given laboratory. Also, anti-FXa activity may not adequately reflect anticoagulation since the anti-FIIa activity appears to be the more important action in kinetic studies,¹² and since LMWH has significant effects on tissue factor pathway inhibitor (TFPI) released by endothelial cells.¹³ Measuring clotting time would be more clinically relevant. Clot formation is the endpoint of most

commonly used tests to evaluate hemostasis processes. However, assays such as the prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) reflect the contribution of thrombin generated only during the initiation phase while the vast majority of thrombin (>95%) is generated during the propagation phase after the clotting process and initial fibrin formation.¹⁴ Increasing evidence shows that the amount of thrombin activity that develops is a better marker of the function of the clotting system than is the clotting time. This is due to thrombin's pivotal role in coagulation, by not only converting fibrinogen to fibrin, but through numerous feedback loops or inhibitory pathways.^{15,16} With the use of thrombin generation (TG) measurements in humans over the recent years, it has been shown that thrombin generation is a sensitive surrogate variable for bleeding or, conversely thrombotic tendency.^{17,18} Ultimately, the goal of anticoagulation is to decrease TG, independently of the mode of action. Therefore, we hypothesize that the measurement of endogenous thrombin potential (ETP) by the Calibrated Automated Thrombogram (CAT) would be responsive to the kinetics of LMWH anticoagulation in healthy dogs. The objective of this study was to perform a pharmacodynamic study in dogs administered clinically relevant dalteparin doses and perform monitoring with TG kinetics, anti-FXa activity and aPTT.

Material and Methods

Animals

Adult beagle dogs (N=24) from the University of Montreal's teaching and research colony were used for the experiment. All dogs included in the study were determined to be healthy according to medical history, a normal physical examination, routine hematological, biochemical, and hemostatic tests. Dogs were excluded from the study if their medical records had mention of having received a steroidal or nonsteroidal anti-inflammatory drug, anticoagulant, surgery or other treatment that might influence coagulation in the 2 months prior to the beginning of the study. Animals were cared for according to the Canadian Council on Animal Care guidelines.¹⁹

Study design

Ex vivo pharmacodynamic study

The dogs were randomized across a control and 3 treatment groups (n=6/group) that were used in a parallel experimental design. Each control dog received a single SC injection of physiological saline (NaCl, 0.9%), and those in each treated group received a single SC injection of dalteparin (Fragmin®)^a at doses of 50U/kg, 100U/kg or 150U/kg. Blood was sampled before injection, and at 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 480, 720 and 1440 minutes following injection. At each sampling time, TG, anti-FXa, and aPTT were measured individually.

Blood sampling and processing

In order to avoid repeated venipuncture in the beagles, a 5 Fr indwelling jugular catheter^b was placed under mild sedation with reversal after completion of the procedure^c. In a pilot study, this sedation procedure was shown to produce statistically non-significant effects on the tested coagulation parameters (data not shown). The first 3 mL of blood collected from the catheters were discarded before collecting the samples for the assays. Then, 8.1 mL of blood were collected and transferred in three 2.7 mL citrate tubes, and finally the catheter was flushed with 5mL of 0.9% NaCl to prevent clotting.

Platelet-poor plasma (PPP) was prepared immediately after collection, by centrifugation at 2500g for 10 minutes at 7°C. The supernatant fraction was collected and immediately stored in 1.5mL aliquots^d at -80°C, and analyzed within 6 months. Thawing was carried out in a preheated water bath at 37°C shortly before analysis.

Coagulation assays

Thrombin generation analyses

Upon thawing, PPP samples were assayed for TG according to Hemker et al.²⁰ The CAT assay uses a fluorogenic thrombin substrate and measures thrombin generation by comparing the fluorescence in plasma during clotting after tissue factor activation to the fluorescence of a thrombin calibrator. To the TG and calibrator wells, 80 µL of PPP is added, followed respectively by 20 µL of buffer solution containing the trigger agent (tissue factor – TF – plus phospholipids) or of thrombin calibrator. In each well, the TG

reaction was initiated by adding 20 μL of a HEPES buffer solution (pH 7.35) containing CaCl_2 and the fluorescent substrate. The final solution contained 5 pM of TF and 4 μM of phospholipids. Fluorescence was measured in specific plates^e with an automated plate fluorometer^f.

Parameters of the TG curve, including ETP ($\text{nM}\cdot\text{min}$), Lag time (min), Peak plasma thrombin concentration (nM) and Time to peak (ttPeak, min) were estimated with a dedicated software^g, which converted the signal to molar concentrations of thrombin. Afterwards, velocity-rate-index of thrombin generation (Rate index; $\text{nM}\cdot\text{min}^{-1}$) was calculated as previously described²¹ with the formula $\text{Rate index} = \text{Peak} \cdot (\text{ttPeak} - \text{lag time})^{-1}$.

Anti-FXa and aPTT assay

Chromogenic anti-FXa activity and aPTT assays were performed using an automated coagulation analyzer^h using their respective reagents.^{i,j}

Data analysis

The fixed effects of time, dalteparin dose and the time·dose interaction on aPTT and the TG parameters were examined with general linear mixed-effects models for repeated measures using a statistical analysis software.^k The covariance structure of the data was modeled with the approach proposed by Littell et al.²² Briefly, the data was

analyzed using a free covariance matrix (i.e. where all variances and covariances of the observations were estimated), and then reanalyzed with more parsimonious covariance matrices (e.g., variance components, compound symmetry, first-order autoregressive). Final selection of the covariance matrix was based on the value of the Akaike Information Criterion (AIC) of goodness-of-fit.²² Post-hoc analyses were performed to examine all differences between treatment groups with a Bonferroni-corrected α -threshold. In addition, survival analysis was performed to compare the times of return to baseline parameter values after dalteparin administration.

Results

Ex vivo pharmacodynamics of LMWH

The mean time-courses of ETP depicted in Fig. 2.1 show decreases that depend on increasing dalteparin dose. One dog in the 50 U/kg group did not have measurable FXa inhibition at any sampling time after dalteparin administration; therefore, this dog was excluded from the study, as this confirmed that he did not receive the required dose due to an administration error.

The repeated-measures general linear mixed model with first-order autoregressive covariance matrix had the best AIC values, and revealed significant effects of time, dose and time·dose interaction on ETP ($p < 0.0001$ for all effects). Similar findings were found for peak ($p < 0.0001$ for all effects), rate index ($p < 0.0006$ for all effects) and Fig. 2.2 shows that the increase in anti-FXa activity was similarly affected ($p < 0.0001$ for all effects). No

significant time trend was detected in the control group for any of the measured parameters. Table II-I displays the means of ETP inhibition relative to baseline ETP, which increased as a function of dalteparin dose. Lag time showed significant effects only for time ($p < 0.0001$) and time·dose interaction ($p=0.047$), and $ttPeak$ was only affected by time ($p < 0.0001$). Time had a significant effect on aPTT ($p < 0.0001$): the mean time-course of this parameter was slightly higher in all dalteparin groups as compared to controls during the first 240 minutes, a difference that was almost significant ($p=0.08$). However, the values remained within the clinical reference interval throughout the duration of the experiment (data not shown).

Post-hoc analysis of the time-course of ETP showed that only the 100 and 150 U/kg dalteparin dose groups differed statistically from the control and 50 UI/kg groups, but the two highest dose groups did not significantly differ with each other.

Dogs receiving the 100U/kg dalteparin SC injection showed the most homogeneous response and return to baseline of ETP amongst treated groups (Fig. 2.3). A plateau effect was noticed in 2 dogs in the 100U/kg dalteparin group, as well as all dogs in the 150U/kg dosing group. The nadir ETP value was around 40 nM*min. Return to baseline ETP was observed at median [95% C.I.] times of 323 [278, 648], 522 [440, 1073], and 879 [358, 1440] minutes for the 50, 100, and 150 U/kg dalteparin SC dose groups, respectively. Survival analysis revealed a significant difference among dose groups ($p=0.0409$), which was assigned in Bonferroni-corrected post-hoc tests to the difference

between dogs in the 50 vs. 150 U/kg groups ($p=0.0344$). Observations of individual return to baseline were however variable for each dog and variability increased with rising doses (Fig. 2.4).

Anti-FXa activity, a surrogate of systemic exposure to LMWH, was highest between 60 and 180 min for the 50 and 100 U/kg dalteparin doses, and between 120 and 240 min for dogs in the 150 U/kg dalteparin group (Fig 2.2). The average peak anti-FXa activities achieved for each dose are shown in table 1. The return to baseline for anti-FXa was observed at median [95% C.I.] times of 408.9 [256.2, 594.5], 501.7 [361.0, 515.6], and 626.1 [501.2, 795.6] min for the dalteparin 50 U/kg, 100 U/kg and 150U/kg dose groups, respectively. Significant differences were recorded again with survival analysis ($p=0.0289$), with the 150 U/kg dogs returning to baseline anti-FXa values later than the 50 U/kg dogs (Bonferroni-adjusted $p=0.0269$). Individual returns to baseline times are shown in Fig. 2.4.

The relationship between anti-FXa activity and the relative inhibition of ETP is shown in Fig. 2.5. The % inhibition of ETP from baseline increased nonlinearly as a function of anti-FXa activity, a relationship that was fitted adequately with a logarithmic trend in the range of measured anti-FXa activity. When dalteparin activity is greater than 0.85 anti-FXa U/mL, ETP inhibition is only further inhibited by approximately 10 %.

Discussion

To our knowledge, our study is the first to use the CAT assay to assess the effect of dalteparin therapy in dogs, and our results show that the drug effectively inhibited *ex vivo* thrombin generation.

This instrument extensively used in medical research to monitor anticoagulant therapy²³⁻²⁵ has shown its potential for the monitoring of dogs receiving unfractionated heparin.²⁶ In this study, the dose-associated changes in the mean and individual time-ETP curves suggest that dalteparin exerts a saturable *in vivo* anticoagulant effect in dogs. Three features can be noted from the mean time-ETP curves: first, the nadir ETP values decrease nonlinearly from the 50 to 150 U/kg doses, with modest differences between the two highest doses. Second, the duration of nadir ETP values increase with dose, and last, the transition from nadir to baseline ETP values is delayed with increasing dose. This is further supported by the prevalence of a plateau nadir in the individual time-ETP curves: none of the 5 dogs in the 50 U/kg dalteparin group, 2/6 dogs in the 100U/kg group and all 6 dogs in the 150 U/kg group demonstrated this plateau. In the dogs where a plateau nadir ETP was recorded, the geometric mean value was approximately 63 nM*min.

The beagles whose time-ETP curves were most homogeneous after a single SC injection of dalteparin were those that received the 100 U/kg dose. In contrast, the dogs that received the 150 U/kg dalteparin dose were considerably more heterogeneous in the return to baseline after the nadir plateau. This difference in return to baseline is unexpected because, to our knowledge, no peer-reviewed report documenting the effects of dalteparin

dose on the time-course of its anticoagulant effects has been published so far. The underlying mechanisms explaining this feature in the 150 U/kg group cannot be elucidated with the data collected in the current study. However we believe it may be associated with pharmacokinetic and pharmacodynamic factors such as the persistence of dalteparin at plasma concentrations above EC_{50} during its elimination phase, combined with inter-individual variability in FXa expression. Figure 6 is suggestive of this possibility because the transition of mean anti-FXa activity in the 150 U/kg dogs seems smoother than in 100 U/kg dogs. Alternatively, these results may be associated with slight but biologically significant plasma Na^+ decrease in dogs receiving 150 U/kg dalteparin. It is acknowledged that heparin induces natriuresis and hyperkalemia through a dose-dependent suppression of aldosterone synthesis.²⁷ Since the procoagulant/anticoagulant ratio of thrombin depends on the percent occupation of the allosteric Na^+ binding site²⁸, a decrease in plasma Na^+ increases the proportion of Na^+ -free thrombin (i.e. “slow” thrombin) that activates the anticoagulant protein C but does not activate the pro-coagulant factors V, VIII and XI. In this case, the increased plasma activated protein C would sustain the overall anticoagulant activity in plasma during the dalteparin elimination phase.²⁸ Even though our study cannot sort the relative contributions of each hypothesized mechanism, our results suggest that the currently recommended dose of 150U/kg of dalteparin in dogs, two to three times daily may not be cost-effective, both in terms of anticoagulant efficacy and safety of repeated dosings. Additional studies using the CAT assay following a repeated dose regimen should be explored to further investigate underlying mechanisms that may lead to more predictable responses.

The doses used in this study (50, 100 and 150U/kg) achieved thromboprophylactic and active thrombotic disease recommendations for anti-FXa activity as extrapolated from humans medical literature²⁹ and studies in dogs.^{2,6,30} In this *ex vivo* pharmacodynamic study, a dose of 100 U/kg following a SC injection achieved ETP inhibition of approximately 73% and a mean anti-FXa activity of approximately 0.81 (IU/mL), which are similar to those of healthy humans following a SC injection of 120 U/kg.²⁴ Measuring anti-FXa activity is considered the standard when laboratory monitoring of LMWH therapy is sought.^{7,31,32} This choice is based on the generally accepted therapeutic mechanism for LMWH: that dalteparin has a ratio of anti-FXa activity to anti-FIIa activity of 2.5:1 at standard doses.^{33,34} However, the anti-FXa : aFIIa ratio, is an indicator of molecular weight, showing differences in pharmacokinetics rather than the mode of anticoagulant action.³⁵

Although dalteparin has substantial anti-FXa activity, it has been shown that the major anticoagulant effect of LMWH actually results from its small anti-FIIa activity.³⁵⁻⁴⁰ The allegedly higher anti-Xa activity of LMWH was shown to be mostly due to an artifact in the absence of Ca[†] using the current laboratory methods to estimate this activity.^{36,41} In the absence of anti-FIIa activity (such as Xa inhibitors-fondaparinux) , the inhibition of Factor-Xa becomes the rate limiting step, but requires much higher concentrations to achieve the same effect than those used for LMWH.³⁷ However, with heparin that has an anti-IIa activity, this action always overrules the anti-FXa action.¹² Therefore, monitoring

the effectiveness of dalteparin anticoagulation through TG is supported by the findings that ETP is a greater reflection of the anti-FIIa activity than the anti-FXa activity.³⁹ This was achieved by showing the different contribution of the impacts of the anti-FXa and anti-FIIa activity on each phase of thrombin generation.²¹ The inhibition of ETP is mainly determined by the concentration of the heparin fragments which contains the anti-FIIa activity.³⁵ Hence, ETP monitors in large part the more potent pharmacologically active species.

Our findings for aPTT showed a minimally but significantly increased effect in the first few hours for our 2 highest doses, but times remained within the reference interval for all dogs at all times and all doses. This supports previous findings of the minimal effect of LMWH on aPTT^{5,6} and supports the conclusion that aPTT prolongation when compared to established references is inadequate as an indicator of the effect dalteparin.³⁹

In this study, we notice a tendency for longer return to baseline times for ETP values in some dogs versus anti-FXa activity, and this with the increasing dosage of dalteparin (Fig. 2.4). These results were not significantly different, but at least 3 dogs in the 150U/kg group, 2 dogs in the 100U/kg group and 1 dog in the 50 U/kg group had longer thrombin inhibition than the longest measured anti-FXa activity in each respective dosing group. This may suggest that at least in some dogs, the coagulation system is still inhibited even though anti-FXa activity has returned to normal. A potential mechanism that could explain this is the anticoagulant properties of TF pathway inhibitor (TFPI)

which is not taken into account when measuring anti-FXa activity. LMWH's are known to increase the release of TFPI from endothelial cells¹³ and TFPI is responsible for a third of the anticoagulant effects of heparins⁴² by inhibiting FXa and FVIIa. FIXa, which is not inhibited by TFPI¹⁶ has also been shown to contribute to the anticoagulation mechanism of LMWH in an antithrombin (AT)-independent way.⁴³ Therefore, the tendency for prolonged coagulation inhibition beyond anti-FXa activity merits further investigation. Functional assays such as the CAT may help provide additional research information on the hemostatic effects of LMWH that are not solely explained by anti-FXa activity.

Other global coagulation assays such as TEG have been used to evaluate the anticoagulant effect of dalteparin in plasma⁴⁴ and in healthy dogs⁴⁵ however in the latter, recalcified TEG was not a good tool to for monitoring *ex vivo* dalteparin therapy. Using a strong activator of coagulation has been suggested⁴⁶ and our study confirms the use of high concentration TF for coagulation activation with the CAT, as all tracings and parameters of TG were recorded for all dalteparin doses, at all times.

This study has several limitations. Firstly, this experiment was performed on young healthy beagle dogs, and extrapolation to a wider population of dogs warrants caution as more variability would be likely if animals of different breeds, ages and ill animals were evaluated. Secondly, thrombin generation was only measured in PPP and, therefore, platelet contribution was not assessed. Platelets are known to play an important role by accelerating the propagation phase of thrombin generation through exposure of

procoagulant phospholipids, and by contributing clotting factors to the microenvironment.¹⁴ However, using the CAT assay, Gerotziafas et al. conclude that the thrombogram parameters obtained in frozen-thawed PPP supplemented with synthetic procoagulant phospholipids at concentrations equal or superior to 4 μ M, as in our study, is quite similar to that obtained in PRP when using physiologically relevant concentrations of TF for both.⁴⁷ Therefore we believe that our results would be similar in the presence of platelets instead of phospholipids. Finally, the inhibition of the contact activation pathway by corn trypsin inhibitor (CTI) was not used in our study. Its use has been a subject of recent debate.^{48,49} In our study, we used a final concentration of 5pM of TF, which according to Spronk and van Veen, does not require the addition of CTI.^{49,50} Additionally, throughout the study, the first 3mL of blood were discarded in order to limit contact activation contamination in the citrated tubes. Finally, only a single SC dose of 50, 100 or 150U/kg was administered. Repeated dose administration such as that used for therapeutic regimens may have variable effects on CAT parameters.

In conclusion, our study shows that the CAT assay can successfully measure the effects of dalteparin at different doses in healthy dogs. Moreover, this study supports previous work demonstrating inter-individual variability on the pharmacodynamics of LMWH after administration of a single dose. Based on our data, the response after a single SC dose of 100U/kg dalteparin would provide highly predictable effects on thrombin generation within 15 minutes with effects lasting up to 9 hours. Our findings support the need for further investigations using the CAT assay as a surrogate measure to assess the

effects of multiple dosing regimens of dalteparin in healthy and ill dogs as well as clinical trials in dogs at risk of thrombosis.

Footnotes

- a. Fragmin ®, Pfizer, Kirkland, Canada. Anti-FXa activity of 10 000 U/mL.
- b. Arrow International, Reading, PA, USA
- c. Torbugesic, 0.2 mg/kg SC (Fort Dodge, Overland Park, USA); Dormitor 10µg/kg SC (Pfizer Animal Health, Kirkland, Canada); Antisedan 0.1 mg/kg IM (Pfizer Animal Health, Kirkland, Canada).
- d. Screw cap Micro Tube 2mL, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co
- e. Immulon 2 HB, Thermo Fisher Scientific*
- f. Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific*
- g. Thrombogram-Thrombinoscope. Synapse BV, Maastricht, the Netherlands.
- h. STACompact Coagulation Analyzer, Diagnostica Stago, Asnières, France.
- i. STARotachrom Heparin 4, Asnières, France.
- j. Dade® Actin® FS, Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Newark, USA
- k. SAS for Windows, 9.3 version. SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.

References

1. Whelan MF, O'Toole TE. The use of thrombolytic agents. *Compendium* 2007;29:476-482; quiz 482, 486.
2. Lunsford KV, Mackin AJ. Thromboembolic therapies in dogs and cats: an evidence-based approach. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007;37:579-609.
3. de Laforcade A. Diseases associated with thrombosis. *Topics in companion animal medicine* 2012;27:59-64.
4. Smith SA. Antithrombotic therapy. *Topics in companion animal medicine* 2012;27:88-94.
5. al Dieri R, Alban S, Beguin S, et al. Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. *J Thromb Haemost* 2004;2:1395-1401.
6. Mischke R, Grebe S, Jacobs C, et al. Amidolytic heparin activity and values for several hemostatic variables after repeated subcutaneous administration of high doses of a low molecular weight heparin in healthy dogs. *Am J Vet Res* 2001;62:595-598.
7. Mischke R, Grebe S. The correlation between plasma anti-factor Xa activity and haemostatic tests in healthy dogs, following the administration of a low molecular weight heparin. *Res Vet Sci* 2000;69:241-247.
8. Kitchen S, Iampietro R, Woolley AM, et al. Anti Xa monitoring during treatment with low molecular weight heparin or danaparoid: inter-assay variability. *Thromb Haemost* 1999;82:1289-1293.
9. Leizorovicz A, Bara L, Samama MM, et al. Factor Xa inhibition: correlation between the plasma levels of anti-Xa activity and occurrence of thrombosis and haemorrhage. *Haemostasis* 1993;23 Suppl 1:89-98.
10. Nieuwenhuis HK, Albada J, Banga JD, et al. Identification of risk factors for bleeding during treatment of acute venous thromboembolism with heparin or low molecular weight heparin. *Blood* 1991;78:2337-2343.
11. Greaves M. Limitations of the laboratory monitoring of heparin therapy. *Scientific and Standardization Committee Communications: on behalf of the Control of Anticoagulation Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis*. *Thromb Haemost* 2002;87:163-164.

12. Hemker HC, Beguin S. Mode of action of heparin and related drugs. *Semin Thromb Hemost* 1991;17 Suppl 1:29-34.
13. Tobu M, Ma Q, Iqbal O, et al. Comparative tissue factor pathway inhibitor release potential of heparins. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005;11:37-47.
14. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:17-25.
15. Mann KG. Thrombin formation. *Chest* 2003;124:4S-10S.
16. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009;19:3-10.
17. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:249-253.
18. Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: what have we learned? *Blood Rev* 2012;26:197-203.
19. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals, 2nd ed. Ottawa, Canada: The Council; 1993.
20. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:4-15.
21. Gerotziafas GT, Petropoulou AD, Verdy E, et al. Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2007;5:955-962.
22. Littell RC, Pendergast J, Natarajan R. Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Statistics in medicine* 2000;19:1793-1819.
23. Green L, Lawrie AS, Patel S, et al. The impact of elective knee/hip replacement surgery and thromboprophylaxis with rivaroxaban or dalteparin on thrombin generation. *Br J Haematol* 2010;151:469-476.
24. Bostrom SL, Hansson GF, Kjaer M, et al. Effects of melagatran, the active form of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran, and dalteparin on the endogenous thrombin potential in venous blood from healthy male subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:457-462.
25. Samama MM, Kunitada S, Oursin A, et al. Comparison of a direct Factor Xa inhibitor, edoxaban, with dalteparin and ximelagatran: a randomised controlled trial in healthy elderly adults. *Thromb Res* 2010;126:e286-293.

26. Allegret V, Dunn M, Bedard C. Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs by measuring thrombin generation. *Vet Clin Pathol* 2011;40:24-31.
27. Oster JR, Singer I, Fishman LM. Heparin-induced aldosterone suppression and hyperkalemia. *Am J Med* 1995;98:575-586.
28. Di Cera E. Thrombin interactions. *Chest* 2003;124:11S-17S.
29. Hirsh J, Levine MN. Low molecular weight heparin. *Blood* 1992;79:1-17.
30. Mestre M, Clairefond P, Mardiguian J, et al. Comparative effects of heparin and PK 10169, a low molecular weight fraction, in a canine model of arterial thrombosis. *Thromb Res* 1985;38:389-399.
31. Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:188S-203S.
32. Lunsford KV, Mackin AJ, Langston VC, et al. Pharmacokinetics of subcutaneous low molecular weight heparin (enoxaparin) in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2009;45:261-267.
33. Hirsh J, Warkentin TE, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 1998;114:489S-510S.
34. Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. *N Engl J Med* 1997;337:688-698.
35. Al Dieri R, Wagenvoord R, van Dedem GW, et al. The inhibition of blood coagulation by heparins of different molecular weight is caused by a common functional motif--the C-domain. *J Thromb Haemost* 2003;1:907-914.
36. Beguin S, Welzel D, Al Dieri R, et al. Conjectures and refutations on the mode of action of heparins. The limited importance of anti-factor xa activity as a pharmaceutical mechanism and a yardstick for therapy. *Haemostasis* 1999;29:170-178.
37. Hemker HC, Beguin S. Low molecular weight heparin inhibits plasma thrombin generation via direct targeting of factor IXa: a Rebuttal. *J Thromb Haemost* 2013.
38. Levi M. All heparins are equal, but some are more equal than others. *J Thromb Haemost* 2003;1:884-885.
39. Hemker HC, Al Dieri R, Beguin S. Laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin therapy--part II. Monitoring LMWH therapy? For the moment a non-question. *J Thromb Haemost* 2005;3:571-573.

40. Hemker HC, Beguin S, Pieters J, et al. The ex vivo correlate of the antithrombotic action of heparin. *Ann N Y Acad Sci* 1989;556:146-157.
41. Hemker HC, Beguin S. The activity of heparin in the presence and absence of Ca²⁺ ions; why the anti-Xa activity of LMW heparins is about two times overestimated. *Thromb Haemost* 1993;70:717-718.
42. Sandset PM, Bendz B, Hansen JB. Physiological function of tissue factor pathway inhibitor and interaction with heparins. *Haemostasis* 2000;30 Suppl 2:48-56.
43. Buyue Y, Misenheimer TM, Sheehan JP. Low molecular weight heparin inhibits plasma thrombin generation via direct targeting of factor IXa: contribution of the serpin-independent mechanism. *J Thromb Haemost* 2012;10:2086-2098.
44. Jessen LR, Wiinberg B, Jensen AL, et al. In vitro heparinization of canine whole blood with low molecular weight heparin (dalteparin) significantly and dose-dependently prolongs heparinase-modified tissue factor-activated thromboelastography parameters and prothrombinase-induced clotting time. *Vet Clin Pathol* 2008;37:363-372.
45. Brainard BM, Koenig A, Babski DM, et al. Viscoelastic pharmacodynamics after dalteparin administration to healthy dogs. *Am J Vet Res* 2012;73:1577-1582.
46. Brainard BM, Koenig AK, Pittman JR, et al. Evaluation of high-dose tissue-factor activated TEG for assessment of unfractionated and low molecular weight heparin therapy in dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2011;21:S10 (abstr).
47. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, et al. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thrombosis journal* 2005;3:16.
48. Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost* 2004;2:1954-1959.
49. Spronk HM, Dielis AW, Panova-Noeva M, et al. Monitoring thrombin generation: is addition of corn trypsin inhibitor needed? *Thromb Haemost* 2009;101:1156-1162.
50. van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC, et al. Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombin-generation measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008;19:183-189.

Tables

Table II-I. Maximal anticoagulation levels achieved for ETP (relative to baseline value) and anti-FXa activity in 23 healthy research beagles administered dalteparin SC at three different doses.

Dose (U/kg)	Maximum ETP % Inhibition		Peak Anti-FXa Activity (U/mL)	
	Beta distribution	Range	Normal distribution	Range
	Mean [SD]		Mean [SD]	
0	17.5 [8.7]	4.92-33.8	ND	ND
50	54.1 [9.4]	36.38-63.94	0.32 [0.1]	0.28-0.53
100	73.6 [6.4]	61.75-81.51	0.81 [0.17]	0.52-1.03
150	81.3 [3.7]	74.06-85.56	1.14 [0.40]	0.97-1.51

Figures

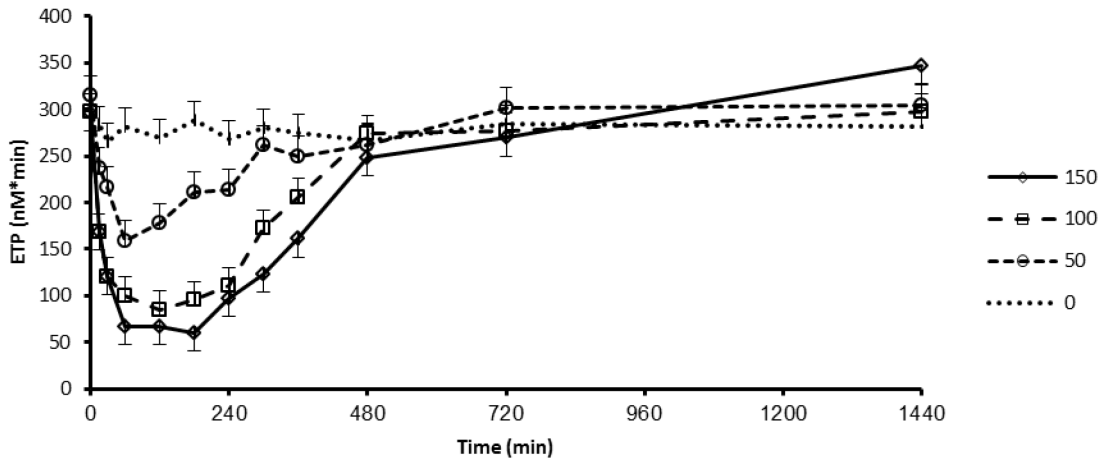


Figure 2.1. Time course of mean total thrombin generated (ETP) after a single SC dose of dalteparin showing a significant time, dose and time*dose interaction. No significant changes over time were observed in control dogs

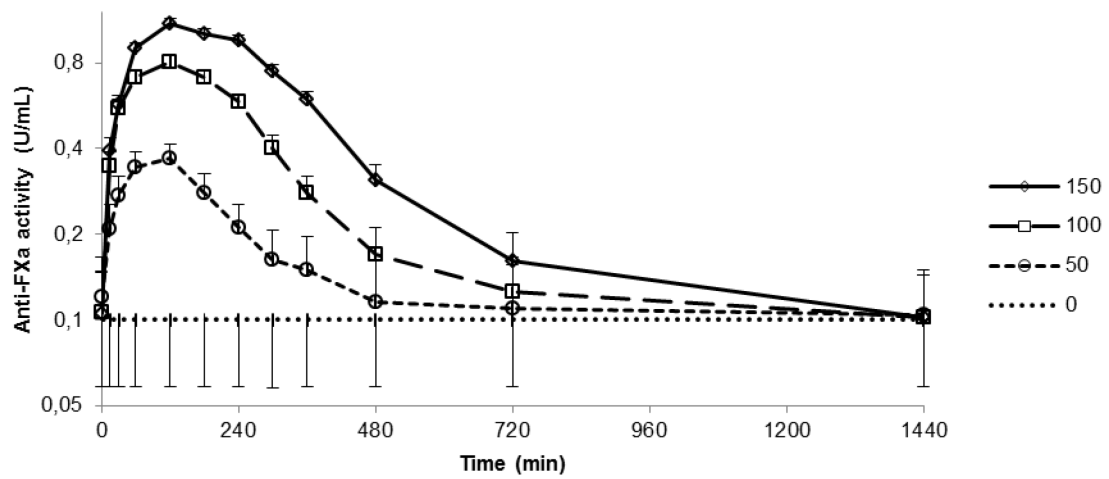


Figure 2.2. Time course of mean anti-FXa activity after a single SC dose of dalteparin, showing a significant time, dose and time*dose interaction. No significant changes over time were observed in control dogs

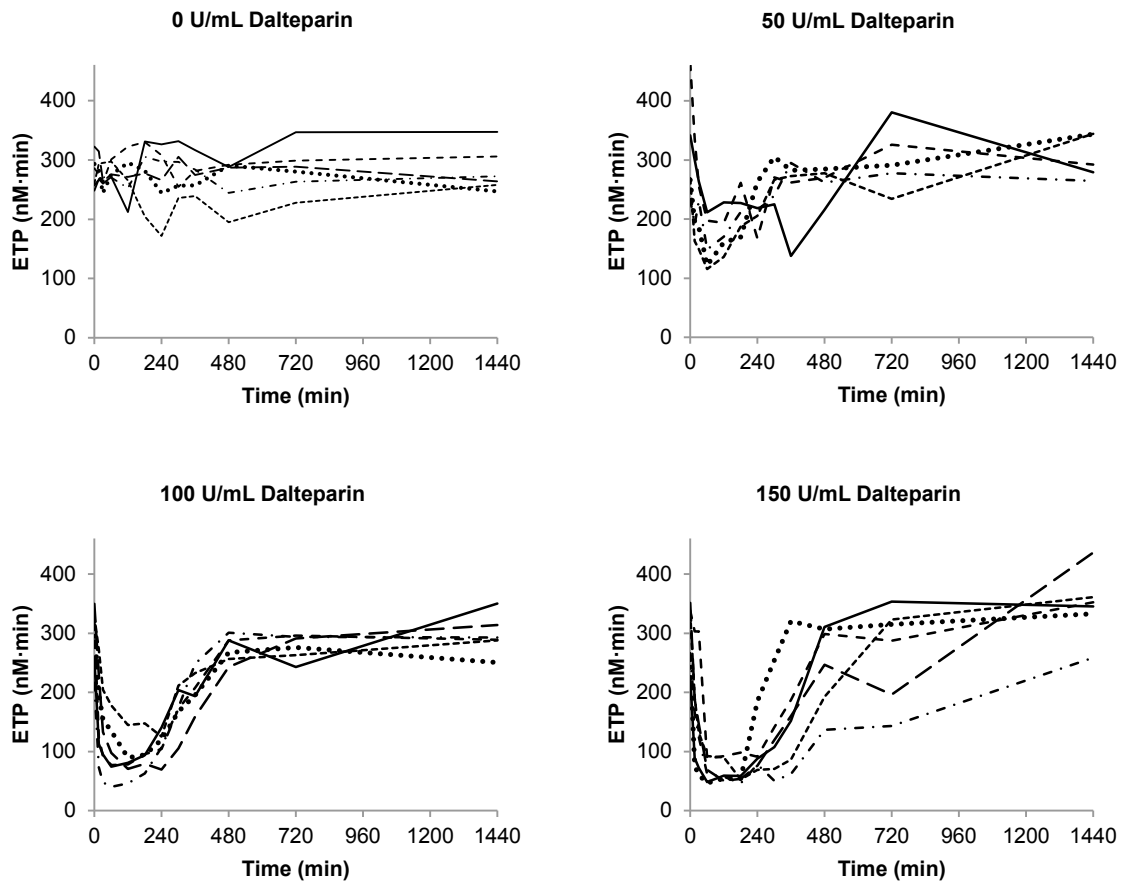


Figure 2.3. Endogenous thrombin potential (ETP) obtained in individual beagle dogs after a single SC dose of dalteparin at doses of 0 U/kg (top left), 50 U/kg (top right), 100 U/kg (bottom left) and 150 U/kg body weight (bottom right).

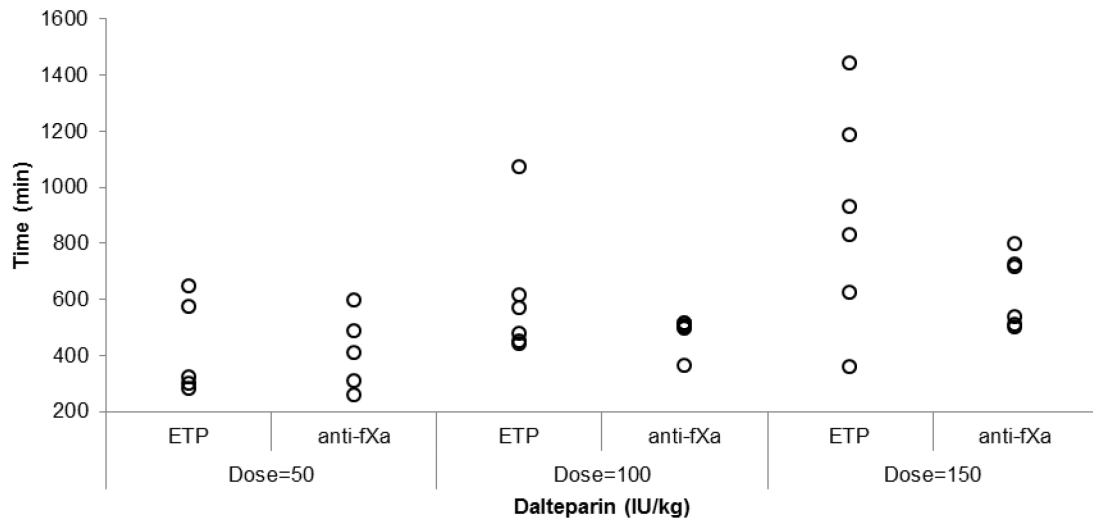


Figure 2.4. Individual return to baseline times calculated for ETP and anti-FXa for each dosing group.

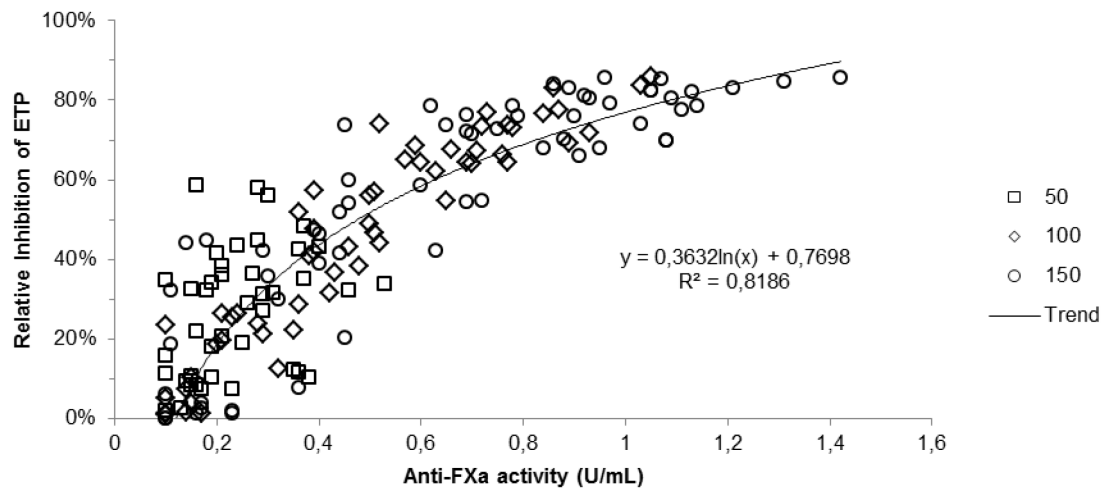


Figure 2.5. Inhibition of ETP relative to baseline value, as a function of anti-FXa activity in beagle dogs treated with SC dalteparin. All individually measured time points are plotted.

CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'intérêt pour une évaluation plus globale de la coagulation s'est accru avec le développement récent de nouveaux outils en médecine humaine. La GT, une technique initialement développée en 1956,¹⁷² puis modernisée en 1986¹⁷³ et améliorée en 2002,¹⁶² est un outil d'investigation de plus en plus utilisé dans la recherche sur la coagulation chez les humains, et ce, depuis 20 ans. Notre étude permet d'établir en médecine vétérinaire un point de départ pour la recherche et la surveillance des héparines de faible poids moléculaire grâce à la GT. Nous avons pu démontrer que la GT est sensible aux effets de la daltéparine d'une manière dose-dépendante. Nos observations ont mis en évidence une variabilité dans la réponse des sujets à l'administration de la daltéparine, qui change non seulement en fonction des individus, mais aussi en fonction de la dose. Ce dernier point soutient la nécessité d'une surveillance pharmacothérapeutique de la daltéparine, un argument discuté par plusieurs auteurs.^{12,123-125} De plus, la corrélation non linéaire entre l'ETP et l'activité anti-FXa est une observation cliniquement pertinente. En effet, les paramètres de la GT indiquent l'effet pharmacocinétique et pharmacodynamique de la daltéparine chez chaque individu, une lacune importante¹⁴³ des tests standards de coagulation.

Lors de l'établissement des valeurs normales, nous avons utilisé des pools plasmatiques de beagles et de chiens de clients, ce qui nous a permis d'observer la non-équivalence de ces deux groupes pour trois des quatre paramètres de la GT. Il est à noter qu'un seuil de 0.10 α - a été utilisé lors de cette analyse puisque c'est l'approche typique

pour 2 tests unilatéraux lors d'études de bioéquivalence.¹⁸⁶ L'établissement de valeurs normales est primordial à des fins de comparaison lors d'études de recherche, ainsi que pour l'application clinique éventuelle d'un test diagnostique. Il sera donc important d'avoir une banque de données représentant des chiens de nombreuses races et de différents âges afin d'obtenir une meilleure représentation des valeurs normales lors d'études futures. Des variations dans les résultats de l'ETP selon l'âge ainsi qu'en fonction des changements environnementaux, tels que le statut nutritionnel, ont été démontrées chez d'autres espèces.^{187,188} Elles pourraient avoir affecté nos valeurs de GT normales ainsi que celles obtenues lors de l'étude pharmacodynamique de manière indépendante de la daltéparine. De plus, des variations dans les concentrations plasmatiques de facteurs de coagulation en fonction des rythmes circadiens ainsi que circannuels ont été démontrées chez l'humain.¹⁸⁹ L'ETP étant une mesure globale des interactions de tous ces facteurs, les résultats qui en sont tirés pourraient changer en fonction de l'environnement de l'étude. De plus, ces changements pourraient être en partie responsables de la grande variabilité interindividuelle remarquée chez les individus normaux (Fig. 1.1). Cette variation interindividuelle est rapportée chez les humains peu importe l'anticoagulant utilisé (inhibiteur direct de la thrombine ou héparines).¹⁹⁰ À ce jour, aucune étude en médecine vétérinaire n'a été réalisée sur ce sujet, et ces points pourront soulever des hypothèses pertinentes à explorer.

L'effet du rôle du sodium sur la GT pourrait aussi s'avérer intéressante, car il s'agit d'un facteur pré-analytique souvent peu considéré en médecine vétérinaire, mais pouvant

contribuer à la variabilité individuelle des chiens. Le sodium active la thrombine, le FXa ainsi que les facteurs V, VIII et XI, ces derniers étant nécessaires pour l'auto-amplification de la thrombine.¹⁹¹ En effet, la thrombine est un enzyme allostérique qui, lorsque activé par le sodium, produit sa forme « rapide », celle requise pour le clivage du fibrinogène. D'ailleurs, cette forme rapide de thrombine active les récepteurs PAR, ce qui mène à l'activation des plaquettes *in vivo*.¹⁹² Dans notre étude, une biochimie sanguine a été effectuée chez tous les animaux avant de procéder aux tests de coagulation. Lors de la révision de leur niveau de sodium, tous les beagles à l'exception d'un (hyponatrémie légère) avaient des valeurs normales. Il est donc peu probable que cette variable ait joué un rôle dans la fluctuation des paramètres des chiens sains, dans la phase *in vitro* ou dans les débuts de l'étude pharmacodynamique. Néanmoins, un suivi de la natrémie lors de traitements à l'héparine serait justifié, car une hyponatrémie causée par une natriurèse, en réponse à un effet supresseur sur l'aldostérone, est documentée chez les humains, et ce, 1 à 3 jours suivant le début d'administration d'héparine.^{193,194} Toutefois, les effets suivant une simple dose de daltéparine, surtout à concentration élevée, ne sont pas documentés et devraient faire partie des critères d'évaluation d'études futures.

Les dilutions de la phase *in vitro* du deuxième objectif ont été sélectionnées de manière efficace puisqu'une inhibition complète n'a été remarquée qu'à une concentration de daltéparine $\geq 0,6$ U/mL. Ainsi, une diminution de l'ETP, de manière dose-dépendante, a pu être observée. Les dilutions ont été basées sur les niveaux thérapeutiques d'activité anti-FXa qui sont visés pour le traitement de la thrombose chez le chien.¹¹ Fait à noter, une

inhibition complète n'a jamais été atteinte lors de l'étude *ex vivo*, et ce, même aux concentrations les plus élevées d'activité d'anti-FXa ($\geq 1,0$ U/mL). De plus, en comparant les résultats *ex vivo* et *in vitro*, on constate que, pour une diminution similaire de l'ETP, la concentration nécessaire en daltéparine doit être plus élevée *ex vivo* que *in vitro* (0,32 U/mL versus 0,289 U/mL, respectivement).

Une explication possible pour cette différence est la demi-vie de l'activité anti-FIIa des héparines qui est considérablement plus courte que celle de l'activité anti-FXa.¹⁹⁵ Puisque l'effet anticoagulant principal de la daltéparine vient plus de son activité anti-FIIa que de l'effet anti-FXa^{12,196-198} et que l'inhibition de l'ETP est affectée en grande partie par l'activité anti-FIIa,^{199,200} des concentrations plus élevées de daltéparine sont nécessaires afin de maintenir l'activité de l'anticoagulant *ex vivo* que dans un environnement statique *in vitro*. La même observation a été notée lors de l'utilisation de la daltéparine dans des conditions *ex vivo* et *in vitro* chez des humains.¹⁸⁰

La diminution de l'ETP *in vitro* ainsi que chez les chiens ayant reçu de la daltéparine n'était pas étonnante puisque notre laboratoire a observé un effet similaire, quoique plus puissant, à la suite de l'administration de l'héparine.¹⁸⁵ La différence entre l'héparine et l'héparine de faible poids moléculaire sur l'ETP est secondaire à l'activité anti-FIIa, plus puissante de l'héparine standard²⁰¹ (ratio anti-FXA : anti-FIIa de 1 :1) que de la daltéparine (ratio anti-FXA : anti-FIIa de 2,2 :1). La mesure de l'activité anti-FIIa comme paramètre aurait été intéressante à ajouter à nos analyses afin d'établir la

corrélation entre la diminution de l'ETP et l'inhibition et la durée de son effet sur l'activité anti-FIIa, en association à l'activité anti-FXa.

L'utilisation d'un activateur de coagulation dans notre étude *in vitro* et *ex vivo*, tel que le facteur tissulaire (FT), s'est démontrée efficace pour la détection des effets de la daltéparine pour les doses de 50 à 150 U/kg. Une concentration finale de 5 pM de FT a été utilisée, et les tracés de tous les paramètres de GT à tous les temps ont été observés. La concentration de l'activateur est importante, car des variations de cette dernière peuvent changer la sensibilité du test CAT. Par exemple, à l'heure actuelle, la compagnie Thrombinoscope® vend le FT à une concentration élevée de 20 pM. Cette concentration est recommandée par la compagnie pour pallier des difficultés à générer des tracés de thrombine, par exemple lorsqu'il y a présence d'héparine standard dans le sang chez les humains. De même, une petite concentration de 1 pM existe, et elle est utile pour détecter de faibles déficiences en facteurs de coagulation, telles que l'hémophilie A et B (diminution de facteur VIII et IX, respectivement). L'utilisation d'un activateur à une concentration trop élevée pourrait masquer les changements dans les courbes de la GT. Notre utilisation d'un activateur est aussi supportée par une étude récente qui utilise la thromboélastographie.¹⁵⁶ En l'absence d'un activateur, une dose de daltéparine de 175 U/kg inhibait la majorité des tracés et des paramètres de la TEG, à partir de quoi les auteurs concluaient que la présence d'un activateur de coagulation serait nécessaire. L'utilisation du kaolin comme activateur est une autre option rapportée efficace pour évaluer l'effet *in vitro* de la daltéparine avec la thromboélastographie.¹⁵⁵ Son utilisation en

tant qu'activateur pour la GT chez les humains est documentée^{202,203} et reste à faire l'objet d'études en médecine vétérinaire.

L'utilisation de PPP dans cette étude était favorisée pour plusieurs raisons. Premièrement, la congélation du plasma est possible et n'affecte pas ses propriétés. Les tests ont pu être effectués en groupes après un court délai de congélation, facilitant les manipulations expérimentales. Deuxièmement, la préparation du PRP nécessite une centrifugation à une vitesse beaucoup plus basse que le PPP, ainsi qu'une standardisation et vérification du comptage plaquettaire. Une étude préliminaire a été effectuée avant l'étude principale, et nous avons observé que la préparation de PRP nécessiterait un prélèvement sanguin excessive afin d'atteindre une quantité nécessaire pour les tests de coagulation. Il est à noter que nous n'avons pas mesuré le comptage de plaquettes résiduelles dans le PPP. Toutefois, nous avons supplémenté chaque PPP avec une concentration de 4 μ M de phospholipides. Gerotziapas et al. (2005) ont démontré qu'en ajoutant $\geq 4\mu$ M de phospholipides synthétique en combinaison avec une concentration de FT physiologique, telle que nous avons utilisée dans cette étude, l'effet spécifique de phospholipides sur tous les paramètres de GT atteignent un seuil maximale et que la présence de plaquettes résiduelles n'avait donc pas d'impact. De plus, ils ont notés que les thrombogrammes avec l'ajout de phospholipides sont similaire à ceux observé avec le PRP. Dans cette même étude, les paramètres de GT n'ont pas été influencés par un comptage de plaquettes qui variaient entre $50 \times 10^9/l$ et $400 \times 10^9/l$.²⁰⁴ Donc, nous ne croyons pas que la variabilité entre les chiens sains soit expliquée par le comptage résiduel

plaquettaire, puisque tous les plasmas ont été supplémentés avec la même quantité de phospholipides synthétiques. Toutefois, une étude de GT utilisant du plasma sans plaquettes en comparaison à du PPP ainsi que du PRP serait nécessaire afin de le confirmer.

Des modèles dans notre étude *in vitro*, tels que le *sigmoid Hill model* et quelques modèles de régression non linéaire, ont été utilisés afin d'estimer la concentration de daltéparine nécessaire pour doubler ou inhiber de moitié les paramètres de coagulation et, de ce fait, catégoriser leur sensibilité pour la détection de l'effet anticoagulant de la daltéparine. La modélisation basée soit sur des données empiriques, telle que celle employée dans notre étude, ou vérifiée empiriquement par la suite, est prometteuse pour prédire des résultats rapidement et de manière peu coûteuse, contrairement à des études cliniques.²⁰⁵ Quelques méthodes de simulation de la coagulation sont couramment exploitées en médecine humaine,²⁰⁶⁻²⁰⁸ cependant, notre équipe est la première à profiter de la modélisation des effets d'anticoagulants en médecine vétérinaire. Néanmoins, la modélisation de la coagulation ainsi que de la GT compte plusieurs limites, surtout imputables à des mécanismes toujours inexplicables, des concentrations de réactifs variables et des constantes cinétiques inconnues.²⁰⁹ Toutefois, puisque la simulation se base sur les notions des recherches connues à ce jour, lorsque la simulation et la réalité des résultats empiriques ne concordent pas, nous pouvons faire la lumière sur des mécanismes sous-jacents qui n'ont possiblement pas encore été soupçonnés. De plus, la modélisation est un

outil qui permet la mise en place d'hypothèses et la vérification de variables par ordinateur afin, ultimement, de préciser de manière efficace les études empiriques.

Dans notre étude pharmacodynamique, l'observation d'un effet de saturation de la daltéparine chez les chiens en fonction de leur activité anti-FXa par rapport à l'ETP (Fig. 2.5) est une trouvaille pouvant avoir des conséquences cliniques. En effet, selon nos résultats, l'atteinte d'une valeur d'activité anti-FXa très élevée, à plus de 0,85 U/mL, ajoute très peu à l'inhibition de la coagulation par la daltéparine, car l'ETP est déjà très réduite. Des études futures évaluant l'effet de doses multiples de daltéparine chez les chiens sont justifiées afin de vérifier si cette observation persiste. Fait intéressant, le risque de saignements chez des humains recevant de la daltéparine pendant plusieurs jours était associé à des doses élevées, mais était indépendant des niveaux d'activité anti-FXa atteints.²¹⁰ En terme de GT, une inhibition de 80 % de l'ETP est utilisée comme limite haute sécuritaire afin d'éviter des saignements provoqués par l'administration d'héparine chez les humains.¹⁶⁹ En recherche humaine, des études commencent à établir des valeurs fiables basées sur la GT pour prédire les résultats cliniques de saignements et de thrombose,^{211,212} démontrant l'utilité clinique de cet outil. En médecine vétérinaire, des études cliniques en fonction de la GT sont pour l'instant inexistantes, et nous suggérons fortement son utilisation lors d'études futures.

Le potentiel de la GT comme outil de recherche dépasse de loin son intérêt pour la surveillance pharmacothérapeutique. L'utilisation d'anticorps spécifiques pour des facteurs

de coagulation, l'utilisation de sang dépourvu de facteurs (ex. hémophilie A) ainsi que l'ajout de facteurs de coagulation purifiés ou recombinés aux réactions crée dans ce système global non seulement la capacité d'explorer les différentes voies et interactions fondamentales de la coagulation, mais aussi les mécanismes d'action de nouveaux et d'anciens anticoagulants. Par exemple, nous devons la récente découverte d'une nouvelle fonction régulatrice du facteur Va à la mesure de la GT.²⁰¹ De plus, le rôle du facteur IXa dans l'effet anticoagulant de l'héparine associé à une indépendance de l'antithrombine a récemment été rapporté.²¹³ La mesure de la GT est également utilisée pour l'étude des mécanismes et des effets de nouveaux anticoagulants.²¹⁴ Étant donné le potentiel évident de cet outil, de nouvelles études utilisant la GT sont indispensables à la recherche en coagulation vétérinaire.

CONCLUSION

Notre étude rapporte les valeurs normales des paramètres du CAT chez des chiens en santé. De plus, nous avons démontré que la daltéparine exerce un effet *in vitro* sur les paramètres de GT de manière concentration-dépendante. La concentration de la daltéparine qui réduit de 50 % l'ETP (IC₅₀) est de 0,289 U/mL, et une inhibition complète *in vitro* de la GT se produit à des concentrations de daltéparine > 0,6 U/mL, lors de l'utilisation d'un activateur de FT à 5 pM. La GT et l'activité anti-FXa sont établies comme des tests diagnostiques plus sensibles que le test standard aPPT pour détecter les effets anticoagulants de la daltéparine.

Notre étude pharmacodynamique démontre que le CAT peut mesurer avec succès les effets de l'administration d'une dose de daltéparine SC à des concentrations différentes chez des chiens sains. Une variabilité interindividuelle importante a été notée chez les chiens, supportant la nécessité d'une surveillance thérapeutique. Selon nos résultats, la réponse la plus prévisible à la GT survient après l'administration SC d'une dose de 100 U/kg. De plus, l'inhibition de l'ETP augmente de manière non linéaire en fonction de l'activité anti-FXa.

L'utilisation du CAT est donc prometteuse pour la surveillance pharmacothérapeutique de la daltéparine chez le chien. De nouvelles études utilisant le CAT pour mesurer les effets de cet anticoagulant à doses multiples chez des chiens en

santé ainsi que lors d'études cliniques chez des chiens à risque de thrombose sont fortement suggérées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mannucci PM, Poller L. Venous thrombosis and anticoagulant therapy. *Br J Haematol* 2001;114:258-270.
2. Johnson LR, Lappin MR, Baker DC. Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. *J Vet Intern Med* 1999;13:338-345.
3. Carr AP, Panciera DL, Kidd L. Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. *J Vet Intern Med* 2002;16:504-509.
4. Respass M, O'Toole TE, Taeymans O, et al. Portal vein thrombosis in 33 dogs: 1998-2011. *J Vet Intern Med* 2012;26:230-237.
5. Rogers CL, O'Toole TE, Keating JH, et al. Portal vein thrombosis in cats: 6 cases (2001-2006). *J Vet Intern Med* 2008;22:282-287.
6. Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol* 2007;44:62-69.
7. de Laforcade A. Diseases associated with thrombosis. *Topics in companion animal medicine* 2012;27:59-64.
8. Barrowcliffe TW. History of heparin. *Handb Exp Pharmacol* 2012:3-22.
9. Lunsford KV, Mackin AJ. Thromboembolic therapies in dogs and cats: an evidence-based approach. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007;37:579-609.
10. Mischke R, Grebe S. The correlation between plasma anti-factor Xa activity and haemostatic tests in healthy dogs, following the administration of a low molecular weight heparin. *Res Vet Sci* 2000;69:241-247.
11. Mischke R, Grebe S, Jacobs C, et al. Amidolytic heparin activity and values for several hemostatic variables after repeated subcutaneous administration of high doses of a low molecular weight heparin in healthy dogs. *Am J Vet Res* 2001;62:595-598.
12. Hemker HC, Al Dieri R, Beguin S. Laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin therapy--part II. Monitoring LMWH therapy? For the moment a non-question. *J Thromb Haemost* 2005;3:571-573.
13. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:4-15.

14. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:17-25.
15. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010;xiv, 1450 p.
16. Ettinger SJ, Feldman EC. Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and the cat, 7th ed. St. Louis, Mo.: Elsevier Saunders; 2010.
17. Abad Rico JI, Llau Pitarch JV, Rocha E. Overview of venous thromboembolism. *Drugs* 2010;70 Suppl 2:3-10.
18. Heit JA. The epidemiology of venous thromboembolism in the community: implications for prevention and management. *J Thromb Thrombolysis* 2006;21:23-29.
19. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, et al. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med* 2000;160:809-815.
20. Wong P, Baglin T. Epidemiology, risk factors and sequelae of venous thromboembolism. *Phlebology* 2012;27 Suppl 2:2-11.
21. Gomez-Outes A, Lecumberri R, Lafuente-Guijosa A, et al. Correlation between thrombus regression and recurrent venous thromboembolism. Examining venographic and clinical effects of low-molecular-weight heparins: a meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2004;2:1581-1587.
22. Andrioli G, Mastacchi R, Barbanti M, et al. Comparison of the antithrombotic and haemorrhagic effects of heparin and a new low molecular weight heparin in rats. *Haemostasis* 1985;15:324-330.
23. Stassen JM, Rapold HJ, Vanlinthout I, et al. Comparative effects of enoxaparin and heparin on arterial and venous clot lysis with alteplase in dogs. *Thromb Haemost* 1993;69:454-459.
24. Klein MK, Dow SW, Rosychuk RA. Pulmonary thromboembolism associated with immune-mediated hemolytic anemia in dogs: ten cases (1982-1987). *J Am Vet Med Assoc* 1989;195:246-250.
25. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* 2003;107:I4-8.
26. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, et al. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 2007;98:756-764.

27. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 2008;451:914-918.
28. Nelson OL, Andreasen C. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *J Vet Intern Med* 2003;17:830-834.
29. Fenty RK, Delaforcade AM, Shaw SE, et al. Identification of hypercoagulability in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia by means of thromboelastography. *J Am Vet Med Assoc* 2011;238:463-467.
30. O'Marra SK, Shaw SP, Delaforcade AM. Investigating hypercoagulability during treatment for immune-mediated thrombocytopenia: a pilot study. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2011.
31. Rose LJ, Dunn ME, Allegret V, et al. Effect of prednisone administration on coagulation variables in healthy Beagle dogs. *Vet Clin Pathol* 2011;40:426-434.
32. McManus PM, Craig LE. Correlation between leukocytosis and necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases (1994-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2001;218:1308-1313.
33. Cook AK, Cowgill LD. Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: a review of 137 cases (1985-1992). *J Am Anim Hosp Assoc* 1996;32:313-322.
34. Moser KM, Guisan M, Bartimmo EE, et al. In vivo and post mortem dissolution rates of pulmonary emboli and venous thrombi in the dog. *Circulation* 1973;48:170-178.
35. Lang IM, Marsh JJ, Konopka RG, et al. Factors contributing to increased vascular fibrinolytic activity in mongrel dogs. *Circulation* 1993;87:1990-2000.
36. Laurenson MP, Hopper K, Herrera MA, et al. Concurrent diseases and conditions in dogs with splenic vein thrombosis. *J Vet Intern Med* 2010;24:1298-1304.
37. Davidson BL, Rozanski EA, Tidwell AS, et al. Pulmonary thromboembolism in a heartworm-positive cat. *J Vet Intern Med* 2006;20:1037-1041.
38. Banse H, Holbrook TC, Gilliam L, et al. Right ventricular and saphenous vein thrombi associated with sepsis in a Quarter Horse foal. *J Vet Intern Med* 2012;26:178-182.
39. Traub-Dargatz JL, Dargatz DA. A retrospective study of vein thrombosis in horses treated with intravenous fluids in a veterinary teaching hospital. *J Vet Intern Med* 1994;8:264-266.

40. Buczinski S, Francoz D, Mulon PY. Ultrasonographic diagnosis of aortoiliac thrombosis in 2 calves. *J Vet Intern Med* 2007;21:348-351.
41. Good LI, Manning AM. Thromboembolic Disease: Physiology of Hemostasis and Pathophysiology of Thrombosis. *Compendium* 2003;25:650-659.
42. Lopez JA, Kearon C, Lee AY. Deep venous thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004:439-456.
43. Malone PC, Agutter PS. Is 'Virchow's triad' useful? *Br J Haematol* 2009;145:839; author reply 840-831.
44. Van Winkle TJ, Liu SM, Hackner SG. Clinical and Pathological Features of Aortic Thromboembolism in 36 Dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 1993;3:13-21.
45. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008;359:938-949.
46. Weiss DJ, Wardrop KJ, Schalm OW. *Schalm's veterinary hematology*, 6th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2010;xxiii, 1206 p.
47. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009;19:3-10.
48. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 2003;16:17-20.
49. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:958-965.
50. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev* 2003;17 Suppl 1:S1-5.
51. Gerotziafas GT. Le test de génération de thrombine: un test utile pour la recherche et nécessaire pour une exploration moderne de l'hémostase. *Biotribune* 2007;24:37-43.
52. Freedman DS, Wattigney WA, Srinivasan S, et al. The relation of atherosclerotic lesions to antemortem and postmortem lipid levels: the Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis* 1993;104:37-46.
53. Chen J, Lopez JA. Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation* 2005;12:235-246.

54. Sevitt S. The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins. *J Clin Pathol* 1974;27:517-528.
55. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2311-2315.
56. Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2594-2604.
57. Osterud B. Tissue factor expression in blood cells. *Thromb Res* 2010;125 Suppl 1:S31-34.
58. Gross PL, Vaezzadeh N. Tissue factor microparticles and haemophilia. *Thromb Res* 2010;125 Suppl 1:S67-69.
59. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1687-1693.
60. Ye R, Ye C, Huang Y, et al. Circulating tissue factor positive microparticles in patients with acute recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Res* 2011.
61. Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003;197:1585-1598.
62. Tracy PB. Regulation of thrombin generation at cell surfaces. *Semin Thromb Hemost* 1988;14:227-233.
63. Springer N, Smith E, Brooks M, et al. Procoagulant activity in horses: measurement of platelet-derived microparticles and endogenous thrombin potential. *Veterinary Clinical Pathology* 2011;40:600.
64. Helmond SE, Catalfamo JL, Brooks MB. Flow cytometric detection and procoagulant activity of circulating canine platelet-derived microparticles. *Am J Vet Res* 2013;74:207-215.
65. Belizaire RM, Prakash PS, Richter JR, et al. Microparticles from stored red blood cells activate neutrophils and cause lung injury after hemorrhage and resuscitation. *J Am Coll Surg* 2012;214:648-655; discussion 656-647.
66. Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, et al. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010;182:261-268.

67. Camus SM, Gausseres B, Bonnin P, et al. Erythrocyte microparticles can induce kidney vaso-occlusions in a murine model of sickle cell disease. *Blood* 2012;120:5050-5058.
68. Siller-Matula JM, Plasenzotti R, Spiel A, et al. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost* 2008;100:397-404.
69. Miller AG, Dow S, Long L, et al. Antiphospholipid antibodies in dogs with immune mediated hemolytic anemia, spontaneous thrombosis, and hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* 2012;26:614-623.
70. Herring JM, McMichael MA, Smith SA. Microparticles in Health and Disease. *J Vet Intern Med* 2013.
71. van der Heyde HC, Gramaglia I, Combes V, et al. Flow cytometric analysis of microparticles. *Methods in molecular biology* 2011;699:337-354.
72. Goggs R, Benigni L, Fuentes VL, et al. Pulmonary thromboembolism. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009;19:30-52.
73. Fluckiger MG, JA. Radiographic findings in dogs with spontaneous pulmonary thrombosis or embolism. *Vet Radiol* 1984;25:124-131.
74. Ichiki M, Sakai Y, Nango M, et al. Experimental venous thrombi: MRI characteristics with histopathological correlation. *Br J Radiol* 2012;85:331-338.
75. Kuzi S, Segev G, Haruvi E, et al. Plasma antithrombin activity as a diagnostic and prognostic indicator in dogs: a retrospective study of 149 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010;24:587-596.
76. Wiinberg B, Jensen AL, Rojkjaer R, et al. Validation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography on citrated whole blood from clinically healthy dogs. *Vet Clin Pathol* 2005;34:389-393.
77. Boisclair MD, Ireland H, Lane DA. Assessment of hypercoagulable states by measurement of activation fragments and peptides. *Blood Rev* 1990;4:25-40.
78. Hirsh J, Warkentin TE, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 1998;114:489S-510S.
79. Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. *N Engl J Med* 1997;337:688-698.
80. Johnson EA, Kirkwood TB, Stirling Y, et al. Four heparin preparations: anti-Xa potentiating effect of heparin after subcutaneous injection. *Thromb Haemost* 1976;35:586-591.

81. Dunn CJ, Jarvis B. Dalteparin: an update of its pharmacological properties and clinical efficacy in the prophylaxis and treatment of thromboembolic disease. *Drugs* 2000;60:203-237.
82. Depaula KM, Delaforcade AM, King RG, et al. Arterial thrombosis after vehicular trauma and humeral fracture in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 2013;243:394-398.
83. Smith SA. Antithrombotic therapy. *Topics in companion animal medicine* 2012;27:88-94.
84. Samama MM, Kunitada S, Oursin A, et al. Comparison of a direct Factor Xa inhibitor, edoxaban, with dalteparin and ximelagatran: a randomised controlled trial in healthy elderly adults. *Thromb Res* 2010;126:e286-293.
85. Beiderlinden M, Treschan TA, Gorlinger K, et al. Argatroban anticoagulation in critically ill patients. *The Annals of pharmacotherapy* 2007;41:749-754.
86. Mannucci PM, Franchini M. Old and new anticoagulant drugs: a minireview. *Annals of Medicine* 2011;43:116-123.
87. Helmond S. Thromboprophylaxis in Immune-Mediated Anemia. In: *ACVIM Forum, New Orleans, Louisiana* 2012.
88. Hirsh J, Levine MN. Low molecular weight heparin. *Blood* 1992;79:1-17.
89. Aguilar D, Goldhaber SZ. Clinical uses of low-molecular-weight heparins. *Chest* 1999;115:1418-1423.
90. Horlocker TT, Heit JA. Low molecular weight heparin: biochemistry, pharmacology, perioperative prophylaxis regimens, and guidelines for regional anesthetic management. *Anesth Analg* 1997;85:874-885.
91. Anonyme. FRAGMIN (dalteparin sodium) Product Monograph. In: Kirkland, QC, Canada: Pfizer Canada Inc; 2011.
92. Maroney SA, Mast AE. Expression of tissue factor pathway inhibitor by endothelial cells and platelets. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 2008;38:9-14.
93. Mast AE, Broze GJ, Jr. Physiological concentrations of tissue factor pathway inhibitor do not inhibit prothrombinase. *Blood* 1996;87:1845-1850.
94. Kubier A, O'Brien M. Endogenous anticoagulants. *Topics in companion animal medicine* 2012;27:81-87.

95. Tobu M, Ma Q, Iqbal O, et al. Comparative tissue factor pathway inhibitor release potential of heparins. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005;11:37-47.
96. Broze GJ, Jr. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6 Suppl 1:S7-13.
97. Eitzman DT, Chi L, Saggin L, et al. Heparin neutralization by platelet-rich thrombi. Role of platelet factor 4. *Circulation* 1994;89:1523-1529.
98. Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, et al. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med* 1995;332:1330-1335.
99. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: a ten-year retrospective. *Annual review of medicine* 1999;50:129-147.
100. Greinacher A, Eichler P, Lietz T, et al. Replacement of unfractionated heparin by low-molecular-weight heparin for postorthopedic surgery antithrombotic prophylaxis lowers the overall risk of symptomatic thrombosis because of a lower frequency of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2005;106:2921-2922.
101. Sakr Y. Heparin-induced thrombocytopenia in the ICU: an overview. *Critical care* 2011;15:211.
102. Junqueira DR, Carvalho M, Perini E. Heparin-induced thrombocytopenia: a review of concepts regarding a dangerous adverse drug reaction. *Revista da Associacao Medica Brasileira* 2013;59:161-166.
103. Duncan SG, Meyers KM, Reed SM. Reduction of the red blood cell mass of horses: toxic effect of heparin anticoagulant therapy. *Am J Vet Res* 1983;44:2271-2276.
104. Moore BR, Hinchcliff KW. Heparin: a review of its pharmacology and therapeutic use in horses. *J Vet Intern Med* 1994;8:26-35.
105. Moore JN, Mahaffey EA, Zboran M. Heparin-induced agglutination of erythrocytes in horses. *Am J Vet Res* 1987;48:68-71.
106. Bara L, Billaud E, Gramond G, et al. Comparative pharmacokinetics of a low molecular weight heparin (PK 10 169) and unfractionated heparin after intravenous and subcutaneous administration. *Thromb Res* 1985;39:631-636.
107. Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. *The New England Journal of Medicine* 1997;337:688-698.

108. Massicotte P, Adams M, Marzinotto V, et al. Low-molecular-weight heparin in pediatric patients with thrombotic disease: a dose finding study. *J Pediatr* 1996;128:313-318.
109. Brindley CJ, Taylor T, Diness V, et al. Relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics of tinzaparin (logiparin), a low molecular weight heparin, in dogs. *Xenobiotica* 1993;23:575-588.
110. Jun L, Arnout J, Vanhove P, et al. Comparison of a low-molecular-weight heparin (nadroparin calcium) and unfractionated heparin as adjunct to coronary thrombolysis with alteplase and aspirin in dogs. *Coron Artery Dis* 1995;6:257-263.
111. Grebe S, Jacobs C, Kietzmann M, et al. [Pharmacokinetics of low-molecular-weight heparins Fragmin D in dogs]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2000;113:103-107.
112. Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:188S-203S.
113. Lunsford KV, Mackin AJ, Langston VC, et al. Pharmacokinetics of subcutaneous low molecular weight heparin (enoxaparin) in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2009;45:261-267.
114. Jacobs C, Grebe S, Kietzmann M, et al. [Pharmacokinetics of an unfractionated heparin (Liquemin) in the dog after intravenous and subcutaneous application based on heparin activity]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1999;106:478-481.
115. Leadley RJ, Jr., Kasiewski CJ, Bostwick JS, et al. Comparison of enoxaparin, hirulog, and heparin as adjunctive antithrombotic therapy during thrombolysis with rtPA in the stenosed canine coronary artery. *Thromb Haemost* 1997;78:1278-1285.
116. Libersan D, Khalil A, Dagenais P, et al. The low molecular weight heparin, enoxaparin, limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc Res* 1998;37:656-666.
117. Plumb DC. *Plumb's veterinary drug handbook*, 7th ed. Stockholm, WI, USA: PharmaVet; 2011;1187.
118. Brooks MB. Evaluation of a chromogenic assay to measure the factor Xa inhibitory activity of unfractionated heparin in canine plasma. *Vet Clin Pathol* 2004;33:208-214.
119. Anonyme. Brochure Hemostase. In. Asnieres, France: Diagnostica Stago; 2008.

120. Dunn M, Charland V, Thorneloe C. The use of a low molecular weight heparin in 6 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2004;18:389.
121. Mestre M, Clairefond P, Mardiguan J, et al. Comparative effects of heparin and PK 10169, a low molecular weight fraction, in a canine model of arterial thrombosis. *Thromb Res* 1985;38:389-399.
122. Mischke R, Fehr M, Nolte I. Efficacy of low molecular weight heparin in a canine model of thromboplastin-induced acute disseminated intravascular coagulation. *Res Vet Sci* 2005;79:69-76.
123. Harenberg J. Is laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin therapy necessary? Yes. *J Thromb Haemost* 2004;2:547-550.
124. Bounameaux H, de Moerloose P. Is laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin therapy necessary? No. *J Thromb Haemost* 2004;2:551-554.
125. Boneu B. Laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin therapy-part II. *J Thromb Haemost* 2005;3:573-574.
126. Barrowcliffe TW. Laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin therapy-part II. *J Thromb Haemost* 2005;3:575-576.
127. Monreal M. Laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin therapy-part II. *J Thromb Haemost* 2005;3:574-575.
128. Lensing AW, Prins MH, Davidson BL, et al. Treatment of deep venous thrombosis with low-molecular-weight heparins. A meta-analysis. *Arch Intern Med* 1995;155:601-607.
129. Laposata M, Green D, Van Cott EM, et al. College of American Pathologists Conference XXXI on laboratory monitoring of anticoagulant therapy: the clinical use and laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin, danaparoid, hirudin and related compounds, and argatroban. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:799-807.
130. Mismetti P, Laporte-Simitsidis S, Navarro C, et al. Aging and venous thromboembolism influence the pharmacodynamics of the anti-factor Xa and anti-thrombin activities of a low molecular weight heparin (nadroparin). *Thromb Haemost* 1998;79:1162-1165.
131. Becker RC, Spencer FA, Gibson M, et al. Influence of patient characteristics and renal function on factor Xa inhibition pharmacokinetics and pharmacodynamics after enoxaparin administration in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2002;143:753-759.

132. Gatt A, van Veen JJ, Woolley AM, et al. Thrombin generation assays are superior to traditional tests in assessing anticoagulation reversal in vitro. *Thromb Haemost* 2008;100:350-355.
133. Brophy DF, Martin EJ, Gehr TW, et al. Thrombin generation time is a novel parameter for monitoring enoxaparin therapy in patients with end-stage renal disease. *J Thromb Haemost* 2006;4:372-376.
134. Monreal M, Suarez C, Fajardo JA, et al. Management of patients with acute venous thromboembolism: findings from the RIETE registry. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:330-334.
135. al Dieri R, Alban S, Beguin S, et al. Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. *J Thromb Haemost* 2004;2:1395-1401.
136. Mischke R, Grebe S, Jacobs C, et al. Amidolytic heparin activity and values for several hemostatic variables after repeated subcutaneous administration of high doses of a low molecular weight heparin in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research* 2001;62:595-598.
137. Scott KC, Hansen BD, DeFrancesco TC. Coagulation effects of low molecular weight heparin compared with heparin in dogs considered to be at risk for clinically significant venous thrombosis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009;19:74-80.
138. Dolovich LR, Ginsberg JS, Douketis JD, et al. A meta-analysis comparing low-molecular-weight heparins with unfractionated heparin in the treatment of venous thromboembolism: examining some unanswered questions regarding location of treatment, product type, and dosing frequency. *Arch Intern Med* 2000;160:181-188.
139. Kitchen S, Iampietro R, Woolley AM, et al. Anti Xa monitoring during treatment with low molecular weight heparin or danaparoid: inter-assay variability. *Thromb Haemost* 1999;82:1289-1293.
140. Beguin S, Hemker HC. Mode of action of enoxaparin in plasma. *Acta Chir Scand Suppl* 1990;556:51-56.
141. Kovacs MJ, Keeney M, MacKinnon K, et al. Three different chromogenic methods do not give equivalent anti-Xa levels for patients on therapeutic low molecular weight heparin (dalteparin) or unfractionated heparin. *Clin Lab Haematol* 1999;21:55-60.
142. Leizorovicz A, Bara L, Samama MM, et al. Factor Xa inhibition: correlation between the plasma levels of anti-Xa activity and occurrence of thrombosis and haemorrhage. *Haemostasis* 1993;23 Suppl 1:89-98.

143. Greaves M. Limitations of the laboratory monitoring of heparin therapy. Scientific and Standardization Committee Communications: on behalf of the Control of Anticoagulation Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 2002;87:163-164.
144. Hemker HC, Beguin S. The activity of heparin in the presence and absence of Ca²⁺ ions; why the anti-Xa activity of LMW heparins is about two times overestimated. *Thromb Haemost* 1993;70:717-718.
145. Sandset PM, Bendz B, Hansen JB. Physiological function of tissue factor pathway inhibitor and interaction with heparins. *Haemostasis* 2000;30 Suppl 2:48-56.
146. Hemker HC, Beguin S. Phenotyping the clotting system. *Thromb Haemost* 2000;84:747-751.
147. Whitten CW, Greulich PE. Thromboelastography: past, present, and future. *Anesthesiology* 2000;92:1223-1225.
148. Kol A, Borjesson DL. Application of thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. *Vet Clin Pathol* 2010;39:405-416.
149. Salooja N, Perry DJ. Thrombelastography. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001;12:327-337.
150. Kang YG, Martin DJ, Marquez J, et al. Intraoperative changes in blood coagulation and thrombelastographic monitoring in liver transplantation. *Anesth Analg* 1985;64:888-896.
151. Spiess BD, Gillies BS, Chandler W, et al. Changes in transfusion therapy and reexploration rate after institution of a blood management program in cardiac surgical patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1995;9:168-173.
152. Alwood AJ, Downend AB, Brooks MB, et al. Anticoagulant effects of low-molecular-weight heparins in healthy cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007;21:378-387.
153. Leclere M, Lavoie JP, Dunn M, et al. Evaluation of a modified thrombelastography assay initiated with recombinant human tissue factor in clinically healthy horses. *Vet Clin Pathol* 2009;38:462-466.
154. Pittman JR, Koenig A, Brainard BM. The effect of unfractionated heparin on thrombelastographic analysis in healthy dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2010;20:216-223.

155. Jessen LR, Wiinberg B, Jensen AL, et al. In vitro heparinization of canine whole blood with low molecular weight heparin (dalteparin) significantly and dose-dependently prolongs heparinase-modified tissue factor-activated thromboelastography parameters and prothrombinase-induced clotting time. *Vet Clin Pathol* 2008;37:363-372.
156. Brainard BM, Koenig A, Babski DM, et al. Viscoelastic pharmacodynamics after dalteparin administration to healthy dogs. *Am J Vet Res* 2012;73:1577-1582.
157. Smith SA, McMichael M, Galligan A, et al. Clot formation in canine whole blood as measured by rotational thromboelastometry is influenced by sample handling and coagulation activator. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010;21:692-702.
158. Bauer NB, Eralp O, Moritz A. Effect of hemolysis on canine kaolin-activated thromboelastography values and ADVIA 2120 platelet activation indices. *Vet Clin Pathol* 2010;39:180-189.
159. Wagg CR, Boysen SR, Bedard C. Thrombelastography in dogs admitted to an intensive care unit. *Vet Clin Pathol* 2009;38:453-461.
160. Donahue SM, Brooks M, Otto CM. Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein-losing nephropathy. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2011;21:346-355.
161. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, et al. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 2000;83:589-591.
162. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:249-253.
163. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost* 2003;1:1504-1514.
164. Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest* 2003;124:18S-25S.
165. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, et al. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006;96:553-561.
166. Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2008;6:219-226.
167. Hemker HC, Al Dieri R, Beguin S. Thrombin generation assays: accruing clinical relevance. *Curr Opin Hematol* 2004;11:170-175.

168. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, et al. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res* 2004;114:539-545.
169. Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: what have we learned? *Blood Rev* 2012;26:197-203.
170. Brummel-Ziedins KE, Pouliot RL, Mann KG. Thrombin generation: phenotypic quantitation. *J Thromb Haemost* 2004;2:281-288.
171. Pitney WR, Dacie JV. A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma; application in the investigation of haemophilia. *J Clin Pathol* 1953;6:9-14.
172. Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol* 1953;6:3-8.
173. Hemker HC, Willems GM, Beguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost* 1986;56:9-17.
174. Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost* 2004;2:1954-1959.
175. Dargaud Y, Beguin S, Lienhart A, et al. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost* 2005;93:475-480.
176. Andresen MS, Abildgaard U, Liestol S, et al. The ability of three global plasma assays to recognize thrombophilia. *Thromb Res* 2004;113:411-417.
177. Hron G, Kollars M, Binder BR, et al. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA* 2006;296:397-402.
178. Dargaud Y, Luddington R, Baglin T. Platelet-dependent thrombography: a method for diagnostic laboratories. *Br J Haematol* 2006;134:323-325.
179. Giansily-Blaziot M, Al Dieri R, Schved JF. Thrombin generation measurement in factor VII-depleted plasmas compared to inherited factor VII-deficient plasmas. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:36-42.
180. Bostrom SL, Hansson GF, Kjaer M, et al. Effects of melagatran, the active form of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran, and dalteparin on the endogenous

thrombin potential in venous blood from healthy male subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:457-462.

181. Al Dieri R, Alban S, Beguin S, et al. Fixed dosage of low-molecular-weight heparins causes large individual variation in coagulability, only partly correlated to body weight. *J Thromb Haemost* 2006;4:83-89.

182. Tchaikovski SN, BJ VANV, Rosing J, et al. Development of a calibrated automated thrombography based thrombin generation test in mouse plasma. *J Thromb Haemost* 2007;5:2079-2086.

183. Rose L, Dunn ME, Bedard C. Effect of canine hyperadrenocorticism on coagulation parameters. *J Vet Intern Med* 2013;27:207-211.

184. Mischke RW, C. Tiede, A. Measurement of thrombin generation in dogs with different diseases. In: *ACVIM Forum, New Orleans 2012*.

185. Allegret V, Dunn M, Bedard C. Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs by measuring thrombin generation. *Vet Clin Pathol* 2011;40:24-31.

186. Toutain PL, Koritz GD. Veterinary drug bioequivalence determination. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 1997;20:79-90.

187. Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, et al. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost* 2006;95:772-775.

188. Sanchez C, Poggi M, Morange PE, et al. Diet modulates endogenous thrombin generation, a biological estimate of thrombosis risk, independently of the metabolic status. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2394-2404.

189. Banfi G, Del Fabbro M. Biological variation in tests of hemostasis. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:119-126.

190. Bloemen S, Hemker HC, Al Dieri R. Large inter-individual variation of the pharmacodynamic effect of anticoagulant drugs on thrombin generation. *Haematologica* 2013;98:549-554.

191. Page MJ, Di Cera E. Is Na⁺ a coagulation factor? *Thromb Haemost* 2006;95:920-921.

192. Di Cera E, Page MJ, Bah A, et al. Thrombin allostery. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 2007;9:1291-1306.

193. Norman NE, Sneed AM, Brown C, et al. Heparin-induced hyponatremia. *The Annals of pharmacotherapy* 2004;38:404-407.

194. Oster JR, Singer I, Fishman LM. Heparin-induced aldosterone suppression and hyperkalemia. *Am J Med* 1995;98:575-586.
195. Samama MM, Bara L, Gerotziafas GT. Mechanisms for the antithrombotic activity in man of low molecular weight heparins (LMWHs). *Haemostasis* 1994;24:105-117.
196. Beguin S, Welzel D, Al Dieri R, et al. Conjectures and refutations on the mode of action of heparins. The limited importance of anti-factor xa activity as a pharmaceutical mechanism and a yardstick for therapy. *Haemostasis* 1999;29:170-178.
197. Levi M. All heparins are equal, but some are more equal than others. *J Thromb Haemost* 2003;1:884-885.
198. Hemker HC, Beguin S. Low molecular weight heparin inhibits plasma thrombin generation via direct targeting of factor IXa: a Rebuttal. *J Thromb Haemost* 2013.
199. Gerotziafas GT, Petropoulou AD, Verdy E, et al. Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2007;5:955-962.
200. Al Dieri R, Wagenvoord R, van Dedem GW, et al. The inhibition of blood coagulation by heparins of different molecular weight is caused by a common functional motif--the C-domain. *J Thromb Haemost* 2003;1:907-914.
201. Hacquard M, Perrin J, Lelievre N, et al. Inter-individual variability of effect of 7 low molecular weight antithrombin-dependent anticoagulants studied in vitro with calibrated automated thrombography. *Thromb Res* 2011;127:29-34.
202. Al Dieri R, Bloemen S, Kelchtermans H, et al. A new regulatory function of activated factor V: inhibition of the activation by tissue factor/factor VII(a) of factor X. *J Thromb Haemost* 2013;11:503-511.
203. Tarandovskiy ID, Balandina AN, Kopylov KG, et al. Investigation of the phenotype heterogeneity in severe hemophilia A using thromboelastography, thrombin generation, and thrombodynamics. *Thromb Res* 2013;131:e274-280.
204. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, et al. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thrombosis journal* 2005;3:16.
205. Mann KG. Is there value in kinetic modeling of thrombin generation? Yes. *J Thromb Haemost* 2012;10:1463-1469.

206. Hockin MF, Jones KC, Everse SJ, et al. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 2002;277:18322-18333.
207. Bungay SD, Gentry PA, Gentry RD. A mathematical model of lipid-mediated thrombin generation. *Mathematical medicine and biology : a journal of the IMA* 2003;20:105-129.
208. Panteleev MA, Ananyeva NM, Ataulakhanov FI, et al. Mathematical models of blood coagulation and platelet adhesion: clinical applications. *Current pharmaceutical design* 2007;13:1457-1467.
209. Hemker HC, Kerdelo S, Kremers RM. Is there value in kinetic modeling of thrombin generation? No (unless...). *J Thromb Haemost* 2012;10:1470-1477.
210. Nieuwenhuis HK, Albada J, Banga JD, et al. Identification of risk factors for bleeding during treatment of acute venous thromboembolism with heparin or low molecular weight heparin. *Blood* 1991;78:2337-2343.
211. Bosch Y, Al Dieri R, Ten Cate H, et al. Preoperative thrombin generation is predictive for the risk of blood loss after cardiac surgery: a research article. *Journal of cardiothoracic surgery* 2013;8:154.
212. Emani S, Zurakowski D, Baird CW, et al. Hypercoagulability Markers Predict Thrombosis in Single Ventricle Neonates Undergoing Cardiac Surgery. *The Annals of thoracic surgery* 2013.
213. Buyue Y, Misenheimer TM, Sheehan JP. Low molecular weight heparin inhibits plasma thrombin generation via direct targeting of factor IXa: contribution of the serpin-independent mechanism. *J Thromb Haemost* 2012;10:2086-2098.
214. Wong PC, White A, Luetzgen J. Inhibitory effect of apixaban compared with rivaroxaban and dabigatran on thrombin generation assay. *Hospital practice* 2013;41:19-25.