



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Небојша Вацић

**Функционално испитивање концентрата тромбоцита припремљених из  
„buffy-coat“-а**

**Докторска дисертација**

МЕНТОР: др.сци.мед. Небојша Анђелковић, ванредни професор

**Крагујевац, 2019. година**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I Аутор</i></b>
Име и презиме: Небојша Вацић
Датум и место рођења: 11.06.1964
Садашње запослење: Клиника за хематологију КЦ Ниш
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Функционално испитивање концентрата тромбоцита припремљених из „Buffy-coat“-а
Број страница:
Број слика: 21
Број библиографских података: 104
Установа и место где је рад израђен: КЦ Ниш и ЗЗТК Ниш
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: др сци мед Небојша Анђелковић , ванредни професор
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 11.10.2018.године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: одлуком бр. IV-03-182/12 од 12.03.2019. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Проф. др Владимир Јаковљевић</b>, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Физиологија</i>, председник</li> <li>2. <b>Доц. др Светлана Ђукић</b>, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Интерна медицина</i>, члан</li> <li>3. <b>Доц. др Миодарг Вучић</b>, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област <i>Интерна медицина-хематологија</i>, члан</li> </ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Проф. др Владимир Јаковљевић</b>, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Физиологија</i>, председник</li> <li>2. <b>Доц. др Светлана Ђукић</b>, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Интерна медицина</i>, члан</li> <li>3. <b>Доц. др Миодарг Вучић</b>, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област <i>Интерна медицина-хематологија</i>, члан</li> </ol>
Датум одбране дисертације:

## САЖЕТАК:

Увод: Припрема концентрата тромбоцита (КТ) из јединице целе крви је метода условљена великим бројем фактора који појединачно или удружено могу имати значајан утицај на квалитет коначног производа. Квалитет концентрата тромбоцита одређен је критеријумима дефинисаним у Водичу за припрему, коришћење и обезбеђење квалитета Европског комитета за трансфузију крви Савета Европе.

Циљ истраживања је био испитати квалитет КТ добијених издвајањем из “buffy coat”-а (ВС) и издвојити факторе који доприносе побољшању квалитета и стандардизацији КТ.

Материјал и метода рада: Испитивање је обухватило укупно 80 КТ издвојених из (ВС) према стандардној процедури припреме у Заводу за трансфузију крви у Нишу. Квалитет КТ је одређиван на основу запремине продукта и лабораторијских тестирања првог (КТ1), трећег (КТ3) и петог дана складиштења (КТ5): хематолошких анализа, гасних анализа ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ ), рН, стерилности и агрегације тромбоцита изазване додавањем 3,2; 6,4 и 9,6  $\mu\text{g}$  колагена/ mL (импедантна агрегометрија).

Резултати: Постоји статистички значајно мањи број тромбоцита,  $pO_2$ ,  $pCO_2$  и рН у КТ3 и КТ5 ( $p < 0,001$ ). Осим испуњености критеријума за број тромбоцита, сви остали параметри су у сагласности са препорукама Водича. Агрегација тромбоцита за све концентрације колагена је показала пад током складиштења, са статистички значајном разликом за КТ3 и КТ5 у односу на КТ1 ( $p < 0,01$ ). Постоји статистички значајна разлика у паду активности узорака КТ активираних применом високих концентрација колагена (6,4 и 9,6  $\mu\text{g}$  колагена/ mL) и мањих концентрација колагена (3,2  $\mu\text{g}$  колагена/ mL).

Закључак: Број тромбоцита, посматрани биохемијски параметри и функција тромбоцита се статистички значајно мењају током периода складиштења. У циљу побољшања квалитета КТ важно је складиштити КТ у прописаним условима, променити врсту кесе за складиштење КТ и користити адитивни раствор за чување тромбоцита уместо плазме.

## ABSTRACT

**Introduction:** Preparation of platelet concentrate (PC) from a unit of whole blood is a method dependent on a number of factors, which alone or together, can have a significant impact on the quality of the final product. Quality of PCs is determined with criteria defined in the Guide to the preparation, use and quality assurance of the Council of European Committee for Blood Transfusion.

**The study aimed to** analyze the quality of PCs prepared from buffy coat (BC) and to allocate the factors of improvement and standardization of the quality of PCs.

**Materials and methods:** The study included a total of 80 PCs prepared from BC according to the standard procedure in Blood Transfusion Institute Niš. The quality of the PCs was determined according to the volume of product and testings performed on the first (PC<sub>1</sub>), the third (PC<sub>3</sub>) and the fifth day of storage (PC<sub>5</sub>). The following parameters were determined: hematological analysis, gas analysis (pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>), pH, sterility and platelet aggregation triggered using 3,2; 6,4 and 9,6 µg collagen/mL (impedance aggregometry).

**Results:** There are significantly lower platelet count, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> and pH in PC<sub>3</sub> and PC<sub>5</sub> (p<0,001). Except for the fulfillment of the criteria for platelet count, all the other quality parameters are in accordance with recommended criteria. Platelet aggregation for all the concentrations of collagen has showed a decrease during the storage period, with statistically significant differences for PC<sub>3</sub> and PC<sub>5</sub> as compared to aggregation for PC<sub>1</sub> (p<0,01). There is statistically significant decrease in activity loss between platelet concentrates triggered with higher concentration of collagen (6,4 and 9,6 µg collagen/mL) and with smaller concentration of collagen (3,2 µg collagen/mL).

**Conclusion:** Platelet count, evaluated biochemical parameters and the platelet function changed statistically during the storage period. In order to improve the quality of PCs it is important to store the products under proper conditions, change the type of plastic bag for PC storage and use platelet additive solutions (PAS) instead of plasma.

## **ЗАХВАЛНИЦА**

*Ова докторска дисертација је настала као резултат оригиналног ауторског истраживања. У њеном стварању изузетну улогу имала је стручна, и свака друга помоћ поштованих колега, породице и пријатеља.*

*Посебну захвалност дугујем ментору, проф др Небојши Анђелковићу, декану, проф др Владимиру Јаковљевићу, проф др Небојши Здравковићу и Слађани Петровић на стрпљењу, саветима, стручној помоћи и подршци.*

*Искрену захвалност дугујем др сци.мед Ани Антић, доц др Миодрагу Вучићуићу и Милету Ранђеловићу на свесрдној помоћи при исраживању и писању ове дисертације.*

*Ову дисертацију посвећујем својој породици, уз неизмерну захвалност.*

## САДРЖАЈ:

<b>I УВОД.....</b>	<b>7</b>
<b>1.Основне карактеристике концентрата тромбоцита.....</b>	<b>7</b>
<b>2.Развој мегакариоцита и формирање тромбоцита.....</b>	<b>9</b>
<b>3.Структура тромбоцита.....</b>	<b>12</b>
<b>4.Рецептори тромбоцита.....</b>	<b>14</b>
<b>5. Секретија тромбоцита.....</b>	<b>17</b>
<b>6. Функција тромбоцита.....</b>	<b>19</b>
<b>7. Улога тромбоцита у коагулацији и фибринолизи.....</b>	<b>22</b>
<b>8. Тестови испитивања поремећаја хемостазе .....</b>	<b>28</b>
<b>9. Концентрати тромбоцита (КТ).....</b>	<b>30</b>
<b>10. Припрема концентрата тромбоцита.....</b>	<b>33</b>
<b>11. Складиштење тромбоцита.....</b>	<b>41</b>
<b>12. Адитивни раствор за чување тромбоцита (PAS).....</b>	<b>42</b>
<b>13. Контрола квалитета КТ.....</b>	<b>44</b>
<b>14. Агрегација тромбоцита.....</b>	<b>45</b>
<b>II ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ:.....</b>	<b>46</b>
<b>III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА.....</b>	<b>48</b>
<b>IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА.....</b>	<b>54</b>
<b>V ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>110</b>
<b>VI ЗАКЉУЧАК.....</b>	<b>119</b>
<b>VII БИОГРАФИЈА.....</b>	<b>120</b>
<b>VIII БИБЛИОГРАФИЈА.....</b>	<b>122</b>

# I УВОД:

## **1. Основне карактеристике концентрата тромбоцита**

Тромбоцити представљају компоненту добијену из јединице целе крви (припремом из плазме богате тромбоцитима (*platelet rich plasma*-ПРП) или “*buffy-coat*”-а (слој леукоцита и тромбоцита, настао после седиментације еритроцита)) или тромбоцитаферезном процедуром помоћу аутоматског сепаратора крвних ћелија (аферезни тромбоцити). Трансфузија концентрата тромбоцита се примењује у превенцији и лечењу крварења код болесника са тромбоцитопенијом или тромбоцитопатијом. Најчешће се примењује у лечењу хематолошких болести, код пресађивања коштане сржи и других органа, у лечењу кардиохируршких болесника и при гастроинтестиналним крварењима (1,2). Повећање примене агресивних медицинских поступака и хемиотерапије повећава учесталост лечења трансфузијама тромбоцитних концентрата. Савремени подаци показују да се годишње трансфундује око 1,5 милиона тромбоцитних концентрата у Америци и око 2,9 милиона у Европи (3).

Примена тромбоцитних концентрата има следеће циљеве:

1. трансфузијом треба у болесникову циркулацију унети довољан број тромбоцита како би се повећао њихов број и омогућила нормална хемостаза,
2. трансфундовани тромбоцити морају бити ефикасни у превенцији и лечењу крварења,
3. трансфузије тромбоцита не смеју узроковати нуспојаве,
4. смањењем броја трансфундованих концентрата тромбоцита треба покушати смањити учесталост нуспојава, инфекција и алоимунизација (4).

Почетак трансфузије концентрата тромбоцита се везује за шездесете године ХХ. века, када су се код појаве хеморагијског синдрома, у резултатима периферне крви болесника уочиле и вредности броја тромбоцита које су били ниже у односу на референтне вредности. Након трансфузије концентрата тромбоцита дошло је до како до повећања броја тромбоцита, тако и одржавања њихове функције, што је довело до смањења смртности код болесника са хеморагијским синдромом.

Тромбоцити нормално у организму учествују у примарној хемостази, мада су значајни у свим фазама коагулације (хемостаза се одвија у четири велике фазе: васкуларна фаза, формирање „тромбоцитног чепа“, формирање фибринског угрушка, лиза угрушка). Смањење броја тромбоцита и/или поремећена функција тромбоцита доводе до појаве крварења, које захтева следећа лабораторијска испитивања: број тромбоцита, време

крварења, испитивање адхезије и агрегације тромбоцита. Полуживот тромбоцита у циркулацији је 10,5 дана, док је преживљавање припремљених тромбоцита 4-5 дана. Оно може бити скраћено у стањима сепсе, ДИК-а, спленомегалије, присуства ало или ауто антитромбоцитних антитела, као и активације тромбоцита (интрааортална балон пумпа и др.). Постизање позитивног ефекта трансфундованих тромбоцита свакако да значајним делом зависи и од квалитета припремљеног продукта. Добијање концентрата тромбоцита (КТ) је метода условљена великим бројем варијабила које појединачно или удружено могу имати значајан утицај на квалитет коначног производа. Стандардизацију препарата концентрованих тромбоцита је веома тешко извршити. Најзначајнији међу факторима су врста и квалитет кеса за узимање крви, карактеристике центрифугирања, начин сепарације и услови складиштења припремљених концентрата тромбоцита (5,6). Данас у свим развијеним земљама света, укључујући и нашу, концентрати тромбоцита се припремају уклањањем *“buffy-coat”* слоја, а њихов квалитет је посебно побољшан уколико се крв узима у тзв. „top & bottom” кесе за прикупљање крви. Тромбоцити се чувају у посебним пластичним кесама за складиштење које омогућавају транспорт кисеоника, на температури од  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  уз константно мешање на хоризонталном агитатору (приближно 70 циклуса/мин) најдуже 5 дана. Рок чувања се може продужити до седам дана применом неке од метода инактивације патогена у концентрате тромбоцита.

Стандардна терапијска доза тромбоцита за одрасле је припремљена из 4-6 јединица крви, те се концентрати тромбоцита могу да трансфундују као појединачни или се даље, због лакше администрације, пулирају ланчаном методом или коришћењем комерцијалног кита за пулирање у једну кесу као терапијска доза. Током пулирања може да се користи и леукоцитни филтер и тако припреме филтрирани (леуко-редуковани) пулирани концентрати тромбоцита.

Квалитет концентрата тромбоцита одређен је критеријумима дефинисаним у Водичу за припрему, коришћење и обезбеђење квалитета Савета Европе Европског комитета за трансфузију крви (19. издање, 2017), који је прихваћен од стране Министарства здравља Републике Србије (7). Обавезни захтеви контроле квалитета концентрата тромбоцита припремљених из *“buffy-coat”*-а подразумевају:

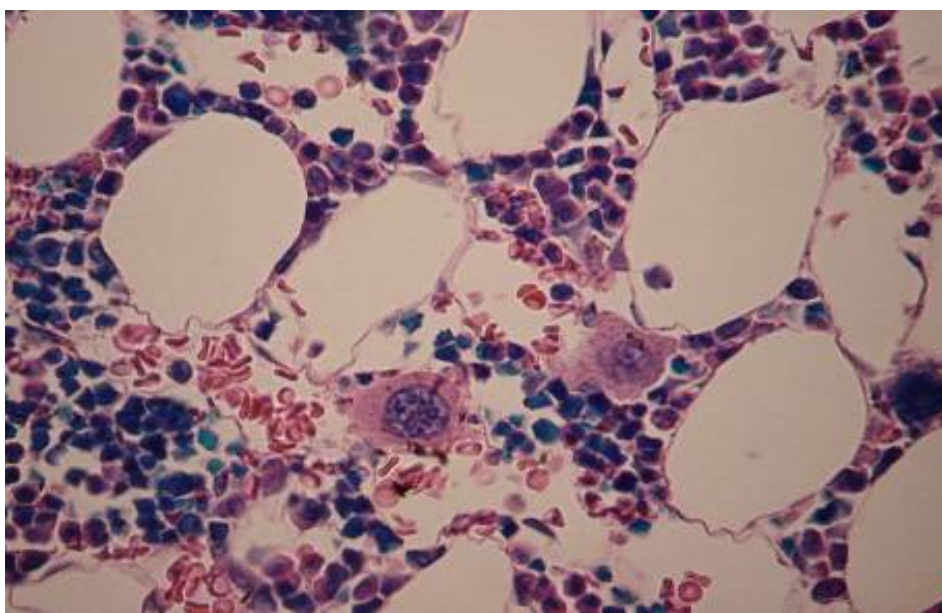
- запремину концентрата тромбоцита  $> 40$  мл која садржи најмање  $60 \times 10^9$  тромбоцита,
- мање од  $0,05 \times 10^9$  леукоцита,
- број еритроцита  $0,2 - 1 \times 10^9$
- рН већи од 6,4.



Осим тога, препоручено је испитивање бактериолошке исправности концентрата тромбоцита, као и испитивање функције тромбоцита у припремљеним концентратима, што најчешће подразумева испитивање агрегације тромбоцита додавањем одговарајућих агониста.

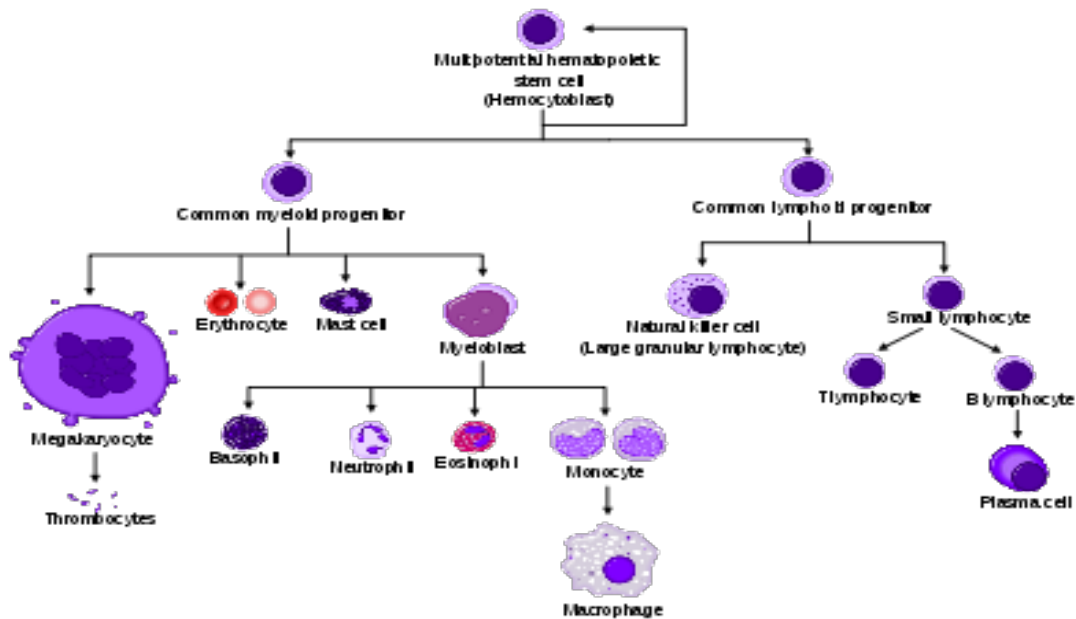
## 2. Развој мегакариоцита и формирање тромбоцита

Мегакариоцит је највећа хематопоезна ћелија од које се процесом тромбоцитопоезе откидају делови цитоплазме формирајући крвне плочице (тромбоците). Пречник достиже 100  $\mu\text{m}$ , а једро је издељено на режњеве и полиплоидно, садржи од 16 до 32 комплета гена. Током процеса дуплирања ДНК (репликација) не повећава се само величина једра већ и количина цитоплазме. У близини једра налазе се органеле које учествују у процесима синтезе, митохондрије и центриоле, а на периферији цитоплазме образују се тромбоцитни демаркациони канали подељени на тромбоцитна поља. Од сваког тромбоцитног поља образоваће се један тромбоцит. Са површине мегакариоцита одвајају се цитоплазматски наставци у виду трака великих димензија који се провлаче између ћелија ендотела и доспевају у шупљину крвног суда. Откидањем са тромбоцитних трака настају тромбоцити па тако од једне траке може да се одвоји и до 1200 крвних плочица. Један мегакариоцит може да образује највише шест таквих трака, а да потом долази до његове дегенерације и замене новим мегакариоцитом.



Слика 1. - Мегакариоцити у коштаном сржи

Тромбоцити или крвне плочице настају из својих претеча мегакариоцита, који су примарно смештени у коштаном сржи, где их има 0,5% свих ћелија. Они настају из BFU-МК (енгл. *burst forming units-megakariociti*) и CFU-МК (енгл. *colony forming units*, јединице које формирају колоније за мегакариоците у коштаном сржи). Колоније ових ћелија имају способност да пролиферишу у мегакариоците. Мегакариоцитна лоза почиње, као и све крвне лозе, од плурипотентне стем ћелије (PPSC/CFU-S), чијом диференцијацијом и асиметричним деобама настају, између осталог, мултипотентне ћелије мијелоидне лозе (CFU-GEMM). Ове ћелије непрепознате морфологије затим дају унипотенту стем ћелију мегакариоцитне лозе (CFU-Meg), чији се изванредан број ћерки диференцира у мегакариоците. Овај процес се одвија кроз неколико фаза. Настали мегакариоцити су највеће хематопоетске ћелије, са крупним, лобулисаним једром најчешће постављеним уз један пол ћелије, и великом количином цитоплазматског материјала. Мегакариоцити су постављени у непосредној близини капилара, чији се наставци у виду трака провлаче између ћелија ендотела, доспевајући у шупљину крвног суда. Откидањем са мегакариоцитних трака настају тромбоцити. Након завршене фрагментације, једро за заосталом цитоплазмом фагоцитују макрофаги. (8)



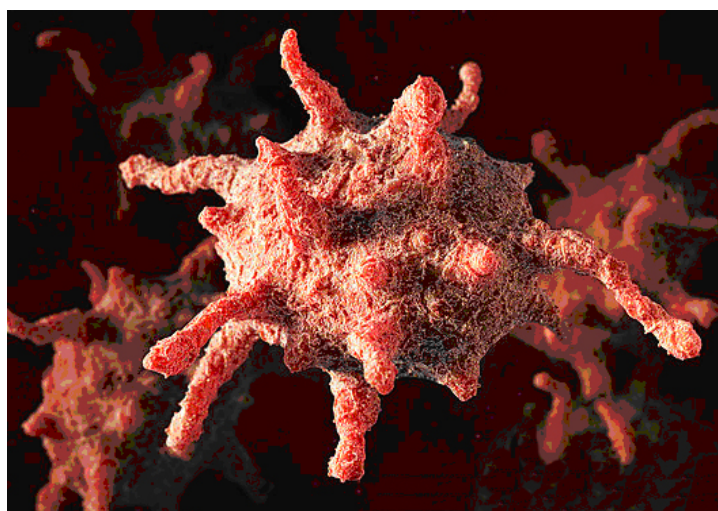
Слика 2. -Модел хематопоезе и тромбоцитопоезе

Мегакариоцитопоеза је регулисана бројним цитокинима. Тромбопоетин (ТРО) је специфичан гликопротеин-цитокин, који индукује пролиферацију и матурацију мегакариоцита и њихових предходника синергистички с осталим цитокинима као што су еритропоетин, IL-3, IL-6 и GM-CSF. Ствара се стално у јетри и слезени и у микроколини коштане сржи у стромалним ћелијама. (9) Синтеза мекакариоцита је повећана у стањима

тромбоцитопеније. Данас је произведен рекомбинантни тромбопоетин који се широко користи у третману тромбоцитопенија. Из мегакариобласта се развија базофилни мегакариоцит, из којег редупликацијом једра настаје мегакариоцит највећа ћелија у коштаног сржи која садржи бројне грануле. Зрели мегакариоцити имају типичну морфологију: велику цитоплазму са бројним гранулама. Ове грануле су предходници тромбоцита, који када се формирају излазе из мегакариоцита у крвоток. Из једног мегакариоцита настаје 3000-4000 тромбоцита. Тромбоцити су мале крвне плочице промера 2-5 $\mu$ , а нормалан број у крви им је  $150-350 \times 10^9/L$ . Просечни волумен је  $12\mu^3$  и смањује се сазревањем тромбоцита, тако да су млађи тромбоцити већи од старијих. Немају једро, а садрже азурофилне грануле, митохондрије и рибозоме. У својој унутрашњости садрже алфа-грануле и густе грануле. Време живота здравих тромбоцита је између 8-12 дана, а полувек живота износи 2-7 дана. 80% тромбоцита циркулише крвотоком, а остали су смештени у слезини. (10) Ако дође до наглог губитка тромбоцита у крви потребно је просечно 10 дана да се сазревањем мегакариоцита надокнади смањени број тромбоцита. (11)

На својој површини тромбоцити имају специфичне антигене АВО система, HLA резреда I или специфичне ало-антигене (PL-A1, PL-G). Антитела на те антигене су главни узрок неонаталне алоимуне тромбоцитопеније, а могу се стварати након поновљених трансфузија тромбоцита. Тромбоцити играју важну улогу у хемостази адхерирајући на оштећени ендотел. Ослобађају, ADP који изазива даљњу агрегацију тромбоцита.

Већ је споменуто да је од многобројних функција тромбоцита најзначајнија она у заустављању крварења. Посредством физичко-хемијских процеса и ослобађањем посебних тромбоцитних чинилаца они учествују у свим фазама хемостазе. Поред тога, тромбоцити имају улогу и у процесима одржавања интегритета васкулног ендотела, фагоцитозе, детоксикације организма, транспорта материја итд. (12-14)





Слике 3,4. –Тромбоцити

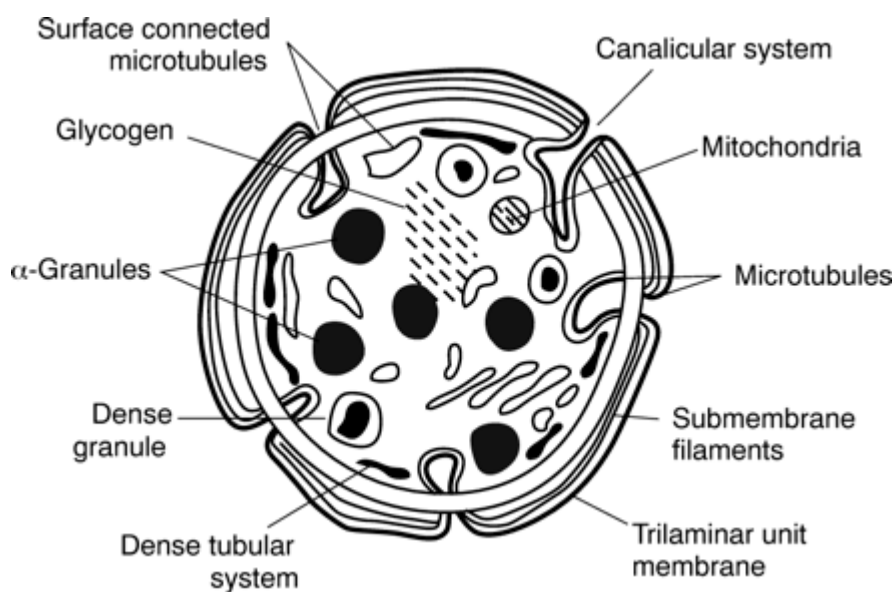
### 3. Структура тромбоцита

Сазревањем мегакариоцита и фрагментирањем њихове цитоплазме у коштаног сржи настају тромбоцити, који су најмање циркулишуће крвне ћелије. Тромбоцити су осетљиве ћелије (реагују на минималну стимулацију), величине 2-3  $\mu\text{m}$  дискоидног облика, не садрже јездро, ендоплазматски ретикулум нити Голџијев апарат. Окружени су омотачем који садржи гликопротеине, укључујући интегрине, који су кључни за адхезију и агрегацију потребну за хемостазу. Испод омотача се налази плазматска мембрана с инвагинацијама које повећавају доступну површину за адсорпцију коагулационих протеина. Цитоскелет тромбоцита изграђен је од бројних међусобно повезаних актинских филамената који регулишу облик тромбоцита. У унутрашњости тромбоцита налазе се алфа грануле и густе грануле. Највише има алфа гранула, које садрже гликопротеине, факторе коагулације, као и многе проангиогене и антиангиогене факторе (васкуларни ендотелни фактор раста (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF*), ендотелни фактор раста пореклом из тромбоцита (енгл. *Platelet-Derived Endothelial Growth Factor - DEGF*), као и тромбосподин). Густе грануле садрже јоне калцијума, серотонин, АТФ и АДФ, потребних за агрегацију тромбоцита стимулисану тромбоксаном А<sub>2</sub>. Посматрано на електронском микроскопу, по електронској густини се разликују два сегмента - светлији, периферни који се назива хијаломера, и унутрашњи, тамнији који се назива грануломера. (15)

Тромбоцитне зоне се још називају: периферна, сол-гел и зона са органелама.

Агрегација тромбоцита одвија се под утицајем агониста: ADP, епинефрин, тромбин, колаген. Епинефрин и ADP су слаби агонисти тромбоцитне агрегације, а да би довели до пражњења тромбоцитних гранула захтевају присуство простагландина и тромбоксана A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>). TxA<sub>2</sub> се синтетише се из арахидонске киселине, која се синтетише из фосфолипида тромбоцита под дејством фосфолипазе. Фибриноген учествује у агрегацији тромбоцита везујући се за GP IIb/IIIa (исти рецептор и за vWF). Комплекс GPIIb/IIIa мора најпре да доживи конформацијске промене изазване активацијом тромбоцита па тек онда везује фибриноген. GP IIb/IIIa је главна компонента тромбоцитног цитоскелета, представља трансмембрански комплекс, удружен са актином на унутрашњој, сакривеној страни мембране. Актин- GP IIb/IIIa омогућава ретракцију коагулума. Када се активирају тромбоцити, на њиховој површини активирају се протеини коагулације и фибринолизе. Простациклин је снажан инхибитор агрегације тромбоцита.

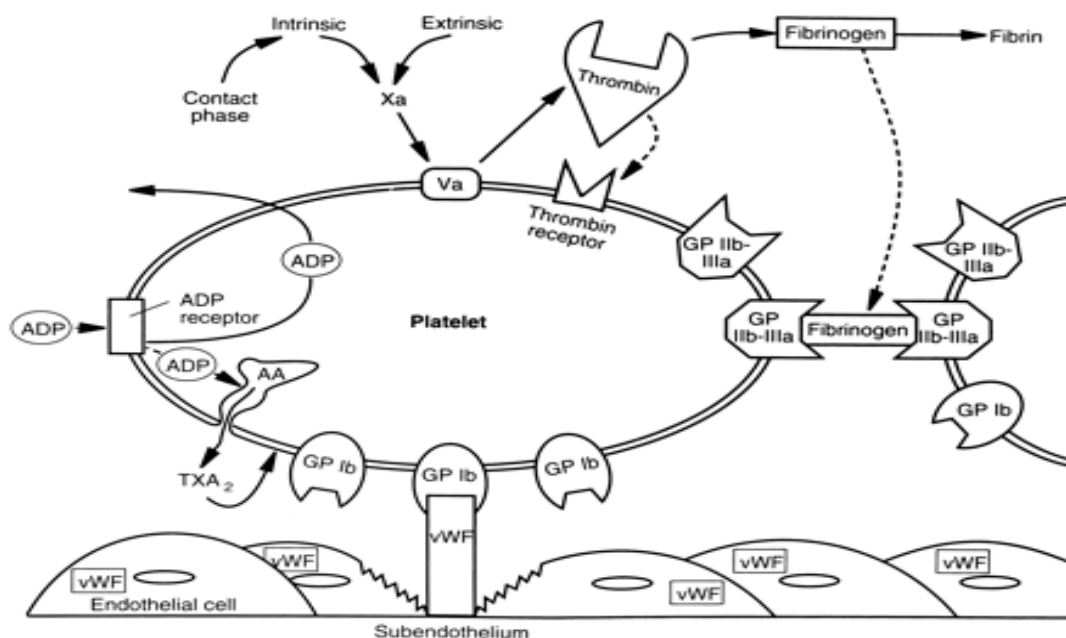
Ћелијска мембрана тромбоцита садржи гликопротеине који спречавају адхезију тромбоцита за нормални ендотел, али омогућава адхезију за повређено ткиво и за друге тромбоците (под извесним условима). Ово својство тромбоцита често отежава њихово бројање. (16)



Слика 5. –Структура тромбоцита

## 4. Рецептори тромбоцита

Тромбоцитни рецептори су гликопротеини смештени на површини тромбоцита и они представљају комуникацију тромбоцита с њиховом околином. Ти су рецептори одговорни за реактивност тромбоцита са палетом различитих агониста и адхезивних протеина. Будући да тромбоцити немају једро и не могу се прилагодити различитим новонасталим ситуацијама, условљених *de novo* синтезом протеина, они преко различитих рецептора дају свој одговор на различите физиолошке и патолошке догађаје. Како је главна улога тромбоцита одржавање хемостазе, не изненађује чињеница да је већина њихових рецептора директно повезана с процесом активације тромбоцита и адхезије на оштећени крвни суд као и стварања примарног тромба. (17,18)



Слика 6. Тромбоцитни рецептори

### 4.1. Тромбински рецептори

Тромбин је најснажнији физиолошки агонист тромбоцита. Он учествује у активацији тромбоцита, али његова кључна улога је у настајању фибриноског угрушка из растворљивог фибриногена. Тромбин се веже на трансмембранске рецепторе из породице протеазом активираних рецептора (енгл. protease-activated receptors, PARs) који су везани за протеин G. Позната су четири PAR рецептора, а у људским тромбоцитима присутни су

само PAR1 и PAR4 (PAR2 и PAR3 присутни су на мишићим тромбоцитима). Хидролитичким цепањем тромбин активира PAR1 и PAR4 омогућајући пренос сигнала у ћелију преко протеина G. PAR1 је високоафинитетни рецептор кога активирају ниске концентрације тромбина за разлику од PAR4 којег активирају високе концентрације тромбина. (19).

#### **4.2. Колагенски рецептори**

На површини тромбоцита налази се неколико гликопротеинских рецептора, ипак сматра се да су само GP Ia/IIa и GPIIb/IIIa одговорни за колагеном индуковану активацију тромбоцита. GP Ia/IIa рецептор, интегрин  $\alpha_2\beta_1$ , изазива адхезију тромбоцита на матрикс субендотела уз претходну активацију неким од "јачих" агониста нпр. тромбином или ADP-ом. GPIIb/IIIa заједно са GPIIb/IIIa учествује у адхезији и формирању тромба на колагенској површини у условима циркулирајуће крви. Сматра се да је полиморфизам гена за GPIIb/IIIa повезан са настанком инфаркта миокарда (20).

#### **4.3. Адхезиони рецептори**

GPIIb/IIIa омогућава тромбоцитима везање са VWF што доводи до успоравања тромбоцита на мјесту оштећења крвног суда и њихову интеракцију с колагеном. GPIIb/IIIa, интегрин  $\alpha_{IIb}\beta_3$  је најзаступљенији адхезиони рецептор који да би постао активан мора проћи конформацијску промену узроковану активацијом тромбоцита неким од адхезионих рецептора (GPIIb, GPIIa/IIa), тромбинским рецепторима (PAR1 и PAR4) или ADP рецепторима (P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>1</sub>, P2X<sub>1</sub>). GPIIb/IIIa углавном веже фибриноген, али такође и VWF, фибронектин, витронектин и тромбоспондин. Његова функција зависна је од Ca<sup>2+</sup>, а везање фибриногена и VWF посредује у агрегацији тромбоцита. (21,22)

#### **4.4. Адренергички рецептори**

Деловање катехоламина посредовано је  $\alpha_2$ -адренергичким рецептором који појачава деловања других агониста и у високој концентрацији изазива агрегацију тромбоцита. Допаминаергички рецептори делују на активацију аденилат-циклазе која

инхибира cAMP, доводи до хидролизе фосфатидил-инозитола, активације  $K^+$ -канала и промене нивоа унутарћелијског  $Ca^{2+}$ . (16, 23)

#### ***4.5. Пуринергички рецептори***

Пуринергички рецептори имају важну улогу у формирању тромба у подручју високог притиска, они посредују у активацији тромбоцита секрецијом ADP-а из секреторних гранула, а састоје се од породице  $P2X_{(1-7)}$  рецептора и породице G-протеин везаних  $P2Y_{(1,2,3,4,11,12,13,14)}$  рецептора. Тромбоцити експримирају углавном  $P2Y_1$ ,  $P2X_1$  и  $P2Y_{12}$  рецепторе, док преостали рецептори из тих породица немају значајнију улогу у активацији односно агрегацији тромбоцита.

Везањем ADP-а на рецептор  $P2Y_1$  долази до пролазног пораста концентрације унутарћелијског  $Ca^{2+}$  што узрокује слабу, пролазну агрегацију, као и истовремено синергистичко деловање ADP-а преко  $P2Y_{12}$  рецептора условљавајући коначну и трајну активацију и агрегацију тромбоцита инхибирањем фосфорилације VASP (вазодилататор-стимулирајућег фосфопротеина) и активирањем GPIIb/IIIa на површини тромбоцита. (24)

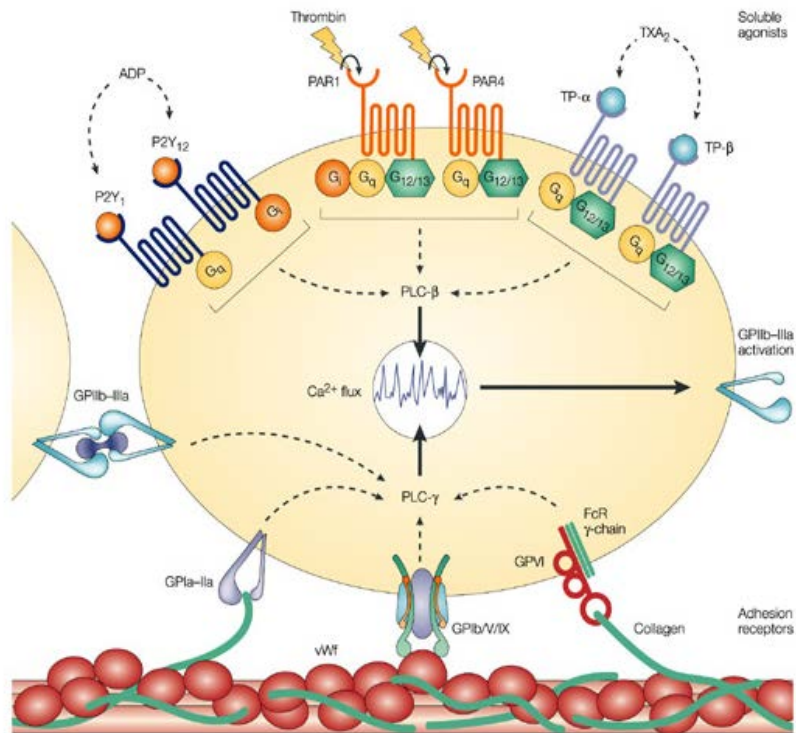
#### ***4.6. Тромбоксан $A_2$ ( $TxA_2$ ) – рецептори***

$TxA_2$ -рецептори ,припадају породици G-протеина, јављају се у две изоформе,  $\alpha$  и  $\beta$ , које посредују деловању тромбоксана на агрегацију тромбоцита и контракцију крвних судова. Тромбоксан  $A_2$  је врло моћан активатор тромбоцита који настаје претварањем AA у простагландине и даље до  $TxA_2$  који има врло брзо деловање на активацију тромбоцита. Његов је полуживот у циркулацији само 30 секунди. (25)

#### ***4.7. 5HT – рецептори***

Активацијом серотонинских рецептора 5HT расте цитоплазматски  $Ca^{2+}$ . Серотонин је сам по себи слаб агонист, али делује синергистички с осталим тромбоцитним агонистима.





Слика 7. Улога тромбоцитних рецептора

## 5. Секреција тромбоцита

Оштећењем ендотела тромбоцити долазе у контакт са колагеном и von Willebrand-овим фактором што доводи до адхезије тромбоцита на месту оштећења интима и активације тромбоцита, где они губе дискоидни облик, постају сферични са дугачким псеудоподама. На адхерисане тромбоците лепе се тромбоцити из циркулације, менусобно агрегирају, стварајући тромбоцитни чеп, који попуњава дефект на зиду крвног суда. Агонисти доводе до секреције, односно ослобађања садржаја тромбоцитних гранула. Овако започет спољашњи пут коагулације релативно неефикасно активира тромбин. Међутим у условима опструкције тока крви на месту оштећења интима где се активирају и тромбоцити, чиме се знатно повећавају концентрације већег броја коагулационих фактора, када долази до несупримиране активације тромбина који затим у позитивној повратној спрези активира друге ефикасније коагулационе процесе којима појачава сопствену активацију. Тромбин унутар тромба је врло активан и релативно недоступан инхибиторима. Он активира тромбоците али и ендотелне ћелије везујући се за GPIb и за своје посебне рецепторе. Активирани ендотел испољава прокоагулантну активност. Тромбин активира XI фактор коагулације, а комплекс TF-VIIa активира IX фактор коагулације чиме се значајно појачава позитивна повратна спрега коагулације јер се укључује унутрашњи пут коагулације којим се много брже од спољашњег пута, преко

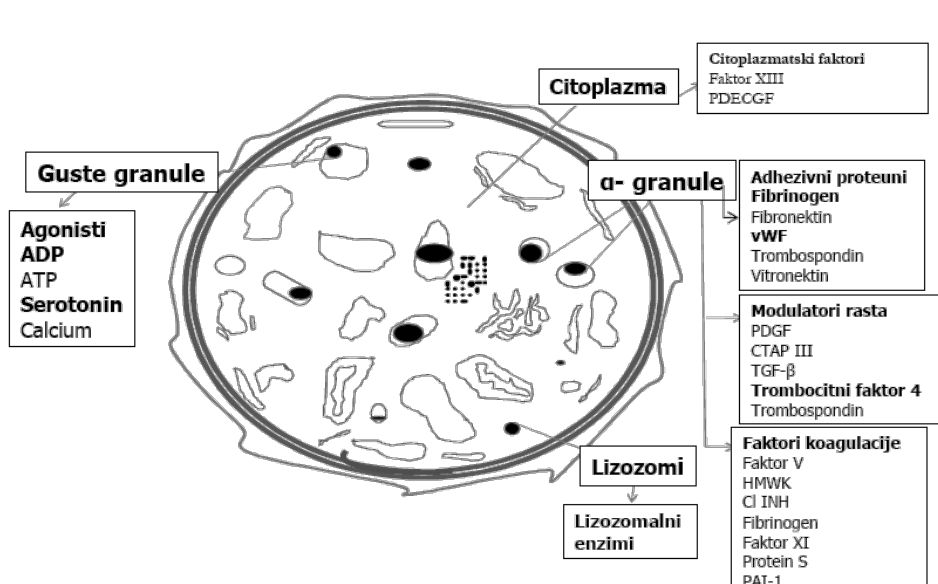
теназа комплекса (IXa, VIIIa, fosfolipidi, Ca) ствара протромбиназни комплекс (Xa, Va, fosfolipidi, Ca). (17,26)

### 5.1. Супстанце секретоване из тромбоцита и тромбоцитних гранула

Агрегација тромбоцита почиње под дејством колагена (GP VI и GP Ia/IIa), када долази до следећих реакција:

1. Контракције цитоскелета и реакције ослобађања из густих гранула: **ADP** (сAMP↓, Ca<sup>2+</sup>↑), серотонини из α- гранула: vWF, фибриногена, тромбоцитног фактора.
2. Синтеза **TXA<sub>2</sub>** (Ca<sup>2+</sup>↑)
3. Промена конформације **GP IIb/IIIa** (везивање фибриногена)
  - Ово је заједнички и коначни механизам агрегације изазване било којим физиолошким агонистом или патолошким агенсом
4. Премештање ањонских фосфолипида у спољашњи липидни слој
  - Ово омогућује везивање FVa и FVIIIa, а тиме и активацију протромбина у **тромбин**, као и FX у Fxa, што је кључни догађај хемостазе (слика испод).

#### Supstance sekretovane iz trombocita i trombocitnih granula



Слика 8. Секреција из тромбоцитних гранула

## 6. Функција тромбоцита

Већ је споменуто да је од многобројних функција тромбоцита најзначајнија она у заустављању крварења. Посредством физичко-хемијских процеса и ослобађањем посебних тромбоцитних чинилаца они учествују у свим фазама хемостазе. Поред тога, тромбоцити имају улогу и у процесима одржавања интегритета васкулног ендотела, фагоцитозе, детоксикације организма, транспорта материја итд. (27,28)

### 6.1. Физиолошка функција тромбоцита

Најзначајнија физиолошка функција тромбоцита јесте активно учествовање у свим фазама хемостазе (29) и то како физичко-хемијским процесима, тако и ослобађањем и активношћу посебних тромбоцитних чинилаца. Ово се пре свега постиже формирањем тромба, када дође до оштећења ендотела крвних судова. Поред тога, они имају улогу и у процесима одржавања интегритета ендотела, фагоцитозе, детоксикације организма и транспорту материја.

Ендотелне ћелије у нормалним околностима поседују механизме којима се спречава адхезија, активација и агрегација тромбоцита (30). То су дејство електростатских сила, али и синтеза медијатора од стране интактног ендотела као што су азот оксид (NO) – ендотелни релаксирајући фактор (*endothelial derived relaxing factor*, простациклин I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) и ензим ADP-аза (10), (11). У ендотелним ћелијама синтетише се и тромбоцитни активирајући фактор – (*platelet activated factor* – PAF), који остаје везан за мембрану ендотела и стимулише активацију тромбоцита (31). Адхезију тромбоцита за неоштећен ендотел спречава и деловање активног механизма, чије функционисање захтева сталну синтезу довољне количине PGI<sub>2</sub>. Деловањем циклооксигеназе из арахидонске киселине настаје лабилни циклични ендопероксид – простагландин G<sub>2</sub> (PG<sub>2</sub>), а из њега посредством простагландинхидропероксидазе, простагландин H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Антиагрегациони ефекат PGI<sub>2</sub> испољава се деловањем на метаболизам тромбоцита. Он стимулише синтезу цикличног аденозин монофосфата (сАМФ) из аденозин трифосфата (АТФ) и редукује интрацелуларну концентрацију јона Ca<sup>2+</sup>. Синтеза NO такође инхибира функцију тромбоцита. С обзиром на то да се и NO и PGI<sub>2</sub> брзо инаktivирају, синтеза ензима ADP-азе вероватно је најважнија заштита ендотела од активираних тромбоцита. (32)

## **6.2. Тромбоцити и примарна хемостаза**

У хемостази, процесу којим се спонтано зауставља крварење из повређеног крвног суда, тромбоцити су кључни учесници све три њене фазе: васкуларној, тромбоцитној и коагулационој.

Први догађај у контроли крварења је формирање примарног хемостатског угрушка на месту оштећења крвног суда. Формирање примарног угрушка се дешава у прве две фазе хемостазе (васкуларној и тромбоцитној) познате као примарна хемостаза (32-34). Оштећење ендотела излаже тромбоцитима субендотелно ткиво богато у vWF, колагену и фибронектину. У додиру са страном површином или када на њих делују активатори, односно агонисти (аденозин дифосфат-ADP, колаген, адреналин, тромбин, чинилац који активира тромбоците, тромбоксан A<sub>2</sub>, простагландини PGG<sub>2</sub> и PGH<sub>2</sub> и др.), тромбоцити се активирају и откривају гликопротеин Ib (GPIb) који служи као рецептор за vWF субендотела и плазме. Тако долази до адхезије тромбоцита за субендотел, њихове агрегације (примарна агрегација-реверзибилна) и реакције ослобађања садржаја гранула (након чега настаје секундарни талас агрегације који је иреверзибилан) - што доводи до стварања белог тромбоцитног тромба, неопходног за затварање озлеђеног места на крвном суду и спречавање даљег истицања крви.

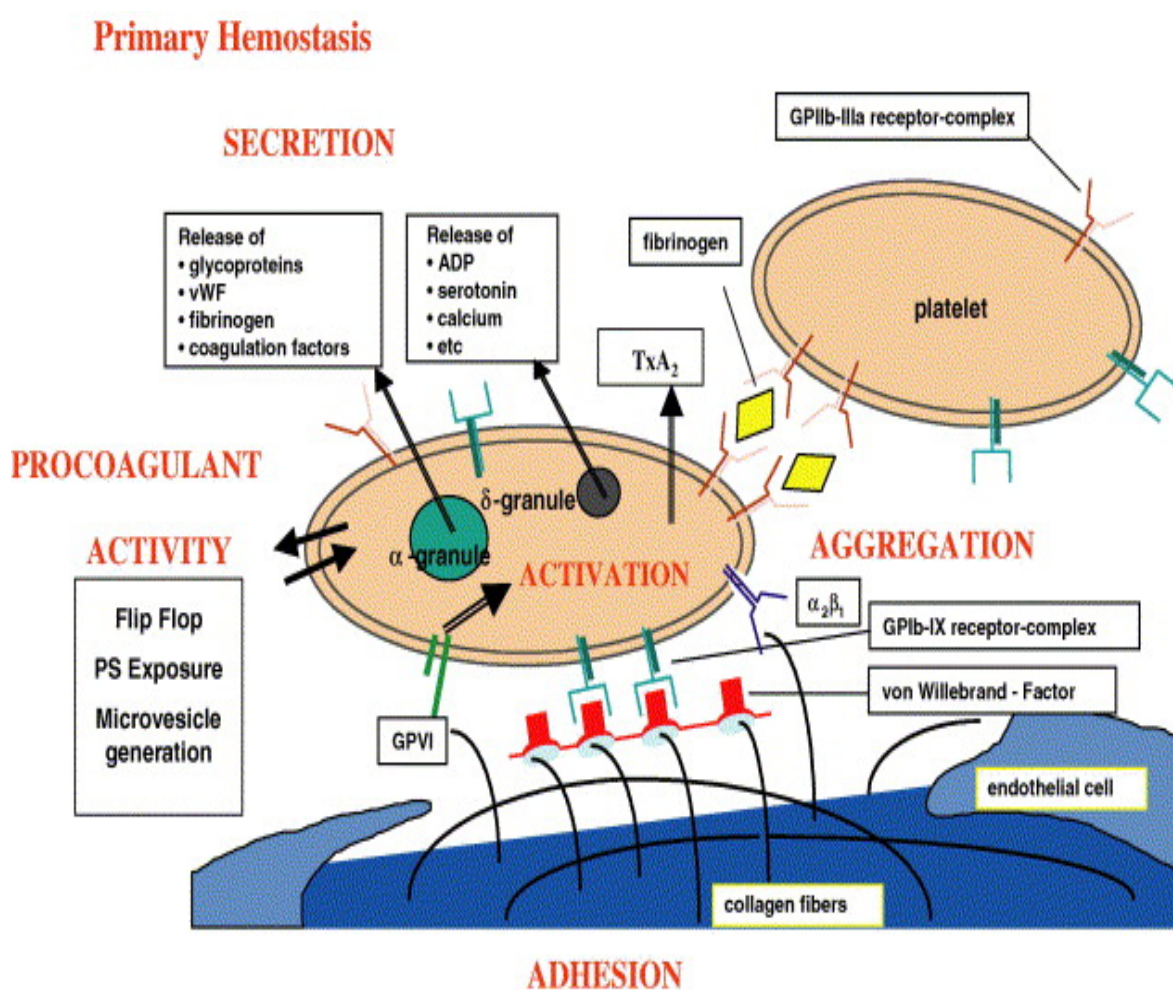
Тромбоцитни тромб је недовољно чврст. Његову чврстину, неопходну за дефинитивну хемостазу, ствара фибрин створен из фибриногена који облаже површину тромбоцита након везивања за GPIIb-IIIa. За исти рецептор веже се и vWF. Тромбоцити, након активације, обезбеђују катализну фосфолипидну површину (на тај начин учествују у коагулацији крви) на којој се врши стварање комплекса теназе и протромбиназе и стварање тромбина, који је неопходан за претварање фибриногена у нити фибрина и стварање дефинитивног тромба (тромбоцитно-фибринског), који потпуно прекида истицање крви из повређеног крвног суда. (32),(34).

## **6.3. Коагулациона каскада**

Фактори коагулације су кључне компоненте секундарне хемостазе, а коагулација крви је сложен биохемијски процес који се одвија преко низа узастопних и комплексних међусобних реакција фактора коагулације, које још увек нису у потпуности разјашњене. Фактори коагулације се у плазми налазе у облику неактивних беланчевина. Када започне процес згрушавања, фактори коагулације у циркулацији се у једном низу биохемијских

реакција активирају, при чему основни токови овог процеса имају карактер ензимских реакција. Осим V и VIII фактора који у активном облику имају улоге кофактора, као и XIII фактора и фибриногена, остали чиниоци након активације добијају особине серинских протеаза. Инхибитори серинских протеаза називају се серпини (32).

Мада класична подела пута коагулације (каскадни модел) на спољашњи пут (покренут ткивним фактором) и унутрашњи пут (покренут контактном активацијом) још увек има одређени значај, данас се зна да је процес коагулације знатно комплекснији и да путеви активације нису независни један од другог, већ да су блиско повезани и међусобно зависни (32-34).



Слика 8. Тромбоцити у примарној хемостази

## 7. Улога тромбоцита у коагулацији и фибринолизи

Коагулација крви је веома сложен ензимски процес заустављања крварења. Активност ензима је каскадно условљена. Прву фазу коагулације представља стварање активног тромбопластина. Другу фазу коагулације чини претварање протромбина у тромбин, а активисани тромбин омогућава да растворљива беланчевина фибриноген пређе у нерастворљив фибрин, током треће фазе коагулације.

У крви здравих особа до коагулације крви не долази због тога, што постоји равнотежа између чиниоца који помажу коагулацији (прокоагулантна средства) и оних који је спречавају (инхибитори коагулације). До сада је препознато око 13 чинилаца (фактора) коагулације. Они су дати у табели:

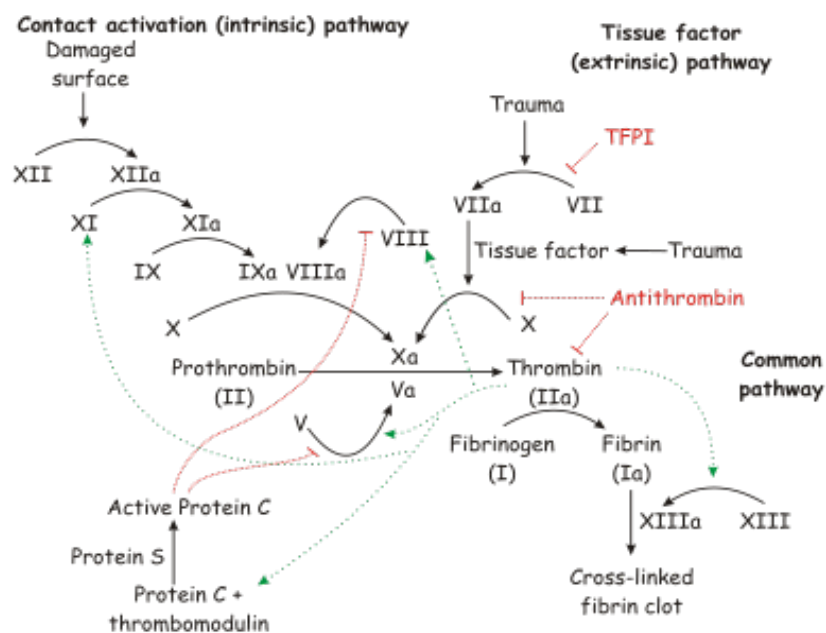
Фактори коагулације	
Назив фактора коагулације	Улога
Фактор I ( <a href="#">Fibrinogen</a> )	Формира фибринску мрежу
Фактор II ( <a href="#">protrombin</a> )	Активира факторе I, V, VII, XIII, <a href="#">protein C</a> , тромбоците
Фактор III ( <a href="#">tkivni faktor</a> , <a href="#">tkivni tromboplastin</a> )	Кофактор за фактор VIIa
Фактор IV	<a href="#">Kalcijum</a>
Фактор V ( <a href="#">proakcelerin</a> )	Кофактор за фактор X
Фактор VI	Стари назив за активни фактор V, фактор Va
Фактор VII ( <a href="#">prokonvertin</a> ), стабилни фактор)	Активира факторе IX, X
Фактор VIII ( <a href="#">antihemofilni globulin A</a> )	Кофактор за фактор IX
Фактор IX ( <a href="#">Kristmasov faktor</a> , <a href="#">antihemofilni globulin B</a> )	Активира фактор X
Фактор X ( <a href="#">Stjuart-Powerov faktor</a> )	Активира фактор II
Фактор XI (прекурсор тромбопластина плазме, <a href="#">antihemifilnii faktor C</a> )	Активира факторе XII, IX и прекаликреин
Фактор XII ( <a href="#">Hagemanov faktor</a> )	Активира <a href="#">prekalikrein</a> i <a href="#">fibrinolizu</a>
Фактор XIII (фактор стабилизације <a href="#">fibrina</a> )	Учвршћује крвни угрушак
<a href="#">Von Wilenbrandov faktor</a>	Учествује у повезивању тромбоцита
<a href="#">prekalikrein</a> ( <a href="#">Flečerov faktor</a> )	
<a href="#">kininogen velike molekulske mase</a> ( <a href="#">engl. HMWK</a> )	Подржава активацију фактора XII, XI, i <a href="#">prekalikreina</a>
<a href="#">fibronektin</a>	Посредује у адхезији тромбоцита

Инхибитори коагулације су по свом деловању: Антитромбопластини – који спречавају активисање ткивног и тромбоцитног тромбопластина, антитромбини – који спречавају активисање протромбина у тромбин и фибринолизини (плазмини) - који врше фибринолизу створеног тромба и делују антикоагулантно.

Улога тромбоцита је заустављање крварења путем стварања тромбоцитног чепа и коагулације крви, дакле и у примарној и у секундарној (дефинитивној) хемостази. Ако дође до повреде крвног суда-крварења, прва реакција је сужавање-констрикција крвног суда под утицајем симпатикуса и вазоконстриктора-супстанци, које изазивају сужење крвног суда вазоконстрикција. Следећи стадијум је активација тромбоцита. Они мањају облик, на површини се образују бројни наставци, везе између тромбоцита, фибриногена и ендотела такозвани тромбоцитни чеп (велику улогу у повезивању игра von Willebrand-ов фактор и гликопротеини мембране тромбоцита). Контракtilни протеини-актин, миозин и тромбастенин се контрахују и ослобађају се супстанце из гранула-серотонин, калцијум, ADP, а такође синтетишу се и нове супстанце као нпр. тромбоксан А2 који је снажан вазоконстриктор. Уколико је повреда мала, реакција се овде зауставља. Ако је повреда крвног суда већа започиње и трећа фаза-коагулације крви. Тромбоцити имају кључну улогу у коагулацији крви јер секретују калцијум, фосфолипиде, и фактор стабилизације фибрина, управо да заустављају крварење из повређеног суда. Сужавање крвног суда и стварање тромбоцитног чепа чине примарну фазу хемостазе. Згрушавање крви чини секундарну фазу. Суштина коагулације крви је претварање неактивног протеина крви протромбина у активни тромбин. Тромбин активира неактивни протеин крви фибриноген у фибрин, тако што га разлаже на мономере-који се опет повезују у полимере и граде мрежу у који се хватају еритроцити, леукоцити и тромбоцити (32, 33).

### ***7.1. Спољашњи пут активирања згрушавања крви***

Спољашњи пут активације згрушавања крви започиње повредом зида крвног суда, услед чега се из зида ослобађа ткивни тромбопластин (фактор III). Он се састоји од фосфолипида ткивних мембрана и липопротеинског комплекса. Липопротеински комплекс ткивног фактора се везује са фактором VII, активира га и у његовом присуству заједно са јонима калцијума (фактор IV) активира фактор X. Овај комплекс фактора III и VII, активира још и фактор IX, који спада у унутрашњи пут коагулације и на тај начин се ова два пута згрушавања крви повезују. (35-37)



Слика 8. – Спољашњи пут активирања згрушавања крви

## 7.2. Унутрашњи пут активирања згрушавања крви

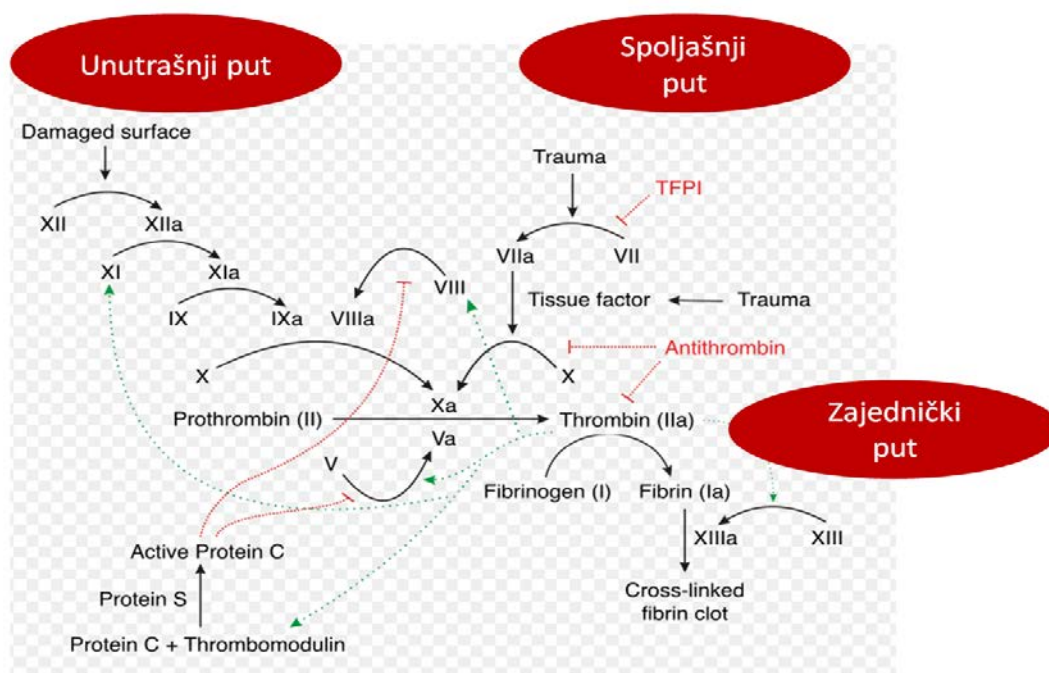
Унутрашњи пут коагулације започиње повредом саме крви или излагањем крви колагену зида оштећеног крвног суда. Повреда крви или контакт крви са колагеном изазива активацију фактора XII (Хагеманов фактор) и ослобађање фосфолипида из активисаних тромбоцита. Активирани фактор XII делује ензимски на фактор XI и активира га. За ову реакцију потребан је и кининоген велике молекулске масе (видети у табели), а и прекаликреин је убрзава. Активирани фактор XI (фактор XIa) сада активира фактор IX. Активирани фактор IX делује заједно са фактором VIII и ослобођеним фосфолипидима из тромбоцита на фактор X и активира га. Фактор VIII је врло значајан за ову активацију и особе код којих је концентрација овог фактора јако смањена су склоне обилом крварењу, односно болују од класичне хемофилије. Даљи ток активације је исти као код спољашњег пута. Фактор X заједно са фактором V и фосфолипидима гради комплекс активатора протробина, који преводи неактивни протромбин у активни тромбин (32, 34).

Спољашњи и унутрашњи пут нису само два одвојена система, већ су она итекако међусобно повезана и активација једног система активира други. Спољашњи пут се активира много брже па у случају тешких повреда до згрушавања може доћи за само 15 секунди. Унутрашњем систему потребно је пар минута (1-6) да доведе до коагулације.



Активирани фактор X (фактор Xa) заједно са фосфолипидима из ткивног фактора гради са фактором V комплекс активатора протромбина. Овај комплекс активира неактивни протромбин у тромбин, који је битан за даљу коагулацију. У почетку је фактор V (проакцелерин) у комплексу у неактивном облику, али кад се активира тромбин долази и до активације овог фактора од стране тромбина. Активирани фактор V сада додатно убрзава коагулацију тј. активацију тромбина. Активирани фактор X може самостално да изазове активацију тромбина, што је на почетку и случај, али активација фактора V вишеструко убрзава овај процес.

Коагулација започиње стварањем активног тромбопластина (тромбокиназа), ензима, који је неопходан за активисање протромбина у тромбин (слика 4). У додиру са оштеченим ендотелом, уз учешће XII чиниоца, антихемофилних глобулина А, В, С, I тромбоцитног тромбопластина (III чинилац) ствара се активни тромбопластин плазме током 4-6 минута. Стварање тромбина је ензимски процес који омогућава претварање протромбина у тромбин током 10-15 секунди. Стварање фибрина (мономер), под дејством тромбина, дешава се брзо. Дејство тромбина је снажно, јер одређена количина тромбина може да коагулише неколико стотина пута веће количине фибриногена. Молекули створеног фибрина се спајају и током 2-3 секунде настаје мрежаста творевина, угрушак (коагулум). (33,34)



Слика 9. – Коагулациона каскада

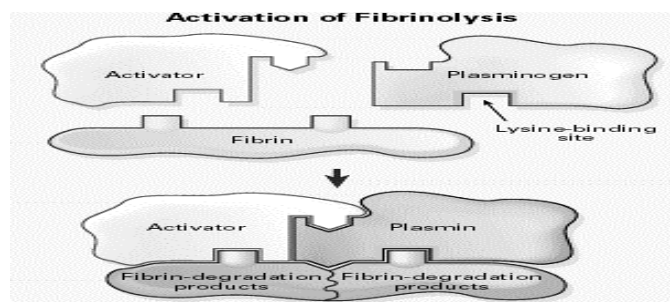


## 7.4. Фибринолиза

Фибринолиза је последња фаза коагулације. У њој се коагулум разграђује под дејством фибринолизина (плазмина), чиме се крвни суд поново чини пролазним за крв. Фибринолизин је у плазми присутан у неактивном облику (плазминоген или профибринолизин). Активисање плазминогена врше се помоћу ензима који се зове активатор фибринолизина. Активатори фибринолизина (плазминогена) доказани су у ткивима али и у неким бактеријама (стрептококе и стафилококе). Деловањем фибринолизина може се доћи до потпуне лизе створеног коагулума и поновног крвављења.

Главни инхибитори плазмина у тромбу су инхибитор активатора плазминогена PAI-1 и на површини ћелија тромбином активирани фибринолитички инхибитор-карбоксипептидаза В (ТАFI). *In vitro* студије су показале да ниво везаног PAI-1 за фибрин директно утиче на резистенцију тромба на фибринолизу. *In vivo* студије су показале да генетски измењене животиње без PAI-1 гена су знатно осетљивије на фибринолизу вештачки изазване артеријске тромбозе од животиња које имају нормалну експресију гена за PAI-1.

Активацију ТАFI врши тромбин и то у комплексу са тромбомодулином на површини ћелија. Показано је да од концентрације ТАFI највише зависи брзина лизирања тромба у *In vitro* условима. (47) У организму се активација плазминогена остварује помоћу ткивног активатора плазминогена и урокиназе. Плазмин поседује велики афинитет за фибрин и нагомилава се у крвном угрушку (јер је богат фибрином). Везивањем за тромбин се активира и разлаже га. Слободни плазмин се у крви брзо инактивише услед дејства ензима  $\alpha_2$  антиплазмин и  $\alpha_2$  макроглобулина. (32)



Слика 11. Модел фибринолизе

## 8. Тестови испитивања поремећаја хемостазе

Функција нормалне хемостазе, игра велику улогу у спречавању губитка крви из неповређеног крвног суда као и заустављање прекомерног крварења из оштећеног крвног суда. Услед поремећаја хемостазе настаје тзв. хеморагијски синдром (HS). Хеморагијски синдром је условљен поремећајем једног или више чинилаца који учествују у хемостази. У дијагностици коагулопатија, данас се користе следећи скрининг тестови: тромбинско време (ТТ), протромбинско време (РТ) и активисано парцијално тромбoplastинско време (РТТ). ТТ мери време претварања фибриногена у фибрин под утицајем тромбина, те су сви остали фактори заобиђени. ТТ је продужено у хипо- и афибриногемима, у присуству инхибитора претварања фибриногена у фибрин, као што су хепарин и присуство FDP (фибрин деградационих продуката) и растворљивих фибринских мономера. Нормално време је 16 - 20 сек. РТ одређује спољашњи и заједнички пут коагулације, те је продужено у дефицитима фактора: F II, F V, F VII, F X и фибриногена. У специјализованим лабораторијама, у дијагностици као и у праћењу терапије, пацијената са мултиплим повредама, користе се специјални тестови за: одређивање појединих чинилаца коагулације, одређивање функције тромбоцита, одређивање Von Willebrand-овог обољења (vWf), тестови за одређивање инхибитора, специјални тестови за DIK и тестови за контролу поремећаја фибринолизе. Код болесника који су добили масивну трансфузију крви, неопходно је контролисати screening тестове хемостазе (најмање РТТ и број тромбоцита). Уколико је РТТ продужен, потребно је применити свеже смрзнуту плазму, а уколико је број тромбоцита снижен, дати концентроване тромбоците. DIK је једини познати синдром у коме се у исто време јављају тромбоза и крвављење. DIK је секундарна појава и компликује и тако тешко стање пацијената. Најчешће је праћен секундарном фибринолизом. Обично је акутни поремећај, али може да се јави и као субакутни и хронични облик. (36)

За испитивање функције тромбоцита користи се апарат који се зове агрегометар, који је неопходан за процену функције тромбоцита у циљу контроле антиагрегационе терапије и индивидуализације терапије, (контрола терапије ацетилсалицилном киселином, тиенопиридинима, блокаторима GP IIb/IIIa рецептора). Ова анализа нам даје информацију о степену инхибираности агрегације тромбоцита након примене антиагрегационе терапије. Увођење ове нове методе има вишеструки значај у лечењу пацијената а могућности апарата су многобројне:

- Могућност одређивања базалне функције тромбоцита (тест неосетљив на аспирин и clopidogrel)
- Тест за одређивање осетљивости на терапију аспирином
- Тест за контролу терапије clopidogrel-ом
- Тест који омогућава процену ефекта GpIIb/IIIa антагониста и код пацијената на терапији аспирином и clopidogrel-ом
- Могућност одређивања GpIb и von Willebrand фактора зависне агрегације тромбоцита
- Контрола квалитета самих мерења ( двоструко мерење сваког узорка )
- Графички и нумерички приказ резултата

Утврђивањем агрегабилности тромбоцита могућа је:

- Процена повећаног кардиоваскуларног ризика и развоја тромбоемболијских поремећаја
- Идентификација пацијената са смањеним или повећаним ризиком од периферног и постоперативног крварења
- Податак о враћању функције тромбоцита у нормалан опсег омогућава безбедно стављање пацијената на оперативни програм

Исправним тумачењем резултата агрегометрије може се деловати превентивно са циљем смањења ризика за нежељене кардиоваскуларне догађаје код ризичних пацијената. (13)

## 9. Концентрати тромбоцита (КТ)

Историја трансфузије тромбоцита почиње шездесетих година 20. века, уочавањем повезаности појаве хеморагијског синдрома и смањеног броја тромбоцита у циркулацији болесника. Повећање броја, као и одржавање функције тромбоцита (Тр) након трансфузије овог лабилног продукта крви у многоне је допринело смањењу смртности болесника са израженим хеморагијским синдромом. До сада разматрана питања, када и зашто примењивати трансфузије тромбоцита, намећу и питања, колико и како их доzirати. Дефинисана је терапијска доза тромбоцита за одрасле особе која треба да садржи изнад  $240 \times 10^9$  тромбоцита или 1 јед. на 10 кг/ТТ. Ову дозу обично чини 4-6 јединица концентрата тромбоцита, или један пул тромбоцита, или једна јединица аферезних тромбоцита. Код мале деце (<20кг) препоручује се примена 10-15 мл/кг из дозе за одрасле. Постизање позитивног ефекта трансфундованих тромбоцита свакако да значајним делом зависи и од квалитета припремљеног продукта. Добијање концентрата тромбоцита (КТ) је метод условљен великим бројем варијабила које појединачно или удружено могу имати сигнификантан утицај на квалитет коначног производа. Стандардизацију препарата концентрованих тромбоцита је веома тешко извршити. На принос тромбоцита утичу следећи фактори: карактеристике даваоца, процедура узимања крви, процесирање крви, чување концентрата тромбоцита пре издавања. (38-40)



Слика 12. Концентрат тромбоцита

## **9.1. Фактори који утичу на квалитет КТ- карактеристике даваоца**

**а) Концентрација тромбоцита** у периферној крви даваоца је најважнији фактор.

Овај захтев је произашао на основу калкулације по којој просечан давалац има око  $220 \times 10^9/L$  тромбоцита. На основу овог прорачуна једна јединица целе крви (СК) требало би да има око  $100 \times 10^9/L$  Тр. Добро оптимизоване методе припреме тромбоцита било из buffy coat-а (ВС) или из плазме богате тромбоцитима (РВТ), требало би да дају коначни принос од око 60% од тромбоцита присутних у СК. Претпоставља се да око 25% давалаца може да има концентрацију тромбоцита нижу од  $200 \times 10^9/L$ . А самим тим и да у 75% контролисаних јединица концентрата тромбоцита треба да буде нормалан бр. тромбоцита у крви, односно  $>45 \times 10^9/L$  у КТ. (38)

**б) Коагулациони статус даваоца**

Стања повишене коагулабилности код даваоца крви, коју не откривамо у току прегледа даваоца, дају нижи принос тромбоцита у концентратима (највероватније услед стварања микрокоагулума или агрегата тромбоцита). (39)

**ц) Липидни статус даваоца**

Нижи приноси тромбоцита добијају се из крви са липемичном плазмом услед промењене густине плазме, а самим тим и промене седиментационих карактеристика ћелија крви. (39)

## **9.2. Фактори који утичу на квалитет КТ – узимање крви**

Процедура узимања крви је друга у низу фактора значајних за принос тромбоцита на које се може утицати.

**а) Количина узете крви**

Концентрате тромбоцита припремамо искључиво из стандардне јединице целе крви од 450 мл  $\pm 10\%$  узете у К4 или К3 кесе.

**б) Дужина процедуре узимања крви**

Оптимално је да донација јединице целе крви (ЦК) траје до 10 минута. Уколико је трајање донације јединице ЦК крви дуже од 12 минута, крв не би требало користити за припрему КТ јер дуже задржавање крви без антикоагуланса у цреву које води у примарну

кесу може довести до адхезије и агрегације тромбоцита и активације ткивног и контактеног пута коагулације услед контакта са страном површином. (39,40)

#### **ц) Прописно и континуирано мешање крви током узимања крви**

Идеално би било користити аутоматске мешалице за мешање крви. Када се користи ручно мешање, кеса са крвљу се мора окретати сваких 30-45 секунди.

### **9.3. Фактори који утичу на квалитет КТ- процесирање крви**

#### **а) Дужина и начин чувања целе крви пре првог центрифугирања**

Цела крв се транспортује и чува на температури 18-22 °С. Цела крв се не сме излагати екстремним температурама. Цела крв треба најмање да одстоји 2 сата након колекције на собној температури (+22 °С до +24 °С). (1,40)

#### **б) Центрифугирање јединица целе крви**

Паковање јединица ЦК у кивете за центрифугирање мора да се уради са великом пажњом да би се избегло прављење "цепова" и неправилно савијање кеса. Параметри за центрифугирање морају се пажљиво оптимизовати (број обртаја, време, убрзање, кочница, температура) за сваку центрифугу и сваки тип кеса. Након центрифугирања кесе са крвљу се морају опрезно водити из кивета водећи рачуна да не дође до мешања исцентрифугираних слојева крви.

#### **ц) Сепарација компонената крви**

Изузетно је важно пребацити сав "buffy-coat" (BC) у кесу за "buffy-coat". Овом процедуром остварује се двострука корист:

1. највећи број тромбоцита (70-90%) наћи ће се у кеси за BC који ће бити коришћен за припрему концентрата тромбоцита;
2. еритроцити ће бити осиромашени леукоцитима за бар 70-80% што је корисно за пацијенте.

#### **д) Складиштење "Buffy-coat"-а (BC)**

Након сепарације неопходно је BC оставити да стоје на собној температури извесно време да би се тромбоцити ресуспендовали (најбоље 2 сата, а најмање 1 сат).

#### **е) Друго центрифугирање "Buffy-coat"-а (BC)**

Брзина другог центрифугирања BC (мањи број обртаја) изузетно је значајна за добар принос тромбоцита у концентрату тромбоцита. За различите центрифуге и различите типове кеса за крв оптимизација програма центрифугирања се мора урадити појединачно.



## 10. Припрема концентрата тромбоцита

Данас је препорука да се тромбоцити издвајају:

1. Из јединице целе крви (узете у четвороструке кесе за припремање тромбоцита из buffy coat-а и троструке кесе за добијање тромбоцита из PRP-а)
2. Тромбоцитаферезом користећи сепараторе крвних ћелија. (1,6)

### *10.1. Начин припреме концентрата тромбоцита из јединице целе крви*

Препарати КТ који се припремају из јединице целе крви су следећи:

- а) Концентрат тромбоцита из плазме богате тромбоцитима (PRP)
- б) Концентрат тромбоцита из појединачног buffy coat-а (BC)
- ц) Пулирани концентрати тромбоцита (из PRP-а или BC-а)
- д) Филтрирани пулирани концентрат тромбоцита (пулирањем појединачних КТ)
- е) Филтрирани пулирани концентрат тромбоцита (пулирање BC и плазме)
- ф) Јединице концентрата тромбоцита мале запремине (43)

### *10.2. Концентрат тромбоцита припремљен из плазме богате тромбоцитима (PRP)*

Концентрат тромбоцита из PRP-а се издваја из јединице целе крви узете у троструку кесу тако што се после првог центрифугирања јединице целе крви на малом броју обртаја издваја PRP. У другој фази PRP се центрифугира на великом броју обртаја, а затим се супернатантна плазма издваја у пратећу интегрисану кесу, а тромбоцити остају у 50-70 мл плазме у којој се ресуспендују (41).

Метода из PRP-а има одређена ограничења. Оштро центрифугирање у другом кораку повећава осетљивост ћелија на одређене стимулусе, као што је активација тромбоцита, сложени ланац реакција доводи до промене облика (од дискоидног до сферичног) и ослобађања садржаја унутрашњих гранула. Зависно од интензитета активације, процес може бити реверзибилан или иреверзибилан. Ипак, иако процес може бити реверзибилан, поновљени циклуси активације и деактивације на крају доводе до дубоких промена у функцији тромбоцита, што је познато као „лезија складиштења”. Обзиром да се овом методом добијају појединачни концентрати тромбоцита бројне су контроверзе о безбедности и ефикасности пулираних концентрата тромбоцита након складиштења и касније трансфузије (42-44). *Sweeny* и аутори су у најновијим

испитивањима показали могућност ресуспендовања тромбоцита у адитивној солуцији за тромбоците (уместо у плазми) и њиховом „pre-storage” пулирању, што одржава ин витро карактеристике чак и до 7 дана (45).

### ***10.3. Концентрат тромбоцита припремљен из појединачног „Buffy-coat”-а (BC)***

Крајем седамдесетих година прошлог века у Европи је почео да се уклања слој buffy coat-а (BC), формиран током центрифугирања између плазме богате тромбоцитима на врху и напакваних еритроцита на дну, како би се на тај начин редуковало присуство микроагрегата и хемолIZE током складиштења јединица еритроцита. Врло брзо након тога уочено је да се из BC могу припремати концентрати тромбоцита и да се принос тромбоцита може значајно повећати ако се за прикупљање целе крви користе “топ анд боттом” кесе (46). Као и много пута у историји медицине, технолошка иновација је омогућила примену нових кеса и нове методе рада: појава стерилне конекције.

У поређењу са методом припреме концентрата тромбоцита из PRP-а, метода из BC омогућава производњу продукта са приближно једнаким садржајем (10% мање контаминације леукоцитима пре леукоредукције), преко 20 мЛ мање еритроцита у јединици еритроцита, али 30-75 мЛ више плазме (47,48). Поред тога, како је први корак центрифугирања оштар, а други лаган, активација тромбоцита индукована методом припреме је много мања.

Јединица целе крви се складишти краће од 24 сата на температури  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , а затим центрифугира како би се издвојио слој BC -а у коме су тромбоцити и леукоцити. Овако центрифугирана крв се најчешће сепарише коришћењем аутоматске опреме, али може да се користи и мануелна метода. BC може да се припреми на два начина (49):

- Класичном методом из четвороструких кеса - током сепарације центрифугиране целе крви одређена количина се плазме се пребацује у кесу, а BC са малом количином плазме се пребацује у другу кесу, остављајући еритроците у оригиналној примарној кеси;
- Коришћењем „*top and bottom*“ кеса –током сепарације центрифугиране целе крви одређена количина плазме се пребацује у кесу додату на врху (*top*), еритроцити се пребацују у другу кесу на дну (*bottom*), остављајући BC са малом количином плазме у оригиналној примарној кеси.

Припремљени концентрати ВС-а се чувају на температури  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  без агитације до даљег процесирања у концентрате тромбоцита, најкасније до 48 сати од давања крви. Тромбоцитни концентрати могу да се производе као појединачни или пулирани.

Метода припреме концентрата тромбоцита из ВС-а даје бројне предности у смислу организације рада у великим трансфузијским центрима – могуће је да се одложи производња концентрата тромбоцита до 24 сата. Супротно методи из PRP-а, где је обавезно процесирање крви унутар 8 сати од колекције, када се јединице целе крви постављају на плоче које убрзано хладе кесе целе крви на температури  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  до 24 сата, сепарација тромбоцита који се припремају из ВС-а може бити одложена до 18 сати (47).

#### **10.4. Пулирање КТ из ВС**

4-6 јединица ВС-а исте АВО крвне групе могу да се пулирају пре центрифугирања. ВС спреман за пулирање је просечног волумена 50 мЛ и хематокрита 0,40 – 0,50. Дилуција пула врши се плазмом (једна од јединица из које је издвојен ВС), или адитивном солуцијом за тромбоците (PAS). PAS одржава функцију тромбоцита и рН боље од плазме (50). ВС могу да се пулирају коришћењем кита за пулирање или ланчаном методом.

##### **10.4.1. Кит за пулирање**

Пулирање ВС може да се врши употребом комерцијалних китова за пулирање. Коришћењем стерилног конектора кесе са ВС се свака појединачно конектују са једним од мултипних крајева кита за пулирање, а затим се додаје плазма или PAS. ВС се пребацују у трансфер кесу запремине 600 мЛ, а плазма или PAS пролази кроз све празне кесе у којима је био ВС како би спрала заостале ћелије. На крају се садржај свих кеса са ВС и приближно 300 мЛ PAS-а или плазме пулира у спојену кесу са укупном запремином од приближно 600 мЛ (38,42). Кеса за пулирање има фабрички спојену кесу за складиштење тромбоцита, а ако је потребно може бити укључен и „in-line“ филтер.

##### **10.4.2. Ланчана метода**

ВС сепарисан из „top and bottom“ кесе може бити пулиран врло ефикасно и економично применом ове методе. Линија на врху кесе за ВС се повезује са линијом на

дну (*bottom*) друге кесе са ВС коришћењем стерилног конектора. На тај начин жељени број ВС се повезује у ланац, а плазма или PAS за дилуцију ВС се спаја за линију на врху ланца. Ланац се окачи са дилентом на врху. Садржај свих ВС се пропушта до ВС на дну, а онда дилуент пролази кроз празне ВС кесе (једну по једну), како би се испрао ВС из њега. Финална кеса има укупну запремину од 600 мЛ ВС који је дилуиран у плазми или PAS. Кеса за складиштење тромбоцита, која може у себи садржати и “in-line”тромбоцитни филтер, спаја се кесом са пулираним ВС.

Кеса са пулираним ВС (припремљеним било применом кита за пулирање или ланчаном методом), са спојеном кесом за складиштење тромбоцита, се центрифугира брзином која омогућава седиментирање еритроцита и леукоцита, остављајући тромбоците суспендоване у супернатанту (плазма или PAS). Услови центрифугирања су кључни за успешну производњу концентрата тромбоцита са високим бројем тромбоцита и ниским бројем леукоцита и еритроцита. Центрифугирани пул се пажљиво вади из центрифуге и поставља у плазма екстрактор или аутоматски апарат за процесирање. Под притиском супернатант богат тромбоцитима се пребацује у кесу за складиштење тромбоцита (могуће кроз филтер, ако је потребно). Кеса са ВС која садржи седиментирани леукоците и еритроците се одбацује (28,51,52).

Термин „*тромбоцити случајног даваоца*“ (*random donor platelets*) означава појединачне или пулиране концентрате тромбоцита произведене из јединице целе крви (53,54). Тромбоцити из 4-6 јединица крви чине терапијску дозу која излаже пацијента значајном ризику трансфузијом преносиве инфекције или алоимунизацији на ХЛА антигене, много већем него приликом трансфузије аферезних тромбоцита.

### **10.5. Филтрирани пулирани концентрати тромбоцита**

Редукција броја леукоцита у хемопродуктима врши се филтерима за уклањање леукоцита. Филтери прве и друге генерације деловали су механички. Задржавајући ћелије (промер пора је износио 170-260  $\mu\text{m}$ , односно 20-40  $\mu\text{m}$ ) они су омогућавали отклањање већине леукоцита и микроагрегата из крви и /или хемопродуката. Употребом оваквих филтера број леукоцита једукован је за 90-99%, што значи да су били довољно ефикасни да превенирају FNHR, али не и за спречавање алоимунизације. (55)

Данас се располаже леукоцитним филтерима који поред механичког задржавања, делују и посредством адсорпције, те много ефикасније отклањају леукоците. Њиховом применом могуће је постићи LD од 4 до 5 Log 10-а (отклањање 99,99% и више леукоцита

из хемопродуката), чиме је могуће знано умањити степен имуномодулацијских ефеката и успешно спречити већину других неповољних ефеката алогених трансфузија. (56,57)

Превенција неповољних ефеката алогених трансфузија је ефикаснија уколико се LD изводи уз помоћ тзв. *In-line* филтера или непосредно по припремању хемопродуката („pre-storage LD”) у поређењу са њиховим отклањањем пре или током терапијске примене („post-storage LD”). Поред тога што су веома ефикасни, савремени *In-line* филтери омогућавају коришћење „затвореног система” јер су саставни део система кеса за прикупљање крви. Њиховом употребом сведена је на најмању меру *in-vitro* продукција инфламацијских цитокина, чиме се поред спречавања алоимунизације примаоца, спречава и појава цитокинима посредована FNHR.

Отклањање леукоцита требало би урадити што пре, док су леукоцити интактни, односно пре но што буду подвргнути апоптози и последичној некрози, и пре но што ослободе распадне продукте, ензиме или цитокине. (39) Филтровање је подједнако ефикасно и за тромбоците добијене из целе крви (PRP или BC метода) или помоћу аферезе (10 на 4 до 10 на 6 резидуалних леукоцита по трансфудованој јединици). По европским стандардима максимална контаминација по јединици концентрованих тромбоцита добијених из целе крви неби требало да буде већа од  $0,2 \times 10^6$  леукоцита. (55)

## **10.6. Аферезни тромбоцити**

Увођење аферезних технологија касних шездесетих година прошлог века омогућило је колекцију најмање једне терапијске дозе тромбоцита (за одрасле) од једног даваоца. У почетку се ова метода примењивала за припрему тромбоцита за пацијенте који су имали рефрактарност на трансфузије стандардних концентрата тромбоцита као резултат ХЛА алоимунизације. Средином осамдесетих година развио се још један тренд примене аферезних тромбоцита за трансфузију, који је подразумевао смањено излагање пацијента већем броју даваоца (које је присутно код стандардних тромбоцита – терапијску дозу чини 4-6 појединачних концентрата тромбоцита) и једноставније снабдевање тромбоцитима (58). Као резултат тог тренда у УСА 2001. године 74 % трансфундованих концентрата тромбоцита су били аферезно прикупљени (30). У већини европских земаља ситуација је супротна, већина трансфундованих концентрата тромбоцита је припремљена из BC-а. Техничке новине које се додају у модерне сепараторе за тромбоцитаферезу доприносе значајном побољшању карактеристика финалног продукта. Модерне аферезне платформе дозвољавају прикупљање тромбоцита

једним венским приступом, са врлом ниским сацајем еритроцита и леукоцита (може даље продукт да се леукоредукује, према врло строгим Европским директивама мање од једног милиона ћелија по јединици је стандард), при чему давалац врло лако подноси процедуру.

Пошто су технологије које користе садашњи лиценцирани аферезни системи за сепарацију и колекцију тромбоцита различите, приказане су разлике у карактеристикама тромбоцитних продуката, углавном односећи се на ниво активације тромбоцита (59,60). Ипак не постоје докази да ове разлике могу да допринесу клиничким разликама када се продукти трансфундују.



*Слика 13. Апарат за припремање тромбоцитних концентрата аферезном процедуром*

Дуго година је плазма била стандардни медијум за складиштење аферезних тромбоцита. Последњих година, у циљу смањења посттрансфузијских реакција које су последица присуства плазме, као и увођења метода патогене инактивације, уведена је адитивна солуција за тромбоците (PAS) и хиперконцентровани концентрати тромбоцита.

Бактеријска сепса удружена са трансфузијом концентрата тромбоцита је и даље најчешћи инфективни ризик за пацијента. Из тог разлога, у бројне земље је уведено рутинско бактериолошко испитивање тромбоцита. Европске директиве дозвољавају продужење рока складиштења концентрата тромбоцита на 7 дана уколико се валидираном методом докаже одсуство бактеријске контаминације (7). У Сједињеним Америчким Државама, FDA (*Food and Drug Administration*) допушта продужење рока тромбоцита на 7 дана ако су прикупљени аферезом на апаратима *Amicus (Baxter)* или *Trima (Gambro)* (59), и ако *BacT-Alert (Biomerieux)* показује негативне резултате испитивања.

У процедури тромбоцитаферезе узима се крв даваоца, обрађује у аферезном апарату и прикупљају само тромбоцити, а све остале компоненте крви се враћају даваоцу, тако да он/она може бити давалац на сепаратору много чешће него што би дао/ла целу крв. Овако прикупљени тромбоцити могу бити леуко-редуковани додатним центрифугирањем или филтрацијом.

Аферезни тромбоцити се могу чувати у плазми или мешавини плазме и PAS-а. Услови чувања су исти као и за стандардне концентрате тромбоцита, обзиром да је то затворен систем. Принос тромбоцита у концентрату добијеном од једног даваоца варира и зависи од самог даваоца, врсте апарата и процедуре, али је у просеку еквивалент најмање 3 до 13 концентрата тромбоцита случајних давалаца (7,60).

Термин „*тромбоцити једног даваоца*“ (*single donor platelets*) означава тромбоците добијене од једног даваоца поступком тромбоцитаферезе (39,53). Тако се добија прихватљива терапијска доза тромбоцита од једног даваоца. Метода показује предност у смислу редукције ризика трансфузијом преносиве инфекције и ХЈА алоимунизације.

## ***10.7. Јединице концентрата тромбоцита мале запремине***

На захтев клиничара, припремају се јединице КТ мале запремине, тако што се јединица концентрата тромбоцита центрифугира (добijена из ВС или PRP), затим се из ње одлије један део плазме у трансфер кесу која је премошћена апаратом за стерилну конекцију са јединицом КТ. Редукција волумена на око 25 мл/јединици доводи до губитка око 10% тромбоцита. Време ускладиштења после редукције волумена ових концентрата тромбоцита је 6 сати. (7,53,60)

### **10.7.1. Дељење аферезних тромбоцита**

Принос тромбоцита добијен једном аферезном процедуром може бити велики за складиштење у једној кеси. Већина сетова за аферезно давање има две кесе за складиштење које дозвољавају да се продукт подели и чува са адекватним дотоком кисеоника. Најчешће је принос тромбоцита у свакој кеси довољан да се примени као стандардна терапијска доза за одрасле (приближно  $240 \times 10^9$  по кеси, не мање од  $200 \times 10^9$ ), и свака кеса се може применити другом пацијенту. У неким случајевима ако друга кеса не може да задовољи стандардну терапијску дозу, може да се подели даље на мање јединице које су погодне за педијатријску примену (више од од  $60 \times 10^9$  тромбоцита у 40-60 мЛ плазме или PAS-а по кеси) (7,60).



## 11. Складиштење тромбоцита

Тромбоцити морају да се чувају у условима који гарантују да ће бити оптимално очуване њихова вијабилност и хемостатске активности:

- а) Пластичне кесе намењене за складиштење КТ морају бити довољно пермеабилне за гасове, да би обезбедиле снабдевање тромбоцита кисеоником.
- б) Температура складиштења треба да буде од + 20 °С до + 24 °С. (7,53)
- ц) Мешање (мућкање) концентрата тромбоцита током складиштења мора да буде довољно ефикасно да гарантује снабдевање кисеоником, али при томе да буде што је могуће нежније (најбоље 40-60 покрета/мин.). За чување КТ се користе специјално конструисане мешалице смештене искључиво у амбијенту са контролисаном температуром. (60)
- д) Дужина складиштења концентрата тромбоцита се за сада код нас не препоручује да траје више од 5 дана, иако се вијабилност тромбоцита под оптималним условима одржава током 7 дана. Пулирани тромбоцити се могу употребљавати до 5 дана, уколико је за њихову производњу употребљен апарат за стерилно силирање пластичних цеви. (42)



Слика 14. Агитатор за складиштење тромбоцита

## 12. Адитивни раствор за чување тромбоцита (PAS)

Идеја да се тромбоцити могу складиштити у вештачком медијуму који не садржи плазму први пут се јавила 1950-тих година (61). Међутим, тек 1985. године су приказани први резултати испитивања ин витро квалитета тромбоцита складиштених у медијуму који садржи свега 15 % плазме, а који су после 72 сата складиштења на собној температури били скоро једнаких параметара са тромбоцитима складиштеним у 100 % плазме даваоца (62). Од тада до данас адитивни раствори за чување тромбоцита су стално унапређивани у свом саставу, тако да до сада постоје три генерације ових раствора: PAS-I, PAS-II (T-Sol, SSP), PAS-III (InterSol) и модификовани PAS- III (PAS-III-SSP+, Composol-PS).

Примена PAS-а показује бројне предности у односу на плазму која се стандардно користи као медијум за чување тромбоцита, како у смислу побољшања квалитета КТ, тако и за саме пацијенте. Пре свега, смањена је количина плазматске фракције у КТ, што смањује инциденцу посттрансфузијских алергијских и фебрилних реакција, већа је могућност примене АБО-инкомпатибилних трансфузија тромбоцита, а, такође, већа је количина плазме доступна за друге намене (нпр. фракционисање) (63,64). Теоретски, из истог разлога узрокована трострука до четворострука дилуција антитела смањује ризик појаве ТРАЛИИ-а (акутно оштећење плућа узроковано трансфузијом). Примена PAS-а дозвољава фотохемијски процес патогене инактивације КТ, који представља тренд савремене трансфузиолошке праксе, обзиром да је низак садржај плазме у КТ (<35%) предуслов за неке од метода патогене инактивације (65).

Највећи број адитивних солуција за тромбоците садржи ацетат у свом саставу као хранљиви медијум за тромбоците, који је основни супстрат за одвијање нормалног тромбоцитног метаболизма, смањује продукцију лактата, а повећава продукцију бикарбоната, те стабилизује рН. Поред тога, ацетат има и алкилизирајући ефекат, па се самим тим понаша као пуфер. У састав PAS-а такође улази и фосфат који има двоструки ефекат на метаболизам тромбоцита. Поред тога што се понаша као пуфер, фосфат такође стимулише и процес гликолизе, што може довести до значајног пада рН, али и продукције већих нивоа АТП-а који омогућавају већу вијабилност тромбоцита.

Испитивања BEST групе (*Biomedical Excellence for Safer Transfusion*) у оквиру Интернационалног удружења за трансфузију крви (ИСБТ) су потврдила вишеструко важну улогу магнезијума и калијума у саставу PAS-а (PAS-III). Додатком ових електролита смањује се активација и агрегација тромбоцита, одржава морфолошки скор и

смањује продукција лактата. Ин витро квалитет тромбоцита складиштених у PAS-IIIМ је статистички значајно побољшан у поређењу са квалитетом тромбоцита складиштених у стандардном PAS-у (66-69).

У састав већине солуција улази натријум-хлорид и цитрат (минимална концентрација је 8 ммол/л како би се спечила коагулација), а испитивања су показала и да Л-карнитин има повољан ефекет на складиштење тромбоците, инхибирајући метаболизам тромбоцита и апоптозу. Састав различитих солуција за припрему и складиштење тромбоцита приказан је у табели 2.

<b>g/L</b>	<b>PAS-II T-Sol (Baxter Fenwal)</b>	<b>PAS-III InterSol (Baxter Fenwal)</b>	<b>Composol (Fresenius)</b>	<b>PAS-IIIМ SSP+ (Macopharma)</b>
<b>NaCl</b>	6,75	4,52	5,26	4,05
<b>KCl</b>	-	-	0,37	0,37
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	-	-	0,30	0,30
<b>Na<sub>3</sub>-citrat</b>	10	11	11	10
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	-	28	-	26
<b>Na-acetat</b>	30	33	27	30
<b>Na-glukonat</b>	-	-	23	-

*Табела 2. Састав различитих раствора за чување тромбоцита*

Бројна испитивања показују да је очуван квалитет КТ припремљених и складиштених на овај начин (70,71), мада примена појединих врста PAS-а може бити удружена са нижим приносом тромбоцита у концентратима или нижим коригованим приносом тромбоцита (CCI) код пацијената у поређењу са стандардним КТ ресуспендованим у плазми (72,73). Разлог томе је управо смањена количина плазме и плазматских фактора који су неопходни за одржавање интегритета и адекватан опоравак тромбоцита, а у мањој мери утицај других чинилаца, као што су микроагрегација, фрагментација и апоптоза.

### 13. Контрола квалитета КТ

Тестови праћења квалитета састоје се у редовном тестирању случајно одабраних узорака компонената крви са циљем праћења, анализе и унапређења процеса рада како би се добили жељени производи. Препорука директиве ЕУ је да, тамо где је могуће, треба тестирати 1% свих производа крви (7).

Захтеви контроле квалитета КТ захтевају следеће параметре:

- Запремина > 40 мЛ на  $60 \times 10^9$  тромбоцита (за све јединице),
- Број тромбоцита >  $60 \times 10^9$  (1% свих јединица уз најмање 10 јединица месечно),
- Број резидуалних леукоцита <  $0,05 \times 10^9$  (1% свих јединица уз најмање 10 јединица месечно),
- рН измерен на крају препорученог рока трајања > 6,4 (1% свих јединица уз најмање 4 јединице месечно).

Поред обавезних тестова система квалитета препоручује се и одређивање стерилности КТ,  $pO_2$  и  $pCO_2$ , као и одређивање функције тромбоцита у концентратима. Могуће је, такође, одредити и функцију тромбоцита кроз тест агрегације тромбоцита, као и нивое маркера активације као што су експресија CD62P и CD63, активација гликопротеина IIb/IIIa, гликопротеина Ib, активност тромбоцитног фактора 3, отпуштање  $\beta$ -тромбоглобулина и тромбоцитног фактора 4.

## 14. АГРЕГАЦИЈА ТРОМБОЦИТА

Агрегацију тромбоцита као лабораторијски тест за процену функције тромбоцита увео је Gustav VR Born 1962.године, и оригинална метода је још увек у употреби. Она мери прозачност светла у мутној плазми богатој тромбоцитима (PRP). Кад тромбоцити агрегирају након стимулације различитим агонистима, замућеност раствора се смањује и више светла пролази кроз PRP. Ове промене у прозачности светла се анализирају и корелирају са променом облика тромбоцита, агрегацијом или дисагрегацијом, ако је присутна (74,75). Слаби агонисти, као што су епинефрин или АДП у ниској концентрацији, показују бифазну кривуљу агрегације, иницијални талас се замењује таласом агрегације. Јаки агонисти, као што су колаген, тромбин или АДП у високој концентрацији, углавном превазилазе прву фазу промене облика и изазивају брз агрегациони одговор.

Дуги низ година у употреби је била класична метода светлосне агрегометрије, док се данас најчешће примењује импедантна агрегометрија, која мери електричну импеданцу између малих електрода уроњених у крв, а кинетика измене импеданце рефлектује агрегацију тромбоцита након додавања агониста (76).

Агрегометрија се, осим за мерење функције тромбоцита у КТ, користи и за праћење ефекта антиромбоцитних лекова (аспирин, клопидогрел), испитивање функције тромбоцита код пацијената који се припремају за хируршку интервенцију, а претходно су били на антиромбоцитној терапији, праћење пацијената који примају трансфузије тромбоцита, као и у дијагностици различитих поремећаја функције тромбоцита, као што су Glanzmann-ова тромбастенија, Bernard-Soulier-ов синдром, Hermansky-Pudlak-ов синдром, von Willebrand-ова болест и др (76,77).

## **II. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ:**

### **A) ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ**

Примарни циљеви овог испитивања су:

1. испитати квалитет концентрата тромбоцита добијених издвајањем из “buffy coat”– а одређивањем хематолошких параметара (број тромбоцита, број резидуалних леукоцита и еритроцита), гасних анализа и рН првог, трећег и петог дана складиштења;
2. испитати стерилност концентрата тромбоцита добијених издвајањем из “buffy coat”-а током целог периода складиштења;
3. испитати степен агрегације тромбоцита у концентратима тромбоцита припремљеним из “buffy coat”-а методом импедантне агрегометрије;
4. на основу добијених резултата утврдити да ли су припремљени концентрати тромбоцита добијени издвајањем из “ buffy coat ”–а сагласни са критеријумима Водича Савета Европе;
5. утврдити факторе побољшања и стандардизације квалитета концентрата тромбоцита добијених издвајањем из “buffy coat”-а.

### **B) ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ:**

1. У условима адекватног складиштења, смањује се број тромбоцита у припремљеним концентратима, али је до краја складиштења тај број у оквиру прописаних параметара контроле квалитета;
2. Концентрати тромбоцита задржавају минималан број леукоцита у свом саставу, што смањује ризик трансфузијских реакција;
3. Постоје биохемијске промене у припремљеним концентратима тромбоцита са последичним променама интрацелуларног метаболизма, које се огледају у промени рН, рО<sub>2</sub> и рСО<sub>2</sub>;
4. Концентрати тромбоцита задржавају стерилност до краја рока складиштења, како на присуство аеробних, тако и анаеробних бактерија;

5. Постоји смањење тромбоцитне функције у припремљеним концентратима током складиштења, али тромбоцити задржавају своју функцију тј. одређени степен агрегације све до петог (последњег) дана складиштења.
6. Примена концентрата тромбоцита који су складиштени у прописаним условима је ефикасна и безбедна током целог рока чувања тромбоцита;
7. У циљу побољшања квалитета концентрата тромбоцита важно је складиштити их у прописаним условима и издвојити све факторе који могу бити од значаја за промену квалитета продукта.

### **III. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА**

#### **A. Врста студије**

Истраживање је дизајнирано као експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*. Да би се реализовало истраживање добијена је сагласност Етичког одбора Клиничког центра у Нишу и Завода за трансфузију крви Ниш.

Истраживање је спроведено у следећим здравственим установама:

-у Заводу за трансфузију крви Ниш, где су се припремали концентрати тромбоцита и извршено функционално испитивање тромбоцита методом импедантне агрегометрије,

-на Клиници за хематологију Клиничког центра у Нишу, где су урађена хематолошка испитивања концентрата тромбоцита,

- у Центру за медицинску биохемију Клиничког центра у Нишу, где су извршена биохемијска испитивања,

- у Институту за јавно здравље у Нишу, где се пратила бактериолошка исправност припремљених концентрата.

#### **B. Популација која се истражује**

Истраживање је обухватило испитивање квалитета 80 концентрата тромбоцита припремљених у Заводу за трансфузију крви у Нишу, према стандардној процедури припреме тромбоцита из “buffy coat”-а. Концентрати тромбоцита припремљени су из јединица целе крви добровољних давалаца крви оба пола, нереактивних на маркере трансмисивних болести, уредних лабораторијских и хематолошких параметара, који нису узимали антиагрегацијске лекове уназад 7 дана од давања крви. Из истраживања су искључени хилозни или хемолизирани концентрати.

#### **B. Ток истраживања**

Ово испитивање састоји се из:

1. Припреме концентрата тромбоцита из јединица крви добровољних давалаца издвајањем из “buffy-coat”-а,
2. Испитивања хематолошких параметара квалитета концентрата тромбоцита,
3. Испитивања биохемијских *in vitro* параметара квалитета концентрата тромбоцита,



4. Испитивања агрегабилности тромбоцита у концентрата тромбоцита ,
5. Испитивања стерилности концентрата тромбоцита .

## Г. Методологија истраживања

### 1. Припрема концентрата тромбоцита

Крв од добровољних давалаца је прикупљена у систем четвороструких пластичних кеса које садрже 63 мл антикоагулантног раствора CPD и 100 ml адитивног раствора за складиштење еритроцита SAGM (*Jiaxing Tiahne Pharmaceutical*). Све јединице крви у испитивању су складиштене на собној температури (20-24° C) и у року од 6 сати од колекције центрифугиране 15 минута на 3200 обртаја и температури од 22° C (центрифуге за крв са хлађењем, *Heraus, Cryofuga 8500i*), а затим је вршена аутоматска сепарација на апаратима *T-ACE II (Terumo)*. На тај начин из сваке јединице целе крви произведени су концентрат еритроцита, јединица плазме и тромбоцитно-леукоцитни слој – „buffy coat“, који је остављен да стоји на собној температури два сата.



Слика 15. Центрифугирање јединица целе крви



Слика 16. Аутоматска сепарација јединица целе крви на апаратима *T-ACE II*



Слика 17. Аутоматска сепарација „buffy coat“-а



Слика 18. Одмарање „buffy coat“-а

Након тога „buffy coat“ је центрифугиран 8 минута на 1100 обртаја и температури од 22° С, концентрати тромбоцита даље пребачени у кесе које омогућавају чување тромбоцита до пет дана, остављени су кратко време на равној површини (како би тромбоцити дезагрегирани), етикетирани (ISBT 128) и складиштени хоризонтално на агитатору (*Teknolabo Instruments, Italy*) до истека рока складиштења (5 дана).



Слика 19. Издвајање „buffy coat“-а



Слика 20. Издајање концентрата  
тромбоцита

## 2. Испитивање квалитета концентрата тромбоцита

Квалитет концентрата тромбоцита процењен је на основу запремине продукта и параметара испитивања из узорака концентрата тромбоцита. Из испитивања су искључени концентрати тромбоцита запремине мање од <20% стандардне запремине продукта, хилозни, хемолизирани и на било који начин контаминирани концентрати тромбоцита.

Из сваког концентрата тромбоцита узета су по три узорка, и то првог (КТ1), трећег (КТ3) и петог дана складиштења (КТ5). Из свих узорака концентрата тромбоцита одређени су следећи параметри:

-**хематолошке анализе** – концентрација тромбоцита, резидуалних еритроцита и леукоцита на апарату *Abbott Cell-Dyn Ruby (Abbott Laboratories)*,

-**гасне анализе**–  $pO_2$ ,  $pCO_2$  на апарату *AVL Compact 3 Blood Gas Analyzer (Roche Diagnostics)*,

-**pH** - на апарату *CyberScan pH510 (Eutech Instruments, Holandija)*,

-**бактериолошка исправност тромбоцита** - на апарату *BacT/ALERT 3D (Biomérieux, Француска)*: испитивани узорци се засејавају у по једну бочицу за аеробне (BPN) и једну за анаеробне бактерије (BPA). Засејане подлоге у бочицама се инкубирају 7 дана на 37° C. Сензор у систему детектује промене боје специфично дизајнираних подлога, осетљивих на промену концентрације угљен-диоксида. Ако бактерије расту, повећана је

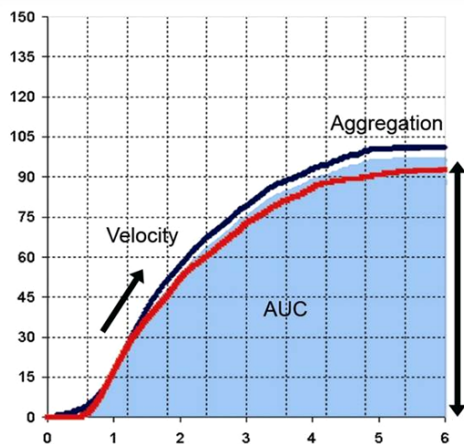
концентрација угљен диоксида која доводи до промене боје на бази бочице, а то систем детектује и сигнализира звучним и визуелним сигналом.

**-агрегација тромбоцита** – методом импедантне агрегометрије на апарату (*Multiplate analyzer, Roche*): метода мери агрегацију тромбоцита који су *ex vivo* стимулирани применом различитих тромбоцитних агониста (нпр. аденозин дифосфат, арахидонска киселина, колеган). Мултиплате тест ћелије имају две независне мерне јединице, од којих је свака састављена од две бакарне, сребром обложене електроде висине 3,2 mm и дијаметра 0,3 mm. Процедура подразумева мешање 150µL концентрата тромбоцита са 450 µL пуфера (0,81 % NaCl, 0,0067 M PO<sub>4</sub>, pH = 7,2) у одговарајућој тест ћелији. Након инкубације на 37°C у трајању од три минута додаје се 20 µL изабраног агониста, и то 3,2; 6,4 и 9,6 µг колагена/мЛ. Узорак крви са додатим агонистом се аутоматски меша (800 U/мин) коришћењем магнетне мешалице обложене поли-тетра-флуоро-етиленом (PTFE). Активирани тромбоцити адхерирају на електроде и појачавају електричну импеданцу између њих која се региструје у току 6 минута, а пораст импеданце се преводи у произвољне агрегацијске јединице (*arbitrary aggregation units (AU)*).

Најважнији параметри који се прате у току тестирања на *Multiplate analyzer* -у јесу: површина испод агрегацијске криве (AUC), која је директно зависна од висине криве, а показује укупну активност тромбоцита, висина агрегацијске криве, која показује степен агрегације тромбоцита и максимални нагиб агрегацијске криве, који показује брзину агрегације тромбоцита.



Слика 20. Импедантни агрегометар (*Multiplate analyzer, Roche*)



- **Aggregation:** повећанје impedance u toku analize
- **Velocity:** max. nagib (brzina) agregacije
- **AUC:** površina ispod agregacione krive- najprihvatljiviji parametar

Слика 21. Параметри тестирања на импедантном агрегометру

#### Д. Статистичка обрада података

Статистичка анализа података рађена је у програмском пакету SPSS 20.0. Континуалне варијабле су представљене аритметичком средином, стандардном девијацијом (SD), медијаном (Me), минималним и максималним вредностима. Квалитативна обележја испитиваних променљивих представљена су учесталошћу (n) и процентуално (%).

Нормалност дистрибуције континуалних варијабли, у зависности од величине узорка, испитивана је Kolmogorov-Smirnov или Shapiro-Wilk-овим тестом. Тестирање значајности разлике у оквиру група за поновљена мерења вршено је Студентовим т-тестом упарених узорака за нормалну, односно Wilcoxonovim тестом ранга за варијабле чија дистрибуција одступа од нормалне. Тестирање значајности разлике у оквиру две различите групе вршено је Mann Whitney U тестом за варијабле чија дистрибуција одступа од нормалне.

За тестирање статистичке значајности разлика апсолутних фреквенција између узорака коришћен је Pearson-ов  $\chi^2$  тест.

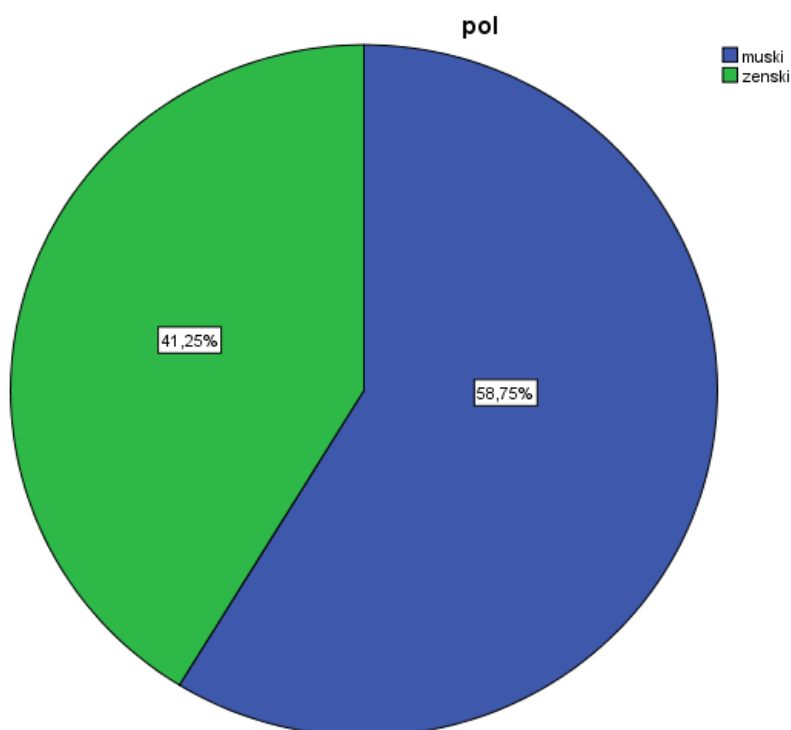
Ефекат различитих концентрација на промене праћених варијабли током времена утврђиван је анализом варијансе за поновљена мерења (RMANOVA), односно Friedman-овим тестом за варијабле чија дистрибуција одступа од нормалне.

## IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

### Демографске карактеристике

#### 1.Разлика у броју мушкараца и жена:

		pol			
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Muski	47	58,8	58,8	58,8
	zenski	33	41,3	41,3	100,0
Total		80	100,0	100,0	



У испитиваном узорку има 47 мушкараца (58,8%) и 33 жене (41,3%), дакле мушкараца има више.

## 2. Просечна старост мушкараца и жена:

Descriptives				
	pol		Statistic	Std. Error
starost	muski	Mean	37,68	1,820
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	34,02
			Upper Bound	41,34
		5% Trimmed Mean		37,38
		Median		36,00
		Variance		155,700
		Std. Deviation		12,478
		Minimum		18
		Maximum		64
		Range		46
	Interquartile Range		18	
	Skewness		,371	,347
	Kurtosis		-,791	,681
	zenski	Mean	36,73	1,903
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	32,85
			Upper Bound	40,60
		5% Trimmed Mean		36,58
		Median		37,00
		Variance		119,517
		Std. Deviation		10,932
Minimum			18	
Maximum			60	
Range			42	
Interquartile Range		18		
Skewness		,136	,409	
Kurtosis		-,831	,798	

Просечна старост мушкараца износи 37,68 година  $\pm$ 12, 478. Најмлађи испитаник има 18, а најстарији 64 године. Медијана за године живота мушкараца износи 36.

Просечна старост жена износи 36,73 године  $\pm$  10,932. Најмлађи испитаник има 18, а најстарији 60 година. Медијана за године живота жена износи 37.

### 3. Разлика у старости давалаца према полу:

#### Тест нормалности расподеле

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
starost	muski	,122	47	,075	,960	47	,105
	zenski	,094	33	,200*	,976	33	,662

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

За одређивање нормалности расподеле коришћен је Тест нормалности и то Shapiro-Wilk, јер за обе групе испитаника имамо мање од 50, мушкараца 47, а жена 33.



## T тест независних узорака

**Group Statistics**

	pol	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
starost	muski	47	37,68	12,478	1,820
	zenski	33	36,73	10,932	1,903

**Independent Samples Test**

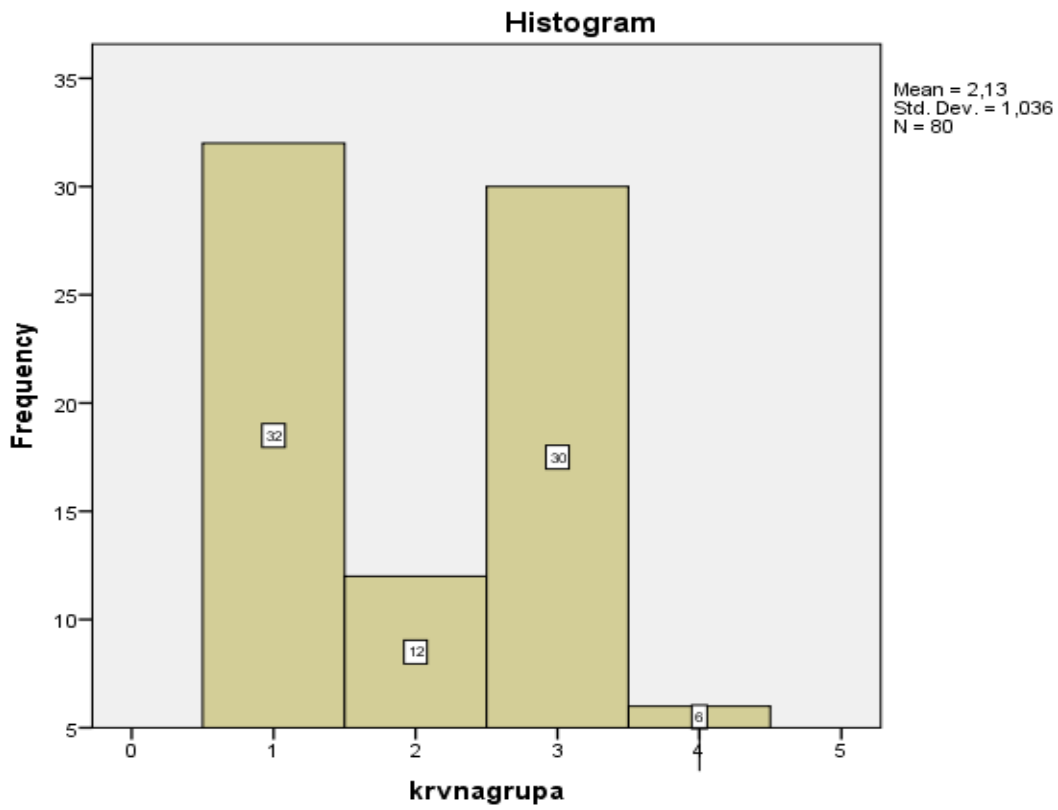
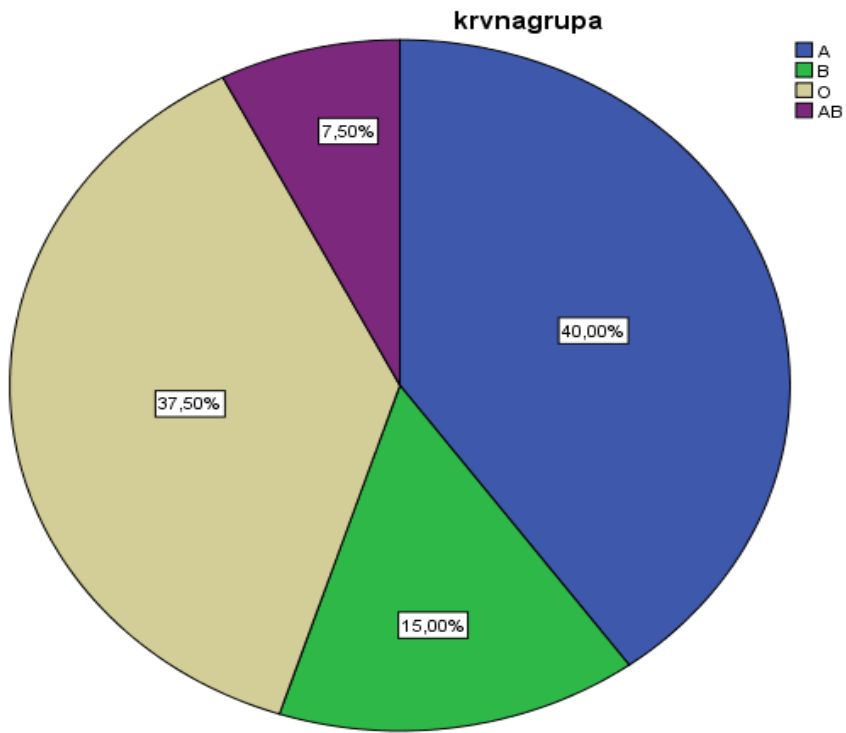
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
starost	Equal variances assumed	,903	,345	,354	78	,724	,954	2,695	-4,413	6,320
	Equal variances not assumed			,362	74,154	,718	,954	2,633	-4,293	6,200

Коришћењем T теста независних узорака и тумачењем Levene's теста за једнакост варијанси чији sig износи 0,345 ( $p > 0,05$ ), узимамо вредност sig (2 tailed) 0,724 ( $p > 0,05$ ) и закључујемо да не постоји статистички значајна разлика у старости давалаца према полу.

#### 4. Дистрибуција према крвно-групној припадности

krvnagrupa				
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
A	32	40,0	40,0	40,0
B	12	15,0	15,0	55,0
Valid O	30	37,5	37,5	92,5
AB	6	7,5	7,5	100,0
Total	80	100,0	100,0	

Од укупно 80 испитаника, њих 32 има А крвну групу, односно 40 %, на другом месту је О крвна група коју има 30 испитаника, односно 37,5%, на трећем месту су испитаници са Б крвном групом, њих 12 (15%) и на четвртном месту су испитаници са АБ крвном групом, њих 6 (7,5%).



## 1. Запремина

Descriptives			Statistic	Std. Error
	Mean		58,7525	,43811
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	57,8805	
		Upper Bound	59,6245	
	5% Trimmed Mean		58,7217	
	Median		58,8700	
	Variance		15,356	
VOLUMEN	Std. Deviation		3,91862	
	Minimum		50,78	
	Maximum		68,77	
	Range		17,99	
	Interquartile Range		5,52	
	Skewness		,031	,269
	Kurtosis		-,209	,532

Просечна вредност запремине износи  $58,75 \pm 3,92$ . Минимална вредност запремине је 50,78, а максимална вредност запремине износи 68,77. Пошто је минимална вредност запремине 50,78, сви узорци испуњавају задати критеријум од 40 mL.

## 2. а) Анализа еритроцита (RBC ) по данима

Descriptives			Statistic	Std. Error
	Mean		,0046	,00115
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	,0023	
	Mean	Upper Bound	,0069	
	5% Trimmed Mean		,0028	
	Median		,0000	
	Variance		,000	
<b>RBCKT1</b>	Std. Deviation		,01030	
	Minimum		,00	
	Maximum		,05	
	Range		,05	
	Interquartile Range		,01	
	Skewness		3,022	,269
	Kurtosis		9,800	,532
	Mean		,0068	,00123
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	,0043	
	Mean	Upper Bound	,0092	
	5% Trimmed Mean		,0053	
	Median		,0000	
	Variance		,000	
<b>RBCKT3</b>	Std. Deviation		,01100	
	Minimum		,00	
	Maximum		,05	
	Range		,05	
	Interquartile Range		,01	
	Skewness		1,854	,269
	Kurtosis		3,394	,532
	Mean		,0104	,00163
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	,0071	
	Mean	Upper Bound	,0136	
	5% Trimmed Mean		,0089	
<b>RBCKT5</b>	Median		,0000	
	Variance		,000	
	Std. Deviation		,01462	
	Minimum		,00	
	Maximum		,06	

Range	,06	
Interquartile Range	,02	
Skewness	1,404	,269
Kurtosis	1,212	,532

**Просечна вредност концентрације еритроцита првог дана** износи  $0,0046 \pm 0,01030$ . Минимална вредност износи 0,00, а максимална вредност износи 0,05.

**Просечна вредност концентрације еритроцита трећег дана** износи  $0,0068 \pm 0,01100$ . Минимална вредност износи 0,00, а максимална 0,05.

**Просечна вредност концентрације еритроцита петог дана**  $0,0104 \pm 0,1462$ . Минимална вредност износи 0,00, а максимална износи 0,06.

## б) Анализа леукоцита (WBC) по данима

### Први дан

Descriptives			Statistic	Std. Error
	Mean		,00699	,000480
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	,00603	
	Mean	Upper Bound	,00794	
	5% Trimmed Mean		,00689	
	Median		,00600	
	Variance		,000	
WBCKT1	Std. Deviation		,004297	
	Minimum		,000	
	Maximum		,017	
	Range		,017	
	Interquartile Range		,003	
	Skewness		,073	,269
	Kurtosis		-,181	,532

Просечна вредност концентрације леукоцита првог дана износи  $0,00699 \pm 0,004297$ .

Минимална вредност износи 0,000, а максимална вредност износи 0,017.

## Трећи дан

Descriptives			Statistic	Std. Error
	Mean		,00773	,000430
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,00687	
		Upper Bound	,00858	
	5% Trimmed Mean		,00774	
	Median		,00700	
	Variance		,000	
WBCKT3	Std. Deviation		,003842	
	Minimum		,000	
	Maximum		,016	
	Range		,016	
	Interquartile Range		,004	
	Skewness		-,036	,269
	Kurtosis		,195	,532

Просечна вредност концентрације леукоцита трећег дана износи  $0,00773 \pm 0,003842$ .

Минимална вредност износи 0,000, а максимална 0,016.



## Пети дан

Descriptives			Statistic	Std. Error
	Mean		,01209	,002094
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,00792	
		Upper Bound	,01626	
	5% Trimmed Mean		,00949	
	Median		,00900	
	Variance		,000	
WBCKT5	Std. Deviation		,018731	
	Minimum		,000	
	Maximum		,140	
	Range		,140	
	Interquartile Range		,005	
	Skewness		5,966	,269
	Kurtosis		36,796	,532

Просечна вредност концентрације леукоцита петог дана  $0,01209 \pm 0,018731$ .

Минимална вредност износи 0,000, а максимална износи 0,140.

## ц) Анализа тромбоцита (PLT) по данима

### Први дан

Descriptives			Statistic	Std. Error
	Mean		62,1661	,27014
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	61,6284	
	Mean	Upper Bound	62,7038	
	5% Trimmed Mean		62,2451	
	Median		62,1900	
	Variance		5,838	
PLTKT1	Std. Deviation		2,41621	
	Minimum		52,46	
	Maximum		68,24	
	Range		15,78	
	Interquartile Range		2,24	
	Skewness		-,733	,269
	Kurtosis		3,641	,532

Просечна вредност концентрације тромбоцита првог дана износи  $62,1661 \pm 2,41621$ .

Минимална вредност износи 52,46, а максимална вредност износи 68,24.

## Трећи дан

### Descriptives

		Statistic	Std. Error
	Mean	60,9148	,26130
	95% Confidence Interval for Lower Bound	60,3946	
	Mean Upper Bound	61,4349	
	5% Trimmed Mean	61,0861	
	Median	61,1900	
	Variance	5,462	
PLTKT3	Std. Deviation	2,33712	
	Minimum	50,55	
	Maximum	65,48	
	Range	14,93	
	Interquartile Range	1,91	
	Skewness	-1,750	,269
	Kurtosis	6,124	,532

**Просечна вредност концентрације тромбоцита трећег дана** износи  $60,9148 \pm 2,33712$ .

Минимална вредност износи 50,55 а максимална вредност износи 65,48.

## Пети дан

### Descriptives

		Statistic	Std. Error
	Mean	59,6418	,27703
	95% Confidence Interval for Lower Bound	59,0903	
	Mean Upper Bound	60,1932	
	5% Trimmed Mean	59,8817	
	Median	60,3150	
	Variance	6,140	
PLTKT5	Std. Deviation	2,47787	
	Minimum	48,26	
	Maximum	63,37	
	Range	15,11	
	Interquartile Range	2,31	
	Skewness	-2,130	,269
	Kurtosis	6,345	,532

**Просечна вредност концентрације тромбоцита петог дана** износи  $59,6418 \pm 2,47787$ .

Минимална вредност износи 48,26, а максимална вредност износи 63,37.

**д) Испитивање постојања статистички значајне разлике вредности током складиштења**

**Тест нормалности**

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
RBCKT1	,411	80	,000	,508	80	,000
RBCKT3	,368	80	,000	,669	80	,000
RBCKT5	,311	80	,000	,741	80	,000
PLTKT1	,135	80	,001	,923	80	,000
PLTKT3	,187	80	,000	,852	80	,000
PLTKT5	,235	80	,000	,798	80	,000
WBCKT1	,234	80	,000	,906	80	,000
WBCKT3	,227	80	,000	,909	80	,000
WBCKT5	,372	80	,000	,307	80	,000

a. Lilliefors Significance Correction

За све испитиване параметре користимо Kolmogorov-Smirnov тест јер у анализи учествује више од 50 испитиваних случајева (df 80). За све испитиване параметре вредност sig < 0.05, из чега следи да подаци не прате нормалну расподелу. Користимо не параметарски Friedmanov тест ради поређења вредности еритроцита, леукоцита и тромбоцита током првог, трећег и петог дана.

## Еритроцити

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of RBCKT1, RBCKT3 and RBCKT5 are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Резултати овог теста показују да **постоји статистички значајна разлика вредности током складиштења еритроцита првог, трећег и петог дана**, на шта нам указује вредност  $\text{sig}=0.000$  ( $<0.05$ ). Следећи корак су накнадни тестови поређења временских тачака од интереса коришћењем Wilcoxonovог теста ранга уз корекцију алфа нивоа који износи 0,025.

### Поређење првог и трећег дана

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between RBCKT1 and RBCKT3 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,002	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

### Поређење трећег и петог дана

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between RBCKT3 and RBCKT5 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

У оба случаја је вредност  $\text{sig}<0.025$ , ( $\text{sig}=0.002$  и  $\text{sig}=0.000$ ), па **закључујемо да постоји статистички значајна разлика у вредностима концентрације еритроцита првог и трећег, односно трећег и петог дана.**

	Mean Rank
RBCKT1	1,74
RBCKT3	1,97
RBCKT5	2,29

Поредећи средње вредности рангова за три скупа резултата (Mean Ranks), видимо да вредност и концентрације еритроцита расту са временом.

### Леукоцити

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of WBCKT1, WBCKT3 and WBCKT5 are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Резултати овог теста показују да постоји статистички значајна разлика вредности током складиштења леукоцита првог, трећег и петог дана, на шта нам указује вредност  $\text{sig}=0.000$  ( $p<0.05$ ). Следећи корак су накнадни тестови поређења временских тачака од интереса коришћењем Wilcoxonovog теста ранга уз корекцију алфа нивоа који износи 0,025.

## Поређење првог и трећег дана

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between WBCKT1 and WBCKT3 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,001	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

## Поређење трећег и петог дана

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between WBCKT3 and WBCKT5 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

У оба случаја је вредност  $\text{sig} < 0.025$ , па закључујемо да постоји статистички значајна разлика у вредностима концентрације леукоцита првог и трећег, односно трећег и петог дана.

	Mean Rank
WBCKT1	1,48
WBCKT3	1,79
WBCKT5	2,73

Поредећи средње вредности рангова за три скупа резултата (Mean Ranks), видимо да вредности концентрације леукоцита расту са временом.



## Тромбоцити

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of PLTKT1, PLTKT3 and PLTKT5 are the same	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Резултати овог теста показују да постоји статистички значајна разлика вредности током складиштења тромбоцита првог, трећег и петог дана, нашта нам указује вредност  $\text{sig}=0.000$  ( $<0.05$ ). Следећи корак су накнадни тестови поређења временских тачака од интереса коришћењем Wilcoxonovog теста ранга уз корекцију алфа нивоа који износи 0,025.

## Поређење првог и трећег дана

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between PLTKT1 and PLTKT3 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

## Поређење трећег и петог дана

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between PLTKT3 and PLTKT5 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

У оба случаја је вредност  $\text{sig} < 0.025$ , па закључујемо да **постоји статистички значајна разлика у вредностима концентрације тромбоцита првог и трећег, односно трећег и петог дана.**

Ranks	
	Mean Rank
PLTKT1	2,99
PLTKT3	2,01
PLTKT5	1,00

Поредећи средње вредности рангова за три скупа резултата (Mean Ranks), видимо да **вредности концентрације тромбоцита опадају са временом.**

### Е) Испуњеност критеријума квалитета параметара крвне слике током испитиваног периода

Parametar	1.dan	3.dan	5. dan
RBC KT < 0.2	80 (100%)	80 (100%)	80 (100%)
WBC KT <0.05	80 (100%)	80 (100%)	80 (100%)
PLT KT >60	73 (91.25%)	67 (83.75%)	53 (66.25%)

Узорци еритроцита и леукоцита током времена складиштења нису губили своја својства, насупротив тромбоцитима која су временом испуњавала све мање захтеве квалитета.

### 3. а) Испитивање утицаја пола на почетни број тромбоцита

#### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of PLTKT1 is the same across categories of pol.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.033	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

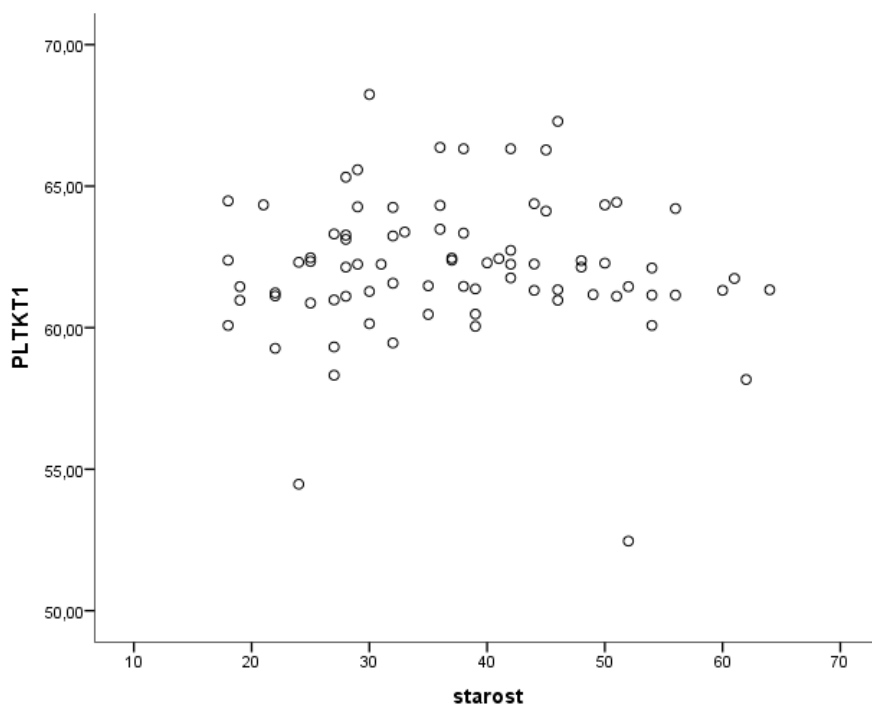
#### Report

Median

pol	PLTKT1
muski	62,2900
zenski	61,3400
Total	62,1900

Коришћењем Mann-Whitney U теста и тумачењем sig=0.033 (<0.05), закључује се да постоји статистички значајна разлика у нивоу почетног броја тромбоцита између испитаника различитог пола, а тумачењем медијана, уочава се да мушкарци имају виши ниво тромбоцита првог дана у односу на жене.

**б) Утицај старости добровољних даваоца на почетни број тромбоцита**



**Correlations**

		PLTKT1	starost
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1,000	,008
	PLTKT1 Sig. (2-tailed)	.	,940
	N	80	80
	Correlation Coefficient	,008	1,000
	starost Sig. (2-tailed)	,940	.
	N	80	80

Тумачењем Spearman's rho коефицијента корелације који износи 0,008, закључујесе да постоји позитивна, али слаба корелација између старости добровољних даваоца и вредности тромбоцита у току првог дана. На основу вредности sig=0.940, ( $p>0.05$ ), вредност коефицијента корелације није статистички значајна.

Једначина регресионе праве :

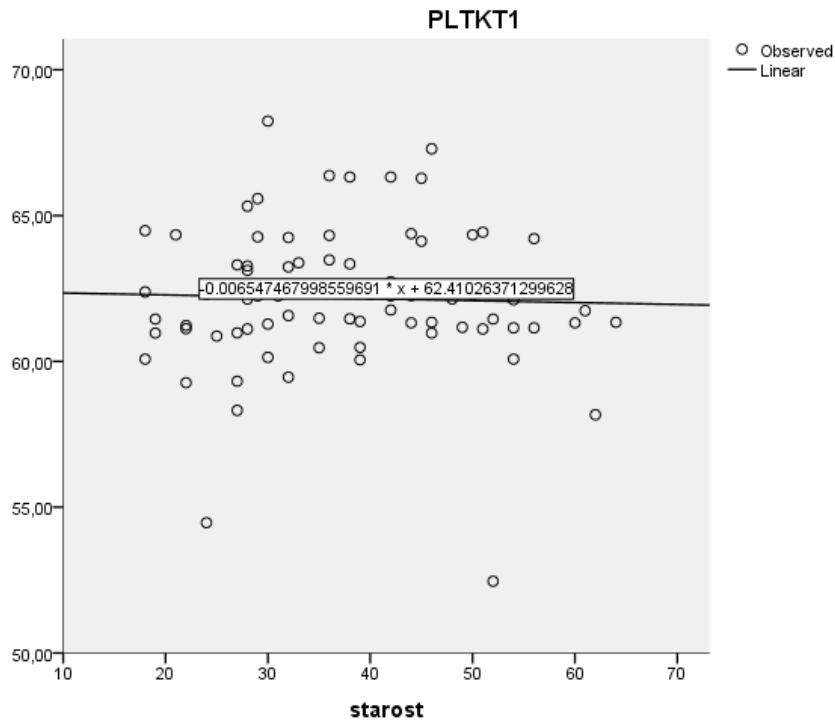
$$y=62.410-0.007*x$$

### Model Summary and Parameter Estimates

Dependent Variable: PLTKT1

Equation	Model Summary					Parameter Estimates	
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
Linear	,001	,080	1	78	,778	62,410	-,007

The independent variable is starost.



#### 4. Детаљнија анализа броја тромбоцита

Descriptives			Statistic	Std. Error
	Mean		,9148	,26130
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,3946	
		Upper Bound	1,4349	
	5% Trimmed Mean		1,0861	
	Median		1,1900	
	Variance		5,462	
razlikatreci	Std. Deviation		2,33712	
	Minimum		-9,45	
	Maximum		5,48	
	Range		14,93	
	Interquartile Range		1,91	
	Skewness		-1,750	,269
	Kurtosis		6,124	,532

Одступање броја тромбоцита трећег дана од  $60 \times 10^9$  износи  $0.9148 \pm 2.3371$ .

Descriptives			Statistic	Std. Error
	Mean		-,3583	,27703
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-,9097	
		Upper Bound	,1932	
	5% Trimmed Mean		-,1183	
	Median		,3150	
	Variance		6,140	
razlikapeti	Std. Deviation		2,47787	
	Minimum		-11,74	
	Maximum		3,37	
	Range		15,11	
	Interquartile Range		2,31	
	Skewness		-2,130	,269
	Kurtosis		6,345	,532

Одступање петог дана од  $60 \times 10^9$  износи  $0.3583 \pm 2.47787$ .

## Пад броја тромбоцита петог у односу на први дан

Descriptives			Statistic	Std. Error
	Mean		2,5244	,16117
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,2036	
		Upper Bound	2,8452	
	5% Trimmed Mean		2,3879	
	Median		2,1150	
	Variance		2,078	
razlikapetogiprvog	Std. Deviation		1,44154	
	Minimum		,70	
	Maximum		8,19	
	Range		7,49	
	Interquartile Range		1,65	
	Skewness		1,517	,269
	Kurtosis		2,812	,532

Рачунамо разлику броја тромбоцита петог у односу на први дан.

Просечне вредности пада износе  $2.5244 \pm 1.44154$ .

Минимални пад износи 0.70, а максимални 8.19.

## 5. Гасне анализе

### А) рН крви

Descriptives			Statistic	Std. Error
	Mean		7,19065	,007440
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	7,17584	
	Mean	Upper Bound	7,20546	
	5% Trimmed Mean		7,18615	
	Median		7,17750	
	Variance		,004	
pH1	Std. Deviation		,066546	
	Minimum		7,108	
	Maximum		7,361	
	Range		,253	
	Interquartile Range		,099	
	Skewness		,909	,269
	Kurtosis		-,003	,532
	Mean		7,18050	,007011
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	7,16654	
	Mean	Upper Bound	7,19446	
	5% Trimmed Mean		7,17640	
	Median		7,17050	
	Variance		,004	
pH3	Std. Deviation		,062709	
	Minimum		7,099	
	Maximum		7,355	
	Range		,256	
	Interquartile Range		,099	
	Skewness		,820	,269
	Kurtosis		-,074	,532
	Mean		7,17011	,006909
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	7,15636	
	Mean	Upper Bound	7,18386	
	5% Trimmed Mean		7,16608	
pH5	Median		7,16100	
	Variance		,004	
	Std. Deviation		,061793	
	Minimum		7,079	



Maximum	7,349	
Range	,270	
Interquartile Range	,094	
Skewness	,854	,269
Kurtosis	,191	,532

### **Први дан**

Просечне вредности рН крви првог дана износе  $7.19065 \pm 0.066546$ .

Минимална вредност рН крви првог дана износи 7.108

Максимална вредност рН крви првог дана износи 7.361

### **Трећи дан**

Просечне вредности рН крви трећег дана износе  $7.18050 \pm 0.062709$

Минимална вредност рН крви трећег дана износи 7.099

Максимална вредност рН крви првог дана износи 7.355

### **Пети дан**

Просечне вредности рН крви петог дана износе  $7,17011 \pm 0.061793$

Минимална вредност рН крви петог дана износи 7.079

Максимална вредност рН крви петог дана износи 7.349

Као захтев критеријума квалитета за рН вредност крви наведена је вредност од 6.4, а посматрајући минималне вредности првог, трећег и петог дана, видимо да све измерене вредности испуњавају задати критеријум јер су веће од 6.4. Испуњеност критеријума је 100%, односно свих 80 узорака.

B) Вредности pO2

Descriptives

		Statistic	Std. Error
pO2prvi	Mean	137,056	,8819
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	135,301	
	Upper Bound	138,812	
	5% Trimmed Mean	136,729	
	Median	137,500	
	Variance	62,220	
	Std. Deviation	7,8880	
	Minimum	123,8	
	Maximum	160,0	
	Range	36,2	
	Interquartile Range	12,1	
	Skewness	,522	,269
	Kurtosis	,137	,532
pO2treci	Mean	130,871	,8490
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	129,181	
	Upper Bound	132,561	
	5% Trimmed Mean	130,608	
	Median	130,750	
	Variance	57,661	
	Std. Deviation	7,5935	
	Minimum	117,8	
	Maximum	152,8	
	Range	35,0	
	Interquartile Range	10,9	
	Skewness	,484	,269
	Kurtosis	-,165	,532
pO2peti	Mean	123,706	,7317
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	122,250	
	Upper Bound	125,163	
	5% Trimmed Mean	123,596	
	Median	122,950	
	Variance	42,830	
	Std. Deviation	6,5445	
	Minimum	111,6	
	Maximum	140,2	
Range	28,6		

Interquartile Range	10,1	
Skewness	,218	,269
Kurtosis	-.667	,532

### **Први дан**

Просечне вредности pO<sub>2</sub> крви првог дана износе 137.056±7.89

Минимална вредност pO<sub>2</sub> крви првог дана износи 123.8

Максимална вредност pO<sub>2</sub> крви првог дана износи 160

### **Трећи дан**

Просечне вредности pO<sub>2</sub> крви трећег дана износе 130.871± 7.5935

Минимална вредност pO<sub>2</sub> крви трећег дана износи 117.8

Максимална вредност pO<sub>2</sub> крви првог дана износи 152.8

### **Пети дан**

Просечне вредности pO<sub>2</sub> крви петог дана износе 123.706 ± 6.5445

Минимална вредност pO<sub>2</sub> крви петог дана износи 111.6

Максимална вредност pO<sub>2</sub> крви петог дана износи 140.2

C) Вредности pCO2

Descriptives

		Statistic	Std. Error
	Mean	49,259	,2912
	95% Confidence Interval for Lower Bound	48,679	
	Mean Upper Bound	49,838	
	5% Trimmed Mean	49,225	
	Median	48,950	
	Variance	6,783	
pCO2prvi	Std. Deviation	2,6045	
	Minimum	41,0	
	Maximum	54,8	
	Range	13,8	
	Interquartile Range	4,0	
	Skewness	-,017	,269
	Kurtosis	,106	,532
	Mean	42,339	,3063
	95% Confidence Interval for Lower Bound	41,729	
	Mean Upper Bound	42,948	
	5% Trimmed Mean	42,400	
	Median	42,300	
	Variance	7,503	
pCO2treci	Std. Deviation	2,7392	
	Minimum	32,4	
	Maximum	48,5	
	Range	16,1	
	Interquartile Range	3,5	
	Skewness	-,414	,269
	Kurtosis	1,672	,532
	Mean	23,854	,3368
	95% Confidence Interval for Lower Bound	23,183	
	Mean Upper Bound	24,524	
	5% Trimmed Mean	23,899	
pCO2peti	Median	23,650	
	Variance	9,074	
	Std. Deviation	3,0123	
	Minimum	15,3	
	Maximum	31,2	

Range	15,9	
Interquartile Range	4,1	
Skewness	-,128	,269
Kurtosis	,168	,532

### **Први дан**

Просечне вредности  $pCO_2$  крви првог дана износе  $49.259 \pm 2.6045$

Минимална вредност  $pCO_2$  крви првог дана износи 41

Максимална вредност  $pCO_2$  крви првог дана износи 54.8

### **Трећи дан**

Просечне вредности  $pCO_2$  крви трећег дана износе  $42.339 \pm 2.7392$

Минимална вредност  $pCO_2$  крви трећег дана износи 32.4

Максимална вредност  $pCO_2$  крви првог дана износи 48.5

### **Пети дан**

Просечне вредности  $pCO_2$  крви петог дана износе  $23.854 \pm 3.0123$

Минимална вредност  $pCO_2$  крви петог дана износи 15.3

Максимална вредност  $pCO_2$  крви петог дана износи 31.2

**Испитивање статистички значајне разлике параметара гасних анализа током складиштења по данима**

Тест нормалности

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
pH1	,125	80	,003	,903	80	,000
pH3	,124	80	,004	,920	80	,000
pH5	,125	80	,003	,931	80	,000
pO2prvi	,085	80	,200*	,967	80	,039
pO2treci	,077	80	,200*	,974	80	,098
pO2peti	,079	80	,200*	,981	80	,274
pCO2prvi	,085	80	,200*	,969	80	,049
pCO2treci	,073	80	,200*	,970	80	,058
pCO2peti	,080	80	,200*	,987	80	,595

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

За све испитиване параметре користимо Kolmogorov-Smirnov тест јер у анализи учествује више од 50 испитиваних случајева (df 80).

За вредности рН крви вредност sig је < 0.05, из чега следи да подаци не прате нормалну расподелу, док подаци за рСО2 и рО2 прате нормалну расподелу јер су вредности sig > 0.05. За вредности рН крви користимо непараметарски Friedmanov тест ради поређења вредности рН крви током првог, трећег и петог дана, док за вредности рСО2 и рО2 користимо параметарски тест упарених узорака.

## pH крви

N	80
Chi-Square	160,000
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Резултати овог теста показују да постоји статистички значајна разлика pH вредности крви првог, трећег и петог дана, нашта нам указује вредност  $\text{sig}=0.000$  ( $<0.05$ ). Следећи корак су накнадни тестови поређења временских тачака од интереса коришћењем Wilcoxonovog теста ранга уз корекцију алфа нивоа који износи 0,025.

### Поређење првог и трећег дана

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between pH1 and pH3 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

### Поређење трећег и петог дана

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between pH3 and pH5 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

У оба случаја је вредност  $\text{sig}<0.025$ , па закључујемо да постоји статистички значајна разлика у вредностима pH крви првог и трећег, односно трећег и петог дана.

### Ranks

	Mean Rank
pH1	3,00
pH3	2,00
pH5	1,00

### Report

Median

pH1	pH3	pH5
7,17750	7,17050	7,16100

Поређећи средње вредности рангова за три скупа резултата (Mean Ranks), видимо да **вредности рН крви опадају савременом**. Највише су током првог дана, а најниже током петог дана.

### рО2 крви

#### Први и трећи дан

#### Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 pO2prvi	137,056	80	7,8880	,8819
pO2treци	130,871	80	7,5935	,8490

#### Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 pO2prvi - pO2treци	6,1850	2,6727	,2988	5,5902	6,7798	20,698	79	,000



Поређењем вредности првог и трећег дана уочава се статистички значајна разлика јер је вредност  $\text{sig}=0.000 < 0.05$ .

Просечне вредности  $\text{pO}_2$  првог дана су 137.056, а трећег дана 130.871, дакле **вредности  $\text{pO}_2$  током времена опадају** и то је статистички значајно. Вредност разлике износи 6.1850.

### Трећи и пети дан

**Paired Samples Statistics**

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 pO2treci	130,871	80	7,5935	,8490
pO2peti	123,706	80	6,5445	,7317

**Paired Samples Test**

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 pO2treci - pO2peti	7,1650	3,5980	,4023	6,3643	7,9657	17,811	79	,000

Поређењем вредности трећег и петог дана уочава се статистички значајна разлика јер је вредност  $\text{sig}=0.000 < 0.05$ .

Просечне вредности  $\text{pO}_2$  трећег дана су 130.871, а петог дана 123.706, дакле **вредности  $\text{pO}_2$  током времена опадају** и то је статистички значајно. Вредност разлике износи 7.1650.

## pCO<sub>2</sub>

### Први и трећи дан

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean	
Pair 1	pCO <sub>2</sub> prvi	49,259	80	2,6045	,2912
	pCO <sub>2</sub> treći	42,339	80	2,7392	,3063

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)	
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference					
				Lower	Upper				
Pair 1	pCO <sub>2</sub> prvi - pCO <sub>2</sub> treći	6,9200	2,8834	,3224	6,2783	7,5617	21,466	79	,000

Поређењем вредности првог и трећег дана уочава се статистички значајна разлика јер је вредност  $\text{sig}=0.000 < 0.05$ .

Просечне вредности pCO<sub>2</sub> првог дана су 49.259, а трећег дана 42.339, дакле **вредности pCO<sub>2</sub> током времена опадају** и то је статистички значајно. Вредност разлике износи 6.9200.

### Трећи и пети дан

**Paired Samples Statistics**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	pCO <sub>2</sub> treci	42,339	80	2,7392	,3063
	pCO <sub>2</sub> peti	23,854	80	3,0123	,3368

**Paired Samples Test**

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 pCO <sub>2</sub> treci - pCO <sub>2</sub> peti	18,4850	3,0851	,3449	17,7984	19,1716	53,591	79	,000

**Поређењем вредности трећег и петог дана уочава се статистички значајна разлика јер је вредност sig=0.000 <0.05.**

Просечне вредности pCO<sub>2</sub> трећег дана су 42.339, а петог дана 23.854, дакле **вредности pCO<sub>2</sub> током времена опадају** и то је статистички значајно. Вредност разлике износи 18.4850.

**6. Просечне вредности agregacije trombocita при различитим концентрацијама колагена по данима**

Descriptives		Statistic	Std. Error
	Mean	1057,29	10,964
	95% Confidence Interval for Lower Bound	1035,46	
	Mean Upper Bound	1079,11	
	5% Trimmed Mean	1058,58	
	Median	1056,00	
	Variance	9617,448	
agregacija32nula	Std. Deviation	98,069	
	Minimum	850	
	Maximum	1251	
	Range	401	
	Interquartile Range	175	
	Skewness	-,111	,269
	Kurtosis	-,934	,532
	Mean	590,14	8,961
	95% Confidence Interval for Lower Bound	572,30	
	Mean Upper Bound	607,97	
	5% Trimmed Mean	590,00	
	Median	591,50	
	Variance	6423,386	
agregacija32treći	Std. Deviation	80,146	
	Minimum	411	
	Maximum	782	
	Range	371	
	Interquartile Range	121	
	Skewness	,106	,269
	Kurtosis	-,466	,532
	Mean	252,46	6,345
	95% Confidence Interval for Lower Bound	239,83	
	Mean Upper Bound	265,09	
	5% Trimmed Mean	251,51	
agregacija32peti	Median	250,00	
	Variance	3221,011	
	Std. Deviation	56,754	
	Minimum	123	

Maximum	421	
Range	298	
Interquartile Range	87	
Skewness	,262	,269
Kurtosis	,228	,532

### **Концентрација 3.2**

#### **Први дан**

Просечне вредности агрегације тромбоцита првог дана при концентрацији колагена од 3.2 износи  $1057.29 \pm 98.069$

Максималне вредности агрегације износе 1251.

Минималне вредности агрегације износе 850.

#### **Трећи дан**

Просечне вредности агрегације тромбоцита трећег дана при концентрацији колагена од 3.2 износи  $590.14 \pm 80.146$

Максималне вредности агрегације износе 782.

Минималне вредности агрегације износе 411.

#### **Пети дан**

Просечне вредности агрегације тромбоцита петог дана при концентрацији колагена од 3.2 износи  $252.46 \pm 56.754$

Максималне вредности агрегације износе 421.

Минималне вредности агрегације износе 123.

## Концентрација 6.4

### Descriptives

		Statistic	Std. Error
	Mean	1111,18	12,414
	95% Confidence Interval for Lower Bound	1086,47	
	Mean Upper Bound	1135,88	
	5% Trimmed Mean	1111,96	
	Median	1133,50	
	Variance	12328,627	
agregacija64nula	Std. Deviation	111,034	
	Minimum	897	
	Maximum	1315	
	Range	418	
	Interquartile Range	203	
	Skewness	-,235	,269
	Kurtosis	-1,040	,532
	Mean	966,90	14,203
	95% Confidence Interval for Lower Bound	938,63	
	Mean Upper Bound	995,17	
	5% Trimmed Mean	966,50	
	Median	985,00	
	Variance	16138,927	
agregacija64treci	Std. Deviation	127,039	
	Minimum	746	
	Maximum	1215	
	Range	469	
	Interquartile Range	218	
	Skewness	-,043	,269
	Kurtosis	-1,190	,532
	Mean	734,18	13,430
	95% Confidence Interval for Lower Bound	707,44	
	Mean Upper Bound	760,91	
	5% Trimmed Mean	733,71	
agregacija64peti	Median	741,00	
	Variance	14429,387	
	Std. Deviation	120,122	
	Minimum	514	
	Maximum	989	

Range	475	
Interquartile Range	208	
Skewness	-,056	,269
Kurtosis	-,918	,532

## **Концентрација 6.4**

### **Први дан**

Просечна вредност агрегације тромбоцита првог дана при концентрацији колагена од 6.4 износи  $1111.18 \pm 111.034$ .

Максималне вредности агрегације износе 1315.

Минималне вредности агрегације износе 897.

### **Трећи дан**

Просечна вредност агрегације тромбоцита трећег дана при концентрацији колагена од 6.4 износи  $966.90 \pm 127.039$ .

Максималне вредности агрегације износе 1215.

Минималне вредности агрегације износе 746.

### **Пети дан**

Просечна вредност агрегације тромбоцита петог дана при концентрацији колагена од 6.4 износи  $734.18 \pm 120.122$ .

Максималне вредности агрегације износе 989.

Минималне вредности агрегације износе 514.

## Концентрација 9.6

### Descriptives

		Statistic	Std. Error
agregacija96nula	Mean	1181,65	13,364
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	1155,05	
	Upper Bound	1208,25	
	5% Trimmed Mean	1182,82	
	Median	1215,00	
	Variance	14287,066	
	Std. Deviation	119,529	
	Minimum	945	
	Maximum	1402	
	Range	457	
	Interquartile Range	195	
	Skewness	-,292	,269
	Kurtosis	-,905	,532
agregacija96treci	Mean	1094,49	13,627
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	1067,36	
	Upper Bound	1121,61	
	5% Trimmed Mean	1097,64	
	Median	1119,00	
	Variance	14856,405	
	Std. Deviation	121,887	
	Minimum	825	
	Maximum	1308	
	Range	483	
	Interquartile Range	186	
	Skewness	-,404	,269
	Kurtosis	-,685	,532
agregacija96peti	Mean	956,15	13,435
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	929,41	
	Upper Bound	982,89	
	5% Trimmed Mean	957,68	
	Median	986,00	
	Variance	14439,623	
	Std. Deviation	120,165	
	Minimum	712	
	Maximum	1214	
	Range	502	



Interquartile Range	206	
Skewness	-,140	,269
Kurtosis	-,943	,532

## **Концентрација 9.6**

### **Први дан**

Просечна вредност агрегације тромбоцита првог дана при концентрацији колагена од 9.6 износи  $1181.65 \pm 119.529$

Максималне вредности агрегације износе 1402.

Минималне вредности агрегације износе 945.

### **Трећи дан**

Просечна вредност агрегације тромбоцита трећег дана при концентрацији колагена од 9.6 износи  $1094.49 \pm 121.887$

Максималне вредности агрегације износе 1308.

Минималне вредности агрегације износе 825.

### **Пети дан**

Просечна вредност агрегације тромбоцита петог дана при концентрацији колагена од 9.6 износи  $956.15 \pm 120.165$

Максималне вредности агрегације износе 1214.

Минималне вредности агрегације износе 712.

**Испитивање постојања статистички значајне разлике у агрегацији тромбоцита за сваку концентрацију посебно**

**Тест нормалности**

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
agregacija32nula	,099	80	,051	,974	80	,096
agregacija32treci	,059	80	,200*	,988	80	,677
agregacija32peti	,073	80	,200*	,981	80	,263
agregacija64nula	,128	80	,002	,948	80	,003
agregacija64treci	,115	80	,011	,953	80	,005
agregacija64peti	,136	80	,001	,964	80	,024
agregacija96nula	,132	80	,002	,958	80	,010
agregacija96treci	,106	80	,025	,965	80	,028
agregacija96peti	,117	80	,008	,965	80	,026

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

За све испитиване параметре користимо Kolmogorov-Smirnov тест јер у анализи учеству је више од 50 испитиваних случајева (df 80). За концентрацију колагена од 3.2 вредност  $\text{sig} > 0.05$ , из чега следи да подаци прате нормалну расподелу. Користимо параметарски тест једнофакторску А нову поновљених мерења ради поређења вредности агрегације тромбоцита током првог, трећег и петог дана. За концентрацију колагена од 6.4 и 9.6 вредност  $\text{sig} < 0.05$ , из чега следи да подаци не прате нормалну расподелу. Користимо непараметарски Friedmanov тест ради поређења вредности агрегације тромбоцита током првог, трећег и петог дана.

## Концентрација 3.2

### Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Partial Eta Squared
Pillai's trace	,989	3437,803 <sup>a</sup>	2,000	78,000	,000	,989
Wilks' lambda	,011	3437,803 <sup>a</sup>	2,000	78,000	,000	,989
Hotelling's trace	88,149	3437,803 <sup>a</sup>	2,000	78,000	,000	,989
Roy's largest root	88,149	3437,803 <sup>a</sup>	2,000	78,000	,000	,989

Each F tests the multivariate effect of vreme. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

a. Exact statistic

### Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE\_1

(I) vreme	(J) vreme	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>b</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	467,150 <sup>*</sup>	8,878	,000	445,435	488,865
	3	804,825 <sup>*</sup>	9,758	,000	780,957	828,693
2	1	-467,150 <sup>*</sup>	8,878	,000	-488,865	-445,435
	3	337,675 <sup>*</sup>	6,754	,000	321,154	354,196
3	1	-804,825 <sup>*</sup>	9,758	,000	-828,693	-780,957
	2	-337,675 <sup>*</sup>	6,754	,000	-354,196	-321,154

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

### Estimates

Measure: MEASURE\_1

vreme	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	1057,288	10,964	1035,463	1079,112
2	590,138	8,961	572,302	607,973
3	252,463	6,345	239,833	265,092

Вредност Wilks lambda износи 0.011 уз вредност sig=0.000, што значи да **постоји статистички значајна разлика у агрегацији тромбоцита при концентрацији колагена од 3.2 током првог, трећег и петог дана.**

Поређењем вредности sig по данима, закључујемо да **постоји статистички значајна разлика током сва три тренутка времена (p<0.05 ) и то тако што агрегација током времена опада.** Вредности су **највише током првог дана** (mean 1057.288), а затим опадају, па трећег дана износе (mean 590.138) и петог (mean 252.463).

#### Концентрација 6.4

N	80
Chi-Square	160,000
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Тумачењем Friedmanовог теста и вредности sig=0.000 (p<0.05), **закључујемо да постоји статистички значајна разлика у агрегацији тромбоцита при концентрацији колагена од 6.4 током три тренутка времена.** Следећи корак су накнадни тестови **поређења временских тачака од интереса коришћењем Wilcoxonовог теста ранга уз корекцију алфа нивоа који износи 0,025.**

#### Први и трећи дан

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between aggregated samples and aggregated samples equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

## Трећи и пети

### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between samples agregacija64treci and agregacija64peti equals 0.	Related-Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

У оба случаја је вредност  $\text{sig} < 0.025$ , па закључујемо да постоји статистички значајна разлика у вредностима агрегације тромбоцита првог и трећег, односно трећег и петог дана.

### Ranks

	Mean Rank
agregacija64nula	3,00
agregacija64treci	2,00
agregacija64peti	1,00

### Report

#### Median

agregacija64nula	agregacija64treci	agregacija64peti
1133,50	985,00	741,00

Поредећи медијане и рангове, вредности су највише током првог дана, а затим опадају све до петог дана, када показују најниже вредности.

## Концентрација 9.6

N	80
Chi-Square	160,000
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Тумачењем Friedmanовог теста и вредности sig=0.000 ( $p < 0.05$ ), закључујемо да **постоји статистички значајна разлика у агрегацији тромбоцита при концентрацији колагена од 9.6 током три тренутка времена. Следећи корак су накнадни тестови поређења временских тачака од интереса коришћењем Wilcoxonовог теста ранга уз корекцију алфа нивоа који износи 0,025.**

### Први и трећи дан

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between aggregated samples and aggregated samples equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

### Трећи и пети дан

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between aggregated samples and aggregated samples equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

У оба случаја је вредност sig<0.025, па закључујемо да **постоји статистички значајна разлика у вредностима агрегације тромбоцита првог и трећег, односно трећег и петог дана.**

### Ranks

	Mean Rank
agregacija96nula	3,00
agregacija96treci	2,00
agregacija96peti	1,00

### Report

#### Median

agregacija96nula	agregacija96treci	agregacija96peti
1215,00	1119,00	986,00

Поређећи медијане и рангове, **вредности су највише током првог дана**, а затим опадају све до петог дана, када показују најниже вредности.

### Поређење концентрација по данима

#### Први дан

### Ranks

	Mean Rank
agregacija32nula	1,01
agregacija64nula	2,01
agregacija96nula	2,98

### Test Statistics<sup>a</sup>

N	80
Chi-Square	154,075
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Тумачењем Friedmanовог теста и вредности sig=0.000 ( $p<0.05$ ), закључујемо да **постоји статистички значајна разлика у агрегацији тромбоцита при концентрацији колагена од 3.2, 6,4 и 9.4 током првог дана**. Следећи корак су накнадни тестови поређења временских тачака од интереса коришћењем Wilcoxonовог теста ранга уз корекцију алфа нивоа који износи 0,017.

### Поређење концентрације 3.2 и 6.4

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between aggregated samples 32 and 64 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

### Поређење концентрације 6.4 и 9.6

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between aggregated samples 64 and 96 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

### Поређење концентрације 3.2 и 9.6

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between aggregated samples 32 and 96 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.



У свим случајевима је вредност  $\text{sig} < 0.017$ , па закључујемо да постоји статистички значајна разлика у резултатима агрегације тромбоцита првог дана унутар концентрација.

**Report**

	agregacija32nul	agregacija64nul	agregacija96nul
	a	a	a
Mean	1057,29	1111,18	1181,65
N	80	80	80
Std. Deviation	98,069	111,034	119,529

**Report**

Median

agregacija32nul	agregacija64nul	agregacija96nul
a	a	a
1056,00	1133,50	1215,00

Поређећи медијане и рангове, вредности су највише приконцентрацији колагена од 9.6, а затим опадају при концентрацији од 6.4 и 3.2.

### Трећи дан

**Test Statistics<sup>a</sup>**

N	80
Chi-Square	156,100
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Тумачењем Friedmanovog теста и вредности  $\text{sig} = 0.000$  ( $p < 0.05$ ), закључујемо да постоји статистички значајна разлика у агрегацији тромбоцита при концентрацији колагена од 3.2, 6.4 и 9.4 током трећег дана. Следећи корак су накнадни тестови поређења временских тачака од интереса коришћењем Wilcoxonovog теста ранга уз корекцију алфа нивоа који износи 0,017.

## Поређење концентрације 3.2 и 6.4

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between samples agregacija32treci and agregacija64treci equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

## Поређење концентрација 3.2 и 9.6

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between samples agregacija32treci and agregacija96treci equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

## Поређење концентрација 9.6 и 6.4

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between samples agregacija96treci and agregacija64treci equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

У свим случајевима је вредност  $\text{sig} < 0.017$ , па закључујемо да постоји статистички значајна разлика у резултатима агрегације тромбоцита трећег дана унутар концентрација.

### Ranks

	Mean Rank
agregacija32treci	1,00
agregacija64treci	2,03
agregacija96treci	2,98

### Report

	agregacija32treci	agregacija64treci	agregacija96treci
	ci	ci	ci
Mean	590,14	966,90	1094,49
Median	591,50	985,00	1119,00

Поређећи медијане и рангове, **вредности агрегације су највише при концентрацији колагена од 9.6**, а затим опадају при концентрацији од 6.4 и 3.2.

### Пети дан

#### Test Statistics<sup>a</sup>

N	80
Chi-Square	160,000
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Тумачењем Friedmanовог теста и вредности sig=0.000 ( $p < 0.05$ ), **закључујемо да постоји статистички значајна разлика у агрегацији тромбоцита при концентрацији колагена од 3.2, 6.4 и 9.4 током петог дана**. Следећи корак су накнадни тестови поређења временских тачака од интереса коришћењем Wilcoxonовог теста ранга уз корекцију алфа нивоа који износи 0,017.

### Поређење концентрације 3.2 и 6.4

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between aggregated samples 32peti and 64peti equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

### Поређење концентрације 3.2 и 9.6

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between aggregated samples 32peti and 96peti equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

### Поређење концентрације 6.4 и 9.6

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between aggregated samples 64peti and 96peti equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

У свим случајевима је вредност  $\text{sig} < 0.017$ , па закључујемо да постоји статистички значајна разлика у резултатима агрегације тромбоцита петог дана унутар концентрација.

### Report

	agregacija32pet i	agregacija64pet i	agregacija96pet i
Mean	252,46	734,17	956,15
Median	250,00	741,00	986,00

### Ranks

	Mean Rank
agregacija32peti	1,00
agregacija64peti	2,00
agregacija96peti	3,00

Поређећи медијане и рангове, **вредности агрегације током петог дана су највише при концентрацији колегена од 9.6**, а затим опадају при концентрацији од 6.4 и 3.2.

## V ДИСКУСИЈА:

Трансфузија концентрата тромбоцита (КТ) је од есенцијалне важности у превенцији и лечењу крварења које је узроковано смањеном продукцијом тромбоцита, њиховом поремећеном функцијом или повећаном потрошњом. Најчешће се примењују у лечењу различитих хематолошких болести, код пацијената који су у програму трансплантације матичних ћелија хематопоезе или трансплантације солидних органа, у лечењу кардиохируршких пацијената и гастроинтестиналних крварења. Такође, повећана примена агресивних медицинских процедура и хемиотерапијских протокола значајно повећава број примењених трансфузија КТ (1,5). Подаци показују да највећи број трансфузија се годишње примени у лечењу хематолошких пацијената, а затим пацијената у јединицама интензивне неге, на општој и кардиохирургији, онкологији и гастроентерологији (78). Имајући у виду да је основни циљ трансфузије КТ да се унесе довољан број тромбоцита у циркулацију примаоца у циљу повећања њиховог броја и успостављања нормалне хемостазе, да се постигне превенција или спречавање крварења, а да се, са друге стране, ризик од нежељених трансфузијских реакција, инфекција и алоимунизација сведе на најмању могућу меру, јасно је да испитивање квалитета припремљених КТ јесте предуслов ефективног трансфузијског лечења пацијената који примају трансфузију овог крвног продукта. Дакле, уколико имамо КТ као продукт који по својим карактеристика задовољава задате критеријуме квалитета, можемо очекивати повољан исход трансфузије кроз заустављање крварења и пораст коригованог броја тромбоцита (CCI- Corrected Count Increment), док у случајевима да КТ по својим карактеристикама не задовољава критеријуме квалитета очекује се субоптимални ефекат трансфузије, што ствара потребу за трансфузијом већег број концентрата уз варијабилни терапијски одговор након сваке трансфузије.

Од почетка примене трансфузије КТ, која датира од шездесетих година прошлог века, припрема и складиштење КТ су претрпели бројне измене оригиналне методе, а у све у циљу побољшања квалитета финалног продукта и повећања ефикасности и безбедности трансфузије. С друге стране, квалитет КТ не само да мора да буде у сагласности са критеријумима квалитета, већ мора да постоји способност трансфундованих тромбоцита да обезбеде *in vivo* хемостатску подршку. Бројна истраживања су потврдила да само 66% трансфундованих тромбоцита циркулише слободно, као и да бројни фактори могу бити од утицаја на њихову функцију, као што су инфекција, примена антибиотика и антиинфламаторних лекова, као и претходна сепарација и лезије складиштења КТ. Према

*Gulliksson H* и ауторима три су тачке у процесу припреме и складиштења КТ кључне за одржавање њиховог квалитета. Прво, важно је спречити или смањити активацију тромбоцита најпре током узимања крви, а затим у процесу припреме и на крају, током складиштења КТ. Друго, ниво гликолитичке активности, анаеробне потрошње глукозе и продукције лактата треба одржавати на најнижем нивоу. Треће, важно је да одређена количина глукозе мора бити присутна у концентрату током целог периода складиштења (79).

Бројне студије су показале да постоје значајне промене у КТ током периода складиштења, како у броју и функцији тромбоцита, тако и биохемијске промене које доводе до последичних промена интрацелуларног метаболизма (80-82). Током складиштења број тромбоцита у КТ се постепено смањује у односу на њихов број одмах након припреме. Постоје промене у морфолошкој дистрибуцији и морфолошком скору тромбоцита, при чему се смањује број дискоидних и сферичних тромбоцита, док су дендритичне и балонизирани хелије које имају функционално мању вредност, све бројније. Ово испитивање је показало најпре да постоји разлика у квалитету иницијално припремљеног продукта КТ у зависности од пола и старости даваоца крви. Наиме, број тромбоцита у КТ који су припремљени од даваоца мушког пола био је статистички значајно већи у односу на КТ припремљене из јединица целе крви које су донирале жене ( $p < 0,05$ ), а такође постоји и слаба, али ипак позитивна корелација између старости добровољних даваоца и броја тромбоцитима у КТ одмах након припреме (први дан складиштења) у смислу смањења броја тромбоцита у КТ који су припремљени из јединица целе крви старије животне доби. Поред тога, постоји статистички значајно смањење броја тромбоцита у концентратима током складиштења, и то како петог у односу на први дан ( $p < 0,05$ ), тако и петог у односу на трећи дан складиштења ( $p < 0,05$ ). Првог и трећег дана складиштења просечан број тромбоцита је био  $> 60 \times 10^9 / \text{Л}$ , док је петог дана складиштења просечан број тромбоцита био мало нижи од задатог критеријума ( $59,642 \pm 2,478 \times 10^9 / \text{Л}$ ), што на први поглед показује да нема великих одступања и да су концентрати мање-више очуваног броја тромбоцита. Просечан број пада тромбоцита петог у односу на први дан складиштења износи  $2,52 \pm 1,44 \times 10^9 / \text{Л}$ , при чему је најмањи пад  $0,7 \times 10^9 / \text{Л}$ , а највећи износи  $8,19 \times 10^9 / \text{Л}$ . Међутим, ако се посматра усаглашеност броја припремљених КТ првог, трећег и петог дана складиштења са задатим критеријумима квалитета ситуација постаје далеко јаснија и показује суштински проблем који постоји. Наиме, првог дана складиштења 91,25% испитиваних КТ испуњава захтеве квалитета, трећег дана 83,75%, док петог дана складиштења само 66,25% КТ садржи у

себи више од  $60 \times 10^9$  тромбоцита. То значи да петог дана, који је и последњи дан складиштења КТ, само две трећине КТ испуњава захтеве квалитета што се тиче броја тромбоцита, па можемо очекивати да ће само у две трећине трансфузија КТ она постићи терапијску ефикасност, док приликом трансфузија више од 30% КТ не можемо очекивати пораст броја тромбоцита (CCI после првог сата  $7 \times 10^3$   $\mu$ l по јединици концентрованих тромбоцита, односно  $4,5 \times 10^3$   $\mu$ l после 24 сата од трансфузије (54)), нити заустављање крварења или друге промене у клиничкој слици. Зна се да код одраслог пацијента просечне телесне масе од 70 кг трансфузија терапијске дозе тромбоцита подиже просечно број тромбоцита за  $20\text{--}40 \times 10^9$  ml (83,84), што у случају трансфузије КТ који се складиште до петог дана не можемо очекивати. Изостанак терапијског одговора трансфузије на даље захтева нове трансфузије КТ, односно трансфузију све већег броја КТ, што са једне стране има штетне последице за самог пацијента, већи број трансфузија носи већ ризик алоимунизације, трансфузијских реакција и посебно инфекција, којима су КТ посебно подложни због специфичних услова складиштења, док се са друге стране, повећавају трошкови лечења због повећаног броја трансфузија, већег броја болничких дана, као и трошкови примене медикамената који се користе као допунска терапија. Посебан проблем представљају и расположиве залихе КТ у службама трансфузије, које су често недовољне да задовоље реалне потребе пацијената, реорганизација трансфузиолошке службе Србије која је спроведена током 2018. године и која подразумева да припрему и складиштење КТ могу да раде само Институт за трансфузију крви Србије, као и два Завода (Завод за трансфузију крви Ниш и Завод за трансфузију крви Војводине), што најчешће у пракси значи да мале службе трансфузије крви широм Србије и болничке банке крви не располажу концентратима тромбоцита на залихама и у обавези су, да по потреби их требају од Института и Завода, а они са своје стране на залихама немају довољне количине тромбоцита да задовоље потребе пацијената за лечење широм земље. На тај начин се ствара један зачарани круг, у коме су на губитку пре свега пацијенти, а затим и клинички лекари и службе трансфузије, или ако генерално посматрамо читав здравствени систем у земљи. То значи да је од суштинског значаја утврдити који су фактори важни за смањење броја тромбоцита током периода складиштења и да ли постоје одређене корелације и са другим параметрима који су праћени током овог истраживања. Наиме, битно је утврдити не само квантитативно смањење броја тромбоцита, већ и постојање одређених биохемијских промена (варијације или промене у метаболизму), што све заједно доводи до смањене функције тромбоцита и изостанка терапијског одговора трансфузије.



Што се тиче осталих хематолошких параметара који су испитивани, број еритроцита у КТ је далеко испод граничних вредности током целог периода складиштења, што показује да је сам поступак центрифугирања и сепарације јединице целе крви, као и издвајања КТ добар и не доводи до контаминације концентрата резидуалним еритроцитима. Анализа садржаја леукоцита у КТ показује број који је током целог складиштења мањи од задатих  $0,05 \times 10^9$ , са тенденцијом пораста броја леукоцита током складиштења која има статистичку значајност, али је све до петог дана тај број далеко мањи од критеријума који су одређени Препорукама Савета Европе. Овај резултат је јако значајан из разлога што су леукоцити одговорни за настанак бројних како акутних, тако и одложених трансфузијских реакција, пре свега, имунски посредованих реакција, трансмисију вируса и болест калем против домаћина (graft-versus-host disease (GvHD)), али и *in vitro* продукцију инфламаторних цитокина и развој фебрилне нехемолитичке трансфузијске реакције (ФНХТР) (85,86). Подаци из литературе показују инциденцију бактеријске контаминације од 1 у 2000 КТ (86), односно минимум бактеријске контаминације после пет дана складиштења од око  $10^7$ /мЛ, што се повезује са посебним условима складиштења КТ на амбијенталној температури од 18-22°C, која посебно погодује развоју бактерија (87,88). Поред тога, леукоцити у КТ имају штетан утицај на медијум за складиштење, што резултира у значајном паду рН, повећању потрошње глукозе, продукцији млечне киселине и ослобађању LDH током складиштења. Као резултат свега, у КТ са повећаним садржајем леукоцита услови складиштења до петог дана су значајно измењени, што се одражава кроз високу екскрецију β-тромбоглобулина, губитак тромбоцитних нуклеотида, смањену способност везивања X-аденозина и промењену морфологију тромбоцита (87,88).

рН је важан маркер квалитета КТ *in vitro* обзиром да смањење вредности овог параметра испод 6,8 доводи до промене облика тромбоцита који постају сферични, док при паду рН испод 6,2 ове промене постају иривезибилне (91,92). Резултати овог испитивања су показали статистички значајно смањење рН током периода складиштења ( $p < 0,05$ ), и то како петог у односу на први дан, тако и трећег у односу на први дан складиштења. Промене у рН су вероватно последица веће гасне пропустљивости пластичне кесе за чување КТ, посебно CO<sub>2</sub>, које се уочавају већ после првих 24 сата од припреме. Наиме, промене у концентрацијама гасова доводе до дисбаланса у концентрацији бикарбоната у медијуму за складиштење, што резултира у смањеном пуферском капацитету целог система са последичним смањењем рН. Познато је да током периода долази до повећане активације гликолитичког пута (оксидација глукозе у

интрацелуларне лактате) у складиштеним тромбоцитима, а да на овај тренд највише утиче рН екстрацелуларног медијума, при чему су промене веће уколико је рН алкалнији. Ако имамо у виду ниске садржаје леукоцита и еритроцита у испитиваним КТ, као и одсуство значајних варијација у њиховом броју, претпоставља се да су лактати присутни у концентратима само и искључиво од постојећих тромбоцита. Међутим, и поред ученог пада рН током периода складиштења вредности овог параметра су све време изнад граничне вредности од 6,4 која је задата као критеријум контроле квалитета од стране Савета Европе (7), што значи да су сви испитивани КТ испунили овај критеријум и у сагласности су са препорукама.

Иако гасне анализе не спадају у групу обавезних испитивања контроле квалитета КТ препоруке указују да би ниво гасова у концентратима требао да остане на константном нивоу током целог периода складиштења, идеално би било на нивоу као првог дана. Бројне студије су показале да се то у пракси ипак не догађа и да већ после 48 сати складиштења се могу уочити промене у  $pO_2$  и  $pCO_2$ , при чему се промена  $pO_2$  јавља нешто касније него промена  $pCO_2$ , што је вероватно последица његове веће концентрације у плазми. Највећи утицај на степен гасних промена имају врста пластичне кесе која се користи за складиштење КТ, као и амбијентална температура од  $22^{\circ}C$  на којој се КТ складиште. Познато је да током складиштења КТ екстрацелуларне лезије доводе до интрацелуларних лезија, што подразумева метаболичке промене, активацију тромбоцита и смањење њихове функције (80,93). Резултати овог испитивања су показали да постоје статистички значајне промене у  $pO_2$  и  $pCO_2$  током целог периода складиштења, и то како трећег у односу на први дан, тако и петог у односу на први дан складиштења ( $p < 0,05$ ). Промене  $pO_2$  су мањег степена у односу на промене  $pCO_2$  и износе 6,185 mm Hg трећег у односу на први дан, односно 7,165 mm Hg петог у односу на трећи дан, што одговара подацима који су до сада приказани у литератури (80,93). Промене  $pCO_2$  су већег степена и износе 6,92 mm Hg трећег у односу на први дан, односно 18,485 mm Hg петог у односу на трећи дан.

Фокус овог испитивања је био на функционалном тестирању тромбоцита у складиштеним КТ. Колаген је познат као врло потентан агонист тромбоцита, јер је повезан са активацијом више интраћелијских метаболичких система са различитим рецепторима на мембрани тромбоцита. Тако се колаген везује за von Willebrand фактор (vWF), стварајући адхерентни мост између колагена и гликопротеина тромбоцита Ib рецептора. Ослобађање садржаја гранула настаје као последица везивања агониста тромбоцита за површину рецептора, што доводи до последичне активације и агрегације

тромбоцита (94,95). Досадашње студије које су се бавиле испитивањем корелације између биохемијских промена екстрацелуларног медијума и агрегације тромбоцита су потврдиле статистичке значајне промене у функцији тромбоцита које су последица промена медијума за складиштење (94,96). Утврђено је да постоји јака корелација између рН и агрегације тромбоцита, као и  $pCO_2$  и агрегације тромбоцита, мада је ова веза директно зависна нешто касније. С друге стране, корелација између  $pO_2$  и агрегације тромбоцита је слаба и инверзно зависна. Оваква испитивања су потврдила постојећу везу између смањења функционалности тромбоцита у КТ и промена које се уочавају у екстрацелуларном медијуму (81,82). Промене функције тромбоцита се уочавају већ после 24 сата складиштења, док се укупан број тромбоцита присутних у концентратима значајно мења тек после 48 сати складиштења. Ова чињеница објашњава да је улога биохемијских параметара у медијуму (рН и  $pCO_2$ ) од пресудног утицај на смањење функције тромбоцита. Могуће објашњење налази се у променама у саставу мембране тромбоцита, другим факторима који су укључени у агрегацију тромбоцита (појачан анаеробни метаболизам, који је последица високог садржаја лактата), као и променама које су изазване променама интрацелуларног рН. У нашем испитивању, резултати агрегације тромбоцита показују да после 5 дана складиштења се може одредити репродукцибилан агрегацијски одговор, али постоји статистички значајно смањење агрегације тромбоцита трећег и петог дана складиштења у односу на први дан, односно петог дана складиштења у односу на трећи дан. Исто тако, постоји статистички значајан пад у губитку активности између КТ који су активирани додавањем колагена у већој концентрацији (6,4 и 9,6  $\mu g$  колаген/мЛ) у односу на колаген у мањој концентрацији (3,2  $\mu g$  колаген/мЛ), и то у сваком тренутку испитивања (првог, трећег и петог дана складиштења). Могуће објашњење за овакву врсту промена тромбоцитне функције могу бити управо промене рН, повећање концентрације лактата као и варијације у саставу мембране тромбоцита.

Имајући у виду све промене квалитета КТ које су доказане у овом испитивању током њиховог складиштења, јасно је да је од изузетне важности идентификовати све оне факторе који могу смањити степен тих промена и побољшати квалитет КТ, посебно од трећег до петог дана складиштења када се КТ најзначајније мењају по свом квалитету. Бројна досадашња истраживања која су се бавила овом темом закључила су да се велики број фактора може издвојити као потенцијалне детерминанте биохемијских и функционалних промена тромбоцита у концентратима (95-97). Најзначајније од њих су температура, запремина, агитација током складиштења, као и врста пластичне кесе која се

користи за чување КТ до пет дана. Како су сви испитивани параметри КТ у овом истраживању првог дана складиштења били потпуно у сагласности са Препорукама Савета Европе (7) и показивали висок квалитет КТ јасно је закључити да фактори који могу бити од утицаја приликом узимања јединице целе крви, транспорта, процесирања и припреме КТ нису значајно утицали на квалитет припремљеног концентрата или су испоштовани у максималној мери, те као такви нису могли утицати на смањење квалитета. Оно што се показало од значајне важности на број тромбоцита у финалном продукту јесу пол и старост добровољних даваоца крви, али је број тромбоцита у КТ првог дана складиштења свакако био изнад прописаних граничних вредности. Обзиром да трећег, а нарочито петог дана складиштења постоје статистички значајне промене на нивоу свих испитиваних параметара у КТ закључујемо да је главни проблем на нивоу складиштења тромбоцита. Ако имамо у виду да смо КТ током испитивања складиштили на прописани начин, који подразумева линеарни агитатор ( $\approx 70$  циклуса/мин) на коме су КТ били постављени појединачно (никако један на други или један уз други), на температури од  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , закључујемо да су два основна фактора која су била од пресудног утицаја на квалите продукта до петог дана. То су врста кесе за складиштење КТ и плазма, као медијум за складиштење тромбоцита у концентратима. Доказане гасне промене доводе до оштећења тромбоцита, мењајући њихов метаболизам, што на секундарном нивоу изазива активацију тромбоцита и смањење њиховог функционалног капацитета (95). Очигледно је да постоји проблем на нивоу кеса за складиштење КТ, односно да врста пластике од које су кесе направљене не одговара карактеристикама које су потребне за очување квалитета продукта. Из тог разлога, битно је да изабери неку другу врсту пластичних кеса за складиштење КТ, које могу да обезбеде стабилну околину, а што ће резултовати у бољем продукту и омогућити петодневно складиштење КТ са очуваним квалитетом.

Са друге стране, познато је да се тромбоцити снабдевају енергијом кроз оксидацију глукозе у процесу гликолизе и оксидацију масних киселина дугих ланаца, при чему током складиштења КТ постоји повећање метаболизма глукозе кроз гликолитички пут, продукција лактата је такође повећана, док се рН и продукција бикарбоната смањују. Из тог разлога већина аутора препоручује да се за складиштење тромбоцита у концентратима уместо плазме користи адитивна солуција за тромбоците (PAS), а све у циљу побољшања услова складиштења. Највећи број адитивних солуција за тромбоците садржи ацетат у свом саставу као хранљиви медијум за тромбоците, који је основни супстрат за одвијање нормалног тромбоцитног метаболизма, смањује продукцију лактата,

а повећава продукцију бикарбоната, те стабилизује рН. Поред тога, ацетат има и алкилизирајући ефекат, па се самим тим понаша као пуфер. У састав PAS-а такође улази и фосфат који има двоструки ефекат на метаболизам тромбоцита. Поред тога што се понаша као пуфер, фосфат такође стимулише и процес гликолизе, што може довести до значајног пада рН, али и продукције већих нивоа АТП-а који омогућавају већу вијабилност тромбоцита. Магнезијум и калијум у оквиру адитивних солуција смањују степен активације и агрегације тромбоцита, одржавају морфолошки скор и смањују продукцију лактата (98-100). У састав већине солуција улази и натријум-хлорид и цитрат (минимална концентрација је 8 ммол/л како би се спечила коагулација), а испитивања су показала и да Л-карнитин има повољан ефекат на складиштење тромбоцита, инхибирајући метаболизам тромбоцита и апоптозу.

Бројна испитивања су показала да тромбоцити ресуспендовани у PAS-у задржавају квалитет концентрата тромбоцита припремљених на стандардни начин и у сагласности су са Препорукама Савета Европе (7). Ипак, потребна су додатна испитивања којим би се утврдиле релевантне разлике у *in vitro* параметрима поређењем различитих солуција, а само клиничка испитивања могу дати дефинитиван одговор о квалитету КТ припремљених и складиштених у PAS -у. Испитивања *van der Meer* -а и *Zhang* -а показују да постоји пад броја тромбоцита у КТ који су складиштени у PAS-у односно да постоји мањи тромбоцитни опоравак. Објашњење за то налази се у нижој вискозности PAS-а која је слична вискозности воде, док солубилни протеини плазме повећавају вискозност па самим тим пулирање КТ у плазми повећава тромбоцитни опоравак (101,102). Ипак, број тромбоцита у пулираним КТ складиштеним у PAS -у не пада испод  $250 \times 10^9/L$ .

КТ који се чувају у адитивним солуцијама треће генерације (садрже магнезијум и калијум) имају нижи рН, показују бржи метаболизам глукозе и лактата, виши степен експресије CD62P, већу концентрацију анексин А5 везујућег протеина и очуван морфолошки скор. Уколико се они даље подвргну патогеној редукцији имају нижи ниво рН, виши ниво лактата и виши степен експресије CD62P, што указује на додатну тромбоцитну активацију (103,104). Међутим, сви КТ показују на крају периода складиштења рН изнад 6,6, што је важно за добро преживљавање тромбоцита и очуван опоравак (рН<6,2 повезан са лошим одговором на трансфузију).

Ипак, само упоредна *in vivo* анализа КТ складиштених у плазми и у неком од PAS-а новије генерације може помоћи да се добије дефинитивни одговор на питање да ли нешто измењени (смањени) *in vitro* параметри PAS -складиштених КТ јесу од клиничког значаја или не. До тада свака трансфузиолошка служба мора појединачно да одлучи да ли

познате предности примене ПАС-а надмашују благо измењене *in vitro* параметре PAS-КТ и да ову методу, која пре свега омогућава продужење рока складиштења КТ уврсти у рутински рад. Но, имајући у виду све предности примене PAS-а (смањење инциденце алергијских и фебрилних трансфузијских реакција, АБО-инкомпатибилних трансфузија тромбоцита, могућност примене неке од метода патогене инактивације, доступна већа количина плазме за фракционисање, продужење рока складиштења КТ до 7 дана), а знајући резултате испитивања квалитета КТ добијених у овом истраживању, потребно је укључити PAS у рутинску трансфузиолошку праксу припреме и складиштења КТ.

## VI ЗАКЉУЧАК:

На основу добијених резултата у овом испитивању и испрне анализе домаће и стране литературе произилазе следећи закључци:

- Концентрати тромбоцита припремљени из јединица целе крви добровољних давалаца издвајањем из „buffy coat“-а задржавају све карактеристике одређене Препорукама за припрему, употребу и обезбеђење квалитета компонената крви Савета Европе, те се могу безбедно применити у рутинској трансфузиолошкој пракси током целог периода складиштења,
- Постоји статистички значајан пад хематолошких параметара (број еритроцита, леукоцита и тромбоцита) и пад рН, као обавезних параметара контроле квалитета, али се њихове вредности све до краја складиштења налазе изнад задатих критеријума Препорука Савета Европе,
- Постоји статистички значајан пад  $pO_2$  и  $pCO_2$ , што је последица повећане гасне пермеабилности пластичних кеса у којима се чувају концентрати тромбоцита,
- Функција тромбоцита мерена кроз њихову агрегацију се током складиштења смањује, и то статистички значајније додавањем веће концентрације агониста, али се све до петог дана уочава очувана функција тромбоцита, која је довољна да доведе до позитивног исхода трансфузије,
- У циљу побољшања квалитета концентрата тромбоцита неопходно је складиштити финални продукт под прописаним условима, променити врсту пластичне кесе за складиштење тромбоцита и увести адитивни раствор за чување тромбоцита, уместо плазме која се стандардно користи.

## VII БИОГРАФИЈА

Мастер менаџер у здравству, Небојша Ваџић, рођен 11.06.1964 године у Нишу, Србија. Завршио основну школу "Ратко Вукићевић" и средњу медицинску школу "Др Мленко Хаџић" у Нишу. Вишу медицинску школу завршио у Ћуприји а Основне струковне студије као и специјалистичке струковне студије завршио на Медицинском факултету Универзитета у Нишу. Основне академске студије- Оперативно примењени менаџмент завршио на Факултету за менаџмент малих и средњих предузећа у Београду.

Мастер академске студије- Менаџмент у здравству завршио на Факултету за примењени менаџмент, економију и финансије „МЕФ„- Београд, Универзитета Привредна академија Нови Сад.

Научно стручни радови:

1. **Ваџић Небојша**, Антић Ана, Станојковић Зоран, Вучић Миодраг, Лазаревић Милан,; “ BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL QUALITY ASSESSMENT OF PLATELET CONCENTRATES”: *Vojnosanitetski pregl* (2018); Online First April, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP180226059V>
2. Антић Ана, Станојковић Зоран, Вучић Миодраг, Лазаревић Милан, **Ваџић Небојша**; “COMPARISON OF FARMACODYNAMIC PROPERTIES OF THREE DIFFERENT ASPIRIN FORMULATIONS IN PATIENTS WITH STABLE CORONARY DISEASE”; *Vojnosanit Pregl* 2019; Decembar vol. 76 (No. 12): pp...
3. Станојковић Зоран Антић Ана, „Бела Балинт, Милена Тодоровић, Вучић Миодраг, **Ваџић Небојша**, Лазаревић Милан,;” EVALUATION OF THE ANTICOAGULANT EFFECT OF VITAMIN K ANTAGONISTS IN PATIENTS WITH NON-VALVULAR ATRIAL FIBRILATION”; *Vojnosanitetski pregl* (2018); Online First January, 2019.
4. Иван Миџић, Милош Петровић, Предраг Стојиљковић, Сања Стојановић, Стево Најман, **Ваџић Небојша**: „RABBIT BONE TISSUE RESPONSE TO THE DEFECTS TREATED WITH DIFFERENT FIXATION METHODS”; UDC:616.71-001.5-089.881 doi:10.5633/amm.2018.0405
5. Ана Антић, Зоран Станојковић, Миодраг Вучић, Милан Лазаревић, **Небојша Ваџић**, „ASSESSMENT OF PLATELET FUNCTION IN PATIENTS TREATED WITH ACETYLSALICYLIC ACID: FACTORS AFFECTING THE EFFICIENCY OF TREATMENT“; Vol. 44 1-2 2018. ANESTEZIJA, REANIMACIJA, TRANSFUZIJA ISSN 0352-194X; ACTION PRO , Beograd
6. Ана Антић, Зоран Станојковић, Миодраг Вучић, Милан Лазаревић, **Небојша Ваџић**, „DIAGNOSTIC TOOLS IN MANAGEMENT OF BLEEDING “; Vol. 44 1-2 2018. ANESTEZIJA, REANIMACIJA, TRANSFUZIJA ISSN 0352-194X; ACTION PRO , Beograd
7. Ваџић Н. „Савремене мере заштите медицинског особља код примене цитотоксичних лекова,, СІР- Каталогизација у публикацији Народна библиотека Србије, Београд; 61 (048) КОНГРЕС здравствених радника Републике Србије са међународним учешћем (Златибор ;2010) Београд: Графос.- ISBN 978-86-84015-19-0 ; а) Медицина – Библиографије, референтиве



; COBISS.SR-ID 178717964

8. Вацић Н., „Медицинска документација трансфузије и акутне трансфузијске реакције“, СІР- Каталогизација у публикацији Народна библиотека Србије, Београд; 61 (048) Симпозијум здравствених радника Републике Србије, „Мајски сусрети, са међународним учешћем (Златибор ;2009) Београд: Графос.- ISBN 978-86-84015-16-9 ; а) Медицина – апстракти ; COBISS.SR-ID 167147788

- Председник Хематоонколошке секције ДМСТБ СУЗР Србије од 2002 г. до 2013 године.
- Главни медицински техничар Клинике за хематологију и клиничку имунологију КЦ Ниш од 2002 г. до 2007 г.
- Главни медицински техничар КЦ Ниш од 2011 до 2012 године
- Председник Савеза здравствених радника региона Ниш од 2007 до 2008 г.
- Оснивач и Председник Удружења здравствених радника Ниш од 2008 г. до данас.
- Делегат Коморе медицинских сестара- здравствених техничара и бабица Републике Србије од 2006 г. до данас у четири мандата.
- Члан У.О. СУЗР Србије од 2007 г. до 2013 године.
- Члан комисије за полагање Стручног испита Струковних медицинских сестара од 2011 г. до 2012 године.
- Спољни стручни надзорник Министарства здравља од 2011 године до данас.
- Председник Националне асоцијације удружења здравствених радника Србије од 2013 године.
- Секретар Радне групе Министарства здравља Републике Србије за израду стратегије сестринства и бабиштва у Републици Србији од 2015 год.

## VIII БИБЛИОГРАФИЈА

1. Antić A, Stanojković Z, Vučić M, Vacić N. Factors for improving the quality of platelet concentrates. *Bilt Transfuziol (Lectures and Abstract Book)* 2018; 63(1-2): 52-3.
2. Balint B, Todorović M. Od hematopoeze do kliničke primene hemoprodukata. In: Balint B, Trkluljić M, Todorović M. *Osnovni principi hemoterapije*. Beograd: Institut za transfuziologiju VMA, 2010 (in Serbian); pp.126-31.
3. Kaufman RM, Djulbegović B, Gernsheimer T, Kleinman S, Tinmouth AT, Capocelli KE, et al. Platelet Transfusion: A Clinical Practice Guideline From the AABB. *Ann Intern Med* 2015; 162: 205–13.
4. Stanojković Z, Antić A, Balint B, Stanojković M, Jelić M. Klinička primena transfuzije trombocita. *Bilt Transfuziol* 2013; 59(1-2): 20-6.
5. Vacić N, Antić A, Stanojković Z, Vučić M, Lazarević M. Biochemical and functional quality assessment of platelet concentrates. *Vojnosanit Pregl* 2018 OnLine-First (00): 59-59; <https://doi.org/10.2298/VSP180226059V>.
6. Stanojković Z, Antić A, Stanojević G, Stanojković M, Jelić M. Savremeni principi pripreme i poboljšanja uslova skladištenja koncentrata trombocita. *Bilt Transfuziol* 2012; 58(1): 13-9.
7. *Guide to preparation, use and quality assurance of blood components*, 19th edition: Council of Europe publishing, 2017.
8. Celloti F, Colciago A, Negri-Cesi P, Pravettoni A, Zaninetti R, Sacchi MC. Effect of platelet-rich plasma on migration and proliferation of SaOs-2 osteoblasts: role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Wound Repair Regen* 2006; 14(2):195-202.
9. Bellucci S. Autoimmune thrombocytopenias. *Baillie's Clinical Haematology* 1998; 11(2):381-9.
10. Zhen-Yi Wang, Zhi-Xiang Shen. Megacary and platelets in immune thrombocytopenic purpura. In: *Clinical Haematology, Megacaryocytes and platelet disorders*. London Philadelphia Sydney Tokio Toronto 1997; 10(10):89-107.
11. Rinder HM, Snyder EL, Tracey JB. Reversibility of severe metabolic stress in stored platelets after in vitro plasma rescue or in vitro transfusion: restoration of secretory function and maintenance of platelet survival. *Transfusion* 2003; 43:1230-37.

12. Hangton RR, Jerome WG, Handt S. Platelet and endothelial cells act in concert to delay thrombolysis evidence from an in vitro model of model of human occlusive thrombus. *Thromb Haemost* 1989;79(3):602-8.
13. Labar B, Hauptman E. Trombociti u: Hematologija. Školska knjiga zagreb 1998:43-7.
14. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007;357:2482-94
15. Naski MC, Lawrence DA, Mosher DF, Podor TJ, Ginsburg D. Kinetics of inactivation of alpha-thrombin by plasminogen activator inhibitor-1: comparison of the effects of native and urea-treated forms of vitronectin. *J Biol Chem* 1993;268(17):12367-72.
16. Muszbek L, Adany R, Szegedi G, Polgar J, Kawai M. Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res* 1985;37(3):401-10.
17. Sakamoto T, Ogawa H, Kawano H, Hirai N, Miyamoto S, Takazoe K. Rapid change of plasma aggregability in acute hyperglycemia. *Thromb Haemost* 2000;83(3):475-9.
18. Jonatan F, Christina Smith, Brent L. Measurement of Phosphatidylserin Exposure in leucocytes and platelet by flow cytometry with annexin V. *Blood cells, Molecules, and diseases* 1999;25:271-8.
19. Luo SZ, Mo X, Afshar-Kharghan V, Srinivasan S, Lopez JA, Li R. Glycoprotein Ibalpha forms disulfide bonds with 2 glycoproteins Ibbeta subunits in the resting platelets. *Blood* 2007;109:603-9.
20. Fontayne A, Vankhoorelbeke K, Pareyn I, Van Rompaey I, Meiring M, Lamprecht S. Rational humanization of the powerful antithrombotic anti-GPIIb/IIIa antibody: B4. *Thromb Haemost* 2006;96:671-84.
21. Ozaki Y, Asazuma N, Suzuki-Inoue, Berndt MC. Platelet GPIIb/IIIa/V-dependent signaling. *J Thromb Haemost* 2005;3:1745-51.
22. Bergmeir W, Piffath CL, Goerge T, Cifuni SM, Ruggeri ZM, Ware J. The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1690-5.
23. Clemetson KJ, Clemetson JM. In *Platelets, Platelet receptors*. ed Michelson AD (Elsevier/Academic Press, San Diego, CA) 2007;2:117-43.
24. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1800-14.
25. Lopez Ja, del Conde I, Shripton CN. Receptors, rafts, and microvesicles in thrombosis and inflammation. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1737-44.

26. Dubois C, Panicot-Dubois L, Gainor JF, Furie BC, Furie B. Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J Clin Invest* 2007; 117: 953-60.
27. Furie B, Furie BC. Mechanismus of thrombus formation. *N Engl J Med* 2009; 359:938-49.
28. Gibbins JM. Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. *J cell Sci* 2004; 117:3415-25.
29. Vandendries ER, Hamilton JR, Coughlin SR, Furie B, Furie BC. Par 4 is required for platelet thrombus propagation but non fibrin generation in mouse model of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:288-92.
30. Prandoni P. Links between arterial and venous disease. *J Intern Med* 2007; 262:341-50.
31. Pozgajova M, Sach UJ, Hein L, Nieswandt B. Reduced thrombus stability in mice lacking the alpha2A-adrenergic receptor. *Blood* 2006; 108: 510-4.
32. Roberts HR, Monroe DM, Escobar MA. Current Concepts of Hemostasis. *Anaesthesiology* 2004; 100: 722-2001.
33. Koscielny J, von Tempelhoff GF, Ziemer S, Practical Concept for Preoperative Managment of Patients With Impaired Primary hemostasis. *Clin Appl Thromb/Haemost* 2004; 10(2):155-66.
34. Bombeli T, Spahn DR. Updates in preoperative coagulation: psychology and managment of thromboembolism and haemorrhage. *Br J Anaesth* 2004; 93(2):275-87.
35. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The Dynamics of Thrombin Formation. *Arterioscler Thromb vasc Biol* 2003; 23: 17-25.
36. Balint B: Functional and therapeutic administration of thrombocytes and their alternatives: *Vojnosanitet Pregl.* 2003; 60(1): 43-51.
37. Ilić S. Transfuziona medicina u : *Interna medicina.* 2004; I: 507-13.
38. Lozano M, Cid J. Platelet components today. *Vox Sang* 2007; 2:216-219.
39. Stroncek FD, Rebullia P. Platelet transfusions. *Lancet* 2007; 370(9585): 427-38.
40. Balint B, Paunović D, Stanojković Z. Hemotherapy for patients with hemostatic disorders. in: Balint B, editor. *Transfusiology.* Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 2004 (In Serbian).pp.331-38.
41. Moroff G, Kline L, Dabay M, Hunter S, Johnson A, McNeil D, Nixon J, Sawyer S, Taylor H, Whitley P, Wahab F, Murphy S. Reevaluation of the resting time period when preparing whole blood-derived platelet concentrates with platelet-rich plasma method. *Transfusion* 2006; 46:572-577.

42. Vassallo RR, Murphy S. A critical comparison of platelet preparation methods. *Curr Opin Hematol* 2006; 13:323-330.
43. Arnold DM, Heddle NM, Kulczycky M, Carruthers J, Sigouin C, Blajchman BA. In vivo recovery and survival of apheresis and whole blood-derived platelets: a paired comparison in healthy volunteers. *Transfusion* 2006; 46:257-264.
44. Seghatchain J, Krailadsiri P. The platelet storage lesion. *Tranfus Med Rev* 1997; 11:130-144.
45. Sweeney J, Kouttab N, Holme S, Kurtis J, Cheves T, Nelson E. Storage of platelet-rich plasma-derived platelet concentrates pools in plasma and additive solution. *Transfusion* 2006; 46:835-840.
46. Antić A, Stanojković Z, Jelić M, Stanojković M. Ispitivanje kvaliteta jedinica koncentrovanih trombocita pripremljenih korišćenjem top&bottom sistema kesa. *Bilt Transfuziol* 2013; 59(1-2): 9-13.
47. Perez-Pujol S, Lozano M, Perea D, Mazzara D, Ordinas A, Escolar G. Effect of holding buffy coats 4 or 18 hours before preparing pooled filtered PLT concentrates in plasma. *Transfusion* 2004; 44:202-209.
48. Cid J, Claparols M, Pinacho A, Hernandez JM, Ortiz P, Puig L, Pau Pla R. Comparison of blood component preparation methods from whole blood bags based on buffy coat extraction. *Transfus Apher Sci* 2007; 36(3): 243-247.
49. Vetlesen A, Mirlashari MR, Ezligini F, Kjeldsen-Kragh J. Evaluation of platelet activation and cytokine release during storage of platelet concentrates processed from buffy coats either manually or by the automated OrboSac system. *Transfusion* 2007; 17:126-132.
50. Gulliksson H, AuBuchon JP, Cardigan R, van der Meer PF, Murphy S, Prowse C, Richter E, Ringwald J, Smacchia C, Slichter S, Wildt-Eggen J. Storage of platelets in additive solutions: a multicentre study of the in vitro effects of potassium and magnesium. *Vox Sang* 2003; 85:199-205.
51. Pietersz RN, Dekker WJ, Reesink HW. A new multiple blood bag system with top and bottom drainage. Comparison with the conventional multiple bag system. *Beitr Infusionsther* 1990; 26:60-4.
52. Hogman CF, Eriksson L, Hedlund K, Wallvik J. The bottom and top system: a new technique for blood component preparation and storage. *Vox Sang* 1988; 55:211-217.
53. Slichter S. Evidence-Based Platelet Transfusion Guidelines. *Hematology* 2007; 1:172-8.

54. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the use of platelet transfusions. *Br J Haem* 2003; 122:10-23.
55. Paunovic D, Van Der Meer P, Kjeldsen-Kragh R, Larson S. Multicenter evaluation of whole-blood filter that saves platelets: *Transfusion* 2004; 44(8): 1197-203.
56. Van Der Meer PF, Pietersz RN, Tiekstra MJ, Hujigens PC, Dekker WJ, Reesink HW. WBC-reduced platelet concentrates from pooled buffy coats in additive solution: an evaluation of in vitro and in vivo measures. *Transfusion* 2001; 41(7):917-22.
57. Larsson S, Gulliksson H, Paunovic D. Evaluation of a whole-blood WBC-reduction filter that saves platelets: in vitro studies. *Transfusion* 2001;41(4):534-9.
58. Bueno JL, Garcia F, Castro E, Barea L, Gonzales R. A randomized crossover trial comparing three plateletpheresis machines. *Transfusion* 2005; 45:1373-81.
59. Ringwald J, Duerler T, Frankow O, Zimmermann R, Zingsem J, Strasser E, Antoon M, Eckstein R. Collection of hyperconcentrated platelets with Trima Accel. *Vox Sang* 2006; 90:92-6.
60. New York State Council on Human Blood and Transfusion Services. Guidelines for the administration of platelets. 2nd ed. 2006.
61. Stanojković Z, Antić A, Stanojković M, Jelić M. Primena aditivne solucije za pripremu i čuvanje trombocita. *Bilt Transfuziol* 2014; 60(1-2): 43-5.
62. Ringwald J, Zimmermann R, Eckstein R. The New Generation of Platelet Additive Solution for Storage at 22°C: Development and Current Experience. *Transfus Med Rev* 2006; 20 (2): 158-64.
63. Gulliksson H. Additive solutions for the storage of platelets for transfusion. *Transfus Med* 2000; 10: 257-64.
64. Insunza A, Romon I, Gonzalez-Ponte ML, Hoyos A, Pastor JM, Iriondo A, Hermosa V. Implementation of a strategy to prevent TRALI in a regional blood centre. *Transfus Med* 2004; 14:157-64.
65. Ringwald J, Walz S, Zimmermann R. Hyperconcentrated platelets stored in additive solution: aspects on productivity and in vitro storage. *Vox Sang* 2005; 89: 11-8.
66. De Wildt-Eggen J, Schrijver JG, Bins M. Storage of platelets in additive solutions: effects of magnesium and/or potassium. *Transfusion* 2002; 42:76-80.
67. Gulliksson H, Aubuchon JP, Vesterinen M. Storage of platelets in additive solutions: a pilot in vitro study of the effects of potassium and magnesium. *Vox Sang* 2002; 82:131-6.

68. Gulliksson H, AuBuchon JP, Cardigan R. Storage of platelets in additive solutions: a multicentre study of the in vitro effects of potassium and magnesium. *Vox Sang* 2003; 85: 199-205.
69. Shanwell A, Falker C, Gulliksson H. Storage of platelets in additive solutions: the effects of magnesium and potassium on the release of RANTES, beta-thromboglobulin, platelet factor 4 and interleukin-7, during storage. *Vox Sang* 2003 85: 206-12.
70. van der Meer PF, Kerkhoffs JL, Curvers J, Scharenberg J, de Korte D, Brand A, de Wildt-Eggen J. In vitro comparison of platelet storage in plasma and in four platelet additive solutions, and the effect of pathogen reduction: a proposal for an in vitro rating system. *Vox Sang* 2010; 98(4): 517-24.
71. Zhang JG, Carter CJ, Devine DV, Scammell K, Weiss S, Gyongyossy-Issa MI. Comparison of a novel viscous platelet additive solution and plasma: preparation and in vitro storage parameters of buffy-coat-derived platelet concentrates. *Vox Sang* 2008; 94: 299–305.
72. Zhang JG, Carter JC, Čulibrk B, Devine DV, Levin E, Scammell K, et al. Buffy-coat platelet variables and metabolism during storage in additive solutions or plasma. *Transfusion* 2008; 48: 847-56.
73. Alhumaidan H, Sweeney J. Current status of additive solutions for platelets. *J Clin Apher* 2012; 27(2): 93-8
74. Reininger AJ. Primary haemostasis and its assessment by laboratory tests. *Hämostaseologie* 2006; 26: 42–7.
75. Antić A, Stanojković Z, Stanojević G, Mačukanović-Golubović L. Laboratorijsko praćenje efekta primene aspirina i klopidoigrela. *Bilt Transfuziol* 2011; 57(1-2): 64-9.
76. Toth O, Calatzis A, Penz S, et al. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2006; 96:781-8.
77. Michelson AD, Frelinger AL III, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol* 2006; 98:4N-10N.
78. Stenholm E. Monitoring of blood transfusion operations in EU countries. A report within EU's Life+ project PVC free Blood Bag LIFE10 ENV/SE/03, 2015.
79. Gulliksson H. Platelets from platelet-rich-plasma versus buffy-coat-derived platelets: what is the difference? *Rev Brasil Hematol Hemoter* 2012; 34(2): 76-7.
80. Vucetić D, Balint B, Taseski J, Mandić-Radić S, Regović V. Biochemical changes in thrombocyte concentrates stored for 5 day. *Vojnosanit Pregl* 2000 (in Serbian); 57(5): 29-36.

81. Rinalducci S, Zolla L. Biochemistry of storage lesions of red cell and platelet concentrates: A continuous fight implying oxidative/nitrosative/phosphorylative stress and signaling. *Transf Apher Sci* 2015; 52 (3): 262 – 9.
82. Kshitija M, Ravneet K. Platelet storage lesion: An update. *Asian J Transfus Sci* 2015; 9(1): 1–3.
83. Klein H, Anstee D. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. Wiley-Blackwell 11<sup>ed</sup> 2006; pp. 611-55.
84. Alamelu J, Liesner R. Modern management of severe platelet function disorders. *Brit J Haematol* 2010;149(6): 813-23.
85. Stanojković Z, Antić A, Stanojković M. Rational use of platelet transfusion. *Proceedings of the Fifth Annual Spring Scientific Symposium in Anaesthesiology and Intensive Care Unit; Faculty of Medicine Niš, 2013: 206-11.*
86. Mathai J. Problem of bacterial contamination in platelet concentrates. *Transfus Apher Sci* 2009; 41(2): 139-44.
87. Goodrich RP, Li J, Pietes H, Crookes R, Roodt J, Heyns AdP. Correlation of in vitro platelet quality measurements with in vivo platelet viability in human subjects. *Vox Sang* 2006; 90:279-85.
88. Stanojković Z, Antić A, Stojanović M. Efekat inaktivacije patogena primenom riboflavina i ultravioletnog zračenja na kvalitet trombocitnih koncentrata. *Vojnosanit Pregl* 2011; 68 (6): 489-94.
89. Singh RP, , Marwaha N, Malhotra P, Dash S. Quality assessment of platelet concentrates prepared by platelet rich plasma-platelet concentrate, buffy coat poor-platelet concentrate (BC-PC) and apheresis-PC methods. *As J As Transf Med* 2009; 3(2): 86-94.
90. de Wildt-Eggen J, Schrijver JG, Bins M. WBC content of platelet concentrates prepared by the buffy coat method using different processing procedures and storage solutions. *Transfusion* 2001; 41(11): 1378-83.
91. Doescher A, Müller TH. Noninvasive pH Monitoring in Platelet Concentrates. *Transfus Med Hemother* 2013; 40: 88-92.
92. Ringwald J, Zimmermann R, Strasser E, Weiss D, Eckstein R. Measuring the pH of platelet concentrates. *Transfusion* 2006; 46(5): 870-1.
93. Gupta A, Chandra T, Kumar A. Evaluation of random donor platelets at different temperatures for an extended shelf life. *Biomed Res* 2010; 21 (4): 433-6.



94. Coêlho MJD, Monteiro T de C, Vasquez FG, et al. Platelet aggregation and quality control of platelet concentrates produced in the Amazon Blood Bank. *Rev Brasil Hematol Hemoter* 2011; 33(2):110-4.
95. Neiva T, Machado M, Hoehn M, Hermes E, Vituri C, Ferreira J, et al. Evaluation of platelet aggregation in platelet concentrates: storage implications. *Rev Brasil Hematol Hemoter* 2003; 25(4):207-12.
96. Mallhi RS, Kumar S, Philip J. A Comparative Assessment of Quality of Platelet Concentrates Prepared by Buffy Coat Poor Platelet Concentrate Method and Apheresis Derived Platelet Concentrate Method. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2015; 31(4): 453-9.
97. Shabani NR, Baqir H. Quality Assessment of Platelet Concentrates Prepared after Whole Blood Overnight Storage. *J Med Bioeng* 2014; 3(2): 87-92.
98. van der Meer PF. PAS or plasma for storage of platelets? A concise review. *Transfus Med* 2016; 26(5): 339-42.
99. Gulliksson H. Platelet storage media. *Vox Sang* 2014; 107(3): 205-12.
100. Rebullà P, Vaglio S, Beccaria F, Bonfichi M, Carella A, Chiurazzi F, et al. Clinical effectiveness of platelets in additive solution treated with two commercial pathogen-reduction technologies. *Transfusion* 2017; 57(5): 1171-83.
101. Zhang JG, Carter JC, Óulibrk B, Devine DV, Levin E, Scammell K, et al. Buffy-coat platelet variables and metabolism during storage in additive solutions or plasma. *Transfusion* 2008; 48: 847-56.
102. van der Meer PF, Kerkhoffs JL, Curvers J, Scharenberg J, de Korte D, Brand A, de Wildt-Eggen J. In vitro comparison of platelet storage in plasma and in four platelet additive solutions, and the effect of pathogen reduction: a proposal for an in vitro rating system. *Vox Sang* 2010; 98(4): 517-24.
103. Zhang JG, Carter CJ, Devine DV, Scammell K, Weiss S, Gyongyossy-Issa MI. Comparison of a novel viscous platelet additive solution and plasma: preparation and in vitro storage parameters of buffy-coat-derived platelet concentrates. *Vox Sang* 2008; 94: 299–305.
104. Shanwell A, Falker C, Gulliksson H. Storage of platelets in additive solutions: the effects of magnesium and potassium on the release of RANTES, beta-thromboglobulin, platelet factor 4 and interleukin-7, during storage. *Vox Sang* 2003 85: 206-12.

# ПРИЛОГ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број - РБ:

Идентификациони број - ИБР:

Тип документације - ТД: **монографска публикација**

Тип записа - ТЗ: **Текстуални штампани материјал**

Врста рада - ВР: **Докторска дисертација**

Аутор - АУ: **Небојша Вацић**

Ментор/коментор - МН: **др.сци.мед.Небојша Анђелковић**

Наслов рада - НР: **Функционално испитивање концентрата тромбоцита припремљених из „buffy-coat“-а**

Језик публикације - ЈП: **српски**

Језик извода - ЈИ: **српски**

Земља публикавања - ЗП: **Србија**

Уже географско подручје - УГП: **Шумадијски округ**

Година - ГО: **2019**

Издавач - ИЗ: **Ауторски репринт**

Место и адреса - МС: **34000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија**

Физичи опис рада - ФО:

Научна област - УДК: **Медицина**

Научна дисциплина - ДИ: **Медицина**

Предметна одредница/ кључне речи - ПО:

Чува се - ЧУ: **У У библиотеци Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија**

Важна напомена- МН:

Извод - ИД:

Припрема концентрата тромбоцита (КТ) из јединице целе крви је метода условљена великим бројем фактора који појединачно или удружено могу имати значајан утицај на квалитет коначног производа. Квалитет концентрата тромбоцита одређен је критеријумима дефинисаним у Водичу за припрему, коришћење и обезбеђење квалитета Европског комитета за трансфузију крви Савета Европе.

Циљ истраживања је био испитати квалитет КТ добијених издвајањем из "buffy coat"-а (ВС) и издвојити факторе који доприносе побољшању квалитета и стандардизацији КТ.

Материјал и метода рада: Испитивање је обухватило укупно 80 КТ издвојених из (ВС) према стандардној процедури припреме у Заводу за трансфузију крви у Нишу. Квалитет КТ је одређиван на основу запремине продукта и лабораторијских тестирања првог (КТ1), трећег (КТ3) и петог дана складиштења (КТ5): хематолошких анализа, гасних анализа ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ ), рН, стерилности и агрегације тромбоцита изазване додавањем 3,2; 6,4 и 9,6  $\mu\text{g}$  колагена/ mL (импедантна агрегометрија).

Резултати: Постоји статистички значајно мањи број тромбоцита,  $pO_2$ ,  $pCO_2$  и рН у КТ3 и КТ5 ( $p < 0,001$ ). Осим испуњености критеријума за број тромбоцита, сви остали параметри су у сагласности са препорукама Водича. Агрегација тромбоцита за све концентрације колагена је показала пад током складиштења, са статистички значајном разликом за КТ3 и КТ5 у односу на КТ1 ( $p < 0,01$ ). Постоји статистички значајна разлика у паду активности узорака КТ активираних применом високих концентрација колагена (6,4 и 9,6  $\mu\text{g}$  колагена/ mL) и мањих концентрација колагена (3,2  $\mu\text{g}$  колагена/ mL).

Закључак: Број тромбоцита, посматрани биохемијски параметри и функција тромбоцита се статистички значајно мењају током периода складиштења. У циљу побољшања квалитета КТ важно је складиштити КТ у прописаним условима, променити врсту кесе за складиштење КТ и користити адитивни раствор за чување тромбоцита уместо плазме.

Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП: 27.02.2019

Датум одбране - ДО:

Чланови комисије - КО:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник
2. **Доц. др Светлана Ђукић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, члан
3. **Доц. др Миодарг Вучић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Интерна медицина-хематологија*, члан

## KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number - ANO:

Identification number - INO:

Documentation type - DT: **monographic publication**

Type of record - TR: **text printed materijal**

Contents code - CC: **doctoral dissertation**

Author - AU: **Nebojsa Vacic**

Menthor/co-mentor - MN: **dr.sci.med.Nebojsa Andjelkovic**

Title - TI: **Functional testing of platelet concentrates prepared from buffy coat**

Language of text - LT: **Serbian**

Language of abstract: **Serbian**

Country of publication - CP: **Serbia**

Locality of publication - LP: **Sumadija district**

Publication year - PY: **2019**

Publisher - PU: **author's reprint**

Publication place - PP: **34000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Serbia**

Physical description - PD:

Scientific field - SF: **Medicine**

Scientific discipline - SD: **Medicine**

Subject/key words - SKW:

UDC **In the library of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia**

Holding data:

Note - N:

**Introduction:** Preparation of platelet concentrate (PC) from a unit of whole blood is a method dependent on a number of factors, which alone or together, can have a significant impact on the quality of the final product. Quality of PCs is determined with criteria defined in the Guide to the preparation, use and quality assurance of the Council of European Committee for Blood Transfusion.

**The study aimed to** analyze the quality of PCs prepared from buffy coat (BC) and to allocate the factors of improvement and standardization of the quality of PCs.

**Materials and methods:** The study included a total of 80 PCs prepared from BC according to the standard procedure in Blood Transfusion Institute Niš. The quality of the PCs was determined according to the volume of product and testings performed on the first (PC<sub>1</sub>), the third (PC<sub>3</sub>) and the fifth day of storage (PC<sub>5</sub>). The following parameters were determined: hematological analysis, gas analysis (pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>), pH, sterility and platelet aggregation triggered using 3,2; 6,4 and 9,6 µg collagen/mL (impedance aggregometry).

**Results:** There are significantly lower platelet count, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> and pH in PC<sub>3</sub> and PC<sub>5</sub> (p<0,001). Except for the fulfillment of the criteria for platelet count, all the other quality parameters are in accordance with recommended criteria. Platelet aggregation for all the

concentrations of collagen has showed a decrease during the storage period, with statistically significant differences for PC<sub>3</sub> and PC<sub>5</sub> as compared to aggregation for PC<sub>1</sub> (p<0,01). There is statistically significant decrease in activity loss between platelet concentrates triggered with higher concentration of collagen (6,4 and 9,6 µg collagen/mL) and with smaller concentration of collagen (3,2 µg collagen/mL).

**Conclusion:** Platelet count, evaluated biochemical parameters and the platelet function changed statistically during the storage period. In order to improve the quality of PCs it is important to store the products under proper conditions, change the type of plastic bag for PC storage and use platelet additive solutions (PAS) instead of plasma.

Accepted by the Scientific Board on - ASB: 27.02.2019

Defended on - DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) - DB:

1. **Prof. Dr. Vladimir Jakovljević**, professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the major scientific field Physiology, president
2. **Doc. dr Svetlana Djukic**, assistant professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the major scientific field Internal medicine, member
3. **Doc. Miodrag Vučić PhD**, assistant Professor at the Faculty of Medicine of the University of Niš for a narrow scientific field Internal medicine-hematology, member

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Небојша Вацић \_\_\_\_\_, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Функционално испитивање концентрата тромбоцита припремљених из „buffy-coat“-а

---

---

која је одбрањена на ФАКУЛТЕТУ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 28.6.2019. године,

\_\_\_\_\_  
Небојша Вацић  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Небојша Ваџић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Функционално испитивање концентрата тромбоцита припремљених из  
„buffy-coat“-а

која је одбрањена на ФАКУЛТЕТУ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, 28.6.2019. године,

Небојша Ваџић

---

потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације

1. **Vacić N**, Antić A, Stanojković Y, Vučić M, Lazarević M. Biochemical and functional quality assessment of platelet concentrates. *Vojnosanitetski pregled*. 2018; doi: 10.2298/VSP180226059V.
2. Antić A, Stanojković Z, Vučić M, Lazarević M, **Vacić N**. Comparison of pharmacodynamic properties of three different aspirin formulations in patients with stable coronary disease. *Vojnosanitetski pregled*. 2018; doi: 10.2298/VSP180110034A.
3. Stanojković Z, Antić A, Balint B, Todorović M, Vučić M, **Vacić N**, Lazarević M. Evaluation of the anticoagulant effect of vitamin K antagonists in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Vojnosanitetski pregled*. 2018; doi: 10.2298/VSP181214008S.



## VOJNOSANITETSKI PREGLED

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**

Tel/faks: +381 11 2669689

[vsp@vma.mod.gov.rs](mailto:vsp@vma.mod.gov.rs)

### ACCEPTED MANUSCRIPT

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article: **BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL QUALITY ASSESSMENT OF PLATELET CONCENTRATES**

### **BIOHEMIJSKA I FUNKCIONALNA ISPITIVANJA KVALITETA KONCENTRATA TROMBOCITA**

Authors: **Nebojša Vacić Pošta, Ana Antić Pošta, Zoran Stanojković, Miodrag Vučić Pošta, Milan Lazarević Pošta**; *Vojnosanitetski pregled* (2018); Online First April, 2018.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP180226059V>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press

version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.

# BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL QUALITY ASSESSMENT OF PLATELET CONCENTRATES

Nebojša Vacić\*, Ana Antić<sup>§</sup>, Zoran Stanojković<sup>§,‡</sup>, Miodrag Vučić<sup>\*,‡</sup>, Milan Lazarević<sup>¶</sup>

\*Clinic for Haematology, Clinical Center Niš, Serbia

<sup>§</sup>Blood Transfusion Institute Niš, Serbia

<sup>‡</sup>Medical Faculty Niš, University of Niš, Serbia

<sup>¶</sup>Department of Cardiac Surgery, Clinic for Vascular Surgery, Clinical Center Niš, Serbia

Contact:

Nebojša Vacić

\*Clinic for Haematology, Clinical Center Niš, Serbia

Boul. dr Z. Djindjića 48, 18000 Niš

Tel. 069/4284333

e-mail: uzrnis@gmail.com

# BIOHEMIJSKA I FUNKCIONALNA ISPITIVANJA KVALITETA KONCENTRATA TROMBOCITA

## *Sažetak*

**Uvod:** Priprema koncentrata trombocita (KT) iz jedinice cele krvi je metoda uslovljena velikim brojem faktora koji pojedinačno ili udruženo mogu imati značajan uticaj na kvalitet konačnog proizvoda. Kvalitet koncentrata trombocita određen je kriterijumima definisanim u Vodiču za pripremu, korišćenje i obezbeđenje kvaliteta Evropskog komiteta za transfuziju krvi Saveta Evrope.

**Cilj istraživanja je** bio ispitati kvalitet KT dobijenih izdvajanjem iz "buffy coat"-a (BC) i izdvojiti faktore koji doprinose poboljšanju kvaliteta i standardizaciji KT.

**Materijal i metoda rada:** Ispitivanje je obuhvatilo ukupno 80 KT izdvojenih iz BC prema standardnoj proceduri pripreme u Zavodu za transfuziju krvi u Nišu. Kvalitet KT je određen na osnovu zapremine produkta i laboratorijskih testiranja prvog (KT<sub>1</sub>), trećeg (KT<sub>3</sub>) i petog dana skladištenja (KT<sub>5</sub>): hematoloških analiza, gasnih analiza (pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>), pH, sterilnosti i agregacije trombocita izazvane dodavanjem 3,2; 6,4 and 9,6 µg kolagena/mL (impedantna agregometrija).

**Rezultati:** Postoji statistički značajno manji broj trombocita, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> i pH u KT<sub>3</sub> i KT<sub>5</sub> (p<0,001). Osim ispunjenosti kriterijuma za broj trombocita, svi ostali parametri su u saglasnosti sa preporukama Vodiča. Agregacija trombocita za sve koncentracije kolagena je pokazala pad tokom skladištenja, sa statistički značajnom razlikom za KT<sub>3</sub> i KT<sub>5</sub> u odnosu na KT<sub>1</sub> (p<0,01). Postoji statistički značajna razlika u padu aktivnosti uzoraka KT aktiviranih primenom visokih koncentracija kolagena (6,4 i 9,6 µg kolagena/mL) i manjih koncentracija kolagena (3,2 µg kolagena/mL).

**Zaključak:** Broj trombocita, posmatrani biohemijski parametri i funkcija trombocita se statistički značajno menjaju tokom perioda skladištenja. U cilju poboljšanja kvaliteta KT važno je skladištiti KT u propisanim uslovima, promeniti vrstu kese za skladištenje KT i koristiti aditivni rastvor za čuvanje trombocita umesto plazme.

**Ključne reči:** trombociti, agregacija, kvalitet

## Summary

**Introduction:** Preparation of platelet concentrate (PC) from a unit of whole blood is a method dependent on a number of factors, which alone or together, can have a significant impact on the quality of the final product. Quality of PCs is determined with criteria defined in the Guide to the preparation, use and quality assurance of the Council of European Committee for Blood Transfusion.

**The study aimed to** analyze the quality of PCs prepared from buffy coat (BC) and to allocate the factors of improvement and standardization of the quality of PCs.

**Materials and methods:** The study included a total of 80 PCs prepared from BC according to the standard procedure in Blood Transfusion Institute Niš. The quality of the PCs was determined according to the volume of product and testings performed on the first (PC<sub>1</sub>), the third (PC<sub>3</sub>) and the fifth day of storage (PC<sub>5</sub>). The following parameters were determined: hematological analysis, gas analysis (pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>), pH, sterility and platelet aggregation triggered using 3,2; 6,4 and 9,6 µg collagen/mL (impedance aggregometry).

**Results:** There are significantly lower platelet count, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> and pH in PC<sub>3</sub> and PC<sub>5</sub> (p<0,001). Except for the fulfillment of the criteria for platelet count, all the other quality parameters are in accordance with recommended criteria. Platelet aggregation for all the concentrations of collagen has showed a decrease during the storage period, with statistically significant differences for PC<sub>3</sub> and PC<sub>5</sub> as compared to aggregation for PC<sub>1</sub> (p<0,01). There is statistically significant decrease in activity loss between platelet concentrates triggered with higher concentration of collagen (6,4 and 9,6 µg collagen/mL) and with smaller concentration of collagen (3,2 µg collagen/mL).

**Conclusion:** Platelet count, evaluated biochemical parameters and the platelet function changed statistically during the storage period. In order to improve the quality of PCs it is important to store the products under proper conditions, change the type of plastic bag for PC storage and use platelet additive solutions (PAS) instead of plasma.

**Key words:** platelets, aggregation, quality

## Introduction

The transfusion of platelet concentrates (PC) is used in the prevention and treatment of bleeding in patients with thrombocytopenia or thrombocytopathias. The most common indications are in the treatment of hematological diseases, in transplantation of bone marrow and other organs, in the treatment of cardiac surgery patients and for the gastrointestinal bleeding. Increasing the applications of aggressive medical treatments and chemotherapy increases the rate of applied transfusions of random donor platelets (1,2). Transfusion of PCs is intended to bring a sufficient number of platelets in the patient's circulation in order to increase their number and allow normal hemostasis, achieve prevention and treatment of bleeding, and on the other side to reduce side effects, infections and alloimmunization to the lowest level. Contemporary data show that each year are transfused about 1,5 million of PCs in the United States and about 2,9 million in Europe (3).

PCs are the blood products obtained from whole blood units (prepared from platelet rich plasma (PRP) or "buffy-coat" (BC - a layer of white blood cell and platelets occurred after red blood cells sedimentation in unit of whole blood) or apheresis platelets, obtained from a single procedure of thrombocytapheresis, using automated blood cell separator. Preparation of PC from a unit of whole blood is a method dependent on a number of factors, which alone or together, can have a significant impact on the quality of the final product. Standardization of PCs is very difficult to execute. The most important factors influencing the quality of PC are the type and quality of blood bags, the characteristics of centrifugation, separation method and storage conditions of the prepared PC (4,5). Today, in all developed countries, including ours, most of PCs are prepared by removing the BC layer and their quality is improving especially if blood is collected in "top & bottom" blood bags (6). Platelets are stored in special plastic bags for storage that allow the transport of oxygen, at a temperature of  $22 \pm 2$  ° C, with continuous agitation on a horizontal agitator (approximately 70 cycles per minute) to prevent platelet aggregation and accelerate the transfer of oxygen for up to 5 days. Application of additive solution for platelets (PAS) extends the storage life of concentrate to 7 days, and generally speaking has numerous advantages over the plasma which is normally used as a medium for storage of platelets,

both in terms of improving the quality of platelet concentrates and efficiency in patients (4,7).

The standard therapeutic dose of platelets for adults is prepared from 4-6 units of blood (dose: 1 concentrate/10 kg BW), and some number of PCs can be merged into one bag by pooling. Pooled platelet concentrate is now commonly prepared by pooling several BC units of the same ABO blood group before centrifugation and dilution of prepared pool can be performed with plasma or PAS.

Quality of PCs is determined with criteria defined in the Guide to the preparation, use and quality assurance of the Council of European Committee for Blood Transfusion (8). Mandatory requirements of quality control of PCs prepared from BC are volume of 50-75 mL which contains at least  $60 \times 10^9$  platelets, less than  $0,05 \times 10^9$  leukocytes, the number of erythrocytes  $0,2 - 1 \times 10^9$  and pH greater than 6,4. In addition, it is recommended to test PC for the presence of bacteria till the end of storage as well as to test platelet function in PCs, which usually means the examination of platelet aggregation by adding the appropriate agonist. This is essential to assess the in vitro function of platelets in respect to different activation pathways (9-11).

**The study aimed to** analyze the quality of PCs prepared from BC by determination of haematological parameters, gas analysis, biochemical in vitro parameters, platelet aggregation and sterility during the whole storage period. On the basis of the results we evaluated if random donor PCs were prepared in accordance with the criteria of the Guide of Council of Europe, and whether we can allocate the factors of improvement and standardization of the quality of PCs.

## Materials and methods

The study included a total of 80 PCs prepared from BC according to the standard procedure in Blood Transfusion Institute Niš. Whole blood from voluntary blood donors of both sexes, non-reactive on the markers of transmissible diseases, with normal clinical and laboratory parameters, who were not taking antiplatelet drugs for last 7 days, was collected in a system of quadruple plastic bags containing 63 ml of CPD anticoagulant solution and 100 ml of additive solution SAGM for storage of red blood cells (JiaxingTiahne



Pharmaceutical, China). All units of blood in the assay were stored at room temperature (20-24°C) and within a period of 6 hours of collection centrifuged for 15 minutes at 3200 rpm and a temperature of 22 ° C (centrifuge with a cooling for blood, Heraeus, Cryofuga 8500). After that, automatic separation of whole blood units was done on the T-ACE II (Terumo) device, and from each blood unit were prepared concentrate of erythrocytes, the plasma unit and platelet-leukocyte layer - "buffy coat" (BC), which was left to stand at room temperature for two hours. After this BCs were centrifuged for 8 minutes at 1100 rpm and a temperature of 22°C, and PCs were transferred in bags that allow storage of platelets for five days. PCs were left a short time on a flat surface (in order to disaggregate platelets), labeled (ISBT 128) and stored horizontally on the agitator (Helmer PC4200i) until the expiration of the storage.

The quality of the PCs was determined according to the volume of product and testings performed on the first (PC1), the third (PC3) and the fifth day of storage (PC5). PCs with a volume less than 20% of the standard volume of the product, chylous, hemolyzed or in any way contaminated products were excluded from this investigation. In order to obtain aliquots from samples of PCs, a sterile connection (TSCD Terumo) was used which ensured the integrity of the environment. From each PC sample, the following parameters were determined:

- hematological analysis - count of platelets, residual erythrocytes and leukocytes on a Abbott Cell-Dyn Ruby analyser (Abbott Laboratories),
- gas analysis - pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> on the AVL Compact 3 Blood Gas Analyzer (Roche Diagnostics),
- pH- on the CyberScan pH510 device (Eutech Instruments),
- sterility – on the Bact / ALERT 3D device (Biomérieux, France): the tested samples were plated in one vial for the presence of aerobic (BPN) and one for anaerobic bacteria (BPA). The bottles were incubated for 7 days at 37 ° C. The sensor system detects a change in the color of the surface, sensitive to the change of carbon dioxide concentration. If the bacteria grow, concentration of carbon dioxide is increasing, which leads to a color change on the base of the bottle, and that the system detects and signals audible and visual signal,
- platelet aggregation - impedance aggregometry method is used on Multiplate (Multiplate Platelet Function Analyzer, Roche): the method measures platelet

aggregation that is ex vivo stimulated by application of various platelet agonist (eg. adenosine diphosphate, arachidonic acid, collagen). Multiplate test cells have two independent measuring units, each of them is composed of two copper, silver-coated electrodes 3.2 mm high and 0.3 mm in diameter. The procedure involves mixing of 150  $\mu$ L PC with 450  $\mu$ l of buffer (0,81% NaCl, 0,0067 M PO<sub>4</sub>, pH 7,2) in a particular test cell. After incubation at 37 ° C for a period of three minutes 20  $\mu$ l of the selected agonist is added, and that is collagen in the concentration of 3,2; 6,4 and 9,6  $\mu$ g/mL. A blood sample containing added agonist is automatically stirred (800 U / min) using a magnetic stirrer coated with poly-tetra-fluoro-ethylene (PTFE). Activated platelets adhere to the electrode and increase the electrical impedance between them, which is registered within 6 minutes, and the increase in impedance is converted into arbitrary units aggregation (aggregation arbitrary units (AU)). The most important parameters that are monitored are: area under the aggregation curve (AUC), which is directly dependent on the height of the curve, and shows the overall activity of platelets, the height of the aggregation curve, which shows the degree of platelet aggregation and the maximum slope of the aggregation curve, which indicates the rate of platelet aggregation.

Statistical analysis was performed using Statistical Package for Social Science (SPSS Software GmbH, Germany), version 15.0. The results are presented in tables and graphs, using the mean values, standard deviations (SD) and medians (Me). Qualitative characteristics of the investigated variables are given as frequency (N) and the percentage (%). Normality of the distribution of continuous variables according to the size of the sample was examined by Kolmogorov-Smirnov or Shapiro-Wilk test. Statistical significance of the experimental data during the storage period was analyzed using the Wilcoxon Signed Ranks Test and Paired Samples T Test. Statistical significance of the difference between the absolute frequencies of samples was analyzed by Pearson's  $\chi^2$  test or Fisher's exact test. The effect of different concentrations of collagen on the monitored variables change over time was determined by analysis of variance for repeated measures (RM ANOVA)

## Results

The average volume of investigated PCs is  $58,75 \pm 3,92$  mL. The results of hematological analysis are shown in Table 1. Comparing the values of the investigated parameters on the first day with the values on the third and the fifth day, there is significantly lower platelet count in PCs on the third and the fifth day, with a level of significance given in Table 1.

Table 1.

Compliance with the quality criteria parameters of blood products during the storage period is shown in Table 2.

Table 2.

Except for the fulfillment of the criteria for platelet count that is filled during storage time for fewer and fewer samples, with no statistically significant difference on the third day, but with a statistically significant difference on the fifth day ( $p < 0,001$ ), all the other hematological parameters are in accordance with recommended criteria. On the first day of storage 91,25% of PCs had the required platelet count, on the third day the percentage is reduced to 83,75%, while on the fifth day only 66,25% of the PCs had more than  $60 \times 10^9/L$  of platelets.

Laboratory parameters and gas analysis during the study period are shown in Table

- There are significantly lower values of  $pO_2$  and  $pCO_2$  on the third and fifth days of storage, as well as the value of pH. pH, as a required criteria for testing the quality of PCs meets the recommended criteria for all the concentrates (80/80, 100%) during the whole period of storage till the fifth day.

Table 3.

Platelet aggregation for  $PC_1$ ,  $PC_3$  and  $PC_5$  triggered with different concentration of collagen is shown in Table 4. It is observed that for all the concentrations of collagen there is a decrease in the aggregation during the storage period, with statistically significant differences for  $PC_3$  and  $PC_5$  as compared to aggregation for  $PC_1$  ( $p < 0,01$ ).

Table 4.

Based on the data in the Graph 1, as well as a generalized linear model for repeated measurements (table 5), which takes account of the different concentrations of collagen, it was confirmed that during the storage period there was a significant decrease in aggregation of all three used concentrations of collagen ( $p < 0,001$ ).

Table 5.

Graph 1.

Also, it has been found that these changes are statistically significantly different between the different collagen concentrations, wherein the smallest decrease of aggregation is for collagen at the highest concentration, and the highest decrease of platelet activity is at the lowest concentration of collagen ( $p < 0,001$ ).

All PCs had negative results for microbiological control till the end of the storage period.

## Discussion

Considering that the main objective of the transfusion of blood products is to achieve the highest therapeutic effect with high safety of the transfusion, it is clear that the evaluation of the quality of prepared blood products is of great importance for efficient transfusion. History of platelet transfusion begins in 1960s with the detection of association between hemorrhagic syndrome and decreased number of platelets in the circulation of patients. Since then there have been many changes in the way of preparation and storage of PCs, with the aim of improving the quality of the product. But, on the other hand, the quality of PC is not just compliance with the criteria of quality system, but also the ability of transfused PC to provide in vivo hemostatic support. Many studies confirmed that only 66% of transfused platelets circulate freely, and many factors can affect their function, such as infection, the use of antibiotics and anti-inflammatory drugs, as well as previous separation and storage lesions in PCs. According to Gulliksson H(12) there are the three most important points in the process of preparation and storage of PC that are essential to maintain good quality of product. First, it is important to prevent or reduce the platelet activation during the blood collection, preparation and storage of PC. Secondly, the level of

glycolytic activity, anaerobic glucose consumption and lactate production should be maintained at the lowest level. Thirdly, it is important that a certain amount of glucose must be present in tissue during the whole period of storage.

Numerous studies have shown that there are significant changes in PCs during the storage period, both in number and platelet function, and biochemical alterations with consequent changes of intracellular metabolism (13-15). During storage period platelet count in PCs progressively decreases comparing to their numbers immediately after preparation. There are changes of the morphological distribution and morphological score of platelets, wherein the number of the discoid and spherical shaped platelets decrease, while dendritic and ballooned cells, which have functionally lesser value, are increasing. This investigation has shown that the average number of platelets on the first and third days of storage meet the required recommendations, whereby on the first day of storage 91,25% of investigated PCs had a platelet count greater than  $60 \times 10^9$ , on the third day 83,75 of PCs had the required number of platelets. During storage till the fifth day, platelet count was statistically significantly decreased, while the average number of platelets was below the required value, and only 66,25% of the PCs had a number of platelets greater than  $60 \times 10^9$ .

In the analysis of the leukocyte content of PCs, we obtained less than  $0,05 \times 10^9$  leukocytes, which indicates normality. This is very important because leukocytes are responsible for a variety of acute and delayed transfusion reactions, primarily an immune-mediated reactions, transmission of the viruses and graft-versus-host disease, but also in vitro production of inflammatory cytokines and the development of febrile non-haemolytic transfusion reactions (16,17). All the investigated samples of PCs remained sterile for aerobic and anaerobic microorganisms until the end of the storage. This is also of the great importance as the presence of bacteria in PC can lead to sepsis and other transfusion reactions. Data from the literature presents the incidence of bacterial contamination of 1 in 2000 PCs (18). pH is an important marker for the quality of PCs in vitro since at values below 6,8 platelets become spherical and this change in shape becomes irreversible when pH drops below 6,2 (19,20). This investigation has shown statistically significant decrease in pH, which appears to be a consequence of a greater permeability of the plastic bag for PC storage to gases, particularly  $\text{CO}_2$ . These changes in gas concentrations lead to changes in the concentrations of bicarbonate, with a resulting buffering of the system and the change of pH.

Although gas analysis do not belong to the group of mandatory parameters for quality testing, recommendations imply that the level of blood gases should stay at a constant level, ideally as on the first day. A number of studies show that this does not occur in the practice, mostly depending to the kind of the used bag and a temperature of 22°C. Obtained results show pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub> significantly decreased on the third and the fifth storage day. It is known that during storage of PCs extracellular alterations can cause cellular lesions, implying metabolism variations and function decrease (13,21).

The focus of this study was functional testing of platelets in PCs. Collagen is known as a very potent platelet agonist as it is related to the activation of several intracellular metabolic systems with different receptors in platelet membranes. Thus, it binds to von Willebrand factor (vWF), creating an adherence bridge between collagen and the platelet glycoprotein Ib receptor. Granule content secretion is triggered by platelet surface receptor agonists (22). In our study, the results of platelet aggregation show that after 5 days of storage a reproducible aggregation response could be determined, but there is statistically significant decrease in platelet aggregation on the third and fifth day of storage compared to the first day. Also, there is statistically significant decrease in activity loss between PCs triggered with higher concentration of collagen (6,4 and 9,6 µg collagen/mL) and with smaller concentration of collagen (3,2 µg collagen/mL). A possible explanation for these changes might be the changes of pH, increase of lactate concentration as well as the variation in the composition of the platelet membrane.

Considering the changes that have been proven in the PC quality during storage it is important to identify factors that may be important to reduce the level of these changes and to improve the quality of PC, specially from the third to the fifth day of storage. A large number of investigations on this subject concluded that there are many factors that can be singled out as determinants of functional and biochemical changes in PCs (23-25). The most important of them are temperature, volume, agitation and the kind of plastic bag used for conservation of PCs. As all the investigated parameters of PC<sub>1</sub> showed a high level of quality, we can conclude that the blood collection process did not significantly affect platelet quality. Our results lead us to the conclusion that in the conditions under which PCs were prepared and stored, there are the two main factors affecting the quality of PCs. These are the kind of bag for storage of PC and plasma, as a medium for storage of

platelets. The observed gas exchanges are capable of causing platelet lesions, altering their metabolism, which, on the second level, lead to significant platelet activation and reduction of functional capacity (23). It is essential to choose some other type of plastic bags for PC storage which can provide an environment that results in an improved product and will permit 5-day storage of PCs with preserved quality. On the other hand, it is known that platelets derive energy from glucose oxidation through glycolysis and  $\beta$ -oxidation of long-chain fatty acids, why during the storage of PC there is an increase of glucose metabolism by the glycolytic via, lactate production is also increased while pH and production of bicarbonate are decreased. Various authors have suggested that instead of plasma should be used platelet additive solutions (PAS) for PC storage in order to improve their quality. PAS contains acetate in its composition as a nutrient medium for platelets, which is a basic substrate for normal platelet metabolism, it reduces the production of lactate and increases the production of hydrogen carbonate solution, which finally leads to pH stabilization. Additionally, acetate acts as a buffer. The other ingredient of PAS is phosphate, which has a double effect on the metabolism of platelets. In addition to its acts as a buffer, a phosphate also stimulates glycolysis, which can lead to a significant drop in pH, but also the production of higher levels of ATP, which allow for greater cell viability of platelets. Magnesium and potassium in PAS reduce the activation and aggregation of platelets, maintain the morphological score and decrease in lactate production (26-28). A number of previous studies have shown that in vitro platelet quality stored in the PAS is a statistically significant improved compared to platelets that are stored in the plasma, and bearing in mind the other advantages of PAS (reduction of the incidence of allergic and febrile transfusion reactions, ABO-incompatible transfusion of platelets, pathogen inactivation, increased amount of plasma available for fractionation, storage of PC for 7 days (29)), it is necessary to include PAS in routine transfusion practice for PC preparation and storage.

## Conclusions

Platelet count, evaluated biochemical parameters and the platelet function changed statistically during the storage period. In order to improve the quality of PCs it is important to store the products under proper conditions, change the type of plastic bag for PC storage and use PAS instead plasma.

## Literature

- Balint B, Todorović M. Od hematopoeze do kliničke primene hemoprodukata. In: Balint B, Trkluljić M, Todorović M. Osnovni principi hemoterapije. Beograd: Institut za transfuziologiju VMA, 2010 (in Serbian); pp.126-31.
- Tynngård N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrates. TransfusApherSci 2009; 41(2): 97-104.
- Hess JR. Conventional blood banking and blood component storage regulation: opportunities for improvement. Blood Transfus2010; 8 (Suppl 3): s9–s15.
- Stanojković Z, Antić A, Stanojević G, Stanojković M, Jelić M. Current principles of preparation and improvement of storage conditions of platelet concentrates. Bilt Transfuziol 2012 (in Serbian); 58(1): 13-9.
- Singh RP, Marwaha N, Malhotra P, Dash S. Quality assessment of platelet concentrates prepared by platelet rich plasma-platelet concentrate, buffy coat poor-platelet concentrate (BC-PC) and apheresis-PC methods. Asian J TransfusSci 2009; 3(2): 86-94.
- Antić A, Stanojković Z, Jelić M, Stanojković M. Quality assessment of platelet concentrates prepared using top&bottom blood bags. Bilt Transfuziol 2013 (in Serbian); 59(1-2): 9-13.
- Mokhtar MB, Hashim HB, Joshi SR. Assessment of quality of platelets preserved in plasma and platelet additive solution: A Malaysian experience. Asian Journal of Transfusion Science 2016;10(1): 84-7.
- Guide to preparation, use and quality assurance of blood components,19th edition: Council of Europe publishing, 2017.
- Paniccia R, Priora R, AlessandrelloLiotta A, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. Vascular Health and Risk Management 2015; 11:133-48.
- Panzer S, Jilma P. Methods for testing platelet function for transfusion medicine. Vox Sang 2011; 101(1): 1-9.
- Kehrel E, Brodde FM. State of the Art in Platelet Function Testing.Transfus MedHem2013; 40(2): 73–86.
- Gulliksson H. Platelets from platelet-rich-plasma versus buffy-coat-derived platelets: what is the difference? Rev BrasilHematolHemoter2012;34(2): 76-7.



- Vucetić D, Balint B, Taseski J, Mandić-Radić S, Regović V. Biochemical changes in thrombocyte concentrates stored for 5 day. Vojnosanit Pregl 2000 (in Serbian);57(5):29-36.
- Rinalducci S, Zolla L. Biochemistry of storage lesions of red cell and platelet concentrates: A continuous fight implying oxidative/nitrosative/phosphorylative stress and signaling. TransfApherSci 2015; 52 (3): 262 – 9.
- Kshitija M, Ravneet K. Platelet storage lesion: An update. Asian J TransfusSci2015; 9(1): 1–3.
- Balint B, Todorović M. From haematopoiesis to clinical use of haemoproducts. In: Balint B, ed. The basic principles of haemotherapy. Čigoja; Institute for transfusion MMA 2010 (In Serbian): 128-31.
- Stanojković Z, Antić A, Stanojković M. Rational use of platelet transfusion. Proceedings of the Fifth Annual Spring Scientific Symposium in Anaesthesiology and Intensive Care Unit; Faculty of Medicine Niš, 2013: 206-11.
- Mathai J. Problem of bacterial contamination in platelet concentrates. TransfusApherSci 2009; 41(2): 139-44.
- Doescher A, Müller TH. Noninvasive pH Monitoring in Platelet Concentrates. Transfus Med Hemother 2013;40:88-92.
- Ringwald J, Zimmermann R, Strasser E, Weiss D, Eckstein R. Measuring the pH of platelet concentrates. Transfusion 2006;46(5):870-1.
- Gupta A, Chandra T, Kumar A. Evaluation of random donor platelets at different temperatures for an extended shelf life. Biomed Res 2010; 21 (4): 433-6.
- Coêlho MJD, Monteiro T de C, Vasquez FG, et al. Platelet aggregation and quality control of platelet concentrates produced in the Amazon Blood Bank. Rev BrasilHematolHemoter 2011; 33(2):110-4.
- Neiva T, Machado M, Hoehn M, Hermes E, Vituri C, Ferreira J, et al. Evaluation of platelet aggregation in platelet concentrates: storage implications. Rev BrasilHematolHemoter 2003; 25(4):207-12.
- Shabani NR, Baqir H. Quality Assessment of Platelet Concentrates Prepared after Whole Blood Overnight Storage. J Med Bioeng 2014; 3(2): 87-92.
- Mallhi RS, Kumar S, Philip J. A Comparative Assessment of Quality of Platelet Concentrates Prepared by Buffy Coat Poor Platelet Concentrate Method and

Apheresis Derived Platelet Concentrate Method. Indian J Hematol Blood Transfus2015;31(4):453-9.

- Stanojković Z, Antić A, Stanojković M, Jelić M. The use of additive solution for preparation and storage of platelets. Bilt Transfuziol 2014; 60(1-2): 43-5.
- van der Meer PF. PAS or plasma for storage of platelets? A concise review. Transfus Med 2016;26(5): 339-42.
- Gulliksson H. Platelet storage media. Vox Sang 2014;107(3):205-12.
- Rebulla P, Vaglio S, Beccaria F, Bonfichi M, Carella A, Chiurazzi F, etal. Clinical effectiveness of platelets in additive solution treated with two commercial pathogen-reduction technologies. Transfusion 2017;57(5): 1171-83.

**Table 1.**  
**Hematological analysis of platelet concentrates during storage**

	PC <sub>1</sub>			PC <sub>3</sub>			PC <sub>5</sub>		
<b>Erythrocytes</b>	0,005±	0,010	(0,000)	0,005±	0,011	(0,000)	0,004±	0,015	(0,000)
<b>Platelet count</b>	62,166±	2,416	(62,190)	60,915±	2,337 <sup>***</sup>	(61,190)	59,642±	2,478 <sup>***</sup>	(60,315)
<b>Leukocytes</b>	0,007±	0,004	(0,006)	0,008±	0,004	(0,007)	0,007±	0,004	(0,006)
<b>Volume</b>	58.753±	3.919	(58.870)						

PC<sub>1</sub>- Platelet concentrates on the first day

PC<sub>3</sub>- Platelet concentrates on the third day

PC<sub>5</sub>- Platelet concentrates on the fifth day

Data are presented as X±SD (Me)

\*\*\* – p<0.001 (Wilcoxon Signed Ranks Test)

**Table 2.****Compliance of platelet concentrates with quality criteria parameters during storage**

	<b>PC<sub>1</sub></b>		<b>PC<sub>3</sub></b>		<b>PC<sub>5</sub></b>	
<b>Erythrocytes</b>						
<b>&lt;0.2-1x10<sup>9</sup></b>	80	100,00%	80	100,00%	80	100,00%
<b>Platelet</b>						
<b>count&gt;60 x 10<sup>9</sup></b>	73	91,25%	67	83,75%	53	66,25% ***
<b>Leucocytes&lt;0,05</b>						
<b>x 10<sup>9</sup></b>	80	100,00%	80	100,00%	78	97,50%
<b>Volume &gt;40ml</b>	80	100,00%				

**PC<sub>1</sub>**- Platelet concentrates on the first day

**PC<sub>3</sub>**- Platelet concentrates on the third

day **PC<sub>5</sub>**- Platelet concentrates on the fifth day

Data are presented as the frequency and percentage

\*\*\* – p<0.001 (Chi Square Test)

**Table 3.****Laboratory parameters and gas analysis of platelet concentrates during storage**

	<b>PC<sub>1</sub></b>		<b>PC<sub>3</sub></b>		<b>PC<sub>5</sub></b>	
<b>pH</b>	7,191±	0,067 (7,178)	7,181±	0,063*** (7,171)	7,170±	0,062*** (7,161)
<b>pO<sub>2</sub></b>	137,056±	7,888 (137,50)	130,87±	7,593*** (130,75)	123,70±	6,544*** (122,95)
<b>pCO<sub>2</sub></b>	49,259±	2,604 (48,950)	42,339±	2,739*** (42,30)	23,854±	3,012*** (23,650)
<b>pH &gt;6,4</b>	<b>N= 80</b>	100%	<b>N=80</b>	100%	<b>N=80</b>	100%

**PC<sub>1</sub>**- Platelet concentrates on the first day

**PC<sub>3</sub>**- Platelet concentrates on the third

day **PC<sub>5</sub>**- Platelet concentrates on the fifth day Data are presented as X±SD (Me)

\*\*\* – p<0,001 (Wilcoxon Signed Ranks Test, Paired Samples T Test)



**Table 4.****Platelet aggregation during storage with collagen in concentration of 9.6, 6.4 and 3.2µg/mL**

Collagen concentration	PC <sub>1</sub>		PC <sub>3</sub>		PC <sub>5</sub>	
3.2µg/mL	<b>1057,29±</b>	98,07 (1056,0)	<b>590,14±</b>	80,15 <sup>***</sup> (591,50)	<b>252,46±</b>	56,75 <sup>***</sup> (250,00)
6.4µg/mL	<b>1111,18±</b>	111,3 (1133,5)	<b>966,90±</b>	127,04 <sup>**</sup> (985,00)	<b>734,18±</b>	120,12 <sup>***</sup> (741,00)
9.6µg/mL	<b>1181,65±</b>	119,3 (1215,0)	<b>1094,49±</b>	121,89 <sup>*</sup> (1119,0)	<b>956,15±</b>	120,16 <sup>***</sup> (986,00)

PC<sub>1</sub>- Platelet concentrates on the first dayPC<sub>3</sub>- Platelet concentrates on the third dayPC<sub>5</sub>- Platelet concentrates on the fifth day

Data are presented as X±SD (Me)

\*\*\* – p&lt;0.001 (Wilcoxon Signed Ranks Test, Paired Samples T Test)

**Table 5.****The effects of different collagen concentrations on platelet aggregation after 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, and 5<sup>th</sup> storage day- the results of generalized linear method for repeated measurements**\*Partial eta squared ( $\eta^2$ )

Received on February 26, 2018.

Accepted on March 26, 2018.

Online First April, 2018.



## VOJNOSANITETSKI PREGLED

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

Crnotravska 17, 11 000 Beograd, Srbija

Tel/faks: +381 11 2669689

[vsp@vma.mod.gov.rs](mailto:vsp@vma.mod.gov.rs)

### ACCEPTED MANUSCRIPT

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article: **COMPARISON OF FARMACODYNAMIC PROPERTIES OF THREE DIFFERENT ASPIRIN FORMUALTIONS IN PATIENTS WITH STABLE CORONARY DISEASE**

Authors: **Antić Ana\***, **Stanojković Zoran\*¶**, **Vučić Miodrag¶**, **Lazarević Milan§**, **Vacić Nebojša¥**; *Vojnosanitetski pregled* (2018); Online First March, 2018.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP180110034A>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.

# COMPARISON OF FARMACODYNAMIC PROPERTIES OF THREE DIFFERENT ASPIRIN FORMUALTIONS IN PATIENTS WITH STABLE CORONARY DISEASE

*Antić Ana\**, *Stanojković Zoran\*<sup>†</sup>*, *Vučić Miodrag<sup>‡†</sup>*, *Lazarević Milan<sup>§</sup>*, *Vacić Nebojša<sup>‡</sup>*

*\* Blood Transfusion Institute Niš, Serbia*

*<sup>†</sup> Medical Faculty Niš, University of Niš, Serbia*

*<sup>‡</sup> Clinic for Hematology, Clinical Center Niš, Serbia*

*<sup>§</sup> Clinic for Cardiovascular and Transplantation Surgery, Clinical Center Niš, Serbia*

Contact:

Antić Ana, PhMD  
Tel.+381631039045  
e-mail:anaantic@sbb.rs

Blood Transfusion Institute Niš  
Boulevard dr Zoran Đinđić 48, Niš

## Summary

**Introduction:** Platelet aggregation, as a laboratory test for assessment of platelet function, is very efficient for optimal antiplatelet treatment and also to identify individuals who have suboptimal response to antiplatelet drugs, such as aspirin and clopidogrel.

**Aim:** To determine the level of inhibition of platelet aggregation using impedance aggregometry in patients receiving different preparations of acetylsalicylic acid (ASA) in a dose of 100 mg per day.

**Patients and methods:** The examination included 215 patients (110 men and 105 women), treated with one of three different ASA preparations after acute myocardial infarction, as a single therapy or with clopidogrel. Among them, 89 patients were on Aspirin protect (*Bayer, Germany*) – Group 1, 66 patients were on Cardiopirin (*GL Pharma GMBH, Austria*) - Group 2, while 60 patients were taking Andol (*Pliva, Croatia*) - Group 3. The groups were equal in the presence of factors that can influence platelet aggregation (age, gender, smoking, diabetes, taking other drugs). Platelet function was measured using impedance aggregometer *Multiplate* (Multiplate Platelet Function Analyzer, Roche) in blood samples with heparin for ASPI and TRAP tests (the area under the aggregation curve (AUC) was used to express the aggregation response over the measured time (AU\*min)).

**Results:** Efficacy of ASA preparations showed statistically significant differences between the three investigated groups ( $\chi_{KW}^2=46,279$ ;  $p<0,001$ ), and it was also observed separately in patients undergoing single therapy ( $\chi_{KW}^2=26,344$ ;  $p<0,001$ ) and dual therapy ( $\chi_{KW}^2=23,498$ ;

$p<0,001$ ). It was found that the patients who were taking Aspirin protect obtained significantly better efficiency compared to the patients receiving Cardiopirin ( $Z=5,472$ ;  $p<0,001$ ) and Andol ( $Z=5,387$ ;  $p=0,022$ ). There is reduced efficiency of all ASA preparation in smokers, while patients receiving Aspirin protect were 10,5 times more likely to be responders.

**Conclusion:** Different ASA preparations observed in this study show different efficiency on platelet function as measured by the method of impedance aggregometry.



# POREĐENJE FARMAKODINAMSKIH OSOBINA TRI RAZLIČITA PREPARATA ASPIRINA KOD PACIJENATA SA STABILNOM KORONARNOM BOLEŠĆU

## Sažetak

**Uvod:** Agregacija trombocita, kao laboratorijski test za procenu funkcije trombocita, je od posebnog značaja za optimalno vođenje antitrombocitne terapije i izdvajanje pacijenata koji pokazuju suboptimalni odgovor na primenu antitrombocitnih lekova, kao što su aspirin i klopidogrel.

**Cilj rada** je bio odrediti stepen inhibicije agregacije trombocita metodom impedantne agregometrije kod pacijenata koji su uzimali različite preparate acetilsalicilne kiseline (ASA) u dozi od 100 mg dnevno.

**Pacijenti i metode:** Ispitivanje je obuhvatilo 215 pacijenata (110 muškaraca i 110 žena), koji su nakon infarkta miokarda sa naknadnom revaskularizacijom uzimali jedan od tri različita ASA preparata, pojedinačno ili u kombinaciji sa klopidogrelom. Od ukupnog broja, 89 pacijenata su uzimali Aspirin protect (*Bayer, Nemačka*) – Grupa 1, 66 pacijenata su uzimali Cardiopirin (*GL Pharma GMBH, Austrija*) – Grupa 2, dok je 60 pacijenata bilo na Andol-u (*Pliva, Hrvatska*) – Grupa 3. Grupe su bile jednake u zastupljenosti faktora koji mogu biti od uticaja na agregaciju trombocita (starost, pol, pušenje, diabetes, uzimanje drugih lekova). Funkcija trombocita merena je na impedantnom agregometru *Multiplate* (*Multiplate Platelet Function Analyzer, Roche*) iz uzoraka krvi sa heparinom korišćenjem ASPI i TRAP testa (rezultati su izraženi kroz površinu ispod agregacione krivulje u periodu ispitivanja (AU\*min)).

**Rezultati:** Postoji statistički značajna razlika u efikasnosti različitih ASA preparata ( $\chi_{KW}^2=46,279$ ;  $p<0,001$ ), što se vidi i posebno kod pacijenata koji su na pojedinačnoj ( $\chi_{KW}^2=26,344$ ;  $p<0,001$ ) i dvojnoj terapiji ( $\chi_{KW}^2=23,498$ ;  $p<0,001$ ). Pacijenti koji su uzimali

Aspirin protect su imali značajno bolju efikasnost leka u poređenju sa pacijentima koji su uzimali Cardiopirin ( $Z=5,472$ ;  $p<0,001$ ) i Andol ( $Z=5,387$ ;  $p=0,022$ ). Postoji smanjeni efekat svih ASA preparata kod pušača, dok pacijenti koji uzimaju Aspirin protect imaju 10,5 puta veću verovatnoću da budu responderi.

**Zaključak:** Različiti preparati acetilsalicilne kiseline posmatrani u ovom ispitivanju pokazuju laboratorijski značajno različitu efikasnost na funkciju trombocita merenu metodom impedantne agregometrije.

## Introduction

Antiplatelet therapy shows significant benefit in the treatment of acute coronary syndrome (ACS). For over 100 years acetylsalicylic acid (ASA) is used as an anti-inflammatory and antipyretic drug, but since the end of 1960s it is known that ASA also reaches its positive cardiovascular effects in the inhibition of thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) by acting on the enzymes cyclooxygenase COX-1 and COX-2 (1,2). The effect of ASA on COX-1 is irreversible and lasts for the life of the platelets, depending on the production of new platelets which will recover COX-1 activity at a rate of about 10% per day in healthy

people. Low doses of ASA are sufficient to suppress more than 95% of TXA<sub>2</sub> synthesis by COX-1, which leads to inhibition of platelet aggregation. However, platelets affected with ASA may still aggregate in the presence of potent platelet agonists such as collagen and thrombin. Higher doses of ASA can inhibit COX-2 synthesis of prostacyclin in endothelial cells, but it retains the ability to regenerate the production of prostacyclin a few hours after ingestion of ASA due to the ability of cells to synthesize the core protein (2-4).

Despite its significant antiplatelet effect ASA is not always able to prevent all cardiovascular events. This is far from surprising when considering the complexity of arterial thrombosis and specific platelet physiology (5). This lack of therapy success was the reason for introduction various diagnostic tests with the intent of guiding and optimizing clinical treatment of patients. Such tests have resulted in the generation of clinical data that suggest suboptimal response to antiplatelet agents such as ASA or clopidogrel, which is called “resistance” (6-8).

The definition of ASA resistance is quite variable in the literature and has been described as the occurrence of thromboembolic events despite ASA intake, insufficient pharmacological inhibition of COX-1-derived TXA<sub>2</sub> formation with subsequent insufficient inhibition of platelet function, or the inability of the drug to cause prolongation of bleeding time (8-10). It should be noted that most experts prefer to use the term “variable response” instead ASA resistance, which indicates that the response to ASA differs among some patients, and may be attributed to various individual-, drug- or disease-related reasons or mechanisms (6,8,10). Several mechanisms have been identified to explain the incidence of variable response to ASA: non-compliance, age, sex, smoking, possible drug interactions (NSAIDs, inhibitors of proton pump), inadequate dosing, alternative pathways of platelet activation, altered platelet response to ASA under some conditions/surgical procedures (e.g. CABG), genetic variations of COX-1 gene or platelet receptors, pre-treatment platelet reactivity and pre-existing clinical conditions (diabetes mellitus, renal failure, essential thrombocythaemia) (11-16).

The possibility of monitoring the platelet response to ASA therapy can have a great impact on the management of therapy and significantly reduce the incidence of morbidity and mortality. The most important thing is to distinguish patients who do not receive the necessary protection with ASA, but also to determine possible causes of treatment failure (17,18). The most clinically meaningful measure of the platelet-inhibitory effects of ASA is the level of serum thromboxane (serum TxB<sub>2</sub> levels reflect TxA<sub>2</sub> formation by platelets) (19). Other methods that are efficient in optimal management of antiplatelet therapy and identification of the patients who have a suboptimal response to antiplatelet drugs are light transmission and impedance aggregometry, thromboelastography, bleeding time assay and flow cytometric analysis (20-22).

**The aim** of this investigation was to test the platelet function by the method of impedance aggregometry in patients receiving various preparations of ASA in order to determine whether the type of ASA preparation affects the degree of inhibition of platelet aggregation and thus affects the degree of variable response to ASA.

## ***Patients and methods***

The study included 215 patients who received a single (ASA) or a dual (ASA + clopidogrel) antiplatelet therapy after acute myocardial infarction with revascularization. These patients were not at the same time on non-steroidal anti-inflammatory drugs, and the patients were not with established thrombocytopenia or thrombocytosis (platelet count was  $150-300 \times 10^9/L$ ). All patients had normal renal function (creatinine clearance greater than 60 mL/min). Patients were taking 3 types of tablet ASA preparations in a single dose of 100 mg daily at least for 2 months, but the longest for 6 months: Aspirin protect (*Bayer, Germany*) – Group 1, Cardiopirin (*GL Pharma GMBH, Austria*) – Group 2 and Andol (*Pliva, Croatia*) – Group 3. The groups were equal in the presence of factors that can influence platelet aggregation (age, gender, smoking, diabetes, taking other drugs).

Platelet function was measured using impedance aggregometer *Multiplate* (Multiplate Platelet Function Analyzer, Roche) in blood samples of 4 mL with lithium heparin as antucoagulant (*VenoSafe, Terumo*) for ASPI and TRAP tests. Blood samples were taken 4 hours after taking ASA. The procedure implies adding 300 ml of the heparinized blood and 300 ml of the saline solution into the test cell. After incubation at 37°C for three minutes 20 ml of the selected agonist is added, so it is achieved a final concentration of arachidonic acid (AA-M) of 0.5 mM (ASPI test) and TRAP of 3.2  $\mu M$  (TRAP test). A blood sample containing added agonist is automatically stirred (800 U/min) using a magnetic stirrer coated with poly-tetra-fluoro-ethylene (PTFE). Activated platelets adhere to the electrode and increase the electrical impedance between them, which is registered within 6 minutes, and the increase in impedance is converted into arbitrary units aggregation (aggregation arbitrary units (AU)). The area under the aggregation curve (AUC) is used to express the aggregation response over the measured time (AU\*min). According to the manufacturer the reference values were 923-1509 AU\* min for TRAP and 790-1410 AU\* min for ASPI test. If ASPI was <400 AU\* min patient was assigned as ASA-responder.

Further, we considered the risk factors that may affect the efficacy of ASA preparations, such as smoking, gender, age, diabetes mellitus or taking other drugs (anticoagulant agents, proton pump inhibitors (PPIs) and  $\beta$ -blockers).

Statistical analysis was performed using Statistical Package for Social Science (*SPSS Software GmbH, Germany*), version 20.0. The results were presented in tables and graphs, using the mean values and standard deviations (SD). The efficacy of ASA preparations between groups was compared using  $\chi^2$ -test, ANOVA, Kruskal-Wallis Test and Mann Whiney U test. Logistic regression analysis was used to determine the predictive factors in the assessment of efficacy of drugs. Statistical significance was determined at the level of  $p < 0,05$ .

## ***Results***

From the total of 215 patients in this study, there were 110 men (110/210 or 51,20 %) and 105 women (105/210 or 48,80 %). The average age of patients in the study was  $55,82 \pm 11,15$  years, the youngest patient was 24 and the oldest one was 80 years. There was no statistically significant difference in the age structure of patients by gender ( $t=1,163$ ;

p=0,046).

All the patients were divided into three groups according to the type of the applied ASA preparation: Group 1- 89 patients (41,4%), Group 2 - 66 patients (30,7%), Group 3 - 60 patients (27,9%). Most of the patients were on a single therapy - 94 patients (44,76%), 55 of them (45,5%) were in Group 1, 33 patients (27,3%) in Group 2 and 33 patients (27,3%) were in Group 3. On the other hand, 121 patients were at dual therapy, 34 of them (36,2%) in Group 1, 33 patients (35,1%) were in Group 2 and 27 patients (28,7%) were in Group 3.

Table 1 shows the general characteristics of the patients in relation to the type of ASA preparation.

Table 1.

Sex and age distribution did not differ significantly by group. Also groups were homogenous according to smoking status and the presence of diabetes. The differences did not exist in relation to the use of anticoagulants, beta-blockers and PPIs.

General assessment of the efficacy of ASA preparations and a comparison between the groups regardless of the type of antiplatelet therapy (single, dual) is shown in Table 2.

Table 2.

TRAP values did not differ significantly among the groups (F=1,238; p=0,292), in patients on single therapy (F=0,371; p=0,069) as well as on a dual therapy (F=1,299; p=0,280), which indicates the similar basic function of platelets in all the patients.

Efficacy of ASA preparations showed statistically significant differences between the three investigated groups ( $\chi^2=46,279$ ; p<0,001), and it was also observed separately in patients undergoing single therapy ( $\chi^2_{KW}=26,344$ ; p<0,001) and dual therapy ( $\chi^2_{KW}=23,498$ ; p<0,001). Examining the efficacy of ASA in all the patients it was found that the patients who were taking Aspirin protect obtained significantly better efficiency compared to the patients receiving Cardiopirin (Z=5,472; p<0,001) and Andol (Z=5,387; p=0,022). Significantly better efficacy of Aspirin protect is also determined in both groups of patients on an individual and dual antiaggregation therapy.

Logistic regression model of independent factors for the assessment of effectiveness of ASA preparations for all the patients in this study is shown in Table 3, where all th

patients are divided in responders (ASPI $\leq$ 400) and non-responders (ASPI $>$ 400). This model included the following variables: age, diabetes, smoking, anticoagulants, beta blockers, PPIs and the type of applied ASA preparation.

Table 3.

The whole model was highly significant ( $\chi^2$  (df=9, N=215) = 112,658, p<0,001) and explained between 40,8% and 54,9% of the variance of efficiency of all ASA preparations according to the ASPI test. The factors that gave statistically significant contribution to the model were smoking (OR=0,108; p<0,001) and the use of Aspirin protect (OR=10,538; p<0,001). In non-smokers the probability for values of ASPI<400 increases for 89,2% compared to smokers, while patients receiving Aspirin protect were 10,5 times more likely to have a value of ASPI<400.

Table 4 shows the three logistic regression models of independent factors for the assessment of effectiveness of three different ASA preparations, where all the patients are also divided in responders (ASPI $\leq$ 400) and non-responders (ASPI $>$ 400). The models included the following variables: age, diabetes, smoking, anticoagulants, beta blockers and PPIs.

Table 4.

The first model included patients in Group 1. The whole model was highly significant ( $\chi^2$  (df=7, N=89) =17,299, p=0,016) and explained between 17,7% and 29% of the variance of efficiency of Aspirin protect. However, none of the variables are not marked as statistically significant.

The second model included the patients in Group 2. The model was highly statistically significant ( $\chi^2$  (df=7, N=66) = 51,939, p<0,001) and generally explained between 54,5% and 73,2% of the variance of the efficiency of Cardiopirin. Statistical significant contribution to the model had the following factors: gender (OR=0,093; p=0,020) and smoking (OR=0,003; p<0,001).

The third model consisted of patients in Group 3. The model was highly statistically significant ( $\chi^2$  (df=7, N=60) = 43,199, p<0,001) and generally explained between 51,3% and 69,4% of the variance of efficiency of Andol. However, none of the factors was not statistically significant.

## ***Discussion***

Antiplatelet therapy can not provide the prevention of all cardiovascular events, but the inhibitory effect on platelet aggregation significantly decreases cardiovascular morbidity and mortality (3). According to data from the American Heart Association (AHA) and the European Society of Cardiology (ESC) therapy with ASA in a dose of 100 mg daily has significant therapeutic effects in patients with moderate cardiovascular risk. In patients with primary coronary intervention (PCI) with or without stenting it is recommended to use clopidogrel (75 mg per day) in combination with ASA in an initial dose of 300 mg, and subsequently the dose is reduced to 75-100 mg daily (23). Also, the recommended initial treatment in patients with acute ischemic attack, which do not have

thrombolytic therapy, is ASA in a dose of 150 to 325 mg and in the further therapy it is recommended ASA in a dose of 100 mg daily with clopidogrel (75 mg daily) (24,25).

The potential relation between low response to antiplatelet therapy and clinical outcome has not yet been fully explained, mainly due to the fact that it is not universally accepted definition of resistance. The term platelet resistance should not be used lightly, because it can have a bad effect if it is not interpreted correctly. Misidentified, it can produce increased risk of thrombosis if the treatment is discontinued, on the other hand there is a risk of hemorrhage if a dose of antiplatelet drug is wrongly increased. Studies have shown inconsistent levels of resistance to ASA. Data range from 1,4-9,8% (*Hurlen et al*) (26) to 55% (*Buchanan et al*) (27), but the most studies have shown the incidence of 15-33% of individuals with bad response to ASA (28-32). Rates are slightly higher in patients with stroke. Recent studies have shown that non-responsiveness to antiplatelet drugs is a risk factor for thromboembolic events (stroke, myocardial infarction, vascular death).

*Škorić B et al* in their study concluded that initial patency of the infarct-related artery in patients with acute ST elevation myocardial infarction is related to platelet response to aspirin (33). Also, *Gum P et al* documented in their investigation a greater than threefold increase in the risk of major adverse events associated with ASA resistance (34). A recent meta-analysis of 20 studies included more than 2900 patients and reported that patients with lower response to ASA had a significantly increased risk of having a cardiovascular event (3,85 OR) (35). Given these data and conclusions it is clear that measuring the antiplatelet effect of ASA is of great relevance.

Nowadays there are a large number of commercial tests available to monitor the effects of ASA, in order to identify patients who are at substantial risk for adverse events while they are on therapy. Recent studies have shown that the impedance aggregometry can be reliably used to assess the effect of ASA therapy, because it shows a high degree of sensitivity and good correlation with other testing methods (2,17). The variability of response to a given ASA is not a surprise given that environment, genetics, and disease can affect the drug's disposition. The most important factors that influence the effectiveness of ASA are the age, gender, the presence of diabetes, smoking and concomitant therapies, such as PPIs, antihypertensive drugs and the anticoagulant drugs. It is known that diabetes mellitus is associated with underlying platelet over-reactivity, which may attenuate the response to aspirin (11), tobacco use increases platelet activation and accentuates platelet thrombosis (9), while concomitant administration of PPIs reduces the effect of ASA due to the weaker absorption that is enhanced by esterases of gastrointestinal mucosa (12). Our investigation has shown that the factors that are statistically significant for the efficiency of ASA are smoking and the type of ASA preparation, where we can see that the patients receiving Aspirin protect are 10,5 times more likely to be responders in ASPI test.

There are not published data yet if the selection of ASA preparation can affect the therapy itself and whether the kind of ASA preparations that is taken in the same dosage and in the same way can affect its effectiveness. This is important especially due to the fact that many authors do not recommend increasing the dose of ASA to achieve and maintain an effective level of antiplatelet activity because of the possibility of increased bleeding, especially in patients with stroke. Therefore, there are important implications for being able to optimize the efficiency and safety of ASA preparations.

Our investigation has shown that three ASA preparations, which are available in our market, demonstrate their effectiveness comparable to the data in the literature. However,

the effectiveness of the ASA preparations which is measured in this investigation by the method of impedance aggregometry showed a statistically significant difference. In general, regardless whether patients were taking just ASA or ASA with clopidogrel, Aspirin protect has shown significantly higher efficiency compared to Cardiopirin and Andol ( $\chi_{KW}^2=46,279$ ;  $p<0,001$ ). The same relation exists in a group of patients on a single therapy ( $\chi_{KW}^2=26,344$ ;  $p<0,001$ ), as well as in the group of patients who have the dual therapy ( $\chi_{KW}^2=23,498$ ;  $p<0,001$ ). Comparing the factors that may influence the efficiency of different ASA preparations we found that none of the evaluated factors were statistically significant for the effectiveness of Aspirin protect and Andol, while gender and smoking were significant for Cardiopirin. It is known that hormonal changes in women can enhance platelet activation (9) and ASA bioinactivation by the liver may be slower in older patients than in younger ones, but it is important to point out that the gender has not been shown to be important factor for the efficacy of all ASA preparations, although, thus increasing the bioavailability in this group (36).

The results of our research confirm our assumption that together with all the factors we know that can influence the effectiveness of ASA, selection of ASA preparation can also impact on the outcome of therapy. Although we can't clinically prove that the type of ASA preparations is of importance for the effectiveness of antiplatelet therapy, it seems reasonable that the laboratory assessment of the efficiency of ASA preparations is taken into consideration as one of the criteria, and a type of ASA preparation as one of the factors which affect the anti-platelet effect of ASA.

## ***Conclusions***

Various preparations of acetylsalicylic acid examined in this investigation show significantly different laboratory efficiency on platelet function as measured by the method of impedance aggregometry.

## **Literature**

1. Reininger AJ. Primary haemostasis and its assessment by laboratory tests. *Hämostaseologie* 2006; 26: 42–7.
2. Antid A, Stanojkovid Z, Stanojevid G, Mačukanovid-Golubovid L. Laboratory monitoring of the aspirin and clopidogrel therapy effect. *Bilt Transfuziol* 2011; 57(1-2): 64-9.
3. Guyer KE. The present state of aspirin and clopidogrel resistance. *Hämostaseologie* 2009; 29: 285–90.
4. Gasparayan AY, Watson T, Lip GY. The role of aspirin in cardiovascular prevention: implications of aspirin resistance. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 1829-43.
5. Grove EL. Antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease. [Dan Med J](#) 2012; 59(9): B4506.
6. Campbell CL, Streinhubl SR. Variability in response to aspirin: do we understand the clinical relevance? *J Thromb Hemost* 2005; 3: 665-9.
7. Zimmerman N, Hohlfeld T. Clinical implications of aspirin resistance. *Thromb Haemost* 2008; 100: 379-90.
8. Schwartz KA. Aspirin Resistance: A Clinical Review Focused on the Most Common Cause, Noncompliance. *The Neurohospitalist* 2011; 1(2): 94-103.
9. Mehta JL, Mohandas B. Aspirin resistance: Fact or fiction? A point of view. *World J Cardiol* 2010; 2(9): 280-8.
10. Patrono J. The multifaceted clinical readouts of platelet inhibition by low-dose aspirin. *Am Coll Cardiol* 2015; 66: 74–85.
11. Linden MD, Tran H, Woods R, et al. High platelet reactivity and antiplatelet therapy resistance. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38:200–12.
12. Dawson J, Quinn T, Rafferty M. et al. Aspirin resistance and compliance with therapy. *Cardiovasc Ther* 2011; 29:301–7.
13. Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A, Milo O, et al. Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin? *Am Heart J* 2004; 147: 293–300.



14. [Kurth T](#), [Glynn RJ](#), [Walker AM](#), [Chan KA](#), [Buring JE](#), [Hennekens CH](#), [Gaziano JM](#). Inhibition of clinical benefits of aspirin on first myocardial infarction by nonsteroidal antiinflammatory drugs. [Circulation](#) 2003; 108(10): 1191-5.
15. Grosser T, Fries S, Lawson JA, Kapoor SC, Grant GR, Fitzgerald GA. Drug resistance and pseudoresistance: an unintended consequence of enteric coating aspirin. [Circulation](#) 2013; 127: 377–85.
16. [Floyd CN](#), [Ferro A](#). Mechanisms of aspirin resistance. [Pharmacol Ther](#) 2014; 141(1): 69-78.
17. Harrison P, Frelinger AL III, Furman MI, et al. Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. [Thromb Res](#) 2007; 120:323-36.
18. Alberts M. Platelet Function Testing for Aspirin Resistance Is Reasonable to Do. [Stroke](#) 2010; 41: 2400-1.
19. Santilli F, Rocca B, De Cristofaro R, et al. Platelet cyclooxygenase inhibition by low-dose aspirin is not reflected consistently by platelet function assays: implications for aspirin “resistance.” [J Am Coll Cardiol](#) 2009; 53: 667–77.
20. Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, Romano E, Gori AM, Marcucci R, Prisco D, Abbate R. Assessment of platelet function on whole blood by multiple electrode aggregometry in high-risk patients with coronary artery disease receiving antiplatelet therapy. [Am J Clin Pathol](#) 2009; 131(6): 834-42.
21. Schror K. What is [aspirin](#) resistance? [Br J Cardiol](#) 2010; 17(Suppl. 1):S5–7.
22. Adamzik M, Görlinger K, Peters J, Hartmann M. Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis. [Critical Care](#) 2012; 16(5): R204 .
23. Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). [Eur Heart J](#) 2018; 39(2): 119-77.
24. Goodman SG, Menon V, Cannon CP, et al. American College of Chest Physicians. Acute ST-segment elevation myocardial infarction: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition). [Chest](#) 2008; 133(6S): 708S-775S.

25. [Weitz JI](#), [Eikelboom JW](#), [Samama MM](#). New antithrombotic drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. [Chest](#) 2012; 141(2 Suppl): e120S-e151S.
26. Hurlen, M, Abdelnoor M, Smith P, Erikssen J, Arnesen H. Warfarin, aspirin, or both after myocardial infarction. *New Engl J Med* 2002; 347: 969–97.
27. Buchanan MR, Verma S. Biological basis and clinical implications of acetylsalicylic acid resistance. *Can J Cardiol* 2006; 22(2): 149-51.
28. [Cheng X](#), [Xie NC](#), [Xu HL](#), [Chen C](#), [Lian YJ](#). Biochemical aspirin resistance is associated with increased stroke severity and infarct volumes in ischemic stroke patients. [Oncotarget](#) 2017; 8(44): 77086-95.
29. Liu L, Fan L, Hu G, Hu Y, Zhu B, Li X, et al. Prevalence and Risk Factors for Aspirin Resistance in Elderly Patients With Type 2 Diabetes. *Int J Gerontol* 2011; 5(2): 112-6.
30. Alahmari S, Alayed K, Malik A, Gader A, Albanyan A, Al-Shaikh Y. Measurement of platelet function to determine the prevalence of aspirin non-responsiveness among Saudi type II diabetic patients. *J Health Spec* 2016; 4(1): 31-6.
31. Mortensen SB, Larsen SB, Grove EL, Kristensen SD, Hvas AM. Reduced platelet response to aspirin in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* 2010; 126: e318-2.
32. [Gluckman TJ](#), [McLean RC](#), [Schulman SP](#), et al. [Effects of aspirin responsiveness and platelet reactivity on early vein graft thrombosis after coronary artery bypass graft surgery.](#) *J Am Coll Cardiol* 2011; 57:1 069.
33. Škorić B, Miličić D, Lovrić D, Gornik I, Škorić Narančić K, Sertić I. Initial patency of the infarct-related artery in patients with acute ST elevation myocardial infarction is related to platelet response to aspirin. *Int J Cardiol* 2010; 140(3): 356-8.
34. Gum P, Marchant K, Welsch P, White J, Toplo E. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *JACC* 2003; 41(6): 961-5.
35. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin „resistance“ and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008; 336:1

36. Rocca B, Petrucci G. Variability in the Responsiveness to Low-Dose Aspirin: Pharmacological and Disease-Related Mechanisms. *Thrombosis* 2012; 2012:376721.

**Table 1.**

		General characteristics of the patients			$\chi^2/F^*$	p
		Group 1	Group 2	Group 3		
<b>Sex</b>	m	45(50,6)	34(51,1)	31(51,7)	0,022	0,989
	f	44(49,4)	32(48,5)	29(48,3)		
<b>Age</b>		56,09±11,31	54,29±11,96	57,10±10,48	1,046*	0,353
<b>Diabetes mellitus</b>	yes	21(23,6)	16(24,2)	18(30,0)	0,862	0,650
	no	68(76,4)	50(75,8)	42(60,0)		
<b>Smoking</b>	yes	33(37,1)	29(43,9)	34(56,7)	5,584	0,061
	no	56(62,9)	37(56,1)	26(43,3)		
<b>Anticoagulants</b>	yes	35(39,3)	16(24,2)	19(31,7)	3,957	0,138
	no	54(60,7)	50(75,8)	41(68,3)		
<b>Beta blockers</b>	yes	41(46,1)	34(51,5)	29(48,3)	0,450	0,798
	no	48(53,9)	32(48,5)	31(51,7)		
<b>Proton pump inhibitors</b>	yes	26(29,2)	19(28,8)	18(30,0)	0,023	0,989
	no	63(70,8)	47(71,2)	42(70,0)		

$\chi^2$ -Hi square test

F-ANOVA

**Group 1** - Aspirin protect (*Bayer, Germany*) a 100 mg

**Group 2** - Cardiopirin (*GL Pharma GMBH, Austria*) a 100 mg

**Group 3** - Andol (*Pliva, Croatia*) a 100 mg

**Table 2.**

		Assessment of efficiency of ASA preparations in all groups			F/ $\chi_{KW}^2$	p
		Group 1 (n= 74)	Group 2 (n=56)	Group 3 (n=50)		
<b>Total</b> (n=210)	<b>TRAP</b>	1166,82±207,23	1186,32±248,78	1125,32±210,63	1,238	0,292
	<b>ASPI</b>	301,93±122,98	521,29±270,71	459,60±185,89	46,279*	<0,001
<b>Single therapy</b>	<b>TRAP</b>	1184,85±206,26	1152,73±229,19	1131,97±190,14	0,704	0,496

(n=94)	<i>ASPI</i>	319,84±121,98	576,76±290,15	469,06±200,22	26,344*	<0,001
<i>Dual therapy</i>	<i>TRAP</i>	1137,65±208,349	1219,91±266,19	1117,18±236,75	1,630	0,202
(n=121)	<i>ASPI</i>	272,97±120,78	465,81±241,50	448,04±169,79	23,498*	<0,001

*F-ANOVA,  $\chi_{KW}^2$  - Kruskal-Wallis Test*

**Group 1** - Aspirin protect (*Bayer, Germany*) a 100 mg

**Group 2** - Cardiopirin (*GL Pharma GMBH, Austria*) a 100 mg

**Group 3** - Andol (*Pliva, Croatia*) a 100 mg

**Table 3.**

**Logistic regression model of independent factors for assessing the efficiency of ASA for all the patients according to ASPI test**

	<b>OR</b>	<b>95%CI</b>	<b>p</b>
<i>Gender</i>	0,658	0,308-1,407	0,281
<i>Age</i>	1,024	0,990-1,059	0,174
<i>Diabetes</i>	0,868	0,315-2,391	0,784
<i>Smoking</i>	0,108	0,040-0,293	<0,001
<i>Anticoagulants</i>	1,794	0,677-4,753	0,240
<i>Beta blockers</i>	0,812	0,388-1,701	0,581
<i>PPIs</i>	0,398	0,153-1,039	0,060
<i>Aspirin</i>	10,538	3,893-28,526	<0,001
<i>Cardiopirin</i>	0,902	0,358-2,271	0,827
<i>Andol</i>	1,109	0,440-2,792	0,832

*OR-Odds Ratio.*

*PPIs-proton pump inhibitors*

Table 4.

Logistic regression model of independent factors for assessing the efficiency of Aspirin protect,

Cardiopirin and Andol according to ASPI test

	OR	95%CI	p
<b>Model 1 (Aspirin protect)</b>			
<i>Gender</i>	0,888	0,228-3,458	0,864
<i>Age</i>	1,054	0,996-1,115	0,067
<i>Diabetes</i>	0,821	0,155-4,343	0,817
<i>Smoking</i>	0,498	0,106-2,346	0,378
<i>Anticoagulants</i>	7,377	0,834-65,261	0,072
<i>Beta blockers</i>	0,709	0,191-2,628	0,607
<i>PPIs</i>	0,622	0,191-2,628	0,592
<b>Model 2 (Cardiopirin)</b>			
<i>Gender</i>	0,093	0,012-0,692	0,020
<i>Age</i>	1,048	0,970-1,132	0,238
<i>Diabetes</i>	0,157	0,004-6,872	0,337
<i>Smoking</i>	0,003	0,000-0,069	<0,001
<i>Anticoagulants</i>	0,179	0,024-1,348	0,095
<i>Beta blockers</i>	1,476	0,259-8,400	0,661
<i>PPIs</i>	0,203	0,021-1,918	0,164
<b>Model 3 (Andol)</b>			
<i>Gender</i>	0,664	0,104-4,224	0,664
<i>Age</i>	0,911	0,822-1,010	0,077
<i>Diabetes</i>	0,139	0,006-3,305	0,222

*OR-Odds Ratio*

*PPIs-proton pump inhibitors*

Received on January 10, 2018.  
Revised on February 2, 2018.  
Revised on February 11, 2018.  
Revised on February 27, 2018.  
Accepted on March 1, 2018.  
Online First March, 2018.



## VOJNOSANITETSKI PREGLED

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

Crnotravska 17, 11 000 Beograd, Srbija

Tel/faks: +381 11 2669689

[vsp@vma.mod.gov.rs](mailto:vsp@vma.mod.gov.rs)

### ACCEPTED MANUSCRIPT

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article **EVALUATION OF THE ANTICOAGULANT EFFECT OF VITAMIN K ANTAGONISTS IN PATIENTS WITH NON-VALVULAR ATRIAL FIBRILATION**

**ISPITIVANJE ANTIKOAGULANTNOG EFEKTA ANTAGONISTA VITAMINA K KOD PACIJENATA SA NEVALVULARNOM ATRIJALNOM FIBRILACIJOM**

**Authors Zoran Stanojković<sup>1,2</sup>, Ana Antić<sup>1</sup>, Bela Balint<sup>3,4,5</sup>, Milena Todorović<sup>6,7</sup>, Miodrag Vučić<sup>2,8</sup>, Nebojša Vacić<sup>8</sup>, Milan Lazarević<sup>9</sup>, Vojnosanitetski pregled (2019); Online First January, 2019.**

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP181214008S>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.



# **EVALUATION OF THE ANTICOAGULANT EFFECT OF VITAMIN K ANTAGONISTS IN PATIENTS WITH NON-VALVULAR ATRIAL FIBRILATION**

**ISPITIVANJE ANTIKOAGULANTNOG EFEKTA ANTAGONISTA VITAMINA K KOD PACIJENATA SA NEVALVULARNOM ATRIJALNOM FIBRILACIJOM**

**Zoran Stanojković<sup>1,2</sup>, Ana Antić<sup>1</sup>, Bela Balint<sup>3,4,5</sup>, Milena Todorović<sup>6,7</sup>, Miodrag Vučić<sup>2,8</sup>, Nebojša Vacić<sup>8</sup>, Milan Lazarević<sup>9</sup>**

1Blood Transfusion Institute Niš, Serbia

2Medical Faculty, University of Niš, Serbia

3Department of Medical Sciences, Serbian Academy of Sciences and Arts

4Department of Transfusion Medicine, Institute of Cardiovascular Diseases “Dedinje”, Serbia

5Institute for Medical Research, University of Belgrade, Serbia

6Clinic for Hematology, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

7Medical Faculty, University of Belgrade, Serbia

8 Clinic for Hematology, Clinical Center of Niš, Serbia

9 Clinic for Cardiovascular and Transplant Surgery, Clinical Center of Niš, Serbia

## Abstract

**Background/Aim.** Despite the introduction of new oral anticoagulants (dabigatran, rivoroxaban, apixaban), vitamin K antagonists (VKA), such as warfarin and acenocoumarol are still the most widely used oral anticoagulants for the treatment of non-valvular atrial fibrillation (NVAF). Time in therapeutic range (TTR) represents a measure of the quality of the anticoagulant effect of these drugs, and it is considered that the lower value of TTR is associated with the adverse effects of therapy. The study aim was to evaluate of the effectiveness of VKA therapy in patients with NVAF and to identify factors affecting the anticoagulation efficacy. **Methods.** A retrospective study was conducted on a population of 725 outpatients with NVAF, treated with VKA and followed in Blood Transfusion Institute of Niš from January to December 2017. Laboratory control of the INR was done from capillary blood of patients on Thrombotrack Solo (Axis Shield, Norway) and Thrombostat (Behnk Elektronik, Germany). Targeted therapeutic INR was between 2.0 and 3.0. For each patient we evaluated all available INR values to calculate the individual TTR according to the Rosendaal method. **Results.** The study included a total of 725 patients with NVAF which had 6105 INR measurements, what is  $8.13 \pm 2.47$  INR measurements per patient. The mean value of TTR and was  $60.15 \pm 17.52\%$ , but 49.72% of patients had a TTR less than 60%. Patients were at high risk of thrombosis in 6.15% of time (INR < 1.5) and high risk of bleeding in 2.2% of time (INR > 4.5). The most significant independent factors affecting the quality of VKA therapy are gender, arterial hypertension, diabetes mellitus and the use of amiodarone and antiplatelet drugs (aspirin, clopidogrel). **Conclusion.** The TTR is undoubtedly useful indicator of the effectiveness of VKA treatment. The most important predictors of poorer efficacy of VKA therapy are arterial hypertension, diabetes mellitus, patients' gender and the use of amiodarone and antiplatelet (aspirin, clopidogrel) drugs. To improve the quality of VKA therapy, education of patient and better collaboration with them, as well as a successful teamwork with clinicians are also imperative.

## Key words:

vitamin K antagonists; anticoagulation; time-in-therapeutic-range.

## Apstrakt

**Uvod/Cilj.** I pored uvođenja novih oralnih antikoagulantnih lekova (dabigatran, rivoroksaban, apiksaban), antagonisti vitamina K (AVK), kao što su varfarin i acenokumarol još uvek jesu najčešće primenjivani oralni antikoagulantni lekovi u terapiji nevalvularne aatrijalne fibrilacije (NVAF). Vreme u terapijskom opsegu (TTR-*Time in Therapeutic Range*) predstavlja meru kvaliteta antikoagulantnog efekta ovih lekova, te se smatra da su niže vrednosti TTR-a udružene sa neželjenim efektima terapije. Cilj ovog rada je bio utvrditi efikasnost AVK terapije kod pacijenata sa NVAF i izdvojiti faktore koji utiču na kvalitet antikoagulantnog efekta ovih lekova. **Metode.** Retrospektivnom analizom obuhvaćeno je 725 pacijenata sa NVAF koji su ambulantno praćeni u Zavodu za transfuziju krvi Niš u periodu januar-decembar 2017. godine. Laboratorijska kontrola INR-a rađena je iz kapilarne krvi pacijenata na aparatima Trombotrack Solo (*Axis Shield, Norveška*) i Thrombostat (*Behnk Elektronik, Nemačka*). Ciljani terapijski INR je bio između 2,0 i 3,0. Na osnovu svih dostupnih vrednosti INR-a za svakog pacijenta ponaosob je određen

individulani TTR metodom po Rosendaal-u. **Rezultati.** Ispitivanje je obuhvatilo ukupno 725 pacijenata sa NVAF kod kojih je u toku 2017. godine urađeno 6105 kontrola INR-a, što predstavlja  $8,13 \pm 2,47$  INR kontrola po pacijentu. Srednja vrednost TTR-a je bila  $60,15 \pm 17,52\%$ , ali je 49,72% pacijenata imalo TTR < 60%. Pacijenti su bili u visokom riziku za trombozu u 6,15% vremena (INR < 1,5), dok su u 2,2% vremena bili u visokom riziku za krvarenje (INR > 4,5). Najznačajniji nezavisni faktori koji utiču na kvalitet AVK terapije su: pol, arterijska hipertenzija, dijabetes, upotreba amiodarona i antitrombocitnih lekova (aspirin, klopidogrel). **Zaključak.** TTR je nedvosmisleno koristan pokazatelj efikasnosti antikoagulantnog efekta AVK. Najznačajniji prediktori lošije efikasnosti AVK su pol, arterijska hipertenzija, dijabetes, upotreba amiodarona i antitrombocitnih lekova (aspirin, klopidogrel). U cilju unapredjenja kvaliteta primene i monitoringa AVK antikoagulantne terapije neophodna je pravilna edukacija i bolja saradnja sa pacijentima, ali i uspešna interdisciplinarna saradnja sa kliničkim lekarima.

## Ključne reči:

**vitamin K antagonisti, antikoagulantni efekat, vreme u terapijskom opsegu.**

### Introduction

Despite the implementation of new oral anticoagulants (NOAC) for the treatment of patients with atrial fibrillation or venous thromboembolism, vitamin K antagonists (VKA), such as warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon are still the most widely used oral anticoagulants. The most common indications for their use are atrial fibrillation, mitral or aortic stenosis, mitral or aortic prosthetic valve, venous thromboembolism and intracavitary thrombosis<sup>1,2</sup>. This therapy is long lasting, for months and years, and in some cases till the end of life. The mechanism of action of these drugs is based on their competition with the vitamin K and reduction the level of vitamin K dependent coagulation factors (FII, FVII, FIX, FX), an anticoagulant protein C and its co-factor protein S<sup>3</sup>.

The use of VKA must be regularly and often laboratory controlled in order to ensure the adequacy of therapy and to avoid sub-dosing or drug overdose. The most commonly used test for the control of oral anticoagulant therapy is the prothrombin time (PT), expressed in INR system, which provides an internationally standardized monitoring of the treatment. Therapeutic range for INR is from 2.0 to 3.5, depending on the indication for which the drug is used<sup>4</sup>. Therapeutic ranges are generally set up on the basis of clinical trials and are determined in order to achieve the required minimum coagulating effect for the prevention of recurrent thrombosis or lasting of existing thrombotic episodes. The treatment carries, on the one hand, the risk of bleeding, and on the other hand, the risk of thrombosis, so warfarin and other VKA have a narrow therapeutic index and should be dosed within strictly defined ranges<sup>3,5</sup>.

The Time in Therapeutic Range (TTR) is commonly used to evaluate the quality of VKA therapy and is an important tool for assessing the risks of this therapy. TTR estimates a percentage of time a patient's INR is within the desired therapeutic range and is widely used as an indicator of anticoagulation control<sup>6-8</sup>. The numerous studies have shown that higher TTR correlates with good clinical outcomes, and that there is a strong correlation between TTR and adverse events (bleeding, thrombosis). But although TTR is routinely assessed, there is no consensus on acceptable target for TTR in practice. Active-W study suggested a minimum TTR of 58% in order to show a benefit of oral anticoagulant therapy over antiplatelet therapy in terms of preventing vascular events<sup>9</sup>, RE-LY study on

Portuguese patients showed mean TTR of 61% <sup>10, 11</sup>, Thrombosis Canada states that good INR control is when TTR is more than 60% <sup>12</sup>, but there are studies that report elevated level of TTR on 74% as a measure of effective anticoagulation <sup>8, 13</sup>. It is known that many factors correlate with TTR, and the most important are age, sex, smoking, concomitant drugs, alcohol, comorbid medical and psychiatric conditions <sup>14</sup>.

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of VKA therapy in patients with NVAF and to identify factors affecting the anticoagulation efficacy.

## Methods

A retrospective study was conducted on a population of 725 outpatients with atrial fibrillation, treated with VKA (warfarin (Farin), acenocoumarol (Sintrom, Sinkum, Acenokumarol)) and followed in Department for hemostatic disorders testings in Blood Transfusion Institute of Niš from January to December 2017. The study included patients of both sexes who had strictly determined diagnosis of NVAF and indication for the use of VKA, the target INR (2.0–3.0), patients who were expected to take VKA throughout the whole period of study and that control testing of INR would be done only at the Institute. We excluded patients who had discontinued treatment for any reason at any time of investigation, patients who have had interruption in taking VKA for any reason, patients who have done any of the control of INR in another facility, patients that had changed target INR during the investigation, as well as patients with INR > 6.0. We have characterized the demographic and clinical characteristics of the patients, as well as the use of other drugs (β-blockers, antiplatelet drugs, statins, amiodarone, ACE inhibitors).

Laboratory control of the INR was done from capillary blood of patients on Thrombotrack Solo (Axis Shield, Norway) and Thrombostat (Behnk Elektronik, Germany). For each patient we evaluated all available INR values to calculate the individual TTR according to the Rosendaal method <sup>15</sup>. This method uses linear interpolation to assign an INR value to each day between successive observed INR values (INR-DAY software program (Dr FR Rosendaal, Leiden, Netherlands)). The primary outcome was to determine the TTR, and the secondary outcomes were to determine time under (INR < 2.0) and over therapeutic range (INR > 3.0), time with increased thrombotic risk (INR < 1.5) and time with increased hemorrhagic risk (INR > 4.5), as well as to determine independent factors for increased risk of worse anticoagulation therapy.

Statistical analysis was performed using Statistical Package for Social Science (SPSS Software GmbH, Germany), version 15.0. The results are presented in tables and graphs, using the mean values and standard deviations (SD). Qualitative characteristics of the investigated variables are given as frequency (N) and the percentage (%). The continuous data were analyzed using Chi-square test. Multivariate logistic regression analysis was performed to identify independent risk factors for TTR < 60%. The results were considered to be statistically significant at a  $p < 0.05$ . Since it is "post-hoc" analysis from the prospective observational registry, we cannot exclude the presence of unmeasured selection bias, and statistical analyses were not specified before the data was seen, which could be some kind of study limitation.

## Results

From the total of 725 patients in this study, there were 430 men (430/725 or 59.40 %) and 295 women (295/725 or 40.60 %). The average age of patients in the study was  $71.05 \pm 10.42$  years, range from 22 to 88 years. There was no statistically significant difference in the age structure of patients by gender ( $t = 1.125$ ;  $p = 0.043$ ). Table 1 shows

the main characteristics of the patients.

Table 1.

During the one year follow-up of patients on VKA therapy a total of 6105 INR measurements were done, which is  $8.13 \pm 2.47$  INR measurements per patient. Average number of days between INR measurements was  $34.89 \pm 17.26$ . Characteristics of anticoagulant therapy during the investigated period are shown in Table 2.

Table 2.

The mean TTR was  $60.15 \pm 17.52\%$ . More than a fifth of the time patients had INR under therapeutic range (INR < 2.0 in 21.05% of time), while in 18.10% of time patients had INR > 3.0. A high risk of thrombosis (INR < 1.5) patients had in 6.15% of time, and in 2.20% of time they were at high risk of bleeding. Time in therapeutic range and time out of therapeutic range in investigated patients are shown in Figure 1.

Figure 1.

During the period of examination there were no major bleedings, while 65 patients (65/725 or 8.96%) had minor bleedings, mainly in the form of bruises, hematoma and epistaxis, whereas 4 patients (4/725 or 0.55%) had haematuria and 3 patients (3/725 or 0.41%) had bleeding from the gastrointestinal tract. After adjusting the dose of VKA bleedings were stopped.

Figure 2 shows distribution of TTR values, where we can see that 49.72% of patients have a TTR less than 60%, which means that almost half of the patients was at increased risk for serious complications of treatment.

Figure 2.

Table 3. shows logistic regression model of independent factors for the assessment of increased risk of poor effect of anticoagulation therapy. The whole model was highly significant ( $\chi^2$ (df = 9, N = 725) = 20.637; p < 0.001) and explained 57.81% of the variance of efficiency of VKA. The factors that gave statistically significant contribution to the model were: gender, arterial hypertension, diabetes mellitus and the use of amiodarone, aspirin and clopidogrel.

Table 3.

## Discussion

Anticoagulant drugs are used in the treatment or prevention of thromboses and thromboembolic complications. Traditional VKA, which have been in use for over 50 years are the gold standard in therapy for all that time. They provide the necessary protection from thromboembolic events and have proven to be sufficiently effective over many years of use. One of the most common indications for VKA therapy is atrial fibrillation and guidelines presents that patients who are at low risk may be treated only with aspirin, while in patients at high risk it is recommended to use VKA<sup>2, 16, 17</sup>. Anticoagulant therapy has reduced a rate of stroke by 64% and mortality by 26% in this group of patients<sup>18</sup>. But VKA therapy has disadvantages and the most important are: unpredictable response, narrow therapeutic window, routine monitoring, slow start/stop action, often dose adjustment, numerous interactions with food and drugs, resistance to warfarin, procoagulant effect of warfarin at the beginning of the therapy. However, the most severe complication of VKA

therapy is intracranial hemorrhage (ICH), whose rate is about 1% in clinical studies <sup>19</sup>.

The efficiency and safety of VKA depend strongly on the TTR value, which is a measure of the period in which the patient was in an optimal INR range. However, although the TTR is generally accepted as a measure for monitoring of the anticoagulant effect of drugs and the successful conduction of this therapy, there are no strengthened data what is accepted value of TTR. Recent trials related to the introduction of new oral anticoagulants have provided data of actual TTR values in different countries of the world. In ROCKET-AF study the mean TTR was 55.2%, but the values in Western Europe and North America were significantly higher, 63% and 64%, respectively <sup>20</sup>. In ARISTOTLE study the mean TTR was 66% <sup>21</sup>, in RE-LY study 67.2%, with the highest values of 77% in Sweden and 74% in Finland and Australia <sup>10, 11</sup>. On the other hand, *Gateman D et al* calculated the mean TTR in St. Paul Family Health Network in Ontario of 58.05% <sup>8</sup>, while the mean TTR in the study of *Ciurus T et al* is 76% that is considered to represent excellent anticoagulation control <sup>1</sup>. According to our study, the mean value of TTR is 60.15% during a follow-up of one year, and it is lower than that reported from big clinical trials, but still correlates with the number of the existing data in the literature. Also, the value is greater than the minimum TTR of 58% at which there is a benefit of anticoagulant therapy over antiplatelet therapy in terms of preventing vascular events <sup>9</sup>. Especially important result of our study was the fact that 49% of patients had TTR less than 60%, indicating that almost half of the patients were at increased risk of serious adverse events, both of bleeding and thrombosis.

This fact imposes a deeper analysis of management of the anticoagulant therapy in our institution, which involves the study of the relationship between patient and transfusion physician, identifying and understanding the factors which may have the influence on the quality of the therapy, the behavior of the patients in accordance with established criteria, as well as the modification of VKA therapy in accordance with co-morbidities and other drugs that must be introduced into therapy afterward. The INR values that are out of therapeutic range require high-speed control (in a short period of time), which enhances the number of patients on a daily and monthly basis, increasing the cost of treatment, and additionally is the risk factor for complications of VKA treatment which may be potentially very serious for the patients.

Great variations in the values of TTR show that the anticoagulant effect of VKA is affected with a great number of factors. Our investigation has shown that gender, arterial hypertension, diabetes mellitus and the use of amiodarone, aspirin and clopidogrel were associated with lower probability of staying within the target INR. The strongest independent factor for bad anticoagulation control was use of amiodarone, which is the most widely used antiarrhythmic in atrial fibrillation. It is known that amiodarone has a negative impact on the anticoagulant effect of VKA, because it inhibits the hepatic metabolism of warfarin, potentiating its anticoagulant effect and resulting of high INR values and increased risk of bleeding <sup>22, 23</sup>. The same effect has the concomitant use of antiplatelet therapy (aspirin and/or clopidogrel), which also potentiate the anticoagulant effect of VKA and increases the risk for bleeding. A large number of studies showed that although this combination of drugs can potentially prevent both thromboembolism and atherothrombotic events, it is also associated with an increased risk of severe bleeding and requires careful consideration of all the risks and benefits <sup>24, 25</sup>. A large, nationwide investigation in Denmark showed that a risk for severe bleeding in patients taking VKA and aspirin is being 1,8-fold increased, 3,5-fold increased in patients taking VKA and clopidogrel, and 4-fold increased in patients taking triple therapy <sup>26</sup>. Looking at the same

problem from the other hand, our recent investigation of different preparations of acetylsalicylic acid in patients with stable coronary disease also has shown that there is an increased effect of aspirin in patients receiving anticoagulant therapy, so there is an increased risk for bleeding <sup>27</sup>.

Gender also stands out as a significant predictor of bad anticoagulation, which shows that women respond poorer to VKA treatment, so there is far more difficult to achieve good control than in men. The reason for this effect is unclear, but previous studies confirmed this fact and have shown that women are at greater risk of AF-related stroke during VKA treatment, as a result of poor anticoagulant effect of warfarin <sup>14, 28, 29</sup>. The impact of arterial hypertension on anticoagulant therapy has not been precisely defined, although it has been studied in numerous investigations. Therefore *Apostolakis et al* have shown that hypertension is associated with lower TTR <sup>14</sup>, while on the other side Veterans Affairs Study to Improve Anticoagulation (VARIA) <sup>30</sup> this relationship didn't confirm. This investigation has shown that arterial hypertension is a predictor of poor anticoagulation, and possible explanation of this influence may be associated with interaction of drugs <sup>31</sup>. Finally, diabetes mellitus, as a predictor of the poorer effect of VKA is associated with increased levels of the procoagulant clotting factors (FII, FVII) and a decrease of anticoagulants, such as thrombomodulin, with abnormal fibrinolytic pathway and decreases fibrinolysis <sup>32, 33</sup>. In these patients, most often there is a disorder of renal function, which leads to the abnormal elimination of these drugs and the poorer anticoagulant effect.

Since of the various effects of VKA and the impact of a number of factors to this therapy it is developed a new era of anticoagulation which is a crucial for all patients who do not have sufficient anticoagulant protection or where the TTR is less than 60%. These are direct oral anticoagulants (DOAC) or new oral anticoagulants (NOAC) (also called a target-specific anticoagulants): on one side, dabigatran, which is a direct inhibitor of thrombin, and on the other side inhibitors of FXa: rivaroxaban, apixaban, edoxaban. A number of meta-analyses have shown that these drugs have a better safety profile than the VKA, lower incidence of bleeding, especially intracranial or gastrointestinal, have fewer interactions with food than VKA, achieve faster antithrombotic effect and there is no need for regular monitoring because of predictable pharmacokinetics <sup>34-36</sup>. Compared with warfarin, dabigatran is associated with a reduced risk of ischaemic stroke, intracranial haemorrhage and mortality, but with an increased risk of major gastrointestinal bleeding. It is the only anticoagulant with a specific antidote Idarucizumab. Inhibitors of FXa are recommended for patients with mild renal impairment (only 1/3 of the drug is renal eliminated), high risk of bleeding, and/or potential drug-drug interactions.

## Conclusion

The TTR is undoubtedly useful and beneficial indicator of the effectiveness of VKA anticoagulant treatment. The most important predictors of poorer VKA therapy efficacy are arterial hypertension, diabetes mellitus, patients' gender and the use of amiodarone and antiplatelet (aspirin, clopidogrel) drugs. To improve the quality of VKA therapy, an education of patient and better collaboration with them, as well as a successful team-work with clinicians are also imperative.

## Acknowledgement

This work was supported from the Ministry of Education, Science and Technological Development of the RS (Project No 175 061, 43 012 and 41004).

## References

1. Ciurus T, Cichočka-Radwan A, Lelonek M. Factors affecting the quality of anticoagulation with warfarin: experience of one cardiac centre. *Kardiochirurgia Pol* 2015; 12(4): 334–40.
2. Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, Hindricks G, Kirchhof P; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J* 2012; 33(21): 2719–47.
3. Baklaja R. Oral anticoagulant therapy. In: Baklaja R, et al. Laboratory diagnostic of hemostatis disorders. Interlab exim, 2008 (In Serbian): 100–9.
4. Witt DM, Clark NP, Kaatz S, Schnurr T, Ansell JE. Guidance for the practical management of warfarin therapy in the treatment of venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis* 2016; 41(1): 187–205.
5. Tideman PA, Tirimacco R, St John A, Roberts GW. How to manage warfarin therapy. *Aust Prescr* 2015; 38(2): 44–8.
6. Farsad BF, Abbasinazari M, Dabagh A, Bakshandeh H. Evaluation of Time in Therapeutic Range (TTR) in Patients with Non-Valvular Atrial Fibrillation Receiving Treatment with Warfarin in Tehran, Iran: A Cross-Sectional Study. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(9): FC04-FC06.
7. Gallego P, Vilchez JA, Lane DA. Apixaban compared with warfarin for stroke prevention in atrial fibrillation: implications of time in therapeutic range. *Circulation* 2013; 127(22): 2163–5.
8. Gateman D, Trojnar ME, Agarwal G. Time in therapeutic range: Warfarin anticoagulation for atrial fibrillation in a community-based practice. *Can Fam Physician* 2017; 63(10): e425–e431.
9. Connolly SJ, Pogue J, Eikelboom J, Flaker G, Commerford P, Franzosi MG, Healey JS, Yusuf S; ACTIVE W Investigators. Benefit of oral anticoagulant over antiplatelet therapy in atrial fibrillation depends on the quality of international normalized ratio control achieved by centers and countries as measured by time in therapeutic range. *Circulation* 2008; 118(20): 2029–37.
10. Wallentin L, Yusuf S, Ezekowitz MD, Alings M, Flather M, Franzosi MG, et al; RE-LY investigators. Efficacy and safety of dabigatran compared with warfarin at different levels of international normalised ratio control for stroke prevention in atrial fibrillation: an analysis of the RE-LY trial. *Lancet* 2010; 376(9745): 975–83.
11. Avezum A, Oliveira GBF, Diaz R, Hermosillo JAG, Oldgren J, Ripoll EF, Noack H, Piegas LS, Connolly SJ. Efficacy and safety of dabigatran versus warfarin from the RE-LY trial. *Open Heart* 2018; 5(1): e000800.



12. Thrombosis Canada. Warfarin: management of out-of-range INRs. Whitby, on: Thrombosis Canada, 2015. Available from: <http://thrombosiscanada.ca/clinicalguides>. Accessed 2018 Sep 9.
13. Wieloch M, Sjalander A, Frykman V, Rosenqvist M, Eriksson N, Svensson P. Anticoagulation control in Sweden: reports of time in therapeutic range, major bleeding, and thrombo-embolic complications from the national quality registry AuriculA. *European Heart Journal* 2011; 32: 2282–9.
14. Apostolakis S, Sullivan RM, Olshansky B, Lip GYH. Factors affecting quality of anticoagulation control among patients with atrial fibrillation on warfarin: the SAME-TT<sub>2</sub>R<sub>2</sub> score. *Chest* 2013; 144(5): 1555–63.
15. Rosendaal FR, Cannegieter SC, van der Meer FJ, Briët E. A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemost* 1993; 69(3): 236–9.
16. Keeling D, Baglin T, Tait C, Watson H, Perry D, Baglin C, Kitchen S, Makris M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on oral anticoagulation with warfarin, Fourth edition. *Br J Haematol* 2011; 154(3): 311–24.
17. Andersen LV, Vestergaard P, Deichgraeber P, Lindholt JS, Mortensen LS, Frost L. Warfarin for the prevention of systemic embolism in patients with non-valvular atrial fibrillation: a meta-analysis. *Heart (British Cardiac Society)* 2008; 94: 1607–13.
18. Amin A. Oral anticoagulation to reduce risk of stroke in patients with atrial fibrillation: current and future therapies. *Clin Interv Aging* 2013; 8: 75–84.
19. Streiner T, Weitz J, Veltkamp R. Anticoagulant-Associated Intracranial Hemorrhage in the Era of Reversal Agents. *Stroke* 2017; 48: 1432–37.
20. Singer DE, Hellkamp AS, Piccini JP, et al. Impact of global geographic region on time in therapeutic range on warfarin anticoagulant therapy: data from the ROCKET AF clinical trial. *J Am Heart Assoc* 2013; 2(1): e000067.
21. Wallentin L, Lopes RD, Hanna M, Thomas L, Hellkamp A, Nepal S, et al; Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) Investigators. Efficacy and safety of apixaban compared with warfarin at different levels of predicted international normalized ratio control for stroke prevention in atrial fibrillation. *Circulation* 2013; 127(22): 2166–76.
22. McDonald MG, Au NT, Wittkowsky AK, Rettie AE. Warfarin-amiodarone drug-drug interactions: determination of [I](u)/K(I,u) for amiodarone and its plasma metabolites. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 91(4): 709–17.
23. Holm J, Lindh JD, Andersson ML, Mannheimer B. The effect of amiodarone on warfarin anticoagulation: a register-based nationwide cohort study involving the Swedish population. *J Thromb Haemost* 2017; 15(3): 446–53.
24. Sarafoff N, Martischnig A, Wealer J, et al. Triple therapy with aspirin, prasugrel, and vitamin K antagonists in patients with drug-eluting stent implantation and an indication for oral anticoagulation. *J Am Coll Cardiol* 2013; 61: 2060.
25. Capodanno D, Angiolillo DJ. Management of Antiplatelet and Anticoagulant Therapy in Patients With Atrial Fibrillation in the Setting of Acute Coronary Syndromes or Percutaneous Coronary Interventions. *Circulation: Cardiovascular interventions* 2014; 7: 113–24.
26. Sørensen R, Hansen ML, Abildstrom SZ, Hvelplund A, Andersson C, Jørgensen C, et al. Risk of bleeding in patients with acute myocardial infarction treated with different combinations of aspirin, clopidogrel, and vitamin K antagonists in Denmark: a retrospective analysis of nationwide registry data. *Lancet* 2009; 374: 1967–74.
27. Antić A, Stanojković Z, Vučić M, Lazarević M, Vacić N. Comparison of

farmacodynamic properties of three different aspirin formulations in patients with stable coronary disease. *Vojnosanit Pregl* 2018 OnLine-First (00): 34–34; <https://doi.org/10.2298/VSP180110034A>.

28. Morgan CL, McEwan P, Tukiendorf A, Robinson PA, Clemens A, Plumb JM. Warfarin treatment in patients with atrial fibrillation: observing outcomes associated with varying levels of INR control. *Thromb Res* 2009; 124(1): 37–41.
29. Melamed OC, Horowitz G, Elhayany A, Vinker S. Quality of anticoagulation control among patients with atrial fibrillation. *Am J Manag Care* 2011; 17(3): 232–7.
30. Rose AJ, Hylek EM, Ozonoff A, Ash AS, Reisman JI, Berlowitz DR. Patient characteristics associated with oral anticoagulation control: results of the Veterans AffaiRs Study to Improve Anticoagulation (VARIA). *J Thromb Haemost* 2010; 8(10): 2182–91.
31. Agarwal S, Bennett D, Smith DJ. Predictors of warfarin use in atrial fibrillation patients in the inpatient setting. *Am J Cardiovasc Drugs* 2010; 10(1): 37–48.
32. Nelson WW, Choi JC, Vanderpoel J, Damaraju CV, Wildgoose P, Fields LE, Schein JR. Impact of co-morbidities and patient characteristics on international normalized ratio control over time in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2013; 112(4): 509–12.
33. Wessels PF. Anticoagulation therapy in diabetic patients. *S Afr J Diabetes Vasc Dis* 2012; 9: 6–7.
34. Hinojar R, Jimenez-Natcher JJ, Fernandez-Golfin C, Zamorano LJ. New oral anticoagulants: a practical guide for physicians. *Eur Heart J - Cardiovasc Pharmacother* 2015; 1 (2): 134–45.
35. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2014; 383: 955–62.
36. Vinogradova Yana, Coupland Carol, Hill Trevor, Hippisley-Cox Julia. Risks and benefits of direct oral anticoagulants versus warfarin in a real world setting: cohort study in primary care *BMJ* 2018; 362: k2505

**Table 1.**

——— **Characteristics of patients (N = 725)**

<b>Characteristic</b>	<b>N (%) / Mean±SD</b>
Age (years)	71.05±10.42
Gender (Male/female)	430 (59.40%) / 295 (40.60%)
Previous stroke/TIA	111 (15.35 %)
Hypertension	524 (72.30 %)
Previous AMI	232 (32.00 %)
Vascular disease history	138 (19.10 %)
Diabetes mellitus	162 (22.40 %)

---

Concomitant drugs:

β-blockers	624 (86 %)
Statins Aspirin	565 (78 %)
Clopidogrel	275 (38%)
Amiodaron	152 (21%)
ACE-inhibitors	138 (19%)
	522 (72%)

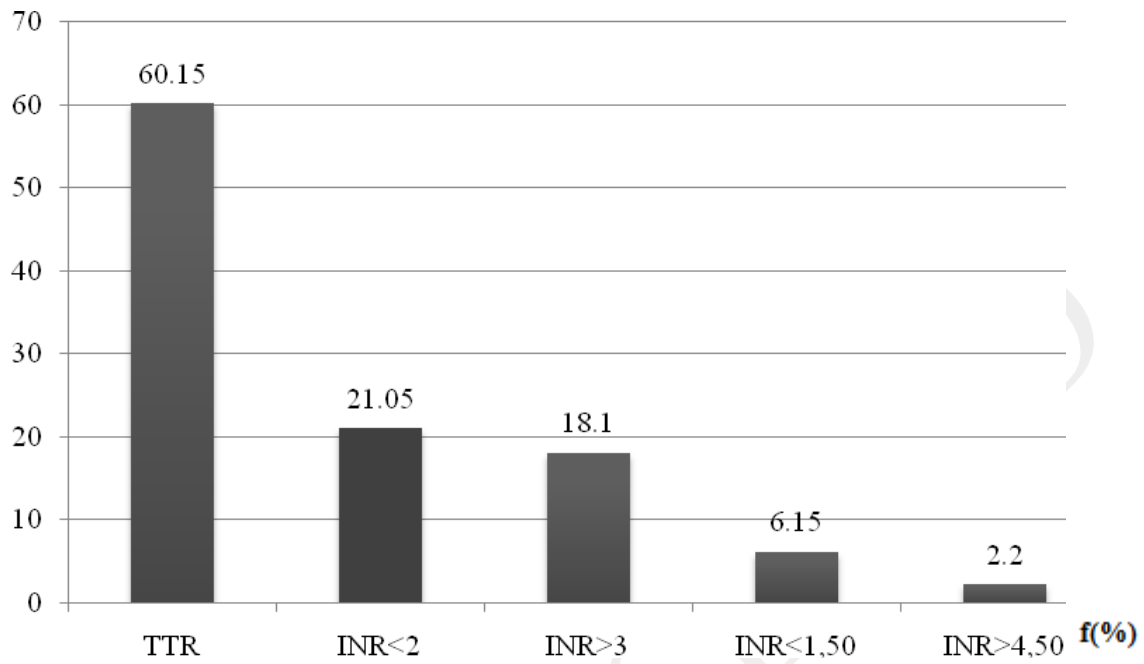
---

**AMI** – acute myocardial infarction

**TIA** – transient ischemic attack

**Table 2.**

<b>Characteristics of anticoagulant therapy</b>	
<b>Characteristic</b>	<b>N (%) / Mean±SD</b>
Number of patients	725 (100%)
Total number of INR measurements	6105
Number of INR measurements per patient	8.13±2.47
Number of days between INR measurements	34.89±17.26
Drug:	
Warfarin	436 (60.10%)
Acenokoumarol	259 (39.90%)
Daily dose of drug:	
Warfarin (mg)	4.7±1.26
Acenokoumarol (mg)	3.58±1.47



**Fig. 1 – Time in therapeutic range (TTR) and time out of therapeutic range in investigated patients (%).**

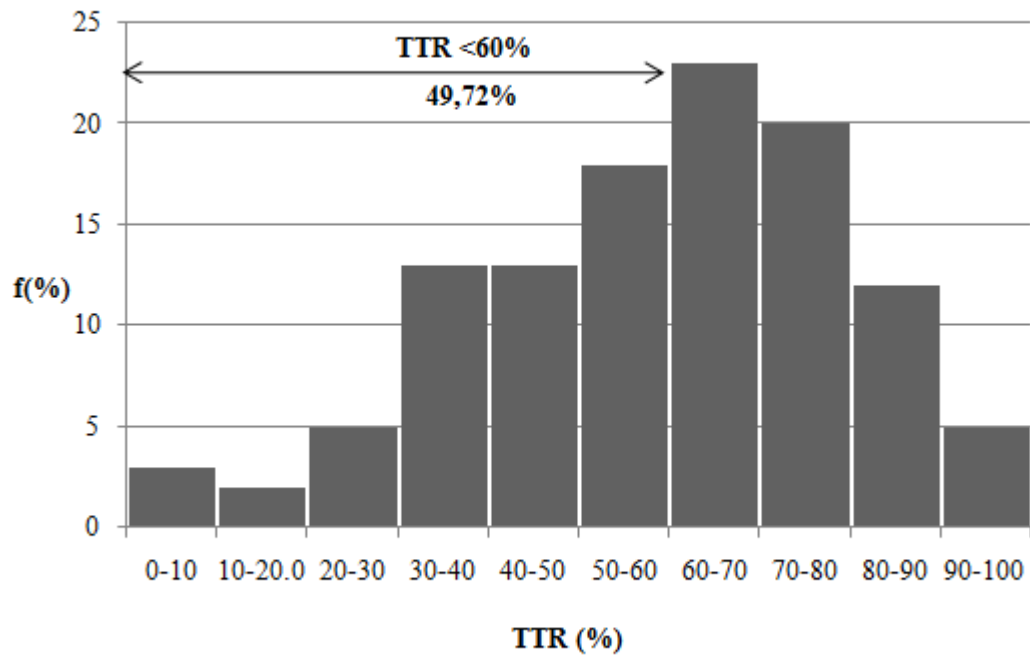


Fig. 2 – Histogram with relative frequencies of TTR.

**Table 3.**

**Logistic regression model of independent factors for assessing the efficiency of AVK**

	<b>OR</b>	<b>95%CI</b>	<b>p</b>
<b>Age</b>	1.223	0.065–8.480	0.092
<b>Gender</b>	3.870	1.065–12.060	0.040
<b>Previous stroke/TIA</b>	1.590	0.951–2.682	0.076
<b>Hypertension</b>	2.082	1.049–4.133	0.036
<b>Previous AMI</b>	0.502	0.050–2.880	0.061
<b>Diabetes mellitus</b>	3.100	2.330–4.150	0.240
<b>Amiodarone</b>	11.360	4.870–26.520	<0.001
<b>Aspirin</b>	4.820	1.150–20.190	0.031
<b>Clopidogrel</b>	5.200	1.520–12.760	0.008

**OR-Odds Ratio.**

Received on December 14, 2018.

Revised on January 8, 2019.

Accepted on January 10, 2019.

Online First January, 2019.