



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

Небојша Вацић

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

**Докторска дисертација**

МЕНТОР: Проф. Др сци мед. Небојша Анђелковић- редовни професор

**Крагујевац, 2019. година**

## САДРЖАЈ:

<b>I УВОД.....</b>	<b>3</b>
<b>1.Основне карактеристике концентрата тромбоцита.....</b>	<b>3</b>
<b>2.Развој мегакариоцита и формирање тромбоцита.....</b>	<b>6</b>
<b>3.Структура тромбоцита.....</b>	<b>10</b>
<b>4.Рецептори тромбоцита.....</b>	<b>12</b>
<b>5. Секретија тромбоцита.....</b>	<b>16</b>
<b>6. Функција тромбоцита.....</b>	<b>18</b>
<b>7. Улога тромбоцита у коагулацији и фибринолизи.....</b>	<b>22</b>
<b>8. Тестови испитивања поремећаја хемостазе .....</b>	<b>29</b>
<b>9. Концентрати тромбоцита (КТ).....</b>	<b>31</b>
<b>10. Припрема концентрата тромбоцита тромбоцита.....</b>	<b>35</b>
<b>11. Складиштење тромбоцита.....</b>	<b>45</b>
<b>12. Адитивни раствор за чување тромбоцита (PAS).....</b>	<b>46</b>
<b>13. Контрола квалитета КТ.....</b>	<b>47</b>
<b>14. Агрегација тромбоцита.....</b>	<b>48</b>
<b>II ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ:.....</b>	<b>49</b>
<b>III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА.....</b>	<b>51</b>
<b>IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА.....</b>	<b>59</b>
<b>V ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>119</b>
<b>VI ЗАКЉУЧАК.....</b>	<b>129</b>
<b>VII ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>130</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.

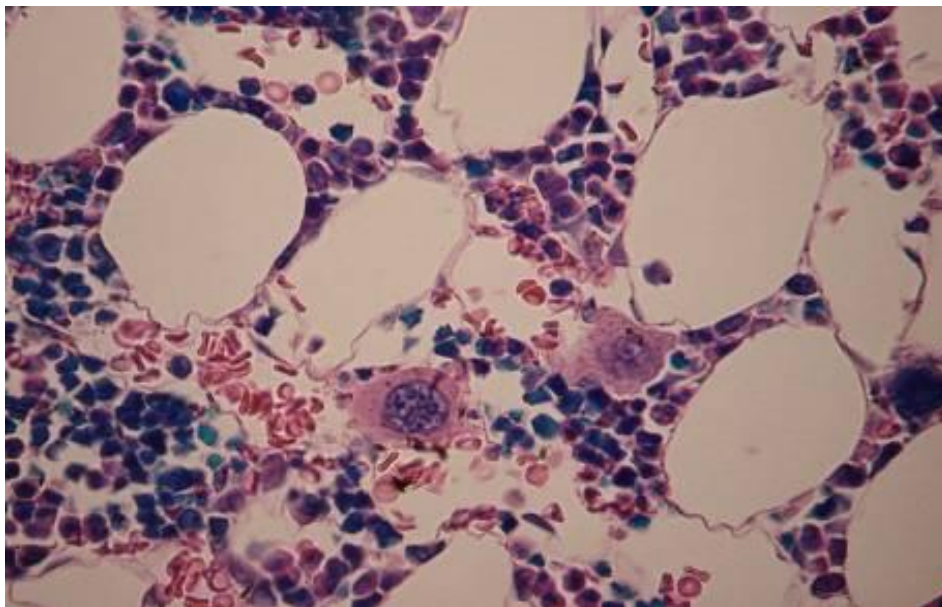
Квалитет концентрата тромбоцита одређен је критеријумима дефинисаним у Водичу за припрему, коришћење и обезбеђење квалитета Савета Европе Европског комитета за трансфузију крви (19. издање, 2017), који је прихваћен од стране Министарства здравља Републике Србије (7). Обавезни захтеви контроле квалитета 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.

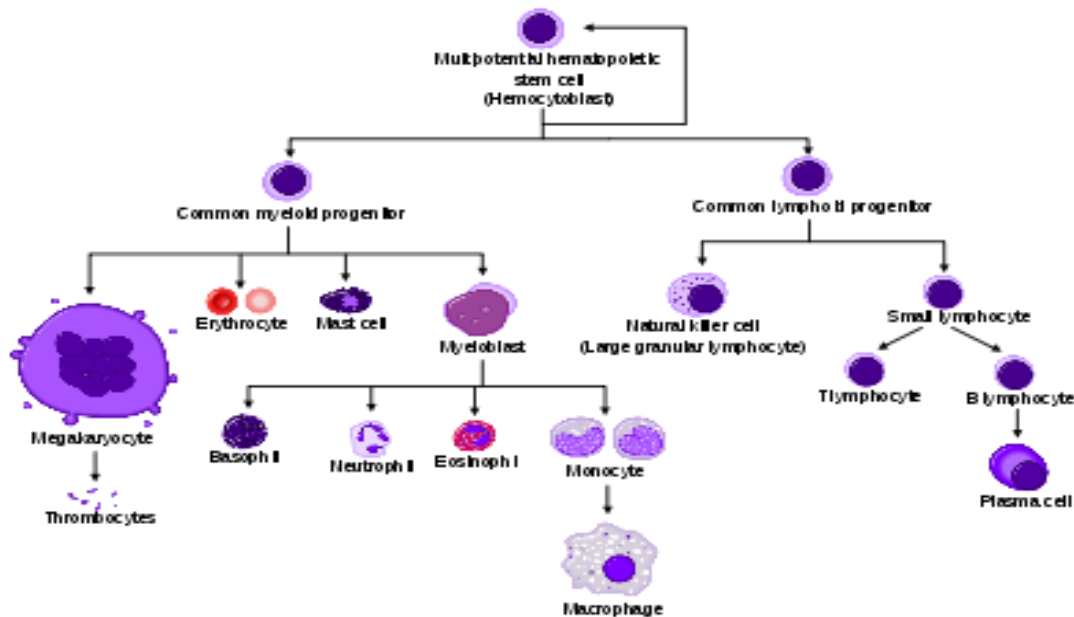
## 2. Развој мегакариоцита и формирање тромбоцита

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 коштаног 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-MK (енгл. *burst forming units-megakariociti*) и CFU-MK (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 хематопоеетске 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

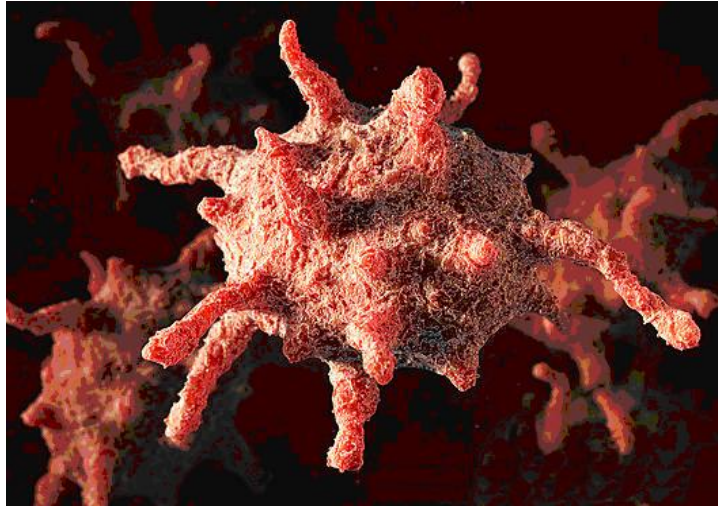
Мегакариоцитопоеза је регулисана бројним цитокинима. Тромбопоетин (ТРО) је специфичан гликопротеин-цитокин, који индукује пролиферацију и матурацију мегакариоцита и њихових предходника синергистички с осталим цитокинима као што су еритропоетин, IL-3, IL-6 и GM-CSF. Ствара се стално у јетри и слезени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

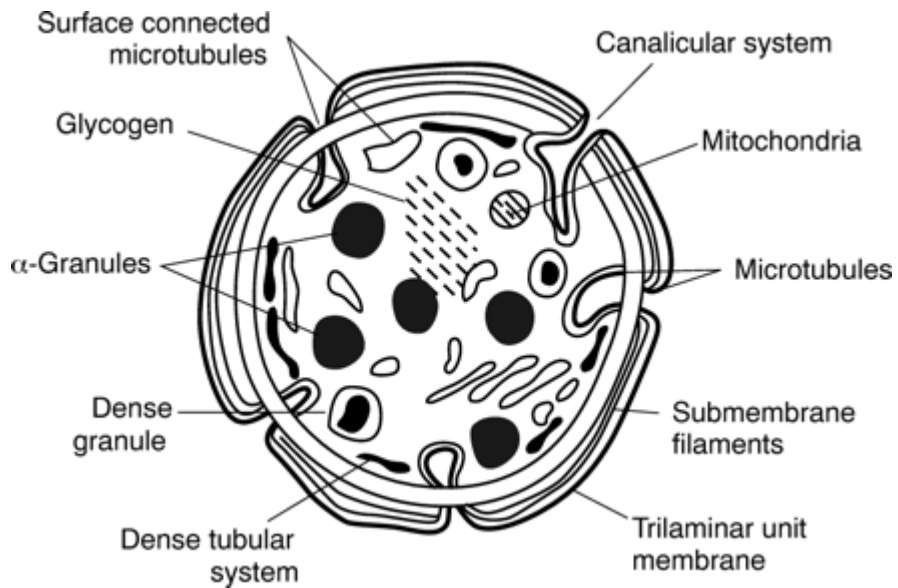
### 3. Структура тромбоцита

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: АДФ, епинефрин, тромбин, колаген. Епинефрин и АДФ су слаби агонисти тромбоцитне агрегације, а да би довели до пражњења тромбоцитних гранула захтевају присуство простагландина и тромбоксана А<sub>2</sub> (ТхА<sub>2</sub>). ТхА<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 GP IIb/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.

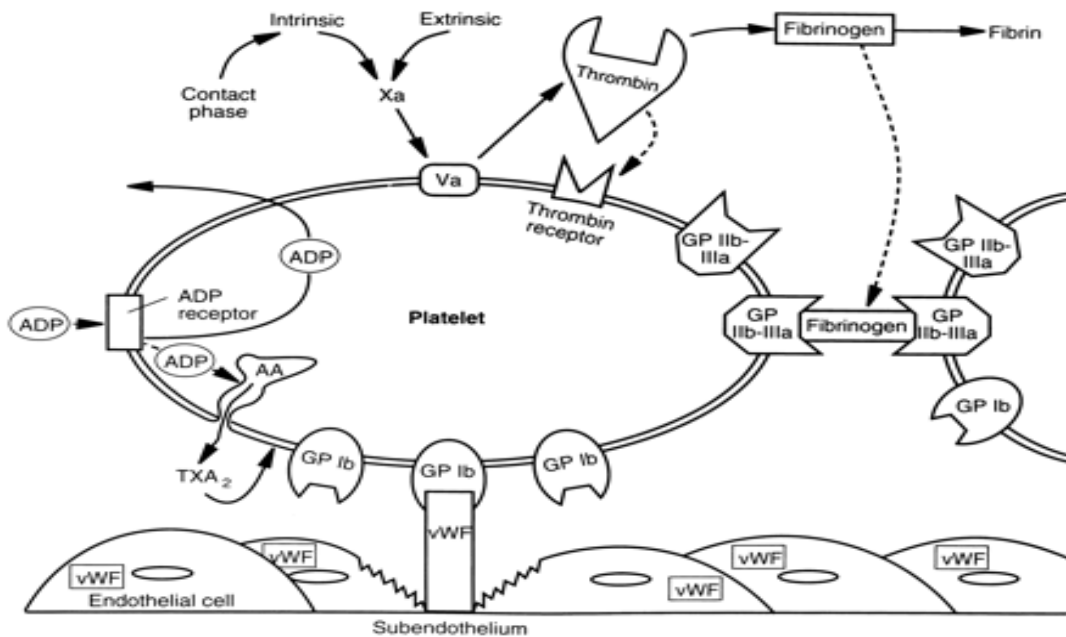
Ћелијска мембрана тромбоцита садржи гликопротеине који спречавају адхезију тромбоцита за нормални ендотел, али омогућава адхезију за повређено ткиво и за друге тромбоците (под извесним условима). Ово својство тромбоцита често отежава њихово бројање. (16)



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 фибринског 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 мишјим тромбоцитима). Хидролитичким цепањем тромбин активира PAR1 и PAR4 омогућујући 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 GPVI 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. GPVI заједно са GPIb/IX/V учествује у адхезији и формирању тромба на колагенској површини у условима циркулирајуће крви. Сматра се да је полиморфизам гена за GPVI повезан са настанком инфаркта миокарда (20).

### ***4.3. Адхезиони рецептори***

GPIb/V/IX омогућава тромбоцитима везање са VWF што доводи до успоравања тромбоцита на мјесту оштећења крвног суда и њихову интеракцију с колагеном. GPIb/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 (GPIb, GPIa/IIa), тромбинским

рецепторима (PAR1 i 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 α<sub>2</sub>-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<sup>+</sup>-канала и промене нивоа унутарћелијског Ca<sup>2+</sup>. (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<sub>(1-7)</sub> рецептора и породице G-протеин везаних P2Y<sub>(1,2,3,4,11,12,13,14)</sub> рецептора. Тромбоцити експримирају углавном P2Y<sub>1</sub>, P2X<sub>1</sub> и P2Y<sub>12</sub> рецепторе, док преостали рецептори из тих породица немају значајнију улогу у активацији односно агрегацији тромбоцита.

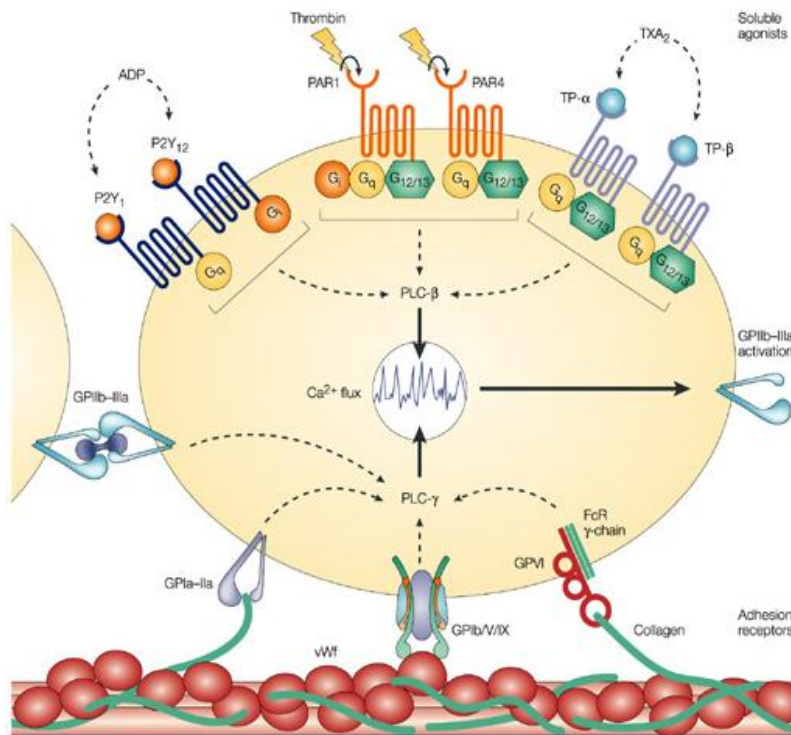
Везањем ADP-а на рецептор P2Y<sub>1</sub> долази до пролазног пораста концентрације унутарћелијског Ca<sup>2+</sup> што узрокује слабу, пролазну агрегацију, као и истовремено синергистичко деловање ADP-а преко P2Y<sub>12</sub> рецептора условљавајући коначну и трајну активацију и агрегацију тромбоцита инхибирањем фосфорилације VASP (вазодилататор-стимулирајућег фосфопротеина) и активирањем GPIIb/IIIa на површини тромбоцита. (24)

#### 4.6. Тромбоксан $A_2$ ( $Tx A_2$ ) – 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 АА 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. Секретија 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 спреси 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 i GP Ia/IIa), када долази до следећих реакција:

1. Контракције цитоскелета и реакције ослобађања из густих гранула: **ADP** (сАМР↓, Ca<sup>2+</sup>↑), серотонини из α- гранула: vWF, фибриногена, тромбоцитног фактора.



2. Синтеза **ТХА<sub>2</sub>** (Ca<sup>2+</sup>↑)

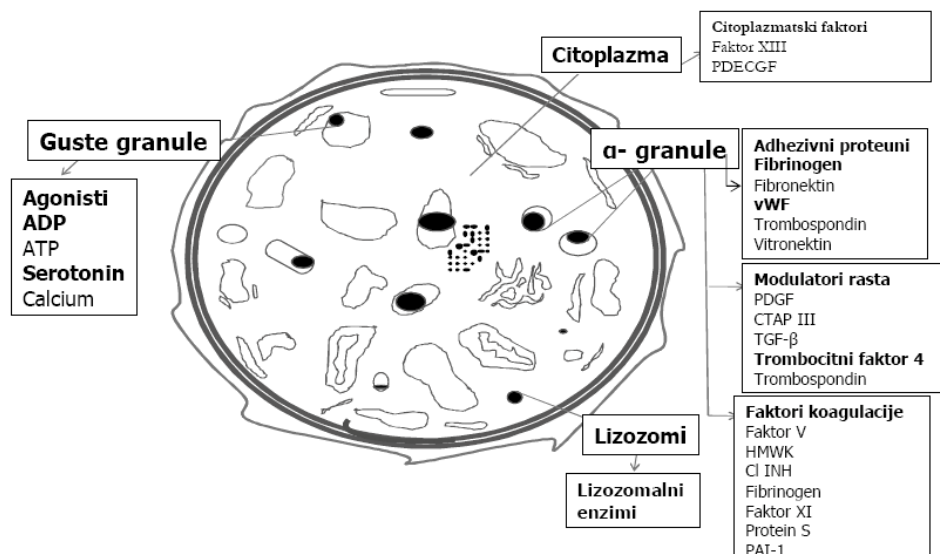
3. Промена конформације **GP IIb/IIIa** (везивање фибриногена)

•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*), простагландин 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 инактивирају, 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 активише тромбоците, тромбоксан A<sub>2</sub>, простагландини PGG<sub>2</sub> и PGH<sub>2</sub> и др.), тромбоцити се активишу 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).



## 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="#">antihemofililni 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> и <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

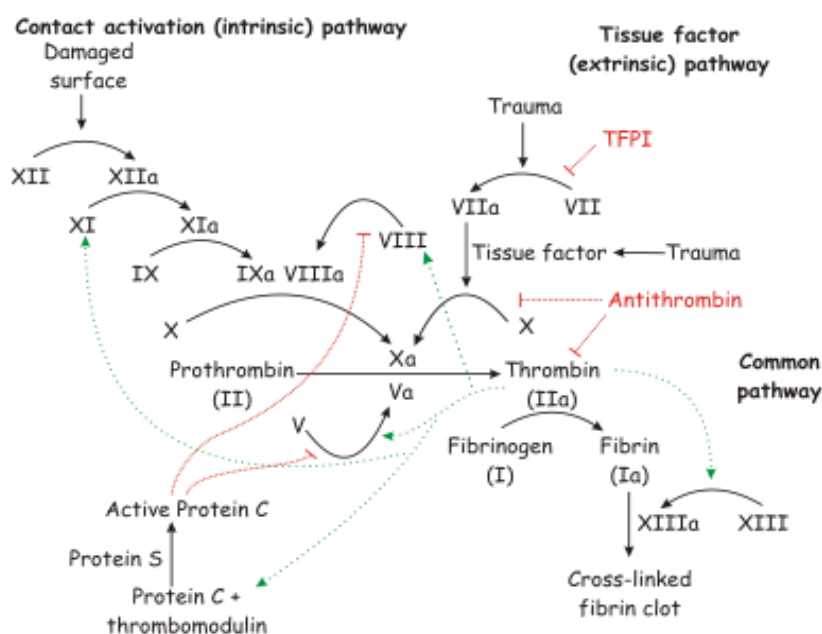
<a href="#">prekalikrein (Flečerov faktor)</a>	
<a href="#">kininogen velike molekulske mase (engl. HMWK)</a>	Подржава активацију фактора XII, XI, i prekalikreina
<a href="#">fibronektin</a>	Посредује у адхезији тромбоцита

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). Контрактилни 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 A2 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 тромбoplastин (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



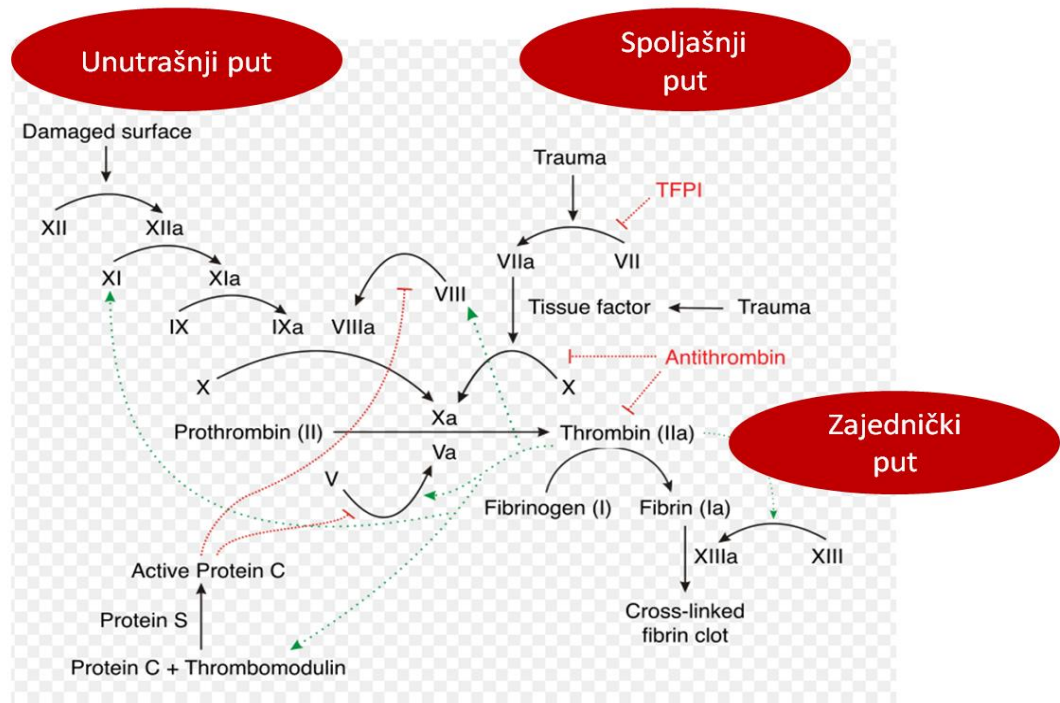
на фактор XI и активира га. За ову реакцију потребан је и кининоген велике молекулске масе (видети у табели), а и прекаликреин је убрзава. Активирани фактор XI (фактор XIa) сада активира фактор IX. Активирани фактор IX делује заједно са фактором VIII и ослобођеним фосфолипидима из тромбоцита на фактор 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 фосфлипидима гради комплекс активатора протромбина, 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 нективни 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 A, B, C, 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)



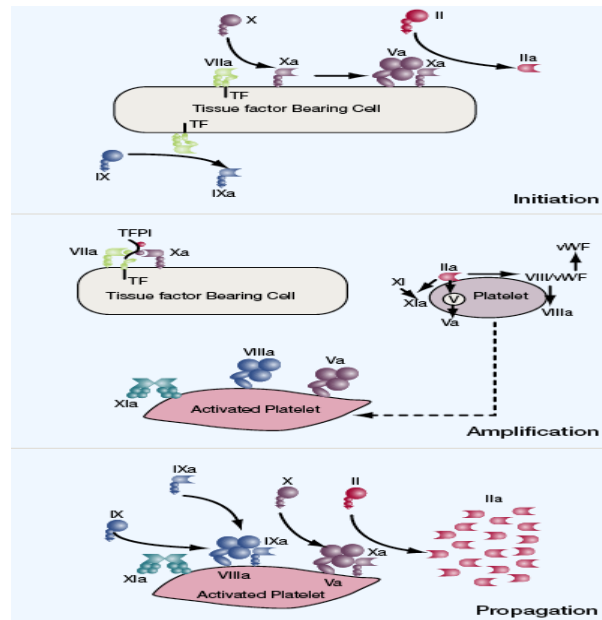
Слика 9. – Коагулациона каскада

### 7.3. Ђелијски модел коагулације

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. (34,35) Традиционална теорија коагулације није могла да одговори на питање зашто недостатак F XII, из унутрашњег пута коагулације не доводи до крварења већ повећава склоност ка

тромбози. Рапапорт је 1992.г доказао да комплекс TF/F VIIa активира и FX и F IX доводећи до активације оба пута коагулације

Данас је прихваћен "ћелијски модел"(cell-based) коагулације у коме, поред фактора коагулације, кључну улогу имају тромбоцити и ћелије на којима се дешава експресија ткивног фактора. Последњих година је указано да је ткивни пут физиолошки иницијатор процеса коагулације и да има доминантну улогу у хемостази, као и да се коагулација одиграва на површини ћелија које експримирају ткивни фактор (TF) и на површини активираних тромбоцита (2-5). Према ћелијском моделу, коагулација се одвија у неколико фаза (32,34,35) (Слика 1.- *Bombeli, 2004*: In vivo процес коагулације је нициран углавном F VIIa везаним за ткивни фактор (TF:велика црна стрелица), који потом активира FX (1) и F IX (2) (=фаза иницијације). У циљу даљег повећања тромбина, тромбин активира FV, FVIII и FIX механизмом повратне спреге (3) (=амплификација). Континурано стварање тромбина осигурано је стварањем великих количина FXa деловањем FIXa и FVIII на FX(=пропагација). Максимално стварање тромбина дешава се тек након формирања фибрина, што доводи до стварања FVIIIa, који потом ствара укрштене везе између фибринских мономера (11) (=стабилизација)



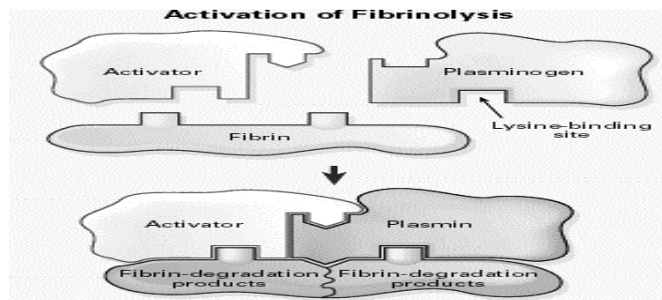
Слика 10. Ћелијски модел коагулације

#### 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 тромбопластинско време (РТТ). ТТ мери време претварања фибриногена у фибрин под утицајем тромбина, те су сви остали фактори заобиђени. ТТ је продужено у хипо- и афибриногенијама, 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 многоме 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  $100 \times 10^9/L$  Тг. 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 ВС 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 (ВС)**

Након сепарације неопходно је ВС 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 (ВС)**

Брзина другог центрифугирања ВС (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 хемоллизе 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. ВС 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 ВС 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 ВС 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 седиментиране 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 ВС 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 ВС-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 ХЛА алоимунизације.

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

На захтев клиничара, припремају се јединице КТ мале запремине, тако што се јединица концентрата тромбоцита центрифугира (добијена 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 °C до + 24 °C. (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 ТРАЛИ-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-IIIМ). 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 складиштеним 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 тромоцита приказан је у табели 2.

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

#### **Б. 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.

## В. 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 између две сепарације*

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. Издвајање 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

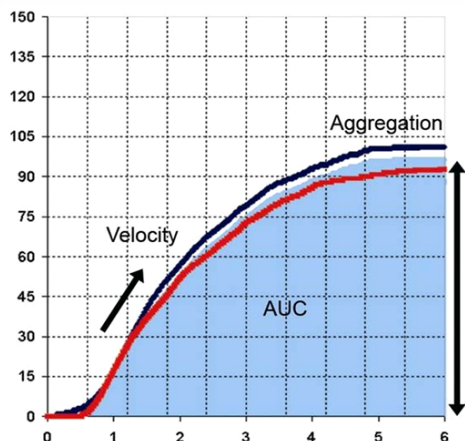
PO<sub>4</sub>, рН = 7,2) у одговарајућој тест ћелији. Након инкубације на 37°C у трајању од три минута додаје се 20 µL изабраног агониста, и то 3,2; 6,4 и 9,6 µг колагена/мЛ. Узорак крви са додатим агонистом се аутоматски меша (800 U/мин) коришћењем магнетне мешалице обложене поли-тетра-флуоро-етиленом (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:** povećanje 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.

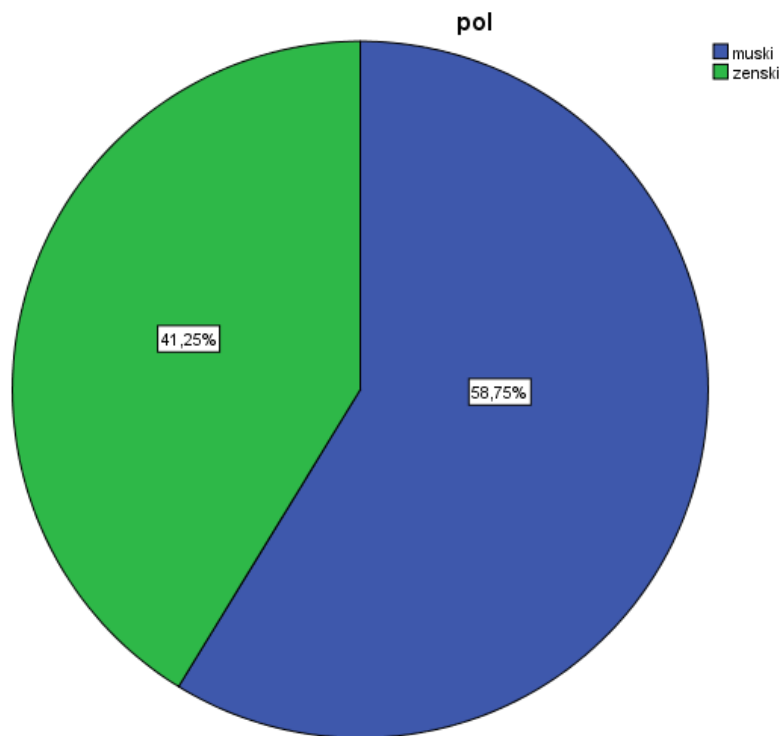
Ефекат различитих концентрација на промене праћених варијабли током времена утврђиван је анализом варијансе за поновљена мерења (RMANOVA), односно Friedman-овим тестом за варијабле чија дистрибуција одступа од нормалне.

## 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							
	pol	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.

## Т 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**

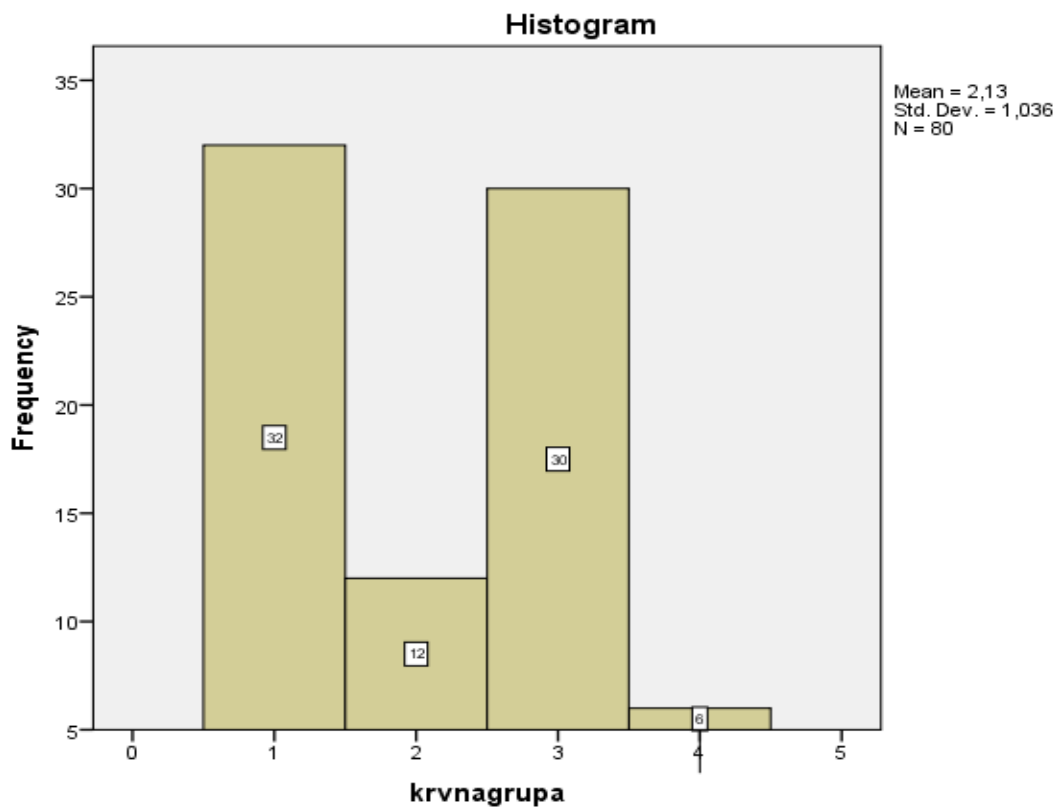
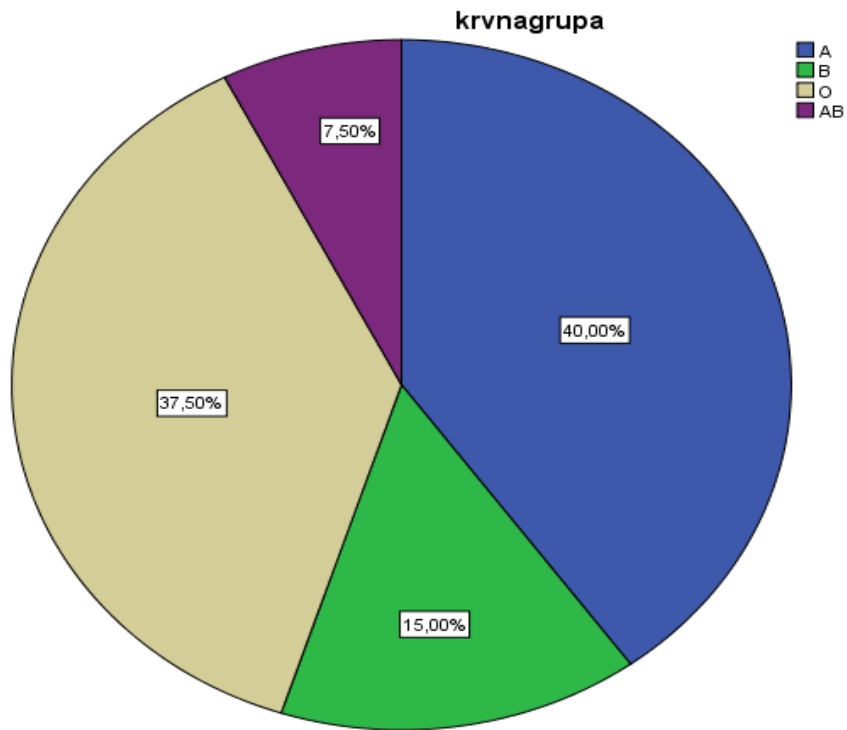
	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
starost	Equal variances assumed	,903	,345	,354	78	,724	,954	2,695	-4,413	6,320
	Equal variances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

Коришћењем Т 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 четвртом 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	
RBCKT1	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	
RBCKT3	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	
RBCKT5	5% Trimmed Mean	,0089	
	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 Lower Bound	,00687	
	Mean 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 Lower Bound	,00792	
	Mean 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 Mean	Lower Bound	60,3946	
		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± 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 Mean	Lower Bound	59,0903	
		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 Friedmanов 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.**

**Ranks**

	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

**Hypothesis Test Summary**

	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.

**Ranks**

	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

**Hypothesis Test Summary**

	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 концентрата 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, наспрот 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.

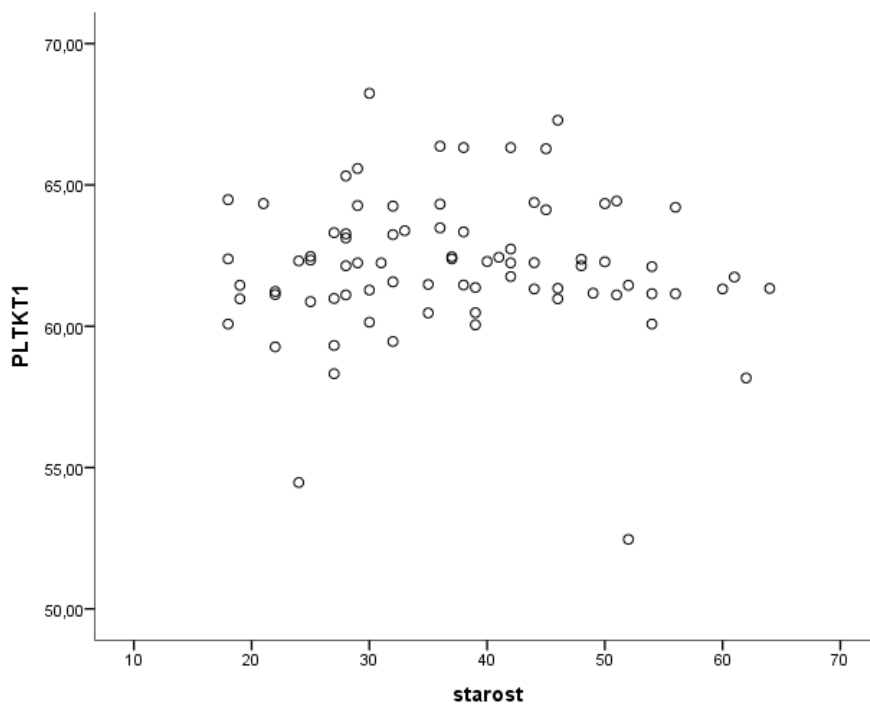
**Report**

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
starost	Correlation Coefficient	,008	1,000
	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 :

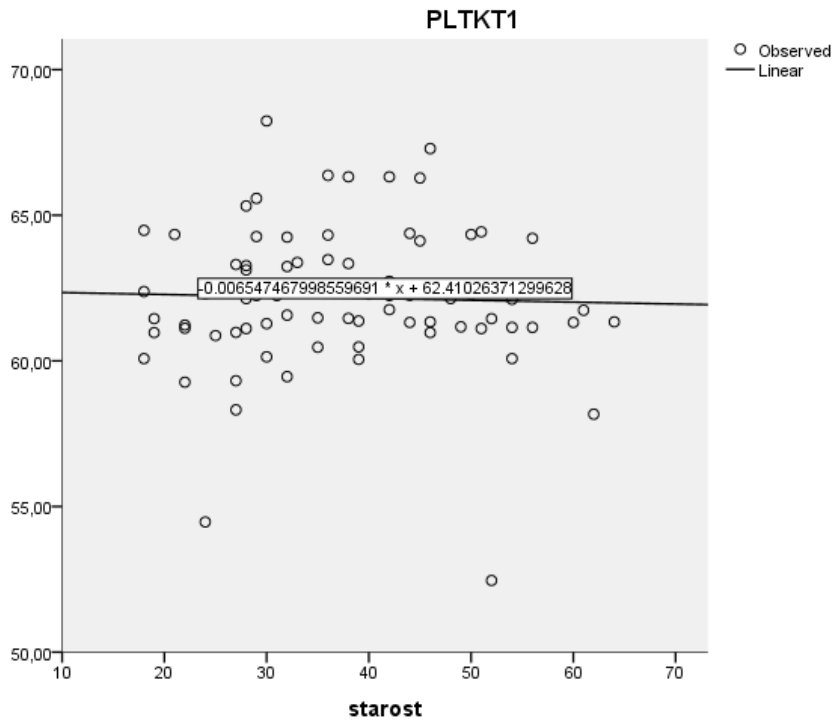
$$y=62.410-0.007*x$$

### 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	Lower Bound	,3946	
	Mean	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	Lower Bound	-,9097	
	Mean	Upper Bound	,1932	
	5% Trimmed Mean		-,1183	
	Median		,3150	
razlikapeti	Variance		6,140	
	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	Lower Bound	2,2036	
	Mean	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	
pH5	Mean	Upper Bound	7,18386	
	5% Trimmed Mean		7,16608	
	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
	Mean		137,056	,8819
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	135,301	
	Mean	Upper Bound	138,812	
	5% Trimmed Mean		136,729	
	Median		137,500	
	Variance		62,220	
pO2prvi	Std. Deviation		7,8880	
	Minimum		123,8	
	Maximum		160,0	
	Range		36,2	
	Interquartile Range		12,1	
	Skewness		,522	,269
	Kurtosis		,137	,532
	Mean		130,871	,8490
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	129,181	
	Mean	Upper Bound	132,561	
	5% Trimmed Mean		130,608	
	Median		130,750	
	Variance		57,661	
pO2treci	Std. Deviation		7,5935	
	Minimum		117,8	
	Maximum		152,8	
	Range		35,0	
	Interquartile Range		10,9	
	Skewness		,484	,269
	Kurtosis		-,165	,532
	Mean		123,706	,7317
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	122,250	
	Mean	Upper Bound	125,163	
pO2peti	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 рО<sub>2</sub> крви првог дана износе 137.056±7.89

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

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

### **Трећи дан**

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

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

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

### **Пети дан**

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

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

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

C) Вредности pCO2

Descriptives			Statistic	Std. Error
	Mean		49,259	,2912
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	48,679	
		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 Mean	Lower Bound	41,729	
		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 Mean	Lower Bound	23,183	
		Upper Bound	24,524	
pCO2peti	5% Trimmed Mean		23,899	
	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.

## рН крви

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

a. Friedman Test

Резултати овог теста показују да постоји статистички значајна разлика рН 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 Wilcoxonovог 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

**Hypothesis Test Summary**

	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 рН 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

Поредећи 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.

## pO2 крви

### Први и трећи дан

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 pO2prvi	137,056	80	7,8880	,8819
pO2treci	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 - pO2treci	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 pO2 првог дана су 137.056, а трећег дана 130.871, дакле вредности pO2 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 sig=0.000 <0.05.**

Просечне вредности рО2 трећег дана су 130.871, а петог дана 123.706, дакле **вредности рО2 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> treci	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> treci	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	pCO2treći	42,339	80	2,7392	,3063
	pCO2peti	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 pCO2treći - pCO2peti	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  $\text{sig}=0.000 < 0.05$ .**

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 агрегације тромбоцита 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	
agregacija32treci	Std. Deviation		80,146	
	Minimum		411	
	Maximum		782	
	Range		371	
	Interquartile Range		121	
	Skewness		,106	,269
	Kurtosis		-,466	,532
	Mean		252,46	6,345
agregacija32peti	95% Confidence Interval for	Lower Bound	239,83	
	Mean	Upper Bound	265,09	
	5% Trimmed Mean		251,51	

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
agregacija64nula	Mean	1111,18	12,414
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	1086,47	
	Upper Bound	1135,88	
	5% Trimmed Mean	1111,96	
	Median	1133,50	
	Variance	12328,627	
	Std. Deviation	111,034	
	Minimum	897	
	Maximum	1315	
	Range	418	
	Interquartile Range	203	
	Skewness	-,235	,269
	Kurtosis	-1,040	,532
agregacija64treći	Mean	966,90	14,203
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	938,63	
	Upper Bound	995,17	
	5% Trimmed Mean	966,50	
	Median	985,00	
	Variance	16138,927	
	Std. Deviation	127,039	
	Minimum	746	
	Maximum	1215	
	Range	469	
	Interquartile Range	218	
	Skewness	-,043	,269
	Kurtosis	-1,190	,532
agregacija64peti	Mean	734,18	13,430
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	707,44	
	Upper Bound	760,91	
	5% Trimmed Mean	733,71	
	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
	Mean	1181,65	13,364
	95% Confidence Interval for Lower Bound	1155,05	
	Mean Upper Bound	1208,25	
	5% Trimmed Mean	1182,82	
	Median	1215,00	
	Variance	14287,066	
agregacija96nula	Std. Deviation	119,529	
	Minimum	945	
	Maximum	1402	
	Range	457	
	Interquartile Range	195	
	Skewness	-,292	,269
	Kurtosis	-,905	,532
	Mean	1094,49	13,627
	95% Confidence Interval for Lower Bound	1067,36	
	Mean Upper Bound	1121,61	
	5% Trimmed Mean	1097,64	
	Median	1119,00	
	Variance	14856,405	
agregacija96treci	Std. Deviation	121,887	
	Minimum	825	
	Maximum	1308	
	Range	483	
	Interquartile Range	186	
	Skewness	-,404	,269
	Kurtosis	-,685	,532
	Mean	956,15	13,435
	95% Confidence Interval for Lower Bound	929,41	
	Mean Upper Bound	982,89	
agregacija96peti	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**

	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 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 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*	8,878	,000	445,435	488,865
	3	804,825*	9,758	,000	780,957	828,693
2	1	-467,150*	8,878	,000	-488,865	-445,435
	3	337,675*	6,754	,000	321,154	354,196
3	1	-804,825*	9,758	,000	-828,693	-780,957
	2	-337,675*	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 platelets and aggregated platelets 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 aggregated platelets on the 3rd and 5th day 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 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
a	i	
1133,50	985,00	741,00

Поређећи 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 Friedmanovog теста и вредности  $\text{sig}=0.000$  ( $p<0.05$ ), 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 Wilcoxonovog 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 1 and 3 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 3 and 5 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 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

Поредећи 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

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

N	80
Chi-Square	154,075
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 првог 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

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between aggregated samples 32nula and 64nula equals 0.	Related-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 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 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 a	agregacija64nul a	agregacija96nul a
Mean	1057,29	1111,18	1181,65
N	80	80	80
Std. Deviation	98,069	111,034	119,529

### Report

Median

agregacija32nul a	agregacija64nul a	agregacija96nul 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 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, 6,4и 9.4 током трећег 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 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 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 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

	agregacija32tre ci	agregacija64tre ci	agregacija96tre 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 platelets and aggregated platelets 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 platelets and aggregated platelets 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 platelets and aggregated platelets 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 гатроентерологији (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 броја 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% иситиваних 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  $7 \times 10^3 \mu\text{l}$  по јединици концентрованих тромбоцита, односно  $4,5 \times 10^3 \mu\text{l}$  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  $20\text{--}40 \times 10^9 \text{ ml}$  (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  $\beta$ -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 ириврезибилне (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  $\text{CO}_2$ , 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 pH 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 ( $pH$  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  $pH$ . У нашем испитивању, резултати агрегације тромбоцита показују да после 5 дана складиштења се може одредити репродуцибилан 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/ $mL$ ) у односу на колаген у мањој концентрацији (3,2  $\mu g$  колаген/ $mL$ ), и то у сваком тренутку испитивања (првог, трећег и петог дана складиштења). Могуће објашњење за овакву врсту промена тромбоцитне функције могу бити управо промене  $pH$ , 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 изаберају 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  $250 \times 10^9/\text{L}$ .

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 A5 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 ПАС-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 ZAKЉUČAK:

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 ЛИТЕРАТУРА

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, Trkluljic M, Todorovic M. *Osnovni principi hemoterapije*. Beograd: Institut za transfuziologiju VMA, 2010 (in Serbian); pp.126-31.
3. Kaufman RM, Djulbegovic 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, PravettoniA, ZaninettiR, SacchiMC. 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, Snayder 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 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-GBIbalpha antibody: B4. *Thromb Haemost* 2006;96:671-84.
21. Ozaki Y, Asazuma N, Suzuki-Inoue, Berndt MC. Platelet GBIb/IX/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. Mechanism 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 not 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. *Anesthesiology* 2004; 100: 722-2001.
33. Koscielny J, von Tempelhoff GF, Ziemer S. Practical Concept for Preoperative Management 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 management 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, Rebutta 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. Seghatchian 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 klopidogrela. *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, Cúlibrk 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.