

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA KNEŽEVIĆ (rojena TEHOVNIK)

**VPLIV PREDANALITSKIH DEJAVNIKOV NA AGREGACIJO  
TROMBOCITOV**

**THE INFLUENCE OF PREANALYTICAL VARIABLES ON  
PLATELET AGGREGATION**

Ljubljana, 2009

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Mojci Stegnar, prof. biol., za mentorstvo, posredovanje strokovnega znanja, nasvete in pomoč pri izvedbi diplomskega dela.

Zahvala velja tudi somentorici dr. Mojci Božič Mijovski, spec. med. biokem. za pomoč in temeljit pregled diplomskega dela.

Najlepša hvala tudi ing. Marinki Tehovnik, osebju laboratorija in medicinskim sestram, ki so mi pomagale pri tehničnem delu naloge.

Iskrena hvala tudi družini, ki me je vsa leta študija požrtvovalno podpirala, mi pomagala ter stala ob strani.

Diplomsko delo sem opravljala na Interni kliniki, Kliničnem oddelku za žilne bolezni Kliničnega centra v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce Stegnar, prof. biol., in somentorstvom dr. Mojce Božič Mijovski, spec. med. biokem. Analize so bile opravljene v laboratoriju Interne klinike, Kliničnem oddelku za žilne bolezni Kliničnega centra v Ljubljani.

### Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Mojce Stegnar, prof. biol., in somentorstvom dr. Mojce Božič Mijovski, spec. med. biokem.

Anja Knežević (Tehovnik)

Ljubljana, september 2009

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.

**KAZALO VSEBINE**

<b>POVZETEK</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>SEZNAM UPORABLJENIH KRATIC IN SIMBOLOV</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Hemostaza .....	1
1.2 Trombociti in njihova vloga v hemostazi (1) .....	3
1.3 Agonisti aktivacije trombocitov .....	7
1.4 Metode za ocenjevanje delovanja trombocitov .....	8
1.4.1 Merjenje časa krvavitve.....	8
1.4.2 Agregometrija v polni krvi .....	8
1.4.3 Analizator trombocitne funkcije PFA-100® .....	9
1.4.4 Analizator VerifyNow® .....	9
1.4.5 Pretočna citometrija.....	9
1.4.6 Serumski tromboksan B2 in njegov metabolit 11-dihidrotromboksan B2 v urinu.....	9
1.4.7 Metoda agregacije trombocitov .....	10
<b>2 NAMEN DELA IN CILJI</b> .....	<b>14</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>16</b>
3.1 Prostovoljci.....	16
3.2 Potek poskusa, odvzem krvi in priprava plazme .....	16
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>22</b>
4.1 Osnovni rezultati .....	22
4.2 Opisna statistika.....	32
4.3 Rezultati post hoc analize .....	34
<b>5 RAZPRAVA</b> .....	<b>40</b>
<b>6 SKLEP</b> .....	<b>45</b>
<b>7 LITERATURA</b> .....	<b>47</b>

## POVZETEK

Agregacija trombocitov je najpogostejša metoda za ocenjevanje delovanja trombocitov in za spremljanje protitrombocitnega zdravljenja, zato je bistvenega pomena, da je standardizirana. V nalogi bomo ugotavljali, kako vplivajo nekateri predanalitski dejavniki na agregacijo trombocitov.

Agregacijo trombocitov smo merili ob uporabi agonistov ADP, kolagen in arahidonska kislina v prilagojeni oz. neprilagojeni plazmi, bogati s trombociti (PRP) s pomočjo avtomatskega koagulacijskega aparata Behring Coagulation Timer (BCT®, Behring Diagnostics GmbH).

Dvajsetim navidezno zdravim prostovoljcem, starim od 20 do 50 let, smo vensko kri odvzeli trikrat v dveh zaporednih dneh. Prvi dan smo jim kri odvzeli od 8.-9. ure zjutraj in od 12.-13. ure, obakrat na tešče. Drugi dan smo jim kri odvzeli od 8.-9. ure po zajtrku.

Z merjenjem agregacije trombocitov v prilagojeni PRP takoj ali po pol ure smo želeli ugotoviti, kako vpliva kratka stabilizacija vzorca na agregacijo trombocitov. Ugotovili smo, da ne obstajajo statistično pomembne razlike med obema meritvama.

Prvi dan opoldne smo pripravili prilagojeno in neprilagojeno PRP in izmerili agregacijo trombocitov po pol ure. S tem smo želeli ugotoviti, kako vpliva prilagajanje števila trombocitov v PRP na agregacijo trombocitov. Ugotovili smo, da je bila z vsemi tremi agonisti agregacija trombocitov pomembno večja v neprilagojeni kot v prilagojeni PRP.

Drugi dan smo pripravili prilagojeno PRP in izmerili agregacijo trombocitov po 30 minutah, po 2 urah in po 4 urah. S tem smo želeli ugotoviti, kako vpliva shranjevanje vzorca pred analizo na agregacijo trombocitov. Ugotovili smo, da je bila agregacija trombocitov z ADP pomembno nižja po 4 urah, agregacija z arahidonsko kislino pa že po 2 urah. Agregacija z kolagenom se ni pomembno spremenila v opazovanem času.

Želeli smo tudi ugotoviti, kako vplivata zajtrk in dnevni ritem na agregacijo trombocitov. Ugotovili smo, da ne obstajajo statistično pomembne razlike med meritvami pred zajtrkom in po njem ter med meritvami zjutraj in opoldne.

Rezultati naše raziskave kažejo, da nekateri predanalitski dejavniki vplivajo na agregacijo trombocitov (prilagoditev števila trombocitov v PRP ter shranjevanje vzorca pred analizo), drugi pa ne (kratka stabilizacija vzorca ter čas odvzema krvi). V smislu teh rezultatov lahko postopek odvzema krvi za agregacijo trombocitov poenostavimo.

## ABSTRACT

Platelet aggregation is the most frequently used method for the evaluation of platelet function and for monitoring antiplatelet therapy, therefore it is important that it is standardized. The aim of the study is to establish the influence of some preanalytical variables on platelet aggregation.

Platelet aggregation was measured by agonists: ADP, collagen and arachidonic acid in adjusted or non-adjusted platelet rich plasma (PRP) using fully automated coagulation analyser, Behring Coagulation Timer (BCT®, Behring Diagnostics GmbH).

Blood from 20 apparently healthy volunteers (aged from 20 to 50 years) was sampled three times in two consecutive days. On the first day blood was obtained between 8 and 9 am and between noon and 1 pm, each time with fasting volunteer. The second day the blood was taken between 8 and 9 am after breakfast.

By measuring platelet aggregation in adjusted PRP immediately after PRP preparation or half an hour later the influence of the short sample stabilization on platelet aggregation was established. We found out that there were no statistically significant differences between the two measurements. On the first day at noon we prepared adjusted as well as non-adjusted PRP and measured platelet aggregation half an hour later. In this way we wanted to find out how the adjustment of the platelet number in PRP influences platelet aggregation. We established that platelet aggregation with all the three agonists was significantly higher in non-adjusted than in adjusted PRP. On the second day we prepared adjusted PRP and measured platelet aggregation 30 minutes, 2 hours later and 4 hours later to study the influence of sample storage before the analysis on platelet aggregation. The platelet aggregation with ADP was significantly lower after 4 hours, while the aggregation with the arachidonic acid was already lower 2 hours later. The aggregation with collagen was not significantly affected during the observation time. We also wanted to establish the influence of breakfast as well as diurnal rhythm on platelet aggregation. There were no statistically significant differences between measurements before and after breakfast and between measurements in the morning and at noon.

Our results show that some preanalytical variables do have an influence on platelet aggregation. Accordingly, the procedure of blood sampling for platelet aggregation can be simplified.

**SEZNAM UPORABLJENIH KRATIC IN SIMBOLOV**

FXII, FXI	Faktor XII in XI
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
RNA	Ribonukleinska kislina
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
Ca <sup>2+</sup>	Ioniziran kalcij
PAI-1	Inhibitor tkivnega aktivatorja plazminogena (plasminogen activator inhibitor 1)
AMP	Adenozin monofosfat
cAMP	Ciklični adenozin monofosfat
PAF	Faktor, ki aktivira trombocite (platelet activating factor)
TXA <sub>2</sub>	Tromboksan A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	Tromboksan B <sub>2</sub>
PRP	Plazma bogata s trombociti (platelet rich plasma)
PPP	Plazma revna s trombociti (platelet poor plasma)
PRP-P	Plazma s prilagojenim številom trombocitov (prilagojena PRP)
EDTA	Etilendiamin tetraacetat
rcf	Relativna centrifugalna sila
OG	Optična gostota
BCT	Avtomatski koagulacijski analizator (Behring Coagulation Timer)
AK	Arahidonska kislina
mOGz	Optična gostota PRP
mOGk	Optična gostota PRP po 10 minut
mOG <sub>PPP</sub>	Optična gostota PPP
ADP%	Odstotek agregacije z ADP
KOL%	Odstotek agregacije s kolagenom
AK%	Odstotek agregacije z arahidonsko kislino
SD	Standardna deviacija
F	Razmerje med variabilnostjo med skupinami in znotraj skupin (vrednost pri ANOVI)
P	Statistična verjetnost

# 1 UVOD

Osnovna naloga tega diplomskega dela je raziskati vpliv predanalitskih dejavnikov na agregacijo trombocitov.

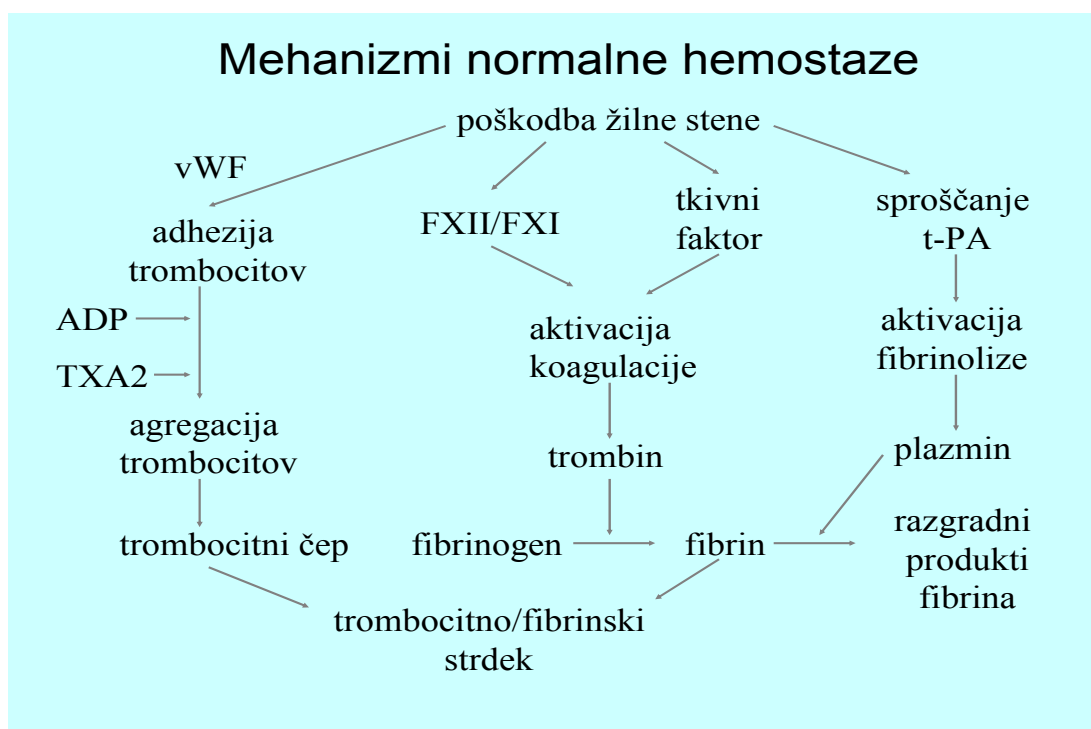
## 1.1 Hemostaza

Hemostaza je skupek procesov med koagulacijskimi in fibrinolitičnimi beljakovinami v krvi in žilni steni, med trombociti in žilno steno, ki zagotavljajo, da ostaja kri v žilah tekoča ali da se strdi, kadar je žila poškodovana. Pri nepoškodovanih žilah vzdržuje normalna hemostaza kri tekočo, s čimer je omogočena preskrba organov in tkiv. Normalna hemostaza, ki se sproži ob poškodbi žilne stene, prepreči večjo krvavitev (1,2).

Hemostaza se začne s skrčenjem žilne stene, prilepljanjem trombocitov in nastankom trombocitnega strdka ter nadaljuje z aktivacijo koagulacije, ki privede do nastanka trombina in s tem do nastanka fibrinskih niti, ki učvrstijo trombocitni strdek. Zaščitni mehanizmi zaviralcev koagulacije preprečijo širjenje strdka, fibrinoliza pa strdek sčasoma razgradi. Uravnavanje hemostaze poteka na površini trombocitov, endotelijskih celic in subendotelija in ne v tekoči krvi (1).

Zaradi lažjega razumevanja delimo hemostazo na primarno in sekundarno reakcijo. Primarna vsebuje: kontrakcijo žilne stene, adhezijo trombocitov in nastanek trombocitnega čepa. Sekundarna pa vključuje: nastanek trombina, nastanek fibrina, zaščitne mehanizme pred širjenjem strdka (zaviralce koagulacije) in razgradnjo fibrina (fibrinolizo). Dejansko trombociti, koagulacija in fibrinoliza ne delujejo ločeno, temveč tesno prepleteno in s številnimi medsebojnimi povezavami. Če je žilna stena poškodovana tako, da se razgali subendotelij, pride do vazokonstrikcije, trombociti pa se pričnejo prilepljati na to površino. Trombociti se aktivirajo. Sinteza tromboksana  $A_2$  povzroči sproščanje beljakovin iz zrn. Sledi fosforilacija specifičnih beljakovin in premik znotrajceličnega kalcija. Na površini trombocitov se pojavijo glikoproteinski receptorji GPIIb/IIIa, na katere se veže fibrinogen,

ki poveže trombocite v trombocitne agregate, da nastane trombocitni čep. Subendotelij aktivira tudi koagulacijo. Kontaktni faktorji (FXII in FXI) ter tkivni faktor, ki je sestavina subendotelija, sodelujejo pri tej aktivaciji. Trombocitna membrana je površina, na kateri se aktivirajo koagulacijski faktorji v kompleksih s kofaktorji in substratom. Posledica aktivacije koagulacijskih faktorjev je tvorba trombin. Trombin aktivira faktorja V in VIII ter tako v pozitivni povratni zanki pospeši svoje nastajanje. Trombin tudi okrepi agregacijo trombocitov in povzroči trobocitno sprostitutveno reakcijo. Trombin povzroči tudi polimerizacijo fibrinskih monomerov v fibrin in s tem učvrsti trombocitni čep. Trombocitno-fibrinski strdek, ki nastane na mestu endotelijske poškodbe, se raztopi šele čez nekaj časa, ko se na fibrin veže dovolj tkivnega faktorja plazminogena in plazminogena. Aktivator pretvori plazminogen v aktivni encim plazmin in tako sproži razgradnjo fibrina ali fibrinolizo in s tem odstrani strdek (1) (slika 1).



Slika 1: Shema procesov hemostaze

AT = antitrombin, ADP = adenzin difosfat, PC = protein C, PS = protein S, t-PA = tkivni aktivator plazminogena, TXA<sub>2</sub> = tromboksan A<sub>2</sub>, vWF = von Willebrandov faktor.



Motnje hemostaze zato vodijo do prepočasnega strjevanja krvi in s tem do krvavitev ali pa do prehitrega strjevanja krvi in s tem do nastankov strdkov v žilah (1).

S preiskavami hemostaze želimo izključiti ali potrditi motnje v posameznih sestavinah hemostaze. Rezultati preiskav nam pomagajo prepoznati te motnje, so pomoč pri napovedovanju poteka bolezni in pri izbiri in vodenju zdravljenja.

Številna odkritja na področju biokemije in fiziologije hemostaze ter rezultati kliničnih raziskav so vplivali na vlogo laboratorija pri prepoznavanju motenj hemostaze. Polavtomatski in avtomatski instrumenti se danes uporabljajo v večini laboratorijev za hemostazo pri izvajanju rutinskih koagulacijskih preiskav (1).

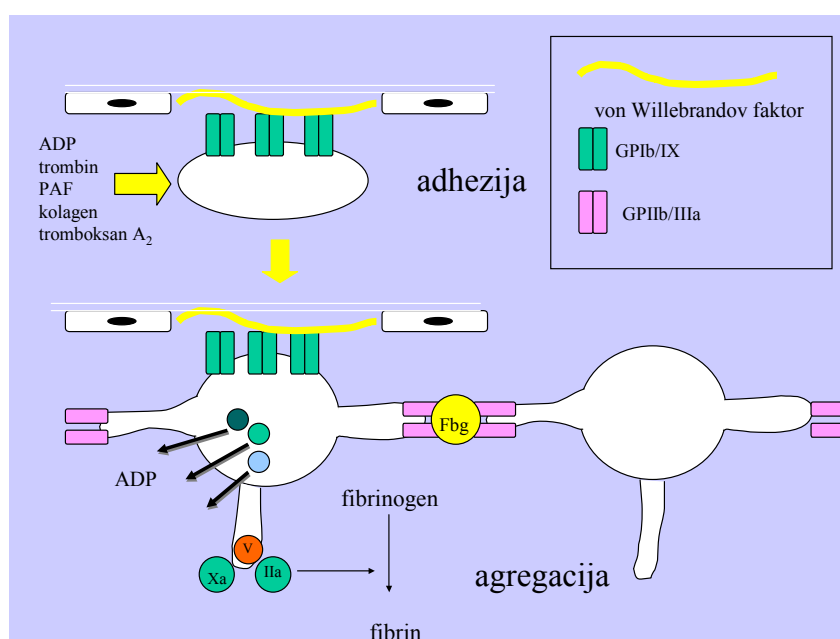
## **1.2 Trombociti in njihova vloga v hemostazi (1)**

Trombociti so brezjedrni delci megakariocitov. Nimajo deoksiribonukleinske kisline (DNA), imajo pa nekaj informacijske ribonukleinske kisline (RNA), ki omogoča omejeno nastajanje beljakovin. Življenjska doba trombocitov v krvnem obtoku je 7 do 10 dni. Trombocite odstranjujejo makrofagi retikuloendotelijskega sistema. Pri zdravih osebah se približno tretjina trombocitov zadržuje v vranici, ostali pa so v krvnem obtoku.

Trombociti so brezjedrne celice bogate z zrni. Njihova glavna funkcija je hemostatska, vlogo pa imajo tudi pri poškodbi tkiva in pri vnetnih procesih. Trombopoeza je proces, ki se začne z multipotentno matično celico, nadaljuje z megakariocitno vrsto in konča z zreliimi trombociti. Megakariopoeza se dogaja v dveh fazah: v prvi pride do proliferacije megakariocitov, v drugi megakariociti zorijo v trombocite. Obe fazi uravnava hemopoetični rastni faktor.

Po začetni poškodbi se trombociti prilepijo (adhezija) in sicer predvsem na subendotelij (na kolagen), ki se razgali na poškodovanem mestu. Začnejo se stvarjati trombocitni agregati (zlepljanje trombocitov med seboj) in aktivira se koagulacija. Aktivirani trombociti sproščajo tudi zaviralec tkivnega aktivatorja plazminogena, ki zavre fibrinolizo in odloži razgradnjo strdka, ki je nastal na poškodovanem mestu, dokler strdek ne opravi svoje hemostatske naloge.

V fizioloških pogojih se trombociti ne lepijo (adherirajo) na nepoškodovano žilno steno zaradi antitrombotičnih lastnosti endotelija. Pri poškodbi pa je prav adhezija trombocitov prvi odgovor na poškodbo. Pri adheziji sodelujejo vezavne beljakovine npr. von Willebrandov faktor, fibrinogen, fibronektin in vitronektin. Te vezavne beljakovine reagirajo s specifičnimi membranskimi glikoproteinskimi receptorji, med katerimi so najpomembnejši integrini. Integrini so povezani s proteini G v notranjosti trombocita. Kompleks GPIb/IX je receptor za von Willebrandov faktor, glavno vezavno beljakovino pri normalnem toku krvi in normalnih strižnih silah. Pri adheziji trombocitov na subendotelij pride do aktiviranja trombocitov (slika 2).



Slika 2: Adhezija in agregacija trombocitov

ADP = adenzindifosfat, Fbg = fibrinogen, GPIb/IX = glikoproteinski receptor Ib/IX, GPIIb/IIIa = glikoproteinski receptor Iib/IIIa, PAF = faktor, ki aktivira trombocite

Na površini trombocitov so receptorji za snovi – agoniste, ki aktivirajo trombocite. To so adrenalin, adenzindifosfat (ADP), trombin, faktor, ki aktivira trombocite (PAF), kolagen in tromboksan  $A_2$ . Aktiviranje trombocitov vodi do spremembe oblike in agregacije trombocitov.

Neaktivirani trombociti imajo ploščici podobno (diskoidno) obliko. Pri aktiviranju pa trombociti postanejo kroglasti in dobijo psevdopodije. Pride tudi do prerazporeditve zrn v

sredino trombocita in do sprostitve snovi iz zrn. Trombociti imajo tri vrste zrn: zrnca  $\alpha$ , gosta zrnca in lizosome. Skozi sistem kanikul, ki povezuje zrnca s površino trombocitov, se po aktiviranju trombocitov izprazni v okolico vsebina zrn v nekaj desetinkah sekunde. Iz gostih zrn se sprostijo ADP, adenozintrifosfat (ATP),  $\text{Ca}^{2+}$  in serotonin, iz zrn  $\alpha$  pa  $\beta$ -tromboglobulin, trombocitni faktor 4, faktor V, fibrinogen, von Willebrandov faktor, trombospondin, fibronektin, vitronektin, inhibitor tkivnega aktivatorja plazminogena (PAI-1) in rastni faktorji. Lizosomi vsebujejo kisle hidrolaze. Po sekreciji izgledajo trombociti pod elektronskim mikroskopom brez zrn.

Aktiviranje trombocitov in njihovo sekrecijo uravnavajo naslednje spremembe:

- spremembe v ravni cikličnih nukleotidov npr. znotrajceličnega cikličnega adenzin monofosfata (cAMP),
- prehajanje  $\text{Ca}^{2+}$  v trombocite,
- hidroliza membranskih fosfolipidov
- fosforilacija kritičnih znotrajceličnih beljakovin.

Od snovi, ki uravnavajo aktiviranje trombocitov, je zelo pomemben cAMP. Slednji ne zavira samo agregacije trombocitov, temveč zavira tudi spremembo oblike in sekrecijo.

Ključni dogodek pri aktiviranju trombocitov je mobilizacija in povečanje znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$ . Znotrajtrombocitni  $\text{Ca}^{2+}$  pospeši delovanje protein kinaze C, aktivira fosfolipazo  $A_2$ , pomemben je pri aktiviranju celičnega ogrodja in pri sekreciji.

Dražljaj za hidrolizo membranskih fosfolipidov in sintezo eikozanoidov je adhezija trombocitov na kolagen in vezava agonistov, kot je npr. trombin, na receptor. Eikozanoidi so oksigenirani derivati arahidonske kisline in vsebujejo 20 ogljikovih atomov. Sinteza eikozanoidov se začne s sproščanjem arahidonske kisline iz dveh glavnih membranskih fosfolipidov, kar katalizirata fosfolipaza C in fosfolipaza  $A_2$ . Arahidonsko kislino spreminja ciklooksigenaza v prostaglandinske endoperokside, te pa spreminja tromboksan sintetaza v tromboksan  $A_2$ . Iz arahidonske kisline nastajajo tudi stabilni prostaglandini, ki zavirajo agregacijo trombocitov.

Ob sekreciji se iz trombocitov sprostijo agonisti, ki sprožijo aktiviranje drugih trombocitov. Trombociti se zlepijo med seboj (agregirajo). Osrednji dogodek pri agregaciji trombocitov je vezava adhezijskih beljakovin, predvsem fibrinogena, pa tudi drugih, kot so von Willebrandov faktor, fibronektin in vitronektin, na glikoproteinske receptorje GPIIb/IIIa. Zaradi svoje posebne molekulske strukture fibrinogen poveže dva trombocita med seboj. Do agregacije trombocitov pride samo po aktiviranju trombocitov in po spremembi trombocitne membrane, ko se glikoproteinski receptorji prerazporedijo v komplekse GPIIb/IIIa.

Trombocitne reakcije, kot so agregacija, sekrecija in retrakcija strdka, so odvisne od prenosa signalov. Agonisti transdukcije signala so ADP, trombin, adrenalin, tromboksan  $A_2$ , PAF pa tudi kolagen in druge adhezijske molekule. Trombin in tromboksan  $A_2$  sta najmočnejša agonista. Proteini G, fosfolipaza C in fosfolipaza  $A_2$ , kot tudi izoencimi proteinkinaze C, sodelujejo pri prenašanju signala. Transdukcija signala povzroči centralizacijo zrnca, nastajanje psevdopodijev in sodeluje pri preoblikovanju receptorjev GPIIb/IIIa za fibrinogen.

Potrebne so tri reakcije, da se trombociti pretvorijo iz neaktivne diskoidne oblike v lepljivo obliko s psevdopodiji in da pride do agregacije:

- v krvi ali v žilni steni morajo nastati signali, ki reagirajo s specifičnimi trombocitnimi membranskimi receptorji,
- priti mora do znotrajceličnega presnosa signala od receptorjev do zrnca, citoskeleta in integrinskih receptorjev, zato da GPIIb/IIIa vežejo fibrinogen,
- vezava fibrinogena na GPIIb/IIIa povzroči znotrajtrombocitni signal v drugem trombocitu in ta trombocit aktivira.

Strdki polne krvi, kot tudi strdki iz trombocitne plazme, se skrčijo (retrahirajo) in iztisnejo serum. Mediatorji retrakcije so kontraktilne beljakovine v psevdopodijih, na katere so se prilepile fibrinske nitke. Retrakcija učvrsti hemostatski strdek ali tromb. Mehanizem retrakcije strdka je analogen krčenju mišice.

### 1.3 Agonisti aktivacije trombocitov

Znano je dejstvo, da fibrinogen ne reagira z mirujočimi trombociti, ampak se veže samo na trombocite, ki so jih aktivirali različni agonisti. Agonisti aktivacije trombocitov so: ADP, kolagen, arahidonska kislina, trombin, tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), adrenalin, serotonin in aktivirajoči faktor trombocitov. Izpostavitve fibrinogenskih receptorjev na površini trombocitov lahko sprožijo tako znotrajcelični kot zunajcelični dražljaji. Pot znotrajceličnih molekularnih mehanizmov še ni povsem pojasnjena, zato o njej obstaja več teorij (3).

- ADP je šibek agonist. V nizkih koncentracijah (0,1 - 0,5 μM) povzroči spremembo oblike trombocitov, pri malo višjih koncentracijah (0,5 – 1,5 μM) pa reverzibilno agregacijo. V še višjih koncentracijah (2 – 5 μM) sproži drugo, ireverzibilno fazo agregacije in sprostitve gostih granul. ADP se veže na agregin in povzroči takšno konformacijsko spremembo tega proteina, da ne ovira več nastanka kompleksa GPIIb/IIIa, na katerega se lahko veže fibrinogen. Druga možnost, ki povzroči spremembo oblike in agregacijo trombocitov, je ta, da zavre delovanje adenilat ciklaze v celici. To posledično vodi v znižanje koncentracije cAMP v trombocitih (visoke koncentracije cAMP inhibirajo agregacijo trombocitov) (3).
- KOLAGEN se veže na receptor GPIIb/IIIa. Vezava kolagena na receptor je odvisna od koncentracije magnezijevih ionov. Monomeri kolagena polimerizirajo v fibrile, ki agregirajo trombocite. Za agregacijo trombocitov je poleg kolagena potreben še ADP, saj kolagen sam ni dovolj močan agonist (3). Je zelo razširjen in pogosto uporabljen reagent, vendar različni kolageni, ki so dostopni na tržišču, dajejo različne rezultate, zato so rezultati redko primerljivi (4).
- TXA<sub>2</sub> je agonist z močnim delovanjem, pri katerem sta znana dva načina aktivacije trombocitov. Pri prvem pride do trombocitne agregacije in sekrecije z aktivacijo fosfolipaze C, pri drugem pa do potrebne strukturne spremembe trombocitov privede zvišan nivo Ca<sup>2+</sup> v citosolu (3).

- ARAHIDONSKA KISLINA (AK) se sprosti iz fosfolipidov v membrani z fosfolipazo A<sub>2</sub>. Pod vplivom encimov ciklooksigenaz in tromboksan sintetaze se arahidonska kislina prevede v TXA<sub>2</sub>, kratkoživeči agonist, ki vodi do nastanka inaktivnega, stabilnega produkta TXB<sub>2</sub>. Acetilsalicilna kislina ireverzibilno inaktivira ciklooksigenazo, zato je sposobnost trombocitov za tvorbo tromboksana A<sub>2</sub> inhibirana (3).

Poskusi so pokazali, da agonisti delujejo sinergistično, saj je aktivacija trombocitov večja, če je prisotnih več različnih agonistov (3, 5).

## 1.4 Metode za ocenjevanje delovanja trombocitov

Metod za ocenjevanje delovanja trombocitov je sorazmerno malo. Uporabljamo *in vivo* metodo merjenja časa krvavitve, ki nam pove število in delovanje trombocitov in odslkava delovanje žilne stene. Z *in vitro* metodami lahko spremljamo različne parametre trombocitne aktivacije, sekrecije, adhezije in agregacije. Med te metode spadajo: metoda agregacije trombocitov, merjenje agregometrije v polni krvi, analizatorji funkcije trombocitov kot so PFA-100® (merjenje zapiralnega časa) in VerifyNow®, pretočna citometrija, vrednosti tromboksana B2 v serumu in vrednosti metabolita tromboksana B2 (11-dihidrotromboksan B2) v urinu.

### 1.4.1 Merjenje časa krvavitve

*In vivo* merjenje časa krvavitve je metoda, ki je zelo odvisna od izvedbe in zelo slabo ponovljiva. Ta metoda ni primerna za spremljanje protitrombocitnega zdravljenja (6,7).

### 1.4.2 Agregometrija v polni krvi

Agregometrija v polni krvi temelji na razliki v napetosti med dvema elektrodama, do katere pride zaradi akumulacije agregiranih trombocitov na elektrodah (2,8,9). Glavni

problem metode v polni krvi je standardizacija metode, saj so različne študije opisale vpliv števila trombocitov in hematokrita na *in vitro* agregacijo v polni krvi (9).

#### **1.4.3 Analizator trombocitne funkcije PFA-100®**

PFA-100® meri adhezijo in agregacijo trombocitov v polni krvi pod pogoji, ki posnemajo dogajanje primarnih hemostaznih mehanizmov, ki se pojavijo *in vivo*. Analizator je enostaven za uporabo, hiter in ponovljiv (10).

#### **1.4.4 Analizator VerifyNow®**

Analizator VerifyNow® je enostaven, popolnoma avtomatiziran analizator, ki meri agregacijo trombocitov, ki jo sprožimo z agonisti, kar se kaže v spremembi optične gostote. Rezultati te metode se lahko primerjajo z rezultati agregometrije (11).

#### **1.4.5 Pretočna citometrija**

Pretočna citometrija je metoda, ki se pogosto uporablja za ocenjevanje delovanja trombocitov. Z njo lahko merimo reaktivnost trombocitov, aktivirane trombocite v obtoku, levkocitno-trombocitne agregate in prokoagulantne mikrodcelce trombocitov (12).

#### **1.4.6 Serumski tromboksan B2 in njegov metabolit 11-dihidrotromboksan B2 v urinu**

Serumski tromboksan B2 je stabilen metabolit tromboksana A2 in odraža celotno kapaciteto trombocitov za sintezo tromboksana A2 in je zato najbolj specifičen test za merjenje farmakoloških učinkov acetilsalicilne kisline (6).

Koncentracije metabolita tromboksana B2 v urinu prav tako kažejo na učinek acetilsalicilno kislinske inhibicije nastajanja tromboksana A2, vendar je občutljivost in

specifičnost tega testa manj zanesljiva, saj je povišana koncentracija 11-dihidrotromboksana B2 lahko posledica akutnih trombotičnih dogodkov (13).

#### **1.4.7 Metoda agregacije trombocitov**

Agregacija trombocitov po Bornu (5) je ena izmed najstarejših in najbolj uveljavljenih metod za merjenje delovanja trombocitov (5,14-18).

Pri tej metodi sprožimo trombocitno aktivacijo in agregacijo v plazmi, bogati s trombociti z agonisti aktivacije trombocitov, kot so kolagen, ADP ali arahidonska kislina, kar se kaže kot povečanje svetlobne prepustnosti.

Rezultati meritev agregacije trombocitov bi lahko bili med seboj primerljivi, če bi bila metoda standardizirana.

Predanalitski dejavniki so verjetno najpomembnejši faktorji, ki vplivajo na rezultate agregacije. Mednje spadajo: pravilni odvzem venske krvi, priprava plazme, bogate s trombociti (PRP), inkubacija PRP pri sobni temperaturi pred analizo, prilagajanje števila trombocitov v PRP s pufrom ali plazmo, revno s trombociti (PPP) in časovna odvisnost izvedbe meritev. Pomembni pa so tudi analitski dejavniki, na primer agonisti, saj že različne soli istega agonista vodijo do različnih rezultatov. Postopek, ki se najpogosteje uporablja in pri katerem se uravnava število trombocitov v plazmi, je dolgotrajen in lahko vpliva na aktivacijo trombocitov.

Prav tako niso postavljena določena pravila za agregometer. Linearizirati bi bilo potrebno spremembo v optični gostoti, standardizirati hitrost snemanja zapisa in kalibrirati občutljivost agregometra. Če bi sprejeli določene standardne postopke, bi bila metoda merjenja agregacije trombocitov relativno preprosta in zanesljiva, primerna tako za klinične raziskave kot tudi za eksperimentalne raziskave (5).



***Odvzem krvi***

Kri za preiskavo odvezamo iz komolčne vene z iglo (12 G) v epruveto. Tako imenovanim metulj sistemom se je potrebno izogibati, saj lahko sprožijo aktivacijo trombocitov (5).

Najpogostejši antikoagulant, ki se uporablja za merjenje agregacije trombocitov, je 0,11 ali 0,13 M natrijev citrat, ki zniža koncentracijo ioniziranega  $\text{Ca}^{2+}$  do mikromolarnih koncentracij. Če bi uporabili kot antikoagulant etilendiamin tetraacetat (EDTA), bi bila koncentracija ioniziranega  $\text{Ca}^{2+}$  prenizka, da bi lahko potekla agregacija trombocitov (5). Uporaba natrijevega citrata kot antikoagulanta pa lahko predstavlja omejitev pri izvedbi kliničnih testov za ocenjevanje funkcije trombocitov, saj trombociti v krvi reagirajo drugače kot trombociti v citratni krvi, ki vsebuje nefiziološko nizke koncentracije ioniziranega kalcija (19).

***Priprava PRP in PPP***

Po odvzemu krvi se obnašanje trombocitov zelo spremeni. Najpomembnejše spremenljivke so temperatura, pri kateri shranjujemo kri oziroma PRP, čas od odvzema krvi do analize in pH PRP (5).

Mnogi laboratoriji prilagajajo število trombocitov v PRP z mešanjem PRP-ja in PPP-ja, da dosežejo število trombocitov med  $200 \times 10^9$  trombocitov/L in  $300 \times 10^9$  trombocitov/L. Proces mešanja lahko sam po sebi vodi do aktivacije trombocitov, pri tem pa se odziv agregacije bistveno ne spremeni pri številu trombocitov med  $150 \times 10^9$  trombocitov/L in  $450 \times 10^9$  trombocitov/L.

Takoj po odvzetju krvi vzorce narahlo pomešamo. Za pripravo PRP centrifugiramo antikoagulantno kri pri sobni temperaturi 4 minute pri 500 rcf. Pri višji centrifugalni sili ali daljšem času centrifugiranja izgubimo večje trombocite. PRP odpipetiramo v drugo epruveto in jo shranimo pri sobni temperaturi. Najprimernejši čas za izvedbo meritev je med 30 minutami in 2 urama (5).

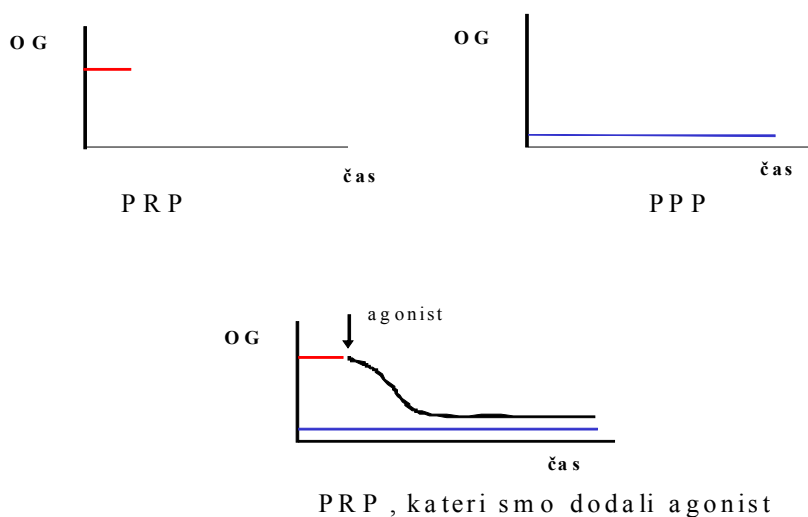
PPP pripravimo tako, da antikoagulantno kri še enkrat centrifugiramo 15 minut pri 1000 rcf. PPP lahko vsebuje določene snovi, ki se sprostijo iz trombocitov med centrifugiranjem plazme v postopku priprave PPP in s tem vplivajo na funkcijo trombocitov (16,17).

### **Meritev**

Vzorcu trombocitov, ki ga stalno mešamo, dodamo agonist (kolagen, arahidonska kislina, ADP, adrenalin), ki aktivira trombocite. Aktiviranje trombocitov povzroči vezavo fibrinogena na trombocitne receptorje GPIIb/IIIa in s tem agregacijo. Agregacija poteka ob prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$ , ki ga je dovolj v citratni krvi ali plazmi.

Agregacijo in aglutinacijo merimo s turbidimetrijo, saj posamični trombociti bolj razpršijo svetlobo kot trombocitni agregati. Zato ima agregacija trombocitov za posledico povečano prepustnost svetlobe. Spremembo svetlobne prepustnosti v časovni enoti po dodatku agonista zabeleži aparat kot agregacijsko krivuljo (1).

Meritev opravimo v PRP, PPP pa služi kot standard. Maksimalna prepustnost za svetlobo je nastavljena na agregometru z PPP, minimalna prepustnost pa predstavlja alikvot PRP pred agregacijo. Ti predstavljata 0% in 100% agregacijo (14,20) (Slika 3).



Slika 3: Sprememba optične gostote (OG) PRP pri agregaciji trombocitov. Po dodatku agonista PRP OG vzorca pade in se približa vrednosti OG PPP.

Metoda ima seveda svoje prednosti in pomanjkljivosti. Prednosti metode so v izbiri različnih agonistov, s katerimi lahko ocenimo delovanje trombocitov z različnih vidikov. Metoda se uporablja rutinsko in je dobro sprejeta. Pomanjkljivosti te metode so, da je dolgotrajna in draga, izvajati pa jo morajo izurjeni laboratorijski delavci.

Slabost metode je tudi to, da je nefiziološka, saj se meri samo delovanje trombocitov in ne tudi njihove interakcije z drugimi krvnimi celicami. Poteka v mirujoči plazmi, kar tudi ne ustreza poškodbi v telesu, kjer se kri pretaka (21).

Prav tako lahko centrifugiranje plazme pri visokih hitrostih aktivira trombocite in s tem da napačne rezultate. Priprava vzorca in s tem možna aktivacija trombocitov s centrifugiranjem pa ne predstavlja omejitve pri metodi, kjer se meri agregometrija v polni krvi (14).

Rezultati agregacije trombocitov različnih laboratorijev se med seboj močno razlikujejo zaradi uporabe različnih instrumentov, antikoagulacijskih sredstev, priprave vzorcev, prilagajanja števila trombocitov v PRP, vrste in koncentracije agonistov, ki sprožijo agregacijo in tudi časa med odvzemom krvi in izvedeno meritvijo (5).

Slabost vseh metod za ocenjevanje delovanja trombocitov je, da niso standardizirane. Na *in vitro* metode znatno vplivajo predanalitski dejavniki, saj so trombociti zelo občutljivi na način odvzema krvi, antikoagulacijska sredstva, shranjevanje, temperaturo vzorca in druge dejavnike. Zaradi sorazmerno slabe ponovljivosti in primerljivosti metod večinoma ne poznamo referenčnih vrednosti.

## 2 NAMEN DELA IN CILJI

Spremembe hemostaze povzročajo nastanek srčnožilnih bolezni, ki v razvitem svetu predstavljajo najpogostejši vzrok obolevnosti in smrti. Med te bolezni uvrščamo vensko tromboembolijsko bolezen in ishemično bolezen arterij (možganska kap, srčni infarkt in arterijska okluzivna bolezen perifernih arterij), ki nastane kot posledica tromboze na aterosklerotično spremenjeni žili. Najpogostejši vzrok, zaradi katerega pride do te bolezni, je nastanek strdka oz. tromba, kjer imajo pomembno vlogo trombociti. Zaradi kopičenja in nekontroliranega zlepljanja trombocitov nastajajo trombocitni strdki.

Za zdravljenje srčnožilnih bolezni se uporabljajo protitrombocitna zdravila, za katere velja, da lahko pride pri različnih bolnikih do različnega odziva bolnikovih trombocitov na protitrombocitno zdravljenje. Testi za ugotavljanje delovanja trombocitov se vse bolj uporabljajo za spremljanje učinkov protitrombocitnih zdravil z namenom določiti optimalni odmerek zdravil za preprečevanje oziroma zdravljenje tromboz z minimalnimi hemoragičnimi stranskimi učinki. Ti testi se pogosto uporabljajo za merjenje »aspirinske rezistence« oziroma »klopidogrelske rezistence« (22).

Merjenje agregacije trombocitov, ki temelji na osnovi fotometrije, je najpogostejša metoda, ki se uporablja za ocenjevanje delovanja trombocitov in trombocitnih antagonistov (20). Slabost le-te je nestandardiziranost metode, kar vodi do različnih rezultatov glede na postopek dela in uporabo različnih agonistov.

Z raziskavo bomo preučili vpliv predanalitskih dejavnikov na agregacijo trombocitov. Agregacijo trombocitov bomo merili na avtomatskem koagulacijskem aparatu Behring Coagulation Timer ( BCT, Behring Diagnostics GmbH).

V raziskavi bomo preučili vpliv kratke stabilizacije vzorca, dnevnega ritma, prilagoditve PRP, zajtrka in vpliv shranjevanja vzorca.

Iz dobljenih rezultatov bomo skušali ugotoviti, kako predanalitski dejavniki vplivajo na agregacijo trombocitov z različnimi agonisti, kot so ADP, kolagen in arahidonska kislina.

## Cilji:

1. Ugotoviti vpliv kratke stabilizacije vzorca (analiza takoj ali čez 30 minut);
2. ugotoviti vpliv dnevnega ritma (odvzem vzorca na tešče ob 8 – 9 ure in od 12 - 13 ure);
3. ugotoviti vpliv prilagoditve števila trombocitov v PRP s PPP (meritev v neprilagojeni PRP in v prilagojeni PRP);
4. ugotoviti vpliv zajtrka (odvzem vzorca prvi dan na tešče in drugi dan ob isti uri kot prvi dan po lahkem zajtrku);
5. ugotoviti vpliv shranjevanja vzorca (analiza vzorca po 30 minutah, po dveh urah in po štirih urah).

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 Prostovoljci**

V raziskavi je sodelovalo 20 navidezno zdravih prostovoljcev (znancev, prijateljev in sorodnikov), od tega 10 žensk in 10 moških, ki so darovali vensko kri. Stari so bili od 20 do 50 let, njihova povprečna starost je bila 32 let. Vsi so bili navidezno zdravi in niso jemali nobenih zdravil, ki bi lahko vplivala na agregacijo trombocitov.

Vse preiskovance smo podrobno seznanili z namenom raziskave in so na odvzem krvi pisno pristali. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko dne 11.12. 2007.

#### **3.2 Potek poskusa, odvzem krvi in priprava plazme**

Prostovoljcem smo kri odvzeli trikrat v dveh zaporednih dnevih po shemi, ki je prikazana na Sliki 4. Prvi dan smo jim kri odvzeli od 8. – 9. ure zjutraj na tešče in drugič od 12. – 13. ure popoldne, prav tako na tešče. Drugi dan smo jim kri odvzeli od 8. - 9. ure zjutraj po zajtrku. Na dan odvzema niso pili kave ali pravega čaja, prav tako niso kadili.

Pred odvzemom 9 mL krvi so preiskovanci počivali sede vsaj 15 minut. Kri smo odvzeli iz komolčne vene. Uporabili smo iglo 21 G in kri odvzeli v vakuumsko epruveto z 0,105 M natrijevem citratom v volumskem razmerju 1 : 9 (1 del Na-citrata : 9 delom krvi). Vse epruvete in pipete, ki smo jih uporabljali, so bile plastične, saj se trombociti lepijo na steklene površine in bi tako lahko sprožili njihovo aktivacijo. Pipetirali smo počasi, da nismo s tem sprožili spontane agregacije trombocitov.

Do analize smo kri hranili pri sobni temperaturi.

Kri smo centrifugirali pri sobni temperaturi 15 minut pri 1000 rcf. Supernatant - trombocitno plazmo bogato s trombociti (PRP – platelet rich plasma) smo previdno odpipetirali v epruveto. Ostanek krvi smo še enkrat centrifugirali pri sobni temperaturi 10 minut pri 2000 rcf. Supernatant - plazmo revno s trombociti (PPP – platelet poor plasma)

smo zopet previdno odpipetirali v drugo epruveto. Plazmo smo hranili pri sobni temperaturi.

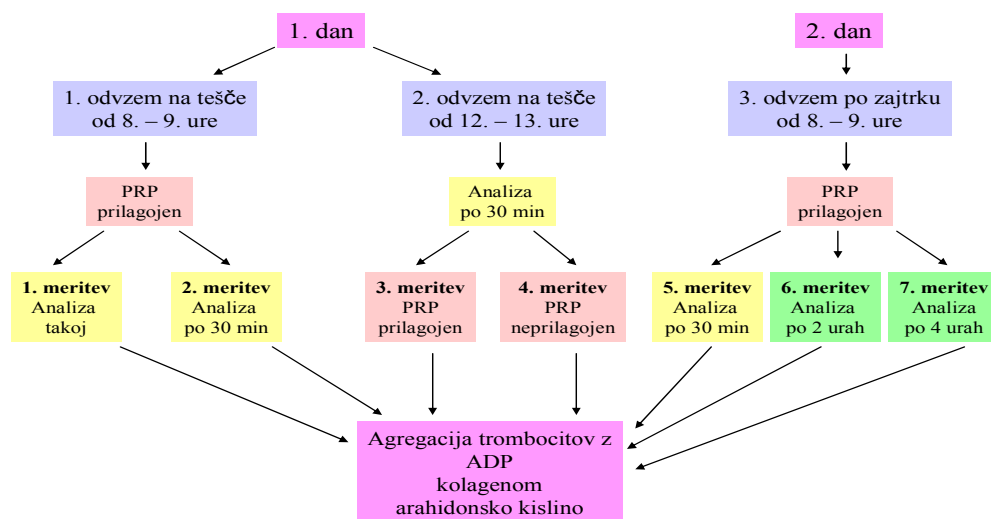
Število trombocitov v obeh plazmah smo prešteli na hematološkem števcu. Število trombocitov v PPP ni preseglo  $16 \times 10^9$  trombocitov/L. Število trombocitov v PRP smo uravnali z redčenjem z analogno PPP do števila  $250 \pm 10\% \times 10^9$  trombocitov/L.

Agregacijo trombocitov smo merili z ADP, kolagenom in arahidonsko kislino.

Prvi dan smo jim kri odvzeli od 8. – 9. ure zjutraj na tešče. Število trombocitov v PRP smo uravnali na  $250 \pm 10\% \times 10^9$  trombocitov. Agregacijo trombocitov smo izmerili takoj in nato še po 30 minutah.

Isti dan smo jim kri odvzeli od 12. – 13. ure tudi na tešče. Plazmo smo pustili stati 30 minut pri sobni temperaturi, nato smo število trombocitov v PRP uravnali na  $250 \pm 10\% \times 10^9$  trombocitov. Tokrat smo izmerili agregacijo trombocitov istočasno v prilagojeni PRP in v neprilagojeni PRP.

Drugi dan smo preiskovancem kri odvzeli od 8. – 9. ure zjutraj po lahkem zajtrku. Zopet smo pripravili prilagojeno PRP. Agregacijo trombocitov smo nato merili po 30 minutah, po dveh urah in po štirih urah (Slika 4).



Slika 4: Shema odvzemov krvi

V naši raziskavi smo si izbrali nekaj primerjav, s katerimi smo ugotovili, če obstajajo statistično pomembne razlike med posameznimi meritvami.

S primerjavo med 1. in 2. meritvijo smo preverili vpliv kratke stabilizacije vzorca na agregacijo trombocitov (primerjava 1/2), saj smo agregacijo trombocitov s 1. meritvijo merili takoj in z 2. meritvijo po 30 minutah.

S primerjavo med 2. in 3. meritvijo smo preverili vpliv dnevnega ritma na agregacijo trombocitov (primerjava 2/3), saj smo agregacijo merili z 2. meritvijo zjutraj in s 3. meritvijo opoldne.

S primerjavo med 3. in 4. meritvijo smo preverili vpliv prilagoditve števila trombocitov v PRP na agregacijo trombocitov (primerjava 3/4), saj smo s 3. meritvijo merili agregacijo trombocitov v prilagojeni PRP, s 4. meritvijo pa v neprilagojeni PRP.

S primerjavo med 2. in 5. meritvijo smo preverili vpliv zajtrka na agregacijo trombocitov (primerjava 2/5), saj smo z 2. meritvijo merili agregacijo trombocitov na teščče, s 5. meritvijo pa po zajtrku.

S primerjavo med 5. in 6. meritvijo ter 5. in 7. meritvijo smo preverili vpliv shranjevanja vzorca na agregacijo trombocitov (primerjava 5/6 in primerjava 5/7), saj smo agregacijo



trombocitov s 5. meritvijo merili po pol ure, s 6. meritvijo po dveh urah in s 7. meritvijo po štirih urah od odvzema krvi.

### 3.3 Priprava agonistov

Za agregacijo smo uporabljali naslednje reagente:

1. DiaColagen (Diamed): 110  $\mu\text{g/mL}$  govejega liofiliziranega kolagena,
2. DiaAdin: (Diamed): 110  $\mu\text{g/mL}$  ADP,
3. DiaChidon: (Diamed): 16 mmol/L liofilizirane AK (arahidonske kisline),
4. fiziološko raztopino.

Hranili smo jih v hladilniku pri temperaturi 2 - 6 °C in jih pripravili po priloženih navodilih.

ADP smo raztopili v 1 mL bidestilirane vode. Raztopino smo hranili pri temperaturi 2 - 8°C. Uporabnost reagenta v hladilniku je bila 1 teden. Začetna koncentracija reagenta je bila 110  $\mu\text{mol/L}$ , končna koncentracija ADP v testu pa 10  $\mu\text{mol/L}$ .

Kolagen je bil pripravljen v obliki suspenzije. Hranili smo ga v hladilniku pri temperaturi 2-8°C. Odprt reagent je bil uporaben 1 teden. Pred uporabo smo ga dobro pretresli. Začetna koncentracija reagenta je bila 110  $\mu\text{g/L}$ , njegova končna koncentracija v testu pa 10  $\mu\text{g/L}$ .

Arahidonsko kislino smo prav tako raztopili v 1 mL bidestilirane vode. Hranili smo jo v hladilniku pri temperaturi 2 - 8°C. Raztopina je bila v hladilniku obstojna 1 teden. Začetna koncentracija reagenta je bila 16 mmol/L, končna koncentracija v testu pa 1,5 mmol/L. Pred uporabo smo vse reagente dobro pretresli in za merjenje agregacije uporabili 1 mL raztopine.

### 3.4 Merjenje agregacije trombocitov

#### *Princip*

Z agonistom (kolagen, ADP, AK) sprožimo v PRP agregacijo trombocitov. Ker se trombociti združujejo v agregate, se poveča prepustnost svetlobe skozi vzorec plazme. Prepustnost svetlobe je največja v PPP, zato za standardizacijo meritve uporabimo PPP istega preiskovanca. Glede na prepustnost PPP plazme (100%) izračunamo največji odstotek agregacije v 10 min v PRP po enačbi:

$$\% \text{agregacije} = \frac{mOG_Z - mOG_K}{mOG_Z - mOG_{PPP}} \times 100$$

- $mOG_Z$  je optična gostota PRP takoj po dodatku agonista
- $mOG_K$  je optična gostota PRP po 10 min
- $mOG_{PPP}$  je optična gostota PPP

Računalnik nam poda tudi hitrost agregacije kot funkcijo spremembe optične gostote plazme v času (mOG/min).

#### *Reagenti in potek dela*

Meritve agregacije smo opravili s pomočjo avtomatskega koagulacijskega aparata Behring Coagulation Timer (BCT®, Behring Diagnostics GmbH).

BCT® je popolnoma avtomatski aparat, ki se uporablja tako za rutinske preiskave kot za specifične koagulacijske teste. BCT® zazna tvorjenje trombocitnih agregatov v PRP kot spremembo v prepustnosti svetlobe pri 37°C (17).

Merjenje agregacije je potekalo fotometrično. Kiveta z vzorcem trombocitne plazme je bila nameščena med izvirom svetlobe in detektorjem svetlobe, ki je povezan z recorderjem v našem primeru z računalnikom. Računalnik je prikazal optično gostoto trombocitne plazme kot funkcijo časa. Ker trombociti odbijajo in absorbirajo svetlobo, je bila optična gostota trombocitne plazme, bogate s trombociti (PRP) višja kot v plazmi, revni s trombociti (PPP). Če smo z dodatkom agonista sprožili agregacijo trombocitov, se je število in

velikost agregatov povečalo, večja je bila tudi razdalja med njimi. Zaradi tvorbe agregatov se je povečal prehod svetlobe, kar je posledično vodilo do padca optične gostote trombocitne plazme.

Maksimum optične gostote je pred agregacijo trombocitov, minimum optične gostote pa je pri popolni agregaciji trombocitov. Računalnik na koncu meritve izriše krivuljo in odčita optično gostoto trombocitne plazme pred in po agregaciji trombocitov ter hitrost agregacije.

Kolagen, ADP in AK smo raztopili z 1 ml destilirane vode in jih dali na ustrezna mesta v aparatu. Vzorce plazme smo dali v rotor 1. Pri PPP smo izbrali test za agregacijo PPP, pri PRP pa test za agregacijo PRP in zaprli pokrov. Nato je analizator sam odpipetiral 135  $\mu\text{L}$  trombocitne plazme v kiveto, dodal 15  $\mu\text{L}$  agonista in 15  $\mu\text{L}$  topila. Meritev je potekala 17 minut. Dobili smo vrednosti optične gostote na začetku in koncu reakcije in hitrost agregacije PRP in optično gostoto PPP. S pomočjo prej zapisane formule smo izračunali odstotek agregacije v PRP.

Rezultate smo izrazili kot odstotek agregacije z ADP (ADP% - odstotek agregacije z ADP), odstotek agregacije s kolagenom (Kol%- odstotek agregacije s kolagenom) ter odstotek agregacije z AK (AK%- odstotek agregacije z arahidonsko kislino).

### 3.5 Statistične metode

Pri statistični obdelavi smo uporabili statistični program STATISTICA 6.0 (Stat Soft Inc). Rezultate smo prikazali kot aritmetične sredine s standardnimi odkloni. Razlike med posameznimi odvzemi smo računali z analizo variance (ANOVA). Če je bila F vrednost statistično pomembna ( $P < 0,05$ ), smo za posamezne pare odvzemov opravili post hoc analizo s t-testom za odvisne vzorce.

S testom korelacije smo nato opisali moči linearne povezave med dvema spremenljivkama. Ugotavljali smo, če obstajajo pomembne povezave med posameznimi odvzemi s številom trombocitov.

## **4 REZULTATI**

### **4.1 Osnovni rezultati**

V preglednicah I.-IX. so prikazani osnovni rezultati agregacije trombocitov za vsakega posameznega prostovoljca ob različnih odvzemih krvi in z uporabo različnih agonistov.

Preglednica I: Rezultati 1. in 2. meritve 1. odvzema agregacije trombocitov z agonistom kolagenom. Preglednica vsebuje naslednje podatke: starost prostovoljca (leta), število trombocitov v PRP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v prilagojeni PRP (PRP-P) (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v PPP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), rezultat agregacije trombocitov pri 1. in 2. meritvi (vrednost v %).

KOLAGEN	Preiskovanec	Starost	1.odvzem				
			PRP	PRP-P	PPP	1. meritev	2. meritev
1	1	26	362	262	5	73,0	66,2
2	2	37	578	257	12	88,4	93,4
3	3	47	466	269	0	81,0	76,9
4	4	26	605	269	3	84,2	57,5
5	5	30	520	263	2	83,5	87,3
6	6	25	579	271	1	92,4	87,3
7	7	50	352	237	0	82,4	82,5
8	8	31	340	255	1	91,4	87,2
9	9	20	407	257	2	90,5	88,3
10	10	35	410	238	7	87,7	73,7
11	11	30	407	231	2	72,6	80,8
12	12	30	344	259	0	88,9	82,2
13	13	28	577	271	0	83,3	86,5
14	14	27	499	252	6	77,1	81,2
15	15	25	409	258	0	85,8	82,2
16	16	28	413	263	0	81,2	85,3
17	17	47	344	268	5	72,7	62,5
18	18	26	434	235	0	82,9	79,8
19	19	33	355	250	2	87,8	87,6
20	20	31	386	252	3	87,5	91,6

Preglednica II: Rezultati 3. in 4. meritve 2. odvzema agregacije trombocitov z agonistom kolagenom. Preglednica vsebuje naslednje podatke: starost prostovoljca (leta), število trombocitov v PRP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v prilagojeni PRP (PRP-P) (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v PPP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), rezultat agregacije trombocitov pri 3. in 4. meritvi (vrednost v %).

<b>KOLAGEN</b>		2. odvzem				
Preiskovanec	Starost	PRP	PRP-P	PPP	3. meritev	4. meritev
1	26	299	248	3	89,2	89,6
2	37	494	254	5	90,7	93,6
3	47	421	267	8	81,4	81,0
4	26	648	266	0	78,4	83,0
5	30	504	270	0	75,5	78,5
6	25	523	267	0	92,5	91,7
7	50	377	242	0	84,3	86,6
8	31	356	248	0	87,5	89,2
9	20	417	244	0	89,0	87,4
10	35	362	225	0	85,9	90,6
11	30	362	231	0	86,2	90,0
12	30	398	265	0	83,0	88,2
13	28	622	267	0	82,7	91,3
14	27	425	257	0	85,8	90,4
15	25	429	271	4	69,4	73,6
16	28	390	262	0	69,5	72,4
17	47	281	237	16	58,8	68,6
18	26	421	256	0	85,2	89,3
19	33	359	239	0	84,2	90,8
20	31	400	257	3	91,2	86,6

Preglednica III: Rezultati 5., 6. in 7. meritve 3. odvzema agregacije trombocitov z agonistom kolagenom. Preglednica vsebuje naslednje podatke: starost prostovoljca (leta), število trombocitov v PRP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v prilagojeni PRP (PRP-P) (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v PPP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), rezultat agregacije trombocitov pri 5., 6. in 7. meritvi (vrednost v %).

KOLAGEN	Preiskovanec	3. odzvem					
		Starost	PRP	PRP-P	PPP	5. meritev	6. meritev
1	26	287	267	0	82,0	84,3	89,2
2	37	474	258	0	81,7	85,0	93,6
3	47	323	241	0	85,2	84,3	89,2
4	26	571	264	0	81,4	78,3	90,0
5	30	400	255	0	84,1	80,7	79,2
6	25	550	272	0	85,1	86,5	91,1
7	50	387	266	0	81,0	82,4	83,1
8	31	377	244	0	82,6	71,6	75,2
9	20	423	256	0	83,6	82,8	80,2
10	35	352	269	0	83,3	83,9	90,3
11	30	350	265	0	78,1	78,6	73,6
12	30	336	235	0	95,8	88,0	82,9
13	28	493	262	0	88,4	87,5	82,4
14	27	450	256	13	79,5	76,8	78,1
15	25	497	259	3	71,5	71,9	75,4
16	28	468	244	0	69,5	77,3	75,9
17	47	315	267	16	58,6	65,9	69,0
18	26	446	254	14	87,2	85,6	81,7
19	33	316	245	13	95,6	88,0	87,2
20	31	351	262	13	82,0	89,7	88,3

Preglednica IV: Rezultati 1. in 2. meritve 1. odvzema agregacije trombocitov z agonistom ADP. Preglednica vsebuje naslednje podatke: starost prostovoljca (leta), število trombocitov v PRP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v prilagojeni PRP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v PPP (PRP-P) (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), rezultat agregacije trombocitov pri 1. in 2. meritvi (vrednost v %).

ADP	Preiskovanec	Starost	1. odvzem				
			PRP	PRP-P	PPP	1. meritev	2. meritev
	1	26	362	262	5	78,9	81,3
	2	37	578	257	12	100,7	100,3
	3	47	466	269	0	77,0	73,5
	4	26	605	269	3	74,4	58,2
	5	30	520	263	2	73,5	75,2
	6	25	579	271	1	89,7	89,7
	7	50	352	237	0	88,4	92,4
	8	31	340	255	1	83,2	83,3
	9	20	407	257	2	84,7	92,5
	10	35	410	238	7	87,1	80,0
	11	30	407	231	2	74,6	74,1
	12	30	344	259	0	87,1	90,8
	13	28	577	271	0	85,4	84,7
	14	27	499	252	6	89,2	84,9
	15	25	409	258	0	30,6	30,2
	16	28	413	263	0	85,5	82,3
	17	47	344	268	5	55,4	62,5
	18	26	434	235	0	50,5	67,8
	19	33	355	250	2	57,9	71,6
	20	31	386	252	3	59,3	75,7



Preglednica V: Rezultati 3. in 4. meritve 2. odvzema agregacije trombocitov z agonistom ADP. Preglednica vsebuje naslednje podatke: starost prostovoljca (leta), število trombocitov v PRP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v prilagojeni PRP (PRP-P) (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v PPP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), rezultat agregacije trombocitov pri 3. in 4. meritvi (vrednost v %).

<b>ADP</b>		2. odvzem				
Preiskovanec	Starost	PRP	PRP-P	PPP	3. meritev	4. meritev
1	26	299	248	3	92,3	89,4
2	37	494	254	5	89,2	92,5
3	47	421	267	8	77,0	80,6
4	26	648	266	0	74,7	83,0
5	30	504	270	0	69,5	75,2
6	25	523	267	0	91,8	94,0
7	50	377	242	0	88,2	90,9
8	31	356	248	0	83,7	89,3
9	20	417	244	0	85,5	90,1
10	35	362	225	0	86,0	86,2
11	30	362	231	0	85,2	87,9
12	30	398	265	0	89,3	91,9
13	28	622	267	0	86,5	90,1
14	27	425	257	0	89,5	89,1
15	25	429	271	4	34,8	54,8
16	28	390	262	0	66,4	67,8
17	47	281	237	16	36,5	46,2
18	26	421	256	0	48,1	43,4
19	33	359	239	0	53,2	58,0
20	31	400	257	3	52,9	83,2

Preglednica VI: Rezultati 5., 6. in 7. meritve 3. odvzema agregacije trombocitov z agonistom ADP. Preglednica vsebuje naslednje podatke: starost prostovoljca (leta), število trombocitov v PRP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v prilagojeni PRP (PRP-P) (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v PPP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), rezultat agregacije trombocitov pri 5., 6. in 7. meritvi (vrednost v %).

ADP	Preiskovanec	3. odvzem						
		Starost	PRP	PRP-P	PPP	5. meritev	6. meritev	7. meritev
	1	26	287	267	0	86,6	87,8	73,8
	2	37	474	258	0	86,1	86,0	81,7
	3	47	323	241	0	78,9	77,2	56,0
	4	26	571	264	0	78,5	73,9	49,1
	5	30	400	255	0	73,6	73,2	50,1
	6	25	550	272	0	90,0	91,8	89,6
	7	50	387	266	0	86,6	84,1	77,2
	8	31	377	244	0	72,4	72,6	68,3
	9	20	423	256	0	68,2	66,2	55,7
	10	35	352	269	0	87,8	87,4	81,9
	11	30	350	265	0	82,1	80,4	75,5
	12	30	336	235	0	89,5	89,8	84,1
	13	28	493	262	0	87,6	84,6	80,0
	14	27	450	256	13	79,0	78,9	76,6
	15	25	497	259	3	25,8	15,1	6,7
	16	28	468	244	0	62,3	65,9	53,5
	17	47	315	267	16	61,8	62,1	63,8
	18	26	446	254	14	60,4	67,4	44,9
	19	33	316	245	13	38,8	65,4	20,1
	20	31	351	262	13	27,9	36,1	8,2

Preglednica VII: Rezultati 1. in 2. meritve 1. odvzema agregacije trombocitov z agonistom AK. Preglednica vsebuje naslednje podatke: starost prostovoljca (leta), število trombocitov v PRP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v prilagojeni PRP (PRP-P) (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v PRP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), rezultat agregacije trombocitov pri 1. in 2. meritvi (vrednost v %).

AK	Preiskovanec	Starost	1. odvzem			
			PRP	PRP-P	PPP	1. meritev
1	26	362	262	5	79,5	84,6
2	37	578	257	12	107,6	101,7
3	47	466	269	0	82,4	80,6
4	26	605	269	3	80,1	73,4
5	30	520	263	2	82,8	13,2
6	25	579	271	1	93,9	90,4
7	50	352	237	0	86,6	78,4
8	31	340	255	1	90,9	91,3
9	20	407	257	2	93,5	89,8
10	35	410	238	7	80,0	78,5
11	30	407	231	2	78,5	78,7
12	30	344	259	0	88,0	88,4
13	28	577	271	0	85,4	92,4
14	27	499	252	6	85,3	84,6
15	25	409	258	0	86,6	74,8
16	28	413	263	0	87,9	73,2
17	47	344	268	5	62,9	65,4
18	26	434	235	0	77,9	73,4
19	33	355	250	2	73,2	74,1
20	31	386	252	3	93,5	91,9

Preglednica VIII: Rezultati 3. in 4. meritve 2. odvzema agregacije trombocitov z agonistom AK. Preglednica vsebuje naslednje podatke: starost prostovoljca (leta), število trombocitov v PRP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v prilagojeni PRP (PRP-P) (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v PPP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), rezultat agregacije trombocitov pri 3. in 4. meritvi (vrednost v %).

AK		2. odvzem				
Preiskovanec	Starost	PRP	PRP-P	PPP	3. meritev	4. meritev
1	26	299	248	3	90,4	91,8
2	37	494	254	5	89,7	92,6
3	47	421	267	8	84,4	89,9
4	26	648	266	0	76,8	84,9
5	30	504	270	0	75,2	81,5
6	25	523	267	0	92,4	91,2
7	50	377	242	0	83,3	90,4
8	31	356	248	0	91,0	92,8
9	20	417	244	0	87,4	90,0
10	35	362	225	0	90,7	91,5
11	30	362	231	0	92,2	93,4
12	30	398	265	0	90,4	95,2
13	28	622	267	0	86,2	93,7
14	27	425	257	0	89,9	91,3
15	25	429	271	4	65,2	70,7
16	28	390	262	0	65,9	69,8
17	47	281	237	16	57,6	58,6
18	26	421	256	0	78,0	84,1
19	33	359	239	0	69,5	63,8
20	31	400	257	3	91,7	93,7

Preglednica IX: Rezultati 5., 6. in 7. meritve 3. odvzema agregacije trombocitov z agonistom AK. Preglednica vsebuje naslednje podatke: starost prostovoljca (leta), število trombocitov v PRP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v prilagojeni PRP (PRP-P) (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), število trombocitov v PPP (vrednost  $\times 10^9$  /L trombocitov), rezultat agregacije trombocitov pri 5., 6. in 7. meritvi (vrednost v %).

AK	Preiskovanec	Starost	3. odvzem				
			PRP	PRP-P	PPP	5. meritev	6. meritev
1	26	287	267	0	93,1	84,5	72,5
2	37	474	258	0	91,3	84,8	87,2
3	47	323	241	0	84,4	89,2	68,6
4	26	571	264	0	80,3	74,2	0,0
5	30	400	255	0	83,3	80,1	64,1
6	25	550	272	0	93,4	91,0	91,9
7	50	387	266	0	84,4	83,6	72,5
8	31	377	244	0	72,6	72,8	56,8
9	20	423	256	0	8,2	2,3	0,0
10	35	352	269	0	90,8	87,4	87,2
11	30	350	265	0	84,4	83,3	78,8
12	30	336	235	0	90,0	89,9	87,3
13	28	493	262	0	89,1	90,7	86,7
14	27	450	256	13	83,8	78,7	78,2
15	25	497	259	3	75,0	68,2	69,2
16	28	468	244	0	70,9	66,5	0,0
17	47	315	267	16	61,2	68,2	67,2
18	26	446	254	14	73,6	71,1	0,0
19	33	316	245	13	0,0	0,0	0,0
20	31	351	262	13	89,1	90,3	84,1

## 4.2 Opisna statistika

Primerjali smo število trombocitov v PRP, število trombocitov v prilagojeni PRP in število trombocitov v PPP (preglednica X) pri 1., 3. in 5. odvzemu (shema odvzemov prikazana v sliki 4).

Preglednica X: Srednja vrednost  $\pm$  standardna deviacija števila trombocitov v PRP, prilagojeni PRP in PPP ( $N \times 10^9/L$  trombocitov) za 1., 3. in 5. odvzem (shema odvzemov prikazana v sliki 4), F vrednost in P vrednost

	1. odvzem	3. odvzem	5. odvzem	ANOVA (F)	P
PRP	439 $\pm$ 89	424 $\pm$ 94	408 $\pm$ 82	0,61	0,55
PRP-P	256 $\pm$ 12	254 $\pm$ 14	257 $\pm$ 10	0,67	0,68
PPP	3 $\pm$ 3	2 $\pm$ 4	4 $\pm$ 6	0,52	0,53

Ugotovili smo, da za PRP ne obstaja statistično pomembna razlika med 1., 3. in 5. odvzemom krvi (shema odvzemov prikazana v sliki 4) v številu trombocitov, saj smo izračunali, da je  $P=0,55$  (preglednica X).

Prav tako smo ugotovili, da za prilagojeno PRP ne obstaja statistično pomembna razlika med 1., 3. in 5. odvzemom krvi (shema odvzemov prikazana v sliki 4), saj smo izračunali, da je  $P=0,68$  (preglednica X).

Tudi za PPP smo ugotovili, da ne obstaja statistično pomembna razlika med 1., 3. in 5. odvzemom krvi (shema odvzemov prikazana v sliki 4), saj smo izračunali, da je  $P=0,53$  (preglednica X).

Ker so bile P vrednosti za vse tri spremenljivke (PRP, prilagojeno PRP in PPP) večje od 0,05, nismo izvedli post hoc analize za posamezne odvzeme.

Nato smo pri statističnem opisu primerjali rezultate agregacije trombocitov z različnimi agonisti (s kolagenom, ADP in arahidonsko kislino) in ugotavljali, če obstajajo statistično pomembne razlike med posameznimi meritvami (shema meritev prikazana v sliki 4).

Rezultati so prikazani v preglednici XI.

Preglednica XI: Srednja vrednost  $\pm$  standardna deviacija agregacije trombocitov s kolagenom, ADP in arahidonsko kislino ( v %) za 1.- 7. meritev (shema meritev prikazana v sliki 4), F vrednost in P vrednost

	meritev							ANOVA (F)	P
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.		
Kolagen	83,7 $\pm$ 6,1	81,0 $\pm$ 9,5	82,5 $\pm$ 8,5	85,6 $\pm$ 7,1	81,1 $\pm$ 8,3	81,5 $\pm$ 6,3	82,8 $\pm$ 6,9	0,85	0,53
ADP	75,7 $\pm$ 16,9	77,5 $\pm$ 15,3	74,0 $\pm$ 18,9	79,2 $\pm$ 16,1	71,2 $\pm$ 19,9	72,3 $\pm$ 18,6	59,8 $\pm$ 24,6	2,28	0,04
Arahidonska kislina	84,8 $\pm$ 9,2	78,9 $\pm$ 17,9	82,4 $\pm$ 10,7	85,5 $\pm$ 11,0	74,9 $\pm$ 25,7	72,8 $\pm$ 25,8	57,6 $\pm$ 35,3	4,10	0,0008

Z ANOVO smo ugotovili, da za agregacijo s kolagenom ne obstajajo statistično pomembne razlike med posameznimi meritvami (shema meritev prikazana v sliki 4), saj je bila P vrednost višja od 0,05, in sicer 0,53 (preglednica XI).

Za agregacijo z ADP pa smo z ANOVO ugotovili statistično pomembne razlike med posameznimi meritvami (shema meritev prikazana v sliki 4), saj je P vrednost znašala 0,04 (preglednica XI).

Prav tako smo za agregacijo z arahidonsko kislino s statistično obdelavo ugotovili pomembne razlike med posameznimi meritvami (shema meritev prikazana v sliki 4), saj je P vrednost znašala 0,0008 (preglednica XI).

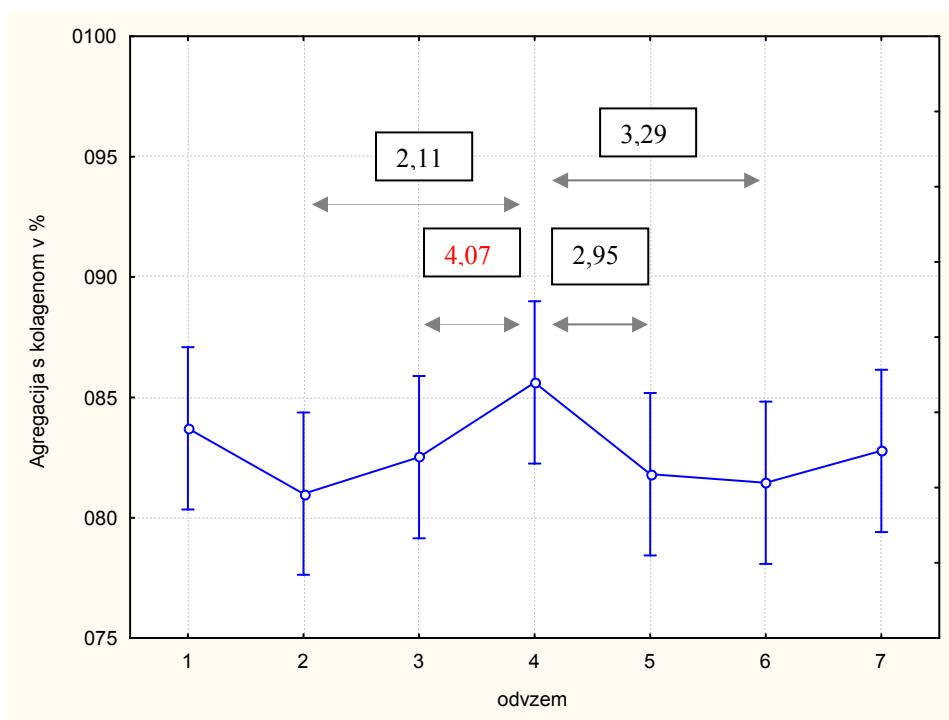
Ker smo za agregacijo trombocitov z ADP in arahidonsko kislino z ANOVO ugotovili statistično pomembne razlike, smo za vse tri agoniste izvedli post hoc analizo s t-testom.

### **4.3 Rezultati post hoc analize**

Post hoc analizo smo opravili s t-testom za odvisne vzorce za primerjave, ki smo jih določili v sliki 4. Primerjali smo vpliv kratke stabilizacije vzorca (primerjava 1/2), vpliv dnevnega ritma (primerjava 2/3), vpliv prilagoditve PRP (primerjava 3/4), vpliv zajtrka (primerjava 2/5) in vpliv shranjevanja vzorca (primerjava 5/6 in 5/7).

Čeprav statistična obdelava z ANOVO ni pokazala statistično pomembnih razlik za agregacijo s kolagenom, saj je bila P vrednost višja od 0,05 ( $P=0,53$ ), smo vseeno opravili post hoc analizo s t-testom. Rezultati t-testa so pokazali (slika 5), da je za agregacijo trombocitov s kolagenom pomemben vpliv prilagoditve PRP (primerjava 3/4).

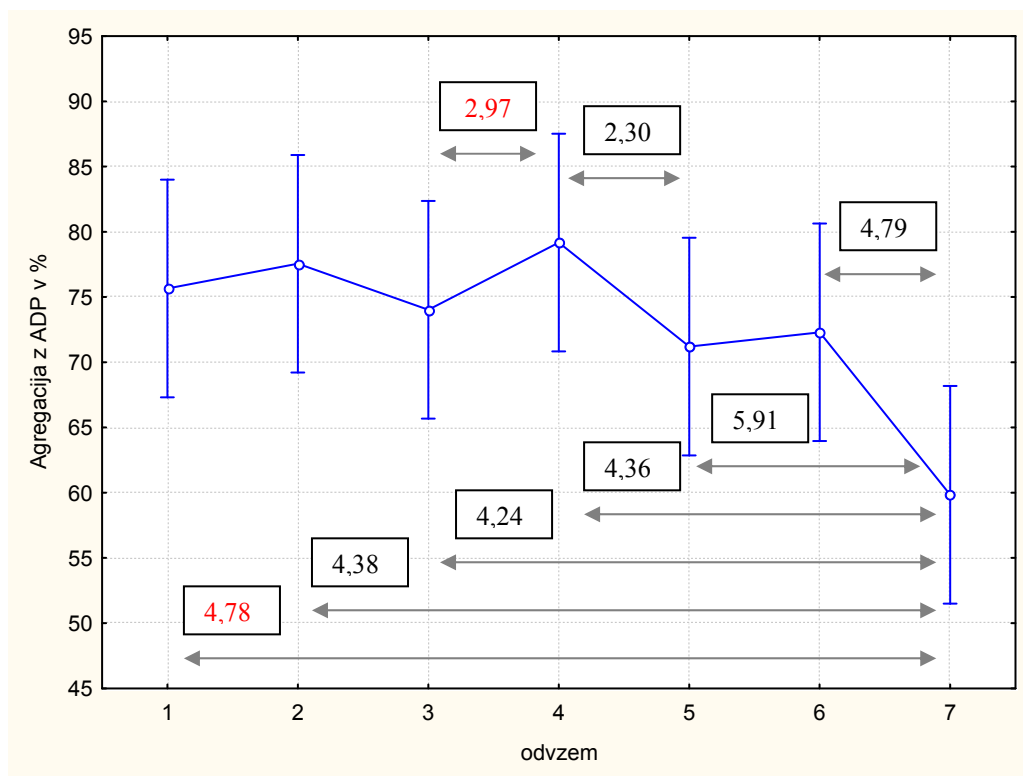




Slika 5: Agregacija trombocitov s kolagenom (v %) za posamezne meritve (shema meritev prikazana v sliki 4). Prikazane so aritmetične sredine (krog) in interval zaupanja ( $\perp$ ). V okvirčkih so prikazani rezultati t-testa, ki so statistično pomembni, rdeče so obarvani rezultati, ki so pomembni za naše primerjave.

Statistična obdelava z ANOVO nam je pokazala, da za agregacijo trombocitov z ADP obstajajo statistično pomembne razlike med posameznimi meritvami, saj je bila P vrednost nižja od 0,05, in sicer  $P=0,04$ , zato smo izvedli post hoc analizo s t-testom.

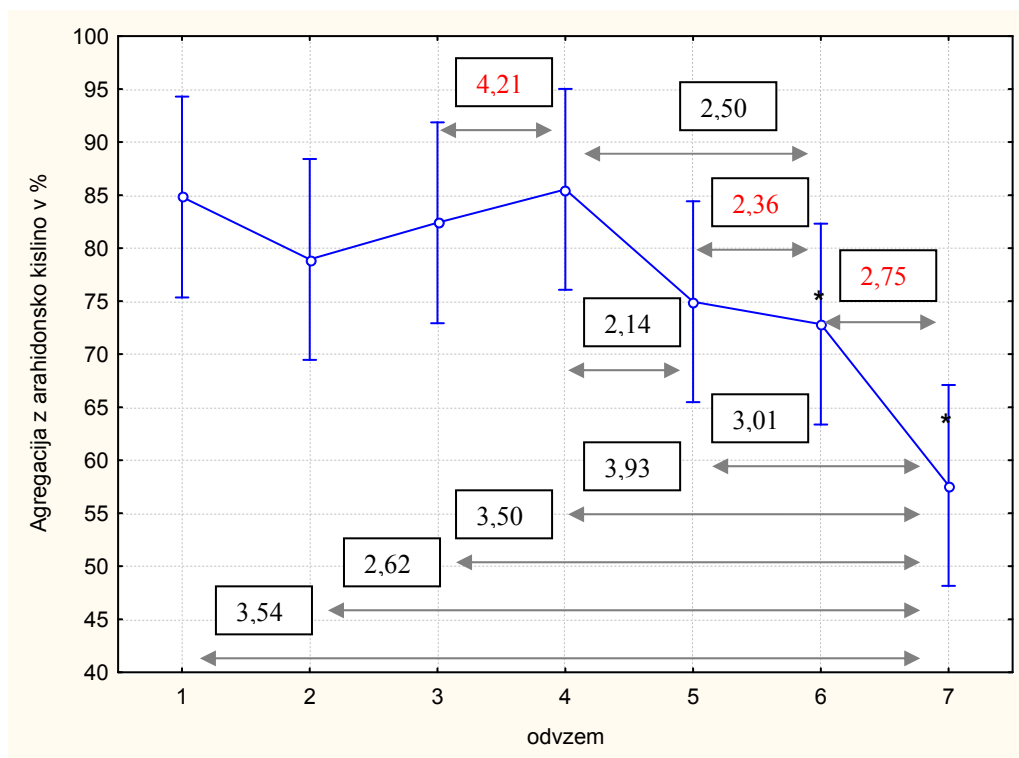
Ugotovili smo, da je za agregacijo trombocitov z ADP pomemben vpliv prilagoditve PRP (primerjava 3/4) in vpliv shranjevanja vzorca (primerjava 6/7) (slika 6).



Slika 6: Agregacija trombocitov z ADP (v %) za posamezne meritve (shema meritev prikazana v sliki 4). Prikazane so aritmetične sredine (krog) in interval zaupanja ( $\perp$ ). V okvirčkih so prikazani rezultati t-testa, ki so statistično pomembni, rdeče so obarvani rezultati, ki so pomembni za naše primerjave.

Statistična obdelava z ANOVO nam je pokazala, da za agregacijo z arahidonsko kislino obstajajo statistično pomembne razlike med posameznimi meritvami, saj je bila P vrednost nižja od 0,05 in sicer  $P=0,0008$ , zato smo izvedli post hoc analizo s t-testom.

Ugotovili smo, da je za agregacijo trombocitov z arahidonsko kislino pomemben vpliv prilagoditve PRP (primerjava 3/4) in vpliv shranjevanja vzorca (primerjava 5/6 in 6/7) (slika 7).



Slika 7: Agregacija trombocitov z arahidonsko kislino (v %) za posamezne meritve (shema meritev prikazana v sliki 4). Prikazane so aritmetične sredine (krog) in interval zaupanja ( $\perp$ ). V okvirčkih so prikazani rezultati t-testa, ki so statistično pomembni, rdeče so obarvani rezultati, ki so pomembni za naše primerjave.

Z analizo smo ugotovili, da je za metodo agregacije trombocitov pomemben vpliv prilagoditve PRP (primerjava 3/4) za vse tri agoniste, ki smo jih uporabili. Pomemben je tudi vpliv shranjevanja vzorca (primerjava 5/6 in 6/7) za izvedbo metode agregacije trombocitov z ADP in arahidonsko kislino. Z ADP je potrebno izvesti analizo najkasneje 2 uri po odvzemu krvi, medtem ko je za arahidonsko kislino analizo potrebno izvesti najkasneje po pol ure.

V naši raziskavi smo kri odvzeli 10 ženskam in 10 moškim. Stari so bili od 20-50 let, njihova povprečna starost je bila 32 let. Ugotovili smo, da niti spol niti starost nista statistično pomembno vplivala na agregacijo trombocitov (rezultati niso prikazani).

Primerjali smo tudi povezavo med številom trombocitov v PRP, prilagojenim PRP in PPP ter agregacijo trombocitov izzvano s kolagenom, ADP in arahidonsko kislino.

Preglednica XII: Povezava med številom trombocitov v PRP (PRP), prilagojenim PRP (PRP-P) in PPP (PPP) ter agregacijo izzvano s kolagenom (shema meritev prikazana v sliki 4). Rdeče so natisnjeni statistično pomembno visoki ( $P < 0,05$ ) korelacijski koeficienti.

	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	5. meritev	6. meritev	7. meritev
PRP 1	0,16	0,04	0,15	0,20	0,12	0,20	0,41
PRP-P 1	0,10	-0,16	-0,31	-0,36	-0,13	-0,11	0,11
PPP 1	-0,10	-0,10	0,19	0,25	-0,18	-0,03	0,33
PRP 3	0,34	0,08	0,12	0,17	0,28	0,26	0,36
PRP-P 3	0,23	0,16	-0,13	-0,22	0,14	0,12	0,13
PPP 3	-0,41	-0,38	-0,55	-0,56	-0,61	-0,45	-0,21
PRP 5	0,34	0,10	-0,00	0,01	-0,07	-0,05	0,12
PRP-P 5	-0,25	-0,31	0,09	0,10	-0,36	-0,08	0,14
PPP 5	-0,23	-0,08	-0,21	-0,14	-0,18	-0,12	-0,24

Preglednica XIII: Povezava med številom trombocitov v PRP (PRP), prilagojenim PRP (PRP-P) in PPP (PPP) ter agregacijo izzvano z ADP (shema meritev prikazana v sliki 4). Rdeče so natisnjeni statistično pomembno visoki ( $P < 0,05$ ) korelacijski koeficienti.

	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	5. meritev	6. meritev	7. meritev
PRP 1	0,31	0,09	0,28	0,27	0,34	0,26	0,22
PRP-P 1	0,10	-0,06	-0,00	0,07	0,07	0,00	0,02
PPP 1	0,32	0,26	0,20	0,20	0,20	0,22	0,26
PRP 3	0,20	-0,00	0,21	0,26	0,22	0,12	0,06
PRP-P 3	-0,08	-0,18	-0,07	0,01	-0,08	-0,19	-0,20
PPP 3	-0,32	-0,29	-0,46	-0,41	-0,19	-0,24	-0,10
PRP 5	0,10	-0,10	0,06	0,08	0,07	-0,07	0,03
PRP-P 5	-0,02	-0,08	0,06	0,12	0,15	0,05	0,18
PPP 5	-0,55	-0,29	-0,65	-0,64	-0,57	-0,41	-0,45

Preglednica XIV: Povezava med številom trombocitov v PRP (PRP), prilagojenim PRP (PRP-P) in PPP (PPP) ter agregacijo izzvano z arahidonsko kislino (shema meritev prikazana v sliki 4). Rdeče so natisnjeni statistično pomembno visoki ( $P < 0,05$ ) korelacijski koeficienti.

	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	5. meritev	6. meritev	7. meritev
PRP 1	0,35	-0,03	0,16	0,25	0,32	0,28	0,08
PRP-P 1	0,09	-0,04	-0,23	-0,18	0,06	0,07	0,04
PPP 1	0,20	0,18	0,20	0,10	0,14	0,09	0,27
PRP 3	0,35	-0,02	0,11	0,26	0,22	0,19	-0,05
PRP-P 3	0,34	-0,13	-0,10	0,06	0,31	0,29	0,01
PPP 3	-0,34	-0,04	-0,45	-0,45	0,02	0,09	0,21
PRP 5	0,42	0,09	-0,06	0,06	0,16	0,10	-0,18
PRP-P 5	-0,10	0,02	0,11	0,09	0,28	0,25	0,31
PPP 5	-0,45	-0,06	-0,37	-0,47	-0,31	-0,25	-0,18

Z analizo nismo uspeli najti korelacij med številom trombocitov v PRP, prilagojeni PRP in PPP ter agregacijo izzvano s kolagenom, ADP in arahidonsko kislino, kar je razvidno iz preglednic XII, XIII in XIV.

Kot je razvidno iz rezultatov, so povezave samo navidezne. Našli smo samo povezave v številu trombocitov v PPP, kar pa ni pomembno za naše meritve.

## 5 RAZPRAVA

Za vsako laboratorijsko metodo je pomembno, da je standardizirana. Standardizirana metoda nam da rezultate, ki jih lahko med seboj primerjamo, tudi če so analize izvedene v različnih laboratorijih. Metoda agregacije trombocitov ni standardizirana, zato rezultati analiz, ki jih dobimo v enem laboratoriju, niso primerljivi z drugimi laboratoriji. Ker je metoda agregacije trombocitov še vedno najpogostejša metoda za spremljanje protitrombocitnih zdravil, je standardizacija metode zelo pomembna, saj bi omogočila primerjavo med različnimi laboratoriji in raziskavami in tako omogočila natančnejša priporočila glede trombocitnega zdravljenja. Poleg različnih analitskih dejavnikov vplivajo na rezultate tudi predanalitski dejavniki, kot so na primer prilagajanje števila trombocitov v PRP z avtologno plazmo ali pufrom (ali se prilagajajo ali ne do števila  $250 \pm 10\% \times 10^9$  trombocitov/L), časovna izvedba analize, vpliv dnevnega ritma, vpliv zajtrka oz. hrane, vpliv redne vadbe, vpliv starosti in spola, način odvzema krvi in vpliv kratke stabilizacije vzorca pred analizo. Zato je bil naš namen raziskati nekaj predanalitskih dejavnikov (vpliv kratke stabilizacije vzorca, vpliv dnevnega ritma, prilagoditve števila trombocitov v PRP, vpliv zajtrka ter vpliv shranjevanja vzorca) na rezultate agregacije trombocitov.

Pri merjenju agregacije trombocitov se pogosto uporablja kratka stabilizacija vzorca, ker je bilo ugotovljeno, da takoj po odvzemu krvi trombociti slabše agregirajo kot po 30 do 45 minutah (5). V naši raziskavi smo želeli potrditi vpliv kratke stabilizacije vzorca na agregacijo trombocitov in smo zato vzorce analizirali takoj po pripravi PRP, oziroma smo vzorce pustili, da so se stabilizirali 30 minut pri sobni temperaturi. Ugotovili smo, da ni statistično pomembne razlike v rezultatih z uporabo vseh treh agonistov, če analizo izvedemo takoj ali po pol ure (slika 5, 6 in 7).

Z nalogo smo prav tako želeli ugotoviti, če na agregacijo trombocitov vpliva dnevni ritem agregacije trombocitov, torej če so rezultati agregacije opravljene v jutranjih urah drugačni od tistih, opravljenih okoli poldneva. Razlike v koncentracijah fizioloških agonistov, kot so

serotonin, ADP, tromboksan A<sub>2</sub> in nukleotidi adenina, bi lahko namreč imele zaradi dnevnega ritma vpliv na aktivacijo trombocitov in posledično na nastajanje strdkov (23). V eni izmed objavljenih raziskav (24) smo zasledili, da je agregacija trombocitov s kolagenom in ADP-jem odvisna od dnevnega ritma, saj so z raziskavo potrdili pomembne razlike med jutranjim in popoldanskim odvzemom. V nasprotju s temi rezultati z našo raziskavo nismo uspeli dokazati vpliva dnevnega ritma na agregacijo trombocitov (slika 5, 6 in 7). Tudi Wiiliam in sodelavci niso uspeli dokazati vpliva odvzemov ob različnih urah dneva na agregacijo trombocitov (24).

Glede prilagoditve števila trombocitov v PRP pred merjenjem agregacije trombocitov ni enotnega mnenja (5,25). Ker je absolutna stopnja agregacije v neprilagojeni PRP odvisna od števila trombocitov, prevladuje mnenje, da je treba število trombocitov v PRP prilagoditi. Maksimalna agregacija je za vse koncentracije ADP približno 8 - 10% višja v neprilagojeni PRP kot v prilagojeni PRP (26). Pri bolnikih, ki prejemajo antitrombocitna zdravila, kot sta acetilsalicilna kislina in klopidogetrel, se agregacija trombocitov bistveno razlikuje, če uporabimo prilagojeno oz. neprilagojeno PRP (26). Naša raziskava je pokazala, da na rezultate agregacije trombocitov z vsemi tremi agonisti (ADP, kolagen in arahidonska kislina) pomembno vpliva prilagoditev števila trombocitov v PRP (preglednica XIII, XIV, XV). V neprilagojeni PRP, v kateri je bilo število trombocitov v povprečju  $420 \times 10^9$  trombocitov/L, je bil odstotek agregacije trombocitov pomembno višji z vsemi tremi agonisti v primerjavi s prilagojeno PRP (število trombocitov okoli  $250 \times 10^9$  trombocitov/L). Ker pa nismo ugotovili povezave med številom trombocitov v PRP in maksimalno agregacijo, menimo, da, vsaj pri zdravih, število trombocitov ne vpliva na rezultat.

Nekateri avtorji menijo (16,17), da je prilagajanje števila trombocitov za vse tri agoniste (kolagen, ADP in arahidonsko kislino) nepotreben in zamuden proces, ki nima nobenih prednosti pred agregacijo izvedeno v prilagojeni PRP. Nekateri avtorji celo menijo (16,26), da vodi prilagajanje števila trombocitov v PRP pri spremljanju učinkov zdravil, kot sta acetilsalicilna kislina in klopidogetrel, do napačnih rezultatov, zato je bolje, da se uporablja

neprilagojena plazma za merjenje agregacije trombocitov tudi pri bolnikih s povišanim številom trombocitov.

Nekateri avtorji priporočajo (16), da pri bolnikih, ki prejemajo protitrombocitna zdravila in imajo povišano število trombocitov, agregacijo trombocitov merimo v neprilagojeni PRP, saj je odziv njihovih trombocitov na različne agoniste bolj točen v neprilagojeni plazmi. Bolniki s povišanim številom trombocitov namreč kažejo različne odzive na protitrombocitno zdravljenje (16).

V literaturi smo zasledili, da lahko funkcijo trombocitov primerjamo med različnimi bolniki tudi brez prilagajanja števila trombocitov v PRP in da ni bistvene razlike v vrednostih maksimalne agregacije (16). V literaturi smo prav tako zasledili (16), da je maksimalna hitrost agregacije nižja v prilagojeni PRP, ker postopek prilagajanja zniža število trombocitov v plazmi. Maksimalna agregacija je višja v neprilagojeni PRP kot v prilagojeni PRP zaradi višjega števila trombocitov. V prilagojeni PRP pa je agregacija trombocitov lahko navidezno višja, kar je lahko posledica povišanih vrednosti fizioloških agonistov v prilagojeni PRP, ki je razredčena s PPP. PPP namreč pripravimo s centrifugiranjem, pri katerem se lahko sprostijo fiziološki agonisti iz trombocitov (16). Eden izmed njih je ADP, ki je normalno prisoten v rdečih krvnih celicah in trombocitih in lahko zmanjša občutljivost receptorjev za ADP v PRP (18). Agregacijo trombocitov je zato bolje meriti v neprilagojeni PRP, saj je odziv trombocitov v neprilagojeni PRP bolj podoben odzivu trombocitov *in vivo* (16,17).

Kri, odvzeta na tešče, se jemlje kot standard pri merjenju hemostaze, vendar pa za agregacijo trombocitov ni znano, ali je odvzem krvi na tešče res potreben.

V naši raziskavi smo tako želeli ugotoviti, kako vpliva zajtrk na agregacijo trombocitov. Ugotovili smo, da ni statistično pomembnih razlik na agregacijo trombocitov z vsemi tremi agonisti, če preiskovanec pred analizo krvi poje lahek zajtrk s kavo ali čajem (slika 5, 6 in 7) ali ne.

Vpliv kave na agregacijo trombocitov ni razjasnjen. Tako so nekateri avtorji ugotovili povečano reaktivnost trombocitov (27), drugi pa zmanjšano aktivnost trombocitov (28,29).

V literaturi smo zasledili, da kajenje ne vpliva na agregacijo trombocitov (24).



Prejšnje raziskave so pokazale, da imata čas shranjevanja in temperatura vzorca velik vpliv na reaktivnost trombocitov. Z daljšim časom in višjo temperaturo shranjevanja se namreč reaktivnost trombocitov zmanjša. Priporočljivo je, da PRP shranimo pri sobni temperaturi in izvedemo analizo v dveh do štirih urah za agonista, kot sta ADP in kolagen (24).

Naša raziskava je pokazala podobno, in sicer, da je pomembna časovna izvedba analize za agonist ADP (analizo moramo izvesti najkasneje po dveh urah od odvzema, preglednica XIV) in za agonist arahidonsko kislino, pri kateri je pomembno, da analizo izvedemo najkasneje po pol ure od odvzema krvi (preglednica XV). Pri daljšem shranjevanju je namreč agregacija trombocitov pomembno nižja, kot če analizo izvedemo takoj. Po drugi strani pa smo ugotovili, da za kolagen shranjevanje plazme nima takega pomena, saj se agregacija trombocitov v plazmi, shranjeni štiri ure, ni pomembno razlikovala od agregacije, opravljene takoj. Podobno tem rezultatom smo v literaturi zasledili, da temperaturna in časovna odvisnost pri agregaciji trombocitov, izzvani s kolagenom, ni tako izrazita (5).

Na agregacijo trombocitov vplivajo tudi drugi dejavniki, ki pa jih v tej raziskavi nismo proučevali. Na primer, za standardizacijo metode je pomembno, pri kateri sili centrifugiramo vzorec krvi za pripravo PRP. Pri agregaciji po Bornu (5) je priporočena sila centrifugiranja 500 rcf. V naši raziskavi pa smo uporabili silo centrifugiranja 1000 rcf. V literaturi smo zasledili, da se pri višji centrifugalni sili od 500 rcf izgubijo večji trombociti za preiskavo (5), zato bi lahko za standardizacijo metode agregacije trombocitov raziskali tudi vpliv različnih centrifugalnih sil.

Za standardizacijo metode bi lahko preverili tudi, kako vpliva na agregacijo trombocitov velikost igle pri odvzemu krvi iz komolčne vene in če lahko uporabimo tako imenovan »metulj sistem«. V literaturi smo zasledili, da lahko različni odvzemi venske krvi vodijo do različnih odzivov trombocitov (30), hkrati pa, da različne tehnike odvzema krvi ne vplivajo na agregacijo trombocitov in da lahko uporabimo tako imenovani »metulj sistem« (26). V naši raziskavi smo vensko kri odvzeli iz komolčne vene z iglo 21 G, priporočilo pa je igla 12 G (5). Za agregacijo trombocitov naj bi se izogibali tako imenovanega »metulj sistema«, saj bi se trombociti lahko aktivirali v dolgih plastičnih ceveh tega sistema (30).

Ker je odvzem venske krvi z »metulj sistemom« primeren za majhne otroke in za odrasle s poškodovanimi venami, bi bilo smiselno preveriti, ali lahko uporabimo tudi ta sistem pri merjenju agregacije trombocitov (30).

V literaturi smo zasledili, da med ženskami in moškimi ni pomembnih razlik v agregaciji trombocitov z ADP, kolagenom in adrenalinom (31). Prav tako niso odkrili pomembnih razlik v agregaciji trombocitov med skupinami različnih starosti (31). Naša raziskava prav tako ni pokazala razlik med spoloma in povezave s starostjo. To pomeni, da ne potrebujemo posebnih referenčnih vrednosti za moške in ženske ter za mlajše in starejše osebe.

## 6 SKLEP

### Naše ugotovitve:

1. Na osnovi naših rezultatov ne moremo trditi, da na metodo agregacije trombocitov vpliva kratka stabilizacija vzorca, zato lahko analizo izvedemo takoj ali po pol ure od odvzema krvi.
2. Na osnovi naših rezultatov ne moremo trditi, da na metodo agregacije trombocitov vpliva dnevni ritem, zato lahko analizo izvedemo bodisi zjutraj bodisi opoldne.
3. Dokazali smo, da na metodo agregacije trombocitov vpliva prilagoditev števila trombocitov v PRP. Agregacija trombocitov v neprilagojeni PRP je višja za približno 10% od agregacije trombocitov v prilagojeni PRP. Agregacijo trombocitov je bolje meriti v neprilagojeni PRP, saj trombociti v neprilagojeni PRP bolj odražajo razmere »*in vivo*«.
4. Na osnovi naših rezultatov ne moremo trditi, da na metodo agregacije trombocitov vpliva zajtrk pred odvzemom krvi, zato lahko analizo izvedemo tudi, če je preiskovanec pred odvzemom krvi jedel.
5. Dokazali smo, da na metodo agregacije trombocitov vpliva shranjevanje vzorca. Analizo z ADP moramo izvesti najkasneje po dveh urah od odvzema krvi, analizo z arahidonsko kislino pa moramo izvesti najkasneje po pol ure od odvzema krvi.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je za metodo agregacije trombocitov pomemben vpliv prilagoditve števila trombocitov v PRP in vpliv shranjevanja vzorca. Na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo trditi, da predanalitski dejavniki, kot so vpliv kratke stabilizacije vzorca, vpliv dnevnega ritma in vpliv zajtrka, vplivajo na rezultate agregacije trombocitov.

Za standardizacijo metode bi lahko preverili še predanalitske dejavnike, kot so: vpliv kajenja in vpliv pitja kave oz. pravega čaja, vpliv različnih centrifugalnih sil, vpliv različnih velikosti igel pri odvzemu krvi iz komolčne vene in vpliv odvzema krvi s tako imenovanim »metulj sistemom« na agregacijo trombocitov.

## 7 LITERATURA

1. Stegnar M: Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami, Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, 2005
2. Lutze G in collaboration with Breyer J, Naumann Ch and Zawta B: Useful Facts about Coagulation Questions/Answers, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim 2000
3. Colman R, Hirsh J, Marder V, Salzman E: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practise. Third Edition, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994: 508-521
4. Rand ML, Leung R, Packham MA: Platelet function assays. *Transfusion and Apheresis Science* 28 (2003); 307-317
5. Breddin HK: Can platelet aggregometry be standardized?. *Platelets*, May/June 2005; 16(34): 151-158
6. Cattaneo M: Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1980-7
7. Buchanan MR, Schwartz L, Bourassa M, Brister SJ, Peniston CM: Results of the BRAT study-a pilot study investigating the possible significance of ASA nonresponsiveness on the benefits and risks of ASA on thrombosis in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Can J. Cardiol* 2000; 16: 1385-90
8. Catalano M, Belletti S, Russo U, Milanese F, and Libretti A: Influence of storage time on whole blood platelet aggregation. *Thrombosis Research* 1991 62; 103-108
9. Sweeney JD, Hoernig LA, Michnik A, and Fitzpatrick JE: Whole Blood Aggregometry. *AJCP*, 1989; 92, 5

10. Jilma B: Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med* 2001; 138: 152-63
11. Smith JW, Stenhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, Collier BS: Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method; *Circulation* 1999; 99: 620-5
12. Michelson AD, Furman MI: Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 342-8
13. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S.: Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105: 1650-5
14. Marcus E. McKenzie, Paul A. Gurbel, Douglas J. Levine, Victor L. Serebruany: Clinical Utility of Available Methods for Determining Platelet Function: Sinai Hospital of Baltimore, Baltimore, Md., USA; *Cardiology* 1999; 92:240-247
15. Yee DL, Sun CW, Bergeron AL, Dong J and Bray PF: Aggregometry detects platelet hyperreactivity in healthy individuals. *Blood* 2005 106: 2723-2729
16. Mani H, Luxembourg B, Kläffling C, Erbe M, Lindhoff-Last E: Use of native or platelet count adjusted platelet rich plasma for platelet aggregation measurements. *J Clin Pathol* 2005; 58: 747-750
17. Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S and Lindhoff-Last E: Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2008, 6: 677-683
18. Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F: Platelet aggregation studies: autologous platelet – poor plasma inhibits aggregation when added to platelet – rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* 2007; 92: 694-697

19. Hellstern P, Stürzebecher U, Wuchold B, Haubelt H, Seyfert UT, Bauer M, Vogt A and Stürzebecher J: Preservation of in vitro function of platelets stored in the presence of a synthetic dual inhibitor of factor Xa and thrombin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007, 5: 2119-2126
20. Nylander S, Johansson K, Van Giezen JJJ, & Lindahl TL: Evaluation of platelet function, a method comparison. *Platelets*, 2006; 17(1): 49-55
21. Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Haas NF, Taite BB, Szalony JA, Page JD, Feigen LP, Lansky DM and Salyers AK: Assessment of platelet function assays. *American Heart Journal*, 1998; 135: S170-S178
22. Michelson AD, Frelinger AD and Furman MI: Current Options in Platelet Function Testing. *The American Journal of Cardiology* 2006, 98: 4N-10N
23. Aldemir H and Kılıç N: The affect of time of day and exercise on platelet functions and platelet-neutrophil aggregates in healthy male subjects. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005, 280: 119-124
24. Silver WP, Keller MP, Teel R and Silver D: Effect of donor characteristic and platelet in vitro time and temperature on platelet aggregometry. *Journal of Vascular Surgery* 1993; 17:726-33
25. Gurbel PA, Tantry US: Clopidogrel resistance?. *Thromb Res* 2007; 120: 311-21
26. Van Der Stelt CAK, Van Werkum JW, Seesing TM, Ten Berg JM, & Hackeng CM: To adjust or not to adjust the platelet count in light transmission aggregometry in patients receiving dual aspirin/clopidogrel treatment. *Platelets* 2007; 18(7): 550-553
27. Ammataro V, Perricone C, Canazio A, Ripaldi M, Ruggiano A, Zuccarelli B, Monti M: Caffeine stimulates in vivo platelet reactivity. *Acta Med Scand* 1998; 224: 245-7

28. Bydlowski SP, Yunker RL, Rymaszewski Z, Subbiah MT: Coffee extracts inhibit platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Vitam Nutr Res* 1987; 57: 217-23
29. Everson SA, Lynch JW, Chesney MA, Kaplan GA, Goldberg DE, Shade SB, Cohen RD, Salonen, JT: Interaction of workspace demands and cardiovascular reactivity in progression of carotid atherosclerosis: population based study. *BMJ* 1997; 314: 553-8
30. Mani H, Kirchmayr K, Kläffling C, Schindewolf M, Luxembourg B, Linnemann B, Lindhoff-Last E: Influence of blood collection techniques on platelet function. *Platelets* (August 2004) 15(5), 315-318
31. Beyan C, Kaptan K, Ifran A, Savaşçı S, Öztürk Y, Ökmen B: Effect of sex difference on platelet aggregation using an optical method in healthy subjects. *Clin Lab Haem* 2006, 28, 14-1