

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BLANKA ULAGA

MAGISTRSKO DELO

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BLANKA ULAGA

**VPLIV RAZLIČNIH POGOJEV ZAMRZOVANJA PLAZME NA OSNOVNE
PREISKAVE HEMOSTAZE TER CELOKUPNI HEMOSTATSKI POTENCIAL**

**EFFECT OF DIFFERENT FREEZING CONDITIONS ON SCREENING
HEMOSTASIS TESTS AND OVERALL HEMOSTASIS POTENTIAL**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc. Raziskovalni del naloge sem izvedla v Laboratoriju za hemostazo in aterotrombozo Kliničnega oddelka za žilne bolezni, Univerzitetni klinični center Ljubljana, pod mentorstvom doc. dr. Mojce Božič Mijovski.

Zahvala

Na tem mestu se zahvaljujem vsem zaposlenim Laboratorija za hemostazo in aterotrombozo, ki so mi omogočili izvedbo praktičnega dela naloge. Še zlasti hvala dr. Petri Malovrh za vso strokovno pomoč, podporo in spodbudne besede ter doc. dr. Mojci Božič Mijovski za potrpežljivost, usmerjanje in uspešno vodenje na poti do cilja. Zahvaliti se moram tudi vsem prostovoljcem, ki so z darovanjem krvi pripomogli k oblikovanju skupine kontrolnih vzorcev v raziskavi. Nenazadnje najlepša hvala mentorici, prof. dr. Janji Marc, za objektivni in kritičen pogled na opravljeno delo.

Prav posebna zahvala gre moji družini za podporo in potrpežljivost v času študija ter vsem dobrim prijateljem, ki verjamejo vame tudi takrat, kadar sama pozabim.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Janje Marc in somentorice doc. dr. Mojce Božič Mijovski.

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj

Član komisije: doc. dr. Janez Mravljak

Blanka Ulaga

KAZALO VSEBINE

Kazalo vsebine	i
Kazalo slik.....	iii
Kazalo preglednic.....	iii
Kazalo grafov	iv
Kazalo enačb	iv
POVZETEK	v
ABSTRACT	vi
KLJUČNE BESEDE	vii
KEY WORDS	vii
SEZNAM OKRAJŠAV	viii
1 UVOD	1
1.1 HEMOSTAZA	1
1.2 LABORATORIJSKE PREISKAVE ZA OCENO HEMOSTAZE	3
1.2.1 Analiza protrombinskega časa.....	3
1.2.2 Analiza aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa	4
1.2.3 Analiza koncentracije D-dimera.....	5
1.2.4 Analiza celokupnega hemostatskega potenciala	6
1.3 VPLIV SHRANJEVANJA VZORCEV NA PREISKAVE HEMOSTAZE	8
1.3.1 Shranjevanje vzorcev na sobni temperaturi.....	9
1.3.2 Shranjevanje vzorcev z zamrzovanjem	10
1.3.3 Drugi vplivi pri zamrzovanju	12
2 NAMEN DELA.....	15
3 VZORCI IN LABORATORIJSKE PREISKAVE	16
3.1 VZORCI.....	16
3.1.1 Priprava in analiza vzorcev	16

3.1.2	Alikvotiranje in zamrzovanje vzorcev	18
3.1.3	Analiza vzorcev po zamrzovanju	19
3.2	LABORATORIJSKE PREISKAVE	20
3.2.1	Analiza protrombinskega časa.....	20
3.2.2	Analiza aktiviranega parcialnega trombolastinskega časa	20
3.2.3	Analiza koncentracije D-dimera.....	20
3.2.4	Analiza celokupnega hemostatskega potenciala	21
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	25
4	REZULTATI.....	28
4.1	REZULTATI IZBRANIH PREISKAV HEMOSTAZE V KONTROLNI SKUPINI	28
4.2	REZULTATI IZBRANIH PREISKAV HEMOSTAZE V SKUPINI BOLNIKOV	32
4.2.1	Vrednosti izven referenčnih območij	36
4.3	REZULTATI IZBRANIH PREISKAV HEMOSTAZE V PLAZMAH BREZ POSAMIČNIH FAKTORJEV KOAGULACIJE	39
5	RAZPRAVA	46
5.1	STABILNOST VZORCEV V KONTROLNI SKUPINI.....	47
5.2	STABILNOST VZORCEV V SKUPINI BOLNIKOV	51
5.2.1	Vrednosti izven referenčnih območij	55
5.3	STABILNOST PLAZEM BREZ POSAMIČNIH FAKTORJEV KOAGULACIJE	56
5.4	PREDLOGI ZA NADALJNJE RAZISKAVE.....	58
6	SKLEP.....	59
7	LITERATURA.....	60
8	VIRI SLIK.....	64
9	PRILOGE.....	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Hemostatsko ravnovesje v telesu	1
Slika 2: Koagulacijska kaskada z glavnimi udeleženiimi faktorji.....	2
Slika 3: Priprava alikvotov plazme za zamrzovanje pri različnih pogojih.....	19
Slika 4: Razporeditev vzorcev in meritev parametrov celokupnega hemostatskega potenciala na mikrotitrski ploščici	24

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Priporočen čas in temperatura za kratkoročno shranjevanju polne krvi ter krvne plazme za koagulacijske preiskave po priporočilih inštituta za klinične in laboratorijske standarde (CLSI)	9
Preglednica II: Priporočen čas in temperatura zamrzovanja krvne plazme za koagulacijske preiskave po priporočilih inštituta za klinične in laboratorijske standarde (CLSI)	11
Preglednica III: Število rezultatov izven referenčnega območja in število vseh rezultatov po enem (predzadnji stolpec) in po šestih tednih shranjevanja (zadnji stolpec) v skupini bolnikov	38
Preglednica IV: Rezultati osnovnih preiskav hemostaze pri kontrolni skupini.....	65
Preglednica V: Rezultati celokupnega hemostatskega potenciala pri kontrolni skupini.....	66
Preglednica VI: Rezultati osnovnih preiskav hemostaze pri bolnikih.....	67
Preglednica VII: Rezultati celokupnega hemostatskega potenciala pri bolnikih	68
Preglednica VIII: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F XII	69
Preglednica IX: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F XI	70
Preglednica X: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F X	71
Preglednica XI: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F IX	72
Preglednica XII: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F VIII	73
Preglednica XIII: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F VII	74
Preglednica XIV: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F V	75

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Prikaz celokupnega hemostatskega potenciala pri zdravem preiskovancu.....	7
Graf 2: Potek analize celokupnega hemostatskega potenciala v programu Excel	25
Graf 3: Osnovne preiskave hemostaze pri kontrolni skupini	29
Graf 4: Celokupni hemostatski potencial pri kontrolni skupini	31
Graf 5: Osnovne preiskave hemostaze pri bolnikih	33
Graf 6: Celokupni hemostatski potencial pri bolnikih	35
Graf 7: Aktivirani parcialni tromboplastinski čas plazem brez posamičnega faktorja koagulacije	40
Graf 8: Protrombinski čas plazem brez posamičnega faktorja koagulacije.....	41
Graf 9: Celokupni koagulacijski potencial plazem brez posamičnega faktorja koagulacije	43
Graf 10: Celokupni hemostatski potencial plazem brez posamičnega faktorja koagulacije	44
Graf 11: Celokupni fibrinolitični potencial plazem brez posamičnega faktorja koagulacije	45

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Izračun celokupnega fibrinolitičnega potenciala.....	6
--	---

POVZETEK

Shranjevanje vzorcev z zamrzovanjem je pogosto tako v rutinski laboratorijski praksi in raziskovalnih procesih kot tudi pri pripravi različnih referenčnih materialov. Na področju hemostaze so priporočila glede stabilnosti posameznih komponent hemostaze splošna in pomanjkljiva. Namen magistrskega dela je bil opredeliti vpliv časa shranjevanja (1 teden, 6 tednov), dveh najpogosteje uporabljenih temperatur shranjevanja (-20 °C in -70 °C) ter hipnega zamrzovanja pred shranjevanjem pri -70 °C na preiskave PČ, APTČ, D-dimer ter CHP, ki je novejša, občutljiva preiskava celotnega procesa koagulacije. S pomočjo deficitnih plazem smo želeli določiti tudi občutljivost ključnih faktorjev koagulacije na omenjene pogoje shranjevanja. Zbrali smo vzorce citratne krvne plazme 27 zdravih preiskovancev ter vzorce 233 naključnih bolnikov, sami pa smo pripravili razredčine plazem brez koagulacijskih faktorjev XII, XI, X, IX, VIII, VII in V. Vpliv shranjevanja smo preučevali z meritvijo navedenih preiskav v svežih vzorcih (z izjemo CHP) ter po enem in šestih tednih shranjevanja. Ne glede na pogoje shranjevanja so bili rezultati preiskav po zamrzovanju pomembno različni. APTČ se je s časom shranjevanja podaljševal, in sicer najbolj izrazito pri -20 °C. Pri bolnikih se je APTČ po shranjevanju pri -70 °C pomembno skrajšal kot posledica nevtralizacije heparina v plazemskih vzorcih. PČ je bil v času do 6 tednov najbolj pravilen po shranjevanju pri -20 °C, medtem ko je pri -70 °C očitno prišlo do aktivacije koagulacije in pomembno krajšega PČ. Kljub temu smo med prvim in šestim tednom pri -20 °C že opazili rahlo podaljšanje PČ. Koncentracija D-dimera se med zamrzovanjem večinoma ni pomembno spremenila. CKP in CHP sta pokazala postopno zniževanje koagulacijske sposobnosti plazme po shranjevanju pri -20 °C. Po 6-tedenskem shranjevanju pri -70 °C smo preko povišanega CHP sklepali na bodisi pospešeno koagulacijo bodisi zavrto fibrinolizo, kar bo potrebno še raziskati. S pomočjo deficitnih plazem smo vse naštetu podprli z dokazano najboljšo stabilnostjo koagulacijskih faktorjev po enem tednu shranjevanja pri -70 °C. Izstopala sta predvsem F V in F VIII, saj sta bila najbolj temperaturno labilna. Hipno zamrzovanje je pomembno izboljšalo zgolj stabilnost komponent notranje poti koagulacije po 6-ih tednih shranjevanja. Dodatno smo ugotovili, da referenčnih območij ne moremo uporabiti za opredelitev izmerjenih vrednosti po zamrzovanju, saj lahko pridemo do napačnih kliničnih odločitev. Dokazano pomemben vpliv zamrzovanja na rezultate preiskav hemostaze potrjuje, da daje analiza svežih vzorcev daleč najbolj točne in natančne zaključke.

ABSTRACT

In everyday laboratory practice, research work, preparation and storage of reference materials plasma samples are often kept frozen for later analysis. Current guidelines about stability of coagulation parameters are non-specific and inadequate. The aim of this Master's thesis was to define how storage time (1 week, 6 weeks), freezing temperature (-20 °C, -70 °C) and snap freezing before storage at -70 °C affect the results of common screening hemostasis tests (PT, aPTT, D-dimer) and OHP, which is a relatively new and sensitive method for overview of the coagulation process as whole. Additionally, we used deficit plasmas to determine which coagulation factors were the most labile in chosen conditions. In order to do this we collected 27 blood samples from healthy individuals and 233 samples from random patients. Diluted plasmas without seven essential coagulation factors (XII, XI, X, IX, VIII, VII, V) we prepared on our own with commercially available reagents of deficient plasmas and standard human plasma. We measured above stated coagulation parameters in fresh plasma samples (except OHP) and after 1 and 6 weeks of storage under different freezing conditions. Our findings revealed important effect of storage regardless of the freezing conditions. aPTT increased with time of storage, especially at -20 °C. In the patients group, where majority of them received heparin therapy, aPTT decreased during freezing at -70 °C because of heparin neutralization. PT results were more accurate at -20 °C, because at -70 °C obviously activated coagulation cascade decreased PT. Nevertheless PT increased significantly between first and sixth week at -20 °C. Concentration of D-dimer was mostly stable during storage. We recognized progressive reduction of plasma coagulation capacity at -20 °C through decreased OCP in OHP parameters. Between 1st and 6th week at -70 °C OHP increased significantly which was either result of accelerated coagulation or inhibited fibrinolysis. Further studies will be needed. Through analysis of deficient plasmas we confirmed all above listed findings. Coagulation factors were the most stable after first week of storage at -70 °C. F V and F VIII were confirmed as the most labile coagulation factors. Snap freezing before storage at -70 °C maintained significantly better activity of intrinsic coagulation components after 6 weeks of storage. Additionally we determined possibility of wrong clinical treatment when using reference values of fresh plasma samples when interpreting results of frozen-thawed samples. Since the effect of freezing seems to be significant, coagulation analysis remain most accurate and precise in fresh plasma samples.

KLJUČNE BESEDE

Protrombinski čas

Aktivirani parcialni tromboplastinski čas

D-dimer

Faktorji koagulacije

Referenčne vrednosti

KEY WORDS

Prothrombin time

Activated partial thromboplastin time

D-dimer

Coagulation factors

Reference range

SEZNAM OKRAJŠAV

ACD – raztopina citronske kisline, natrijevega citrata, dekstroze (*angl. anticoagulant citrate dextrose*)

ANOVA test – statistični test analize variance (*angl. analysis of variance*)

APTČ (*angl. aPTT*) – aktivirani parcialni tromboplastinski čas (*angl. activated partial thromboplastin time*)

AVK (*angl. VKA*) – zdravilne učinkovine, ki delujejo kot antagonisti vitamina K (*angl. vitamin K antagonists*)

CFP (*angl. OFP*) – celokupni fibrinolitični potencial (*angl. overall fibrinolytic potential*)

CHP (*angl. OHP*) – celokupni hemostatski potencial (*angl. overall hemostasis potential*)

CKP (*angl. OCP*) – celokupni koagulacijski potencial (*angl. overall coagulation potential*)

CLSI – inštitut za klinične in laboratorijske standarde (*angl. Clinical and laboratory standards institute*)

CPD – raztopina natrijevega citrata, citronske kisline, dekstroze, natrijevega fosfata (*angl. citrate phosphate dextrose*)

CPDA – raztopina natrijevega citrata, citronske kisline, dekstroze, natrijevega fosfata, adenina (*angl. citrate phosphate dextrose adenine*)

DIC – razsejana znotrajžilna koagulacija (*angl. disseminated intravascular coagulation*)

F – faktor koagulacije

g – gravitacijski pospešek

HMWK – kininogen z visoko molekulsko maso (*angl. high molecular weight kininogen*)

INR – mednarodno umerjeno razmerje (*angl. International normalized ratio*)

ISI – mednarodni kazalec občutljivosti tromboplastinskega reagenta (*angl. International sensitivity index*)

LIS – laboratorijski informacijski sistem

NIH – mednarodne enote za koncentracijo trombina

NZP – normalna zmesna plazma

p – statistična stopnja verjetnosti

PČ (*angl. PT*) – protrombinski čas (*angl. prothrombin time*)

PK – prekalikrein (*angl. prekallikrein*)

s – sekunda

SHP – standardna humana plazma (*angl. standard human plasma*)

ST – sobna temperatura

TD – tekoči dušik

TF – tkivni faktor (*angl. tissue factor*)

t-PA – tkivni aktivator plazminogena (*angl. tissue plasminogen activator*)

vWf – von Willebrandov faktor (*angl. von Willebrand factor*)

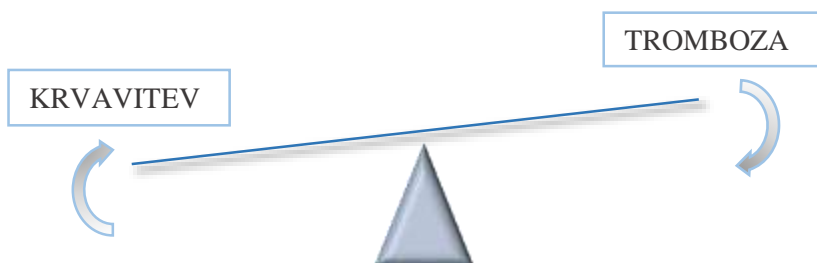
1 UVOD

1.1 HEMOSTAZA

S pojmom hemostaza označujemo skupek procesov in interakcij, ki normalno stečejo ob poškodbi žilne stene. V prvi fazi je pomembno, da se krvavitev učinkovito, torej hitro in popolnoma, ustavi. Za čim manjšo izgubo krvi po poškodbi poskrbi koagulacija. Sestavni del hemostaze pa so tudi procesi, ki omogočijo ponovno normalno prehodnost v prej poškodovani žili. Skupek dogajanj, ki omogočijo rekanalizacijo žile, imenujemo fibrinoliza. V vseh procesih hemostaze sodeluje zajetno število komponent krvi, pa tudi komponent tkiva:

- trombociti
- gladke mišice v žilni steni
- endotelijske celice žilne stene
- celice in komponente subendotelija (npr. kolagen)
- koagulacijske beljakovine in njihovi zaviralci
- fibrinolitične beljakovine in njihovi zaviralci (1, 2).

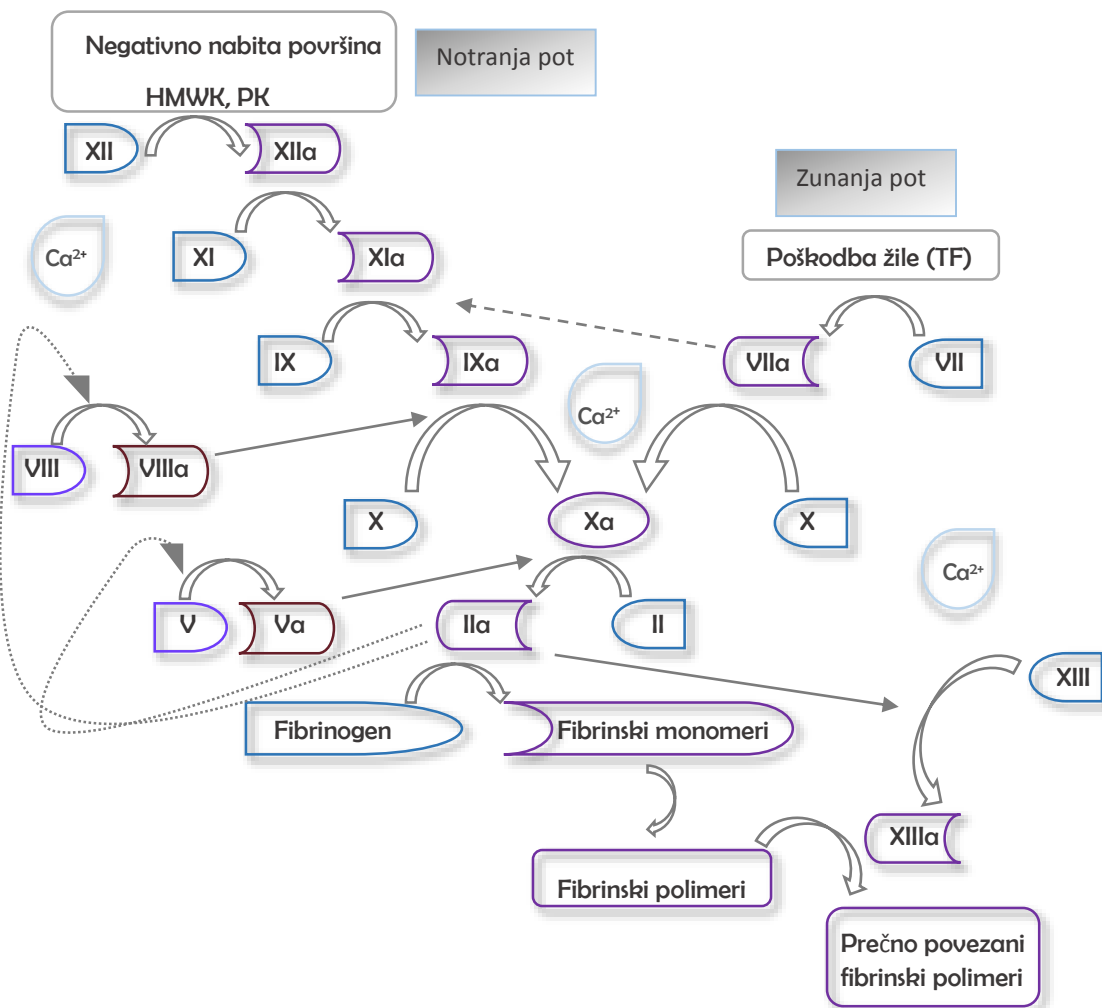
Ključnega pomena je med seboj usklajeno delovanje sestavin hemostaze. Pretirana ali pomanjkljiva količina ali delovanje katere izmed komponent koagulacije ali fibrinolize lahko vodi v motnje v strjevanju krvi, kar pogosto ponazorimo s tehtnico (1, 2, 3).



Slika 1: Hemostatsko ravnovesje v telesu

Hemostatski procesi so med seboj sicer zelo prepleteni, vendar jih zaradi lažjega razumevanja razdelimo na posamezne večje dele celote. V osnovi ločimo primarno in sekundarno hemostazo. Primarno hemostazo sestavljajo trombociti ter komponente endotelija in subendotelija, ki omogočijo nastanek trombocitnega čepa. Za popolno ustavitev krvavitve morajo komponente

sekundarne hemostaze (koagulacijski in fibrinolitični faktorji ter zaviralci) poskrbeti za nastanek trdnega fibrinskega strdka. Sekundarno hemostazo predstavljajo kaskadne reakcije med omenjenimi faktorji. Razdelimo jih na notranjo (intrinzično) in zunanjo (ekstrinzično) pot koagulacije, ki imata zadnji del skupen – skupna pot koagulacije. Kljub temu, da notranjo in zunanjo pot koagulacije v laboratoriju preiskujemo ločeno, klinična opazovanja kažejo na njuno prepletenost »*in vivo*« (1, 2, 3).



Slika 2: Koagulacijska kaskada z glavnimi udeleženiimi faktorji

Preplet notranje in zunanje poti dobro pojasni naslednja teorija. Reakcije koagulacije normalno potekajo vedno lokalno, na fosfolipidni površini, ter ob prisotnosti kalcijevih ionov. Po poškodbi krvne žile pride kri v stik s tkivnim faktorjem, ki aktivira F VII. Ta v večji meri neposredno

aktivira F X, v manjši meri pa aktivira F IX. Tako se koagulacija prične po zunanji poti, ki nato posredno aktivira notranjo pot (Slika 2). Koagulacijska kaskada, ki omogoči nastanek fibrinskega strdka, torej deloma poteka po obeh poteh hkrati (1, 3).

Takoj po poškodbi krvne žile se aktivira tudi proces fibrinolize, ki pa učinke svojega delovanja bolj intenzivno pokaže po tem, ko je strdek že opravil svojo nalogo. Glavna aktivna komponenta fibrinolize je plazmin, ki raztopi fibrinski strdek (1, 2).

Rezultat vseh omenjenih procesov je s strdkom ustavljena krvavitev, obnovljena žilna stena, raztopljen fibrinski strdek in nemoten tok krvi skozi (prej poškodovano) žilo (1, 2, 3).

Hemostatsko ravnovesje v telesu ocenjujemo s pomočjo zelo različnih laboratorijskih preiskav. Napredek na področju merilnih principov in naprav nam danes omogoča natančno meritev koncentracije ali aktivnosti skoraj katerekoli komponente hemostaze. S presejalnimi preiskavami ugotavljamo prisotnost koagulopatij (dednih ali pridobljenih motenj v koagulaciji), nadalje pa lahko z bolj specifičnimi, modificiranimi preiskavami oziroma njihovo kombinacijo motnje tudi natančno diagnosticiramo. Veliko zdravil, tako antikoagulacijskih kot tistih, s katerimi nadomeščamo pomanjkljive faktorje koagulacije, zahteva stalno spremljanje hemostatskega ravnovesja v telesu (1, 2).

1.2 LABORATORIJSKE PREISKAVE ZA OCENO HEMOSTAZE

1.2.1 Analiza protrombinskega časa

Protrombinski čas (PČ) nam omogoča analizo zunanje in skupne poti koagulacije. Pri poškodbi krvne žile pride kri v stik s transmembransko beljakovino tkivnega faktorja (TF), ki je močno izražena predvsem v zunanji plasti žilne stene (*Adventicia*). Pri tem se na fosfolipidni površini aktivira F VII. V kaskadni reakciji se s pomočjo kalcijevih ionov v zaporedju aktivirajo faktorji skupne poti koagulacije. V »*in vitro*«*»* pogojih posnemamo dogajanje tako, da krvni plazmi dodamo omenjene ključne komponente. Merimo čas do nastanka strdka, to pomeni čas do nastanka prvih agregiranih fibrinskih monomerov (1, 2, 4, 5).

Primarni rezultat analize je čas v sekundah, ki pa ga je potrebno standardizirati. Časovna skala pri podajanju rezultatov v klinični praksi ni ustrezna, ker je odvisna od uporabljenega

tromboplastinskega reagenta in analizatorja. Standardizacija pripomore k boljši ponovljivosti in medlaboratorijski primerljivosti rezultatov (1, 2). Imamo tri možne načine podajanja rezultatov:

- PČ preiskovanca podamo kot odstotek vrednosti PČ normalne zmesne plazme

Relativno vrednost PČ za vzorec dobimo s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo pripravimo s kalibracijskimi plazmami in je shranjena v z analizatorjem povezanim računalniškim sistemom. Izračun izvede sistem sam na podlagi izmerjenega časa do koagulacije.

- razmerje $R = \frac{P\check{C} \text{ preiskovanca [s]}}{\text{Srednji referenčni P}\check{C} \text{ zdravih preiskovancev [s]}}$
- mednarodno umerjeno razmerje INR (*angl. International normalized ratio*)

$$INR = R^{ISI}$$

Rezultate podajamo v obliki INR samo za spremljanje zdravljenja z antagonisti vitamina K (AVK) – kumarini. Večina analizatorjev tudi vrednost INR izračuna samodejno (2, 6).

Izolirano podaljšanje časa do koagulacije po zunanji poti je specifično za pomanjkanje F VII. PČ se vsakodnevno uporablja za spremljanje zdravljenja z AVK in oceno jetrne funkcije, pa tudi za opredelitev hemostatskega ravnotežja pred operacijami. Podaljšan čas lahko kaže na pomanjkanje vitamina K (1, 2, 6).

1.2.2 Analiza aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa

Preko meritve aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) analiziramo notranjo in skupno pot koagulacije. V telesu pride ob stiku z negativno nabito površino, ki je navadno kolagen iz subendotelija, do prepleta reakcij med beljakovinami prekalikreina, kininogena in F XII. Za potek reakcij, ki se odvijajo na fosfolipidni površini, je že v začetku potreben kalcij. Pri tem nastane aktivni F XII (F XIIa), ki sproži notranjo pot koagulacije. V »*in vitro*« pogojih kontaktno aktivacijo omenjenih komponent ustvarimo sami. Posledica aktivacije in poteka koagulacijske kaskade je krvni strdek. Rezultat analize podamo v sekundah (2, 4, 5).

Meritev APTČ opravimo ob sumu na pomanjkljivost katerega izmed faktorjev koagulacije po notranji poti, pomanjkljivost von Willebrandovega faktorja (vWf) (von Willebrandova bolezen), pri sumu na hemofilijo A, ugotavljamo prisotnost lupusnih antikoagulantov ter

spremljamo zdravljenje z nefrakcioniranim heparinom (1, 2, 4, 6). Meritev APTČ je preiskava z večjo občutljivostjo, zato lahko z njo odkrijemo tudi blažjo pomanjkljivost katerega izmed faktorjev ter tudi pomanjkljivosti, ki nimajo klinične slike (pomanjkljivost F XII, prekalikreina, kininogen). Iz tega razloga je tudi priporočena preiskava za odkrivanje motenj v koagulaciji pred kirurškimi posegi (2, 5, 6).

1.2.3 Analiza koncentracije D-dimera

Pri procesu fibrinolize aktivna molekula plazmin razcepi premrežen fibrinski strdek v manjše, topne fragmente. Cepitev vezi je naključna, zato nastanejo fragmenti različne velikosti in sestave, vsi pa vsebujejo za premreženi fibrin značilni D-dimer. Slednjega plazmin zaradi kovalentne vezi med podenotama ne more cepiti (1, 2, 3).

Meritev D-dimera ne sodi med klasične koagulacijske preiskave, saj je metoda meritve imunska. Specifična monoklonska protitelesa se vežejo na epitop D-dimera in ustvarijo imunske komplekse. Njihov nastanek in koncentracijo lahko merimo na mnogo različnih načinov. Najpogosteje uporabljena metoda je lateksna aglutinacija z optičnim načinom detekcije (turbidimetrija, nefelometrija) (2, 4).

Omejitev uporabe D-dimera v klinični praksi je predvsem njegova slaba diagnostična specifičnost – povišano koncentracijo D-dimera v krvi vedno izmerimo po razgradnji premreženega fibrina, pri tem pa ni razlik glede na obseg (lokalno, sistemsko) ali bolezenski proces, ki je primarno povzročil nastanek strdka. D-dimer je zvišan tudi pri ne-trombotičnih dogodkih, na primer pri celjenju rane, sepsi, ledvični bolezni, malignih bolezenskih procesih v telesu (1, 2, 3, 6). Zaradi svoje visoke negativne napovedne vrednosti ima večjo uporabnost pri izključitvi določenih bolezenskih stanj. Normalna koncentracija D-dimera lahko, kljub izrazitim in značilnim kliničnim znakom, skoraj zagotovo ovrže sum na vensko trombozo ali pljučno embolijo. Poleg tega je meritev D-dimera klinično uporabna pri spremljanju kroničnih bolezni, kjer je fibrinoliza povečana (npr. kronična razsejana znotrajžilna koagulacija (DIC), tumorji) ter za nadzor trombolitičnega zdravljenja (1, 2, 6).

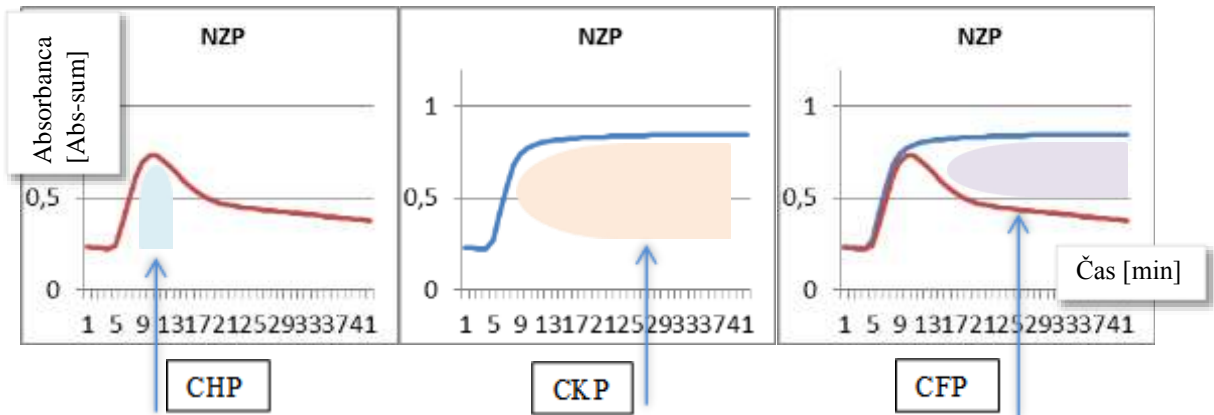
1.2.4 Analiza celokupnega hemostatskega potenciala

Že nekaj časa je na področju hemostaze težnja po uvedbi preiskave, s katero bi lahko z visoko specifičnostjo in občutljivostjo odkrili motnjo v katerikoli komponenti ali procesu hemostaze. Idealno bi tudi bilo, da bi bil rezultat take preiskave skladen s kliničnim izidom. S tem bi zmanjšali ceno in število potrebnih preiskav do postavitve diagnoze (7). Analiza celokupnega hemostatskega potenciala v plazmi (CHP) je potencialni kandidat za tako preiskavo, saj nam omogoči splošen vpogled v celoten sistem koagulacije, fibrinolize ter njuno medsebojno usklajevanje. Ker pa ne moremo natančno locirati motnje, je specifičnost metode slaba (8, 9).

Metodo CHP je prvotno opisala He s sod., nato pa so sledile še modifikacije. V osnovi analiza CHP sestoji iz meritve dveh osnovnih parametrov: celokupnega koagulacijskega potenciala (CKP) in celokupnega hemostatskega potenciala (CHP), na njuni osnovi pa izračunamo še celokupni fibrinolitični potencial (CFP). Če uvedemo dodatne merjene parametre se občutljivost metode poveča (8, 9, 10). Preiskavo izvedemo na mikrotitrski ploščici v več paralelkah vzorca. Nastanek fibrina izmerimo po dodatku trombina in kalcijevega klorida vzorcu citratne plazme (meritev CKP), nastanek in razgradnjo fibrina pa po dodatku trombina, kalcijevega klorida in tkivnega aktivatorja plazminogena (t-PA) (meritev CHP). Vzorcju dodamo zgolj majhno količino trombina, ki preko pozitivne povratne zanke aktivira procese koagulacije, ne katalizira pa neposrednega nastanka fibrina. Pretvorba fibrinogena v fibrin je tako rezultat predvsem »*in vitro*« nastalega trombina. t-PA katalizira pretvorbo beljakovine plazminogen v plazmin, ki razgradi nastali fibrin. Detekcija dinamike nastanka in razgradnje fibrina je spektrofotometrična pri valovni dolžini (λ) 405 nm. Spektrofotometer med analizo, ki traja 40 minut, odčita absorbanco vsako minuto. Vsaka izmerjena absorbanca je odsev količine fibrina v vzorcju »*in vitro*« v trenutku meritve. Na podlagi meritev se preko programske opreme izvršijo izračuni in izrišejo grafi absorbanca(čas). CKP in CHP za posamezen vzorec predstavljata površini pod »fibrinsko« krivuljo, CFP pa je razlika med površinama (8, 10).

$$CFP = \frac{(CKP - CHP)}{CKP} \times 100$$

Enačba 1: Izračun celokupnega fibrinolitičnega potenciala



Graf 1: Prikaz celokupnega hemostatskega potenciala pri zdravem preiskovancu

Vsota absorbanc oziroma površina pod krivuljo nam poda splošno informacijo o tvorbi in lizi fibrina po aktivaciji koagulacijske kaskade »*in vitro*«, prav tako pa odseva končno sliko združenih učinkov aktivnosti koagulacije ter fibrinolize »*in vivo*« (8, 10).

Še vedno potekajo študije, ki vrednotijo klinično uporabnost metode CHP v rutini. Za zdaj se uporabnost kaže na področju ugotavljanja

- klinično izražene hiperkoagulabilnosti (npr. pri nosečnosti, preeklampsiji, nekaterih oblikah trombofilije, koronarnih boleznih srca, infarktu, diabetesu, operativnih posegih na žilah),
- klinično izraženi hipokoagulabilnosti (hemofilija A in B, von Willebrandova bolezen) (8, 11, 12),
- oceni tveganja za trombozo ali krvavitev pri posameznikih s kombinacijo genetskih motenj (13),
- spremljanje zdravljenja (antikoagulacijskega (aspirin, heparin), nadomeščanje faktorjev koagulacije pri hemofiliji) (8, 11, 12).

1.3 VPLIV SHRANJEVANJA VZORCEV NA PREISKAVE HEMOSTAZE

Rezultat laboratorijske analize je lahko pravilen in natančen samo takrat in v takšni meri, ko analiziramo kakovosten biološki vzorec. Predanalitska faza tudi na področju koagulacijskih analiz doprinese velik delež k celokupni laboratorijski napaki. Neustrezno ravnanje z vzorcem na katerikoli stopnji od odvzema do analize ima lahko za posledico napačno izmerjene parametre ter neustrezno obravnavo preiskovanca (2, 14, 15, 16).

Stabilnost komponent in parametrov hemostaze pri različnih pogojih shranjevanja je bilo potrebno opredeliti iz več razlogov. Vzorce pogosto shranjujemo za testiranje v seriji, ker s tem pridobimo na času, pogosto pa je razlog tudi ekonomski – stroške reagentov, kalibratorjev in kontrol želimo čim bolj znižati. Natančne smernice glede optimalnih pogojev shranjevanja zahtevajo oddaljene klinike, kjer lahko že sam transport do laboratorija vzame več kot štiri ure časa (15, 16, 17). Zamrzovanje je pogosto tudi, kadar vzorce pošljamo v referenčne laboratorije za natančno vrednotenje, pri vzorcih, ki jih vključimo v raziskave in kontrolnih ter drugih referenčnih materialih (14, 18).

Odložena analiza vzorca pri koagulacijskih preiskavah je lahko povezana z:

- daljšim časom do nastanka strdka zaradi poškodbe ali razgradnje katerega od koagulacijskih faktorjev ali
- pa je čas koagulacije glede na pričakovanja krajši, kot posledica razgradnje in sproščanja vsebine celic (1, 19).

Pogoji zamrzovanja (način, temperatura, čas) bolj vplivajo na nekatere, bolj občutljive koagulacijske faktorje – njihova stabilnost in aktivnost sta navadno neposredno povezani s pogoji shranjevanja, medtem ko so drugi relativno stabilni. Posledično je učinek zamrzovanja seveda bolj viden na rezultatih analiz, ki vključujejo občutljivejše faktorje (2, 18).

Za zagotavljanje točnih in natančnih rezultatov se držimo priporočil, ki navajajo stabilnost vzorca na sobni temperaturi oziroma se odločimo za zamrzovanje citratne plazme, če analiza v priporočenem časovnem okvirju ne bo mogoča. Priporočila dopuščajo možnost, da posamezen

laboratorij uporabi drugačne pogoje shranjevanja, če so njihovo primernost v laboratoriju podrobno raziskali in validirali (14, 15).

1.3.1 Shranjevanje vzorcev na sobni temperaturi

Vzorca citratne krvne plazme ne zamrzujemo, če bomo analizo lahko opravili v priporočenem časovnem intervalu. Dopusten čas med odvzemom vzorca in njegovo analizo je odvisen od vrste preiskave ter temperature med transportom in shranjevanjem do analize. Vzorec venske krvi za koagulacijske preiskave naj bi v splošnem prišel v laboratorij v pokončnem položaju, na sobni temperaturi ter v eni uri po odvzemu. Vzorec je stabilen kot polna krvi z natrijevim citratom ali s centrifugiranjem ločena polna kri v primarni epruveti ali v drug vsebnik ločena citratna plazma. S čimprejšnjim centrifugiranjem polne krvi se bolje ohrani integriteta vzorca za nekatere preiskave, ločitev plazme v drug vsebnik pa je potrebna predvsem v primeru odložene analize in kadar pričakujemo mehanske tresljaje na vzorec (npr. med transportom). Vzorce vedno hranimo v zaprtih epruvetah (14, 15, 16, 20).

Preglednica I: Priporočen čas in temperatura za kratkoročno shranjevanju polne krvi ter krvne plazme za koagulacijske preiskave po priporočilih inštituta za klinične in laboratorijske standarde (CLSI)

Preiskava	Pogoj shranjevanja			
	Polna kri		Alikvot plazme	
	ST*	2-8 °C	ST	2-8 °C
PČ	24 ur	Ni dovoljeno	24 ur	Ni dovoljeno
APTČ	4 h	Ni podatka	4 h	4 h
APTČ (nefrakcionirani heparin)	1 h	Ni podatka	4 h	4 h
Aktivnost F VIII in vWF	4 h	Ni dovoljeno	4 h	4 h
Ostale preiskave (aktivnost preostalih F, Protein C ipd.)	4 h	Ni podatka	4 h	4h

* ST: Sobna temperatura

Shranjevanje vzorca v hladilniku ali na ledu za nobeno od preiskav ni priporočeno. Kadar vzorci vsebujejo nefrakcionirani heparin, mora biti analiza APTČ čimprejšnja – vzorce centrifugiramo v prvi uri po odvzemu, analiziramo pa lahko v času 4 ur po odvzemu (2, 14-16, 21-23). Analiza sicer zelo dobro stabilnega D-dimera je potrebna v 24 urah po odvzemu vzorca, ki ga hranimo na sobni temperaturi (24-28). Glede na rezultate raziskav imajo poleg PČ tudi mnogi drugi analiti in parametri dokazano boljše oziroma daljšo stabilnost od priporočenih 4 ur, vendar so priporočila splošna in zato prilagojena glede na bolj občutljive analite (14, 15, 19, 22, 26, 28, 29).

1.3.2 Shranjevanje vzorcev z zamrzovanjem

Če bo do analize preteklo več časa, kot smernice za posamezno preiskavo še priporočajo, se odločimo za zamrzovanje citratne krvne plazme revne s trombociti (2, 14-16). Vzorec čimprej po odvzemu centrifugiramo in plazmo ločimo od stolpca krvnih celic v majhen, za zamrzovanje in koagulacijske analize primeren vsebnik. Pri tem pazimo, da kakorkoli ne zmotimo integritete celičnega stolpca, saj bi s tem vzorec plazme lahko kontaminirali s celicami. Plazme pred zamrzovanjem ne filtriramo, ker s tem lahko odstranimo tudi nekatere koagulacijske faktorje ter s tem vplivamo na rezultate koagulacijskih preiskav (14-16). Priporočila pravijo, da lahko citratno plazmo hranimo do 2 tedna pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ali nižji temperaturi, za daljše obdobje shranjevanja pa izberemo temperaturo pod $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (14). Najdaljšega časovnega intervala zamrzovanja, ki pri tej temperaturi še zagotovi pravilno izmerjene vrednosti, za večino preiskav niso natančno opredelili, ampak so se deloma oprli na rezultate prve obsežnejše in bolj natančne raziskave Woodhamsa in sod. (Preglednica II). Vplive različnih koagulopatij oziroma zdravih učinkovin v plazmi na stabilnost komponent oziroma parametrov hemostaze med zamrzovanjem pa niso opredelili niti v priporočilih niti v omenjeni raziskavi (14, 18). Za shranjevanje vzorcev uporabljamo zamrzovalnike z natančnim nadzorom temperature. Uporaba zamrzovalnikov s cikli zamrzovanja in taljenja ni primerna, saj lahko privede do hladne aktivacije nekaterih faktorjev (zlasti F VII) ali pa njihove poškodbe, razgradnje (1, 14, 15, 17).

Preglednica II: Priporočen čas in temperatura zamrzovanja krvne plazme za koagulacijske preiskave po priporočilih inštituta za klinične in laboratorijske standarde (CLSI)

Preiskava	Pogoj zamrzovanja (aliquot plazme)	
	-20 °C	-70 °C
PČ	2 tedna	12 mesecev
APTČ	2 tedna	12 mesecev
APTČ (nefrakcionirani heparin)	2 tedna	Ni podatka
Aktivnost F VIII, vWf	2 tedna	6 mesecev
Ostale preiskave	Odkvisno od preiskave oziroma analita *	

* Po rezultatih raziskave Woodhamsa in sod. (18)

Rezultati drugih raziskav, ki so preučevale stabilnost komponent in parametrov hemostaze, so bili mnogokrat drugačni od priporočil. V raziskave, ki so bile že po trajanju zelo raznolike, so bile vključene tudi različne skupine preiskovancev (zdravi preiskovanci, bolniki z različnimi koagulopatijami ali na terapiji z različnimi zdravili). Pridobljene rezultate so obdelali z različnimi statističnimi metodami. Nekatere raziskovalne skupine so stabilnost parametrov določale pri meji statistično pomembnih razlik, druge pri meji klinično pomembnih razlik.

Veliko raziskovalnih skupin se je do shranjevanja vzorcev pri -20 °C negativno opredelilo že na krajši časovni rok. Ugotovili so, da sta se PČ in APTČ podaljšala relativno sorazmerno s časom shranjevanja (17, 21, 30-33). Na drugi strani se je stabilnost citratne plazme in njenih komponent z nižanjem temperature shranjevanja izboljšala. (18, 19, 30, 33). Čas do koagulacije se je med shranjevanjem, ne glede na temperaturo shranjevanja, postopno, vendar najbolj očitno podaljševal pri preiskavi APTČ (18, 19, 21, 30). Na njeno pravilno izmerjeno vrednost po zamrzovanju je po rezultatih raziskovalne skupine Woodhams in sod. pomembno vplival tudi volumen vzorca ter mrtvi volumen v vsebniku za zamrzovanje (18).

Koncentracija D-dimera je bila na različne pogoje shranjevanja relativno neobčutljiva preiskava (14, 18, 25-27). Po priporočilih, ki opredeljujejo kvantitativno določitev D-dimera za izključitev venske tromboembolije, je D-dimer pri -24 °C stabilen leto dni, ostale raziskave pa so pri omenjeni in nižjih temperaturah določile še daljšo stabilnost (14, 18, 24, 27, 34).

Smernice za kasnejšo analizo aktivnosti koagulacijskih faktorjev navajajo, da so vzorci citratne plazme stabilni, če jih shranimo pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Najdaljšega časovnega intervala shranjevanja, ki še zagotovi stabilnost preučevanih analitov, niso opredelili (35). Nekatere raziskovalne skupine pa so zamrzovanje vzorcev za kasnejšo analizo aktivnosti, zlasti labilnih koagulacijskih faktorjev, odsvetovale (19, 21, 26). Med njimi je bil na prvem mestu F VIII, ki sta mu sledila F V in F IX (18, 19, 21, 26). Dodatno so ugotovili, da je na stabilnost nekaterih koagulacijskih faktorjev (zlasti F VIII in F V) pomembno vplivala tudi hitrost zamrzovanja. Njuna aktivnost se je bolje ohranila po hitrem zamrzovanju (29, 36). Pri F VII je bila poleg kratkega razpolovnega časa problematična še njegova hladna aktivacija med procesi zamrzovanja oziroma taljenja (1, 17, 18).

1.3.3 Drugi vplivi pri zamrzovanju

Nekaj raziskav je preučevalo vpliv **načina zamrzovanja** (18, 27, 29, 30, 36). Woodhams in sod. so skupino vzorcev pred shranjevanjem pri $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ hipno zamrznili (npr. s tekočim dušikom). V času do dveh let niso opazili pomembno izboljšane pravilnosti PČ in APTČ v primerjavi s počasi zamrznjenimi vzorci. Sklepali so, da stabilnost koagulacijskih beljakovin ni bila odvisna od načina zamrzovanja, ampak samo od časa in temperature shranjevanja (18). Alesci in sod. pa so vzorce hipno zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Med shranjevanjem so pri hitro zamrznjenih vzorcih ugotovili manjša odstopanja PČ in APTČ od svežega vzorca v primerjavi s počasi zamrznjenimi vzorci (30). Stabilnost D-dimera, ki je bila med shranjevanjem pri različnih temperaturah že v splošnem precej dobra, se pod vplivom hipnega zamrzovanja ter nadaljnjega shranjevanja pri različnih temperaturah ni pomembno izboljšala (18, 27). Kot že omenjeno, sta F V in F VIII svojo biološko aktivnost bolje ohranila po hitrem zamrzovanju (29, 36).

Na ponovljivost preiskave PČ je vplival tudi izbran **tromboplastinski reagent v kombinaciji z analizatorjem** (14, 37). Davis in sod. so pri uporabi različnih tromboplastinskih reagentov že v svežih vzorcih bolnikov na terapiji z AVK izmerili statistično in klinično pomembne razlike v INR. Ugotovili so, da je imela uporaba različnih tromoplastinskih reagentov večji vpliv na ponovljivost vrednosti PČ kot čas shranjevanja vzorcev (37). Strokovnjaki in smernice zaradi razlik priporočajo, da vsak laboratorij, glede na svoje pogoje in protokol analize, določi oziroma

potrdi najdaljši časovni interval shranjevanja, pri katerem je odstopanje PČ od prave vrednosti še sprejemljivo (14).

Raziskovalna skupina Woodhamsa in sod. je dokazala, da je na pravilnost posameznih analiz po shranjevanju vplival tudi **volumen shranjenega alikvota, vrsta in volumen vsebnika ter mrtvi volumen v vsebniku**. Ugotovili so, da so bili pri -24 °C bolj stabilni manjši alikvoti v manjših vsebnikih. Pri nižji temperaturi shranjevanja (pod -70 °C), kjer so poročali o splošno boljši stabilnosti vzorca, pa znatnega vpliva volumna alikvota na njegovo stabilnost niso zaznali. V zaključku so priporočili shranjevanje manjših alikvotov v manjših vsebnikih, saj je bila variabilnost tako v splošnem, ne glede na pogoj shranjevanja, vedno najmanjša (18).

Poznamo različne **načine in naprave za taljenje plazme** po zamrzovanju. Raziskali so, da so ti vplivali zgolj na temperaturo vzorca takoj po taljenju, ne pa na aktivnost koagulacijskih faktorjev ter rezultate koagulacijskih preiskav (38). Čas taljenja navadno prilagodimo volumnu vzorca, saj lahko podaljšano segrevanje vpliva na integriteto vzorca. V rutinski klinični praksi vzorce tipično talimo v vodni kopeli pri 37 °C največ 10 minut. Nato je zelo pomembno, da vzorce nežno, vendar dobro premešamo in takoj analiziramo. Še posebno moramo biti pozorni, če je zaradi vpliva zamrzovanja in taljenja v vzorcu nastala proteinska oborina. Z mešanjem jo moramo resuspendirati in analize izvesti takoj (2, 14, 15).

Na voljo imamo precejšnje število raziskav, ki so na področju **shranjevanja krvnih komponent za transfuzijo** opredelile stabilnost posameznih koagulacijskih faktorjev v plazmi po zamrzovanju (36, 39, 40). Aktivnosti ključnih koagulacijskih faktorjev so bile znotraj sprejemljivega intervala za transfuzijo v plazmi s CPD (raztopina natrijevega citrata, citronske kisline, dekstroze in natrijevega fosfata) po hitrem zamrzovanju do treh let pri -70 °C ter morda celo 10 let pri -80 °C (36, 39). Biološka aktivnost koagulacijskih faktorjev se je med shranjevanjem zmanjševala počasi in postopoma, pri čemer sta bili izjemi hitrejša izguba F V in F VIII. Slednja sta bila v plazmi s CPD najbolj stabilna po hitrem zamrzovanju in nižjih temperaturah shranjevanja (29, 36, 40). Hladni aktivaciji F VII, ki je najpogostejša pri 4 °C, se naj bi izognili s hipnim zamrzovanjem plazme pod -20 °C (40, 41). Rezultati raziskav iz področja transfuzije so bili sicer izpeljani za vzorce plazme, ki je bila odvzeta zdravemu posamezniku s postopkom afereze oziroma plazmafereze v vsebnik z antikoagulantom ACD

(raztopina citronske kisline, natrijevega citrata, dekstroze), CPD ali CPDA (raztopina CPD z dodatkom adenina). Iz vidika uporabljenih različnih antikoagulantov oziroma konzervansov, drugačne populacije preiskovancev in drugačnega načina odvzema krvi ne moremo biti prepričani, ali lahko rezultate stabilnosti koagulacijskih faktorjev neposredno prenesemo na področje hemostaze. Poleg tega med seboj ne moremo neposredno primerjati priporočil o zadostni aktivnosti koagulacijskih faktorjev za namen zdravljenja s transfuzijo in priporočil glede aktivnosti koagulacijskih faktorjev, ki še zagotovijo pravilne rezultate koagulacijskih preiskav.

2 NAMEN DELA

Na področju hemostaze obstaja splošno priporočilo, ki pravi, da se stabilnost plazme in njenih komponent za kasnejše analize najbolje ohrani po hitrem zamrzovanju in pri nizkih temperaturah shranjevanja. Natančnih podatkov o stabilnosti posameznih komponent hemostaze glede na temperaturo in čas shranjevanja pa ni, saj so si tudi ugotovitve raziskav med seboj precej različne.

V raziskavi se bomo osredotočili zgolj na en segment znotraj-laboratorijske predanalitske faze – preučili bomo vpliv dveh najpogosteje uporabljenih temperatur zamrzovanja, prednosti hipnega zamrzovanja v tekočem dušiku ter časa shranjevanja na osnovne in hkrati najpogostejše preiskave hemostaze (PČ, APTČ, D-dimer) ter novejšo, občutljivo analizo CHP. V ta namen bomo zbrali vzorce zdravih preiskovancev ter vzorce naključnih bolnikov iz rutinske klinične prakse, ki jih bomo shranili za obdobje enega in šestih tednov pri naslednjih pogojih:

- Hipno zamrzovanje v tekočem dušiku in shranjevanje pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Neposredno zamrzovanje in shranjevanje pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Neposredno zamrzovanje in shranjevanje pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Po shranjevanju pri različnih pogojih bomo ocenili pravilnost rezultatov omenjenih izbranih preiskav glede na predhodno izmerjene rezultate v svežih vzorcih. Pri vzorcih bolnikov bomo določili tudi delež rezultatov, ki bodo po shranjevanju spremenili klinični pomen glede na referenčno območje.

Dodatno bomo na enak način, s pomočjo meritev PČ, APTČ in CHP, v razredčinah sedmih različnih deficitnih plazem določili občutljivost ključnih koagulacijskih faktorjev (F XII, F XI, F X, F IX, F VIII, F VII, F V) na omenjene pogoje shranjevanja in njihov prispevek k rezultatom preiskav.

3 VZORCI IN LABORATORIJSKE PREISKAVE

3.1 VZORCI

V raziskovalno delo smo vključili naključne zaporedne vzorce citratne plazme preiskovancev, ki so jih analizirali v Laboratoriju za hemostazo in aterotrombozo (v nadaljevanju bolniki). Za analizo vpliva kratkoročnega shranjevanja (1 teden) na izbrane preiskave hemostaze smo analizirali skupno 87 vzorcev, pri dolgoročnem shranjevanju (6 tednov) pa 146 vzorcev.

V kontrolno skupino smo vključili 27 zdravih prostovoljcev (11 moških in 16 žensk) brez znanih motenj v koagulaciji. Njihova povprečna starost je bila 29 let (razpon od 21 do 55 let). Iz vzorca citratne plazme vsakega prostovoljca smo pripravili šest alikvotov po približno 500 μ L. Preostanek citratne plazme smo uporabili za pripravo normalne zmesne plazme (NZP), ki smo jo kasneje potrebovali kot kontrolni vzorec pri analizi CHP. Protokol ravnanja s kontrolnimi vzorci je bil enak kot pri vzorcih bolnikov.

S pomočjo deficitnih plazem in standardne humane plazme (SHP) smo pripravili vzorce z različno vsebnostjo posameznega faktorja koagulacije. Meritve koagulacijskih časov smo izvedli v svežih vzorcih ter po enem in šestih tednih preučevali vpliv zamrzovanja na različne koncentracije faktorjev koagulacije v plazmi.

3.1.1 Priprava in analiza vzorcev

3.1.1.1 Vzorci bolnikov in kontrolni vzorci

Uporabili smo samo pravilno odvzete vzorce, ki so imeli primerno polnitev epruvete in so bili brez vidnih strdkov. Prva stopnja pri vzorcih za koagulacijske preiskave je bilo centrifugiranje (2000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 30 minut), saj je vzorec izbora plazma z antikoagulantom natrijevim citratom. Centrifugirane vzorce brez znakov hemolize smo v primarni epruveti vstavili v stojala in jih poslali v popolnoma avtomatizirano analizo na analizatorju Sysmex® CS-2100i (Sysmex®, Kobe, Japonska). V svežih vzorcih smo izmerili PČ, APTČ in D-dimer. Enako smo ravnali tudi s kontrolnimi vzorci.

3.1.1.2 Deficitne plazme

Humana plazma, kateri je posamezen faktor koagulacije odstranjen (preostala aktivnost je nižja od 1 %), medtem ko imajo vsi ostali faktorji normalno aktivnost, imenujemo deficitna plazma.

Reagenti in oprema za pripravo deficitnih plazem

- Deficitne plazme brez koagulacijskih faktorjev XII, XI, X, IX, VIII, VII, V (HemosIL®, Instrumentation Laboratory Company, Bedford, ZDA), shranjene pri 2-8 °C
- SHP (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, München, Nemčija), shranjena pri 2-8 °C
- Redestilirana voda, sobna temperatura
- Elektronske pipete in nastavki za pipete

Posamezno deficitno plazmo proizvajalci ponujajo v liofilizirani obliki. V vsako stekleničko smo po navodilih dodali 1 mL redestilirane vode in nežno premešali. Pripravljene raztopine smo pustili na sobni temperaturi vsaj 30 minut in vmes večkrat rahlo premešali, da se je vsebina v steklenički povsem raztopila. Potem smo vsebino vseh 10 stekleničk izlili v večji vsebnik in tako pripravili 10 mL plazme brez enega izmed faktorjev. Na identičen način smo pripravili tudi SHP, le da je bil po navodilih priporočen čas inkubacije vsaj 15 minut.

Sledila je priprava razredčin volumna 4 mL z različno vsebnostjo posamičnega faktorja koagulacije (v %):

- 100%: 4 mL SHP
- 80%: 3,2 mL SHP + 0,8 mL deficitne plazme
- 50%: 2 mL SHP + 2 mL deficitne plazme
- 20%: 0,8 mL SHP + 3,2 mL deficitne plazme
- 0%: 4 mL deficitne plazme

Razredčine smo nežno, vendar dobro premešali in takoj alikvotirali. Pri vsaki razredčini smo pripravili pet alikvotov po 600 µL in enega s približno 700 µL. V zadnjem smo izmerili vrednost PČ in APTČ v svežem vzorcu.

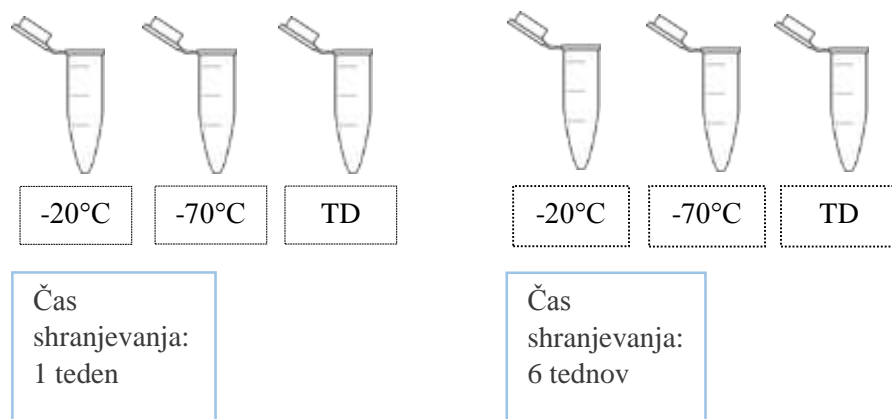
3.1.2 Alikvotiranje in zamrzovanje vzorcev

Posamezen svež vzorec citratne plazme bolnikov smo po analizi na koagulacijskem analizatorju alikvotirali v tri vsebnike za shranjevanje. Te smo označili z identifikacijsko številko vzorca in pripisali pogoj, pri katerim ga bomo shranili. Pri pipetiranju smo uporabili plastične pasteurjeve pipete ali pa mehansko pipeto in pripravili homogene alikvote. Pipetirali smo počasi in ob steni epruvete ter vedno prenehali, ko je bila gladina plazme vsaj še 3 mm nad celicami, da ne bi posrkali trombocitov. Od sprejema vzorca v laboratorij do shranjevanja so bili vzorci na sobni temperaturi do največ dve uri. Prvo serijo vzorcev smo pri različnih pogojih hranili en teden, drugo serijo pa 6 tednov.

Povsem enako smo ravnali tudi s kontrolnimi vzorci in razredčinami deficitnih plazem, le da smo iz posameznega vzorca pripravili 6 alikvotov. Tri smo shranili pri različnih pogojih za analizo vpliva eno-tedenskega shranjevanja in tri za analizo vpliva šest-tedenskega shranjevanja (Slika 3).

Prvi alikvot smo shranili v zamrzovalni omari s povprečno temperaturo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (dovoljen razpon od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$), drugega pa v zamrzovalni omari pri $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ (dovoljen razpon od $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$). Zadnji alikvot smo hipno zamrznili v tekočem dušiku tako, da smo ga s stojalom postavili v manjšo količino tekočega dušika, ki smo ga iz jeklenke prelili v polistirensko posodo. Za zamrznitev vzorca je bilo potrebno največ 20 sekund. Preostanek tekočega dušika smo izlili nazaj v jeklenko, alikvot pa prav tako shranili v zamrzovalni omari pri $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za skupine vzorcev, ki so bile shranjene pri različnih pogojih, smo uvedli enotno poimenovanje:

- Skupina svežih vzorcev → Sveži vzorci
- Skupina vzorcev po shranjevanju pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ → $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Skupina vzorcev po hipnem zamrzovanju v tekočem dušiku in shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ → TD
- Skupina vzorcev po shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ → $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$



Slika 3: Priprava alikvotov plazme za zamrzovanje pri različnih pogojih

Tako vzorce preiskovancev kot tudi kontrolne vzorce in razredčine deficitnih plazem smo analizirali v dveh časovnih intervalih - kratkoročno shranjevanje je trajalo 6-10 dni (v nadaljevanju 1 teden) in dolgoročno shranjevanje 40-50 dni (v nadaljevanju 6 tednov). Koagulacijske parametre (PČ, APTČ, D-dimer) smo izmerili v svežih vzorcih in nato še po shranjevanju. Pri deficitnih plazmah D-dimera nismo merili. Analizo CHP smo izvedli samo po shranjevanju. Razlik v procesu analize med alikvoti sicer ni bilo.

3.1.3 Analiza vzorcev po zamrzovanju

Tipično smo po zamrzovanju hkrati analizirali 6 alikvotov – vzorca dveh preiskovancev shranjena na tri različne načine. Alikvote smo odtajali neposredno pred analizo v mešalniku pri temperaturi 37°C (5 minut, 800 obratov/min). V primeru malo večjega volumna v vsebniku smo taljenje podaljšali za minuto do dve. Sledilo je vrtinčenje oziroma mešanje na vibracijskem mešalniku in izvedba izbranih analiz (PČ, APTČ, D-dimer) v vsakem alikvotu na koagulacijskem analizatorju CS-2100i. Pred analizo smo še preverili, da na površini alikvotov zaradi shranjevanja in mešanja niso nastali mehurčki. Te smo posrkali s pasteurjevo pipeto. Pri mehurčkih namreč analizator napačno zazna gladino vzorca in meritve ne opravi.

3.2 LABORATORIJSKE PREISKAVE

3.2.1 Analiza protrombinskega časa

Analizo PČ po Quicku analizator izvede v merilni kiveti pri temperaturi 37 °C z metodo merjenja nastanka strdka. Osnovni princip metode sestoji iz dodatka popolnega tromboplastina (tkivni faktor in fosfolipidi) ter kalcija vzorcu citratne plazme. Aktivira se koagulacijska kaskada. Analizator preko zmanjšanja prepuščene svetlobe skozi merilno kiveto (optični način meritve) izmeri čas do nastanka strdka. Uporabili smo reagent Thromborel® S (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, München, Nemčija), ki že vsebuje vse potrebne sestavine. Preko programske opreme se izvršijo tudi vsi potrebni izračuni in končen rezultat meritve dobimo v treh oblikah: čas do nastanka strdka (v sekundah), relativna vrednost PČ ter vrednost INR. Pri raziskavi smo se osredotočili na vrednost INR, ki se tudi običajno uporablja.

3.2.2 Analiza aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa

Analizo APTČ smo izvedli z reagentom Pathromtin® SL (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, München, Nemčija). Ta vsebuje delni tromboplastin (fosfolipidi brez tkivnega faktorja) in delce silicijevega dioksida kot površinski aktivator koagulacije. Posebej analizator vzorcu doda še kalcijeve ione v obliki kalcijevega klorida in prične z meritvijo v merilni kiveti, ki je ogreta na 37°C. Analiza je končana, ko količina prepuščene svetlobe pade na vnaprej določeno intenziteto, ki definira nastanek strdka. Rezultat analize, ki nam kaže na aktivacijo notranje poti koagulacije, je čas do nastanka strdka v sekundah.

3.2.3 Analiza koncentracije D-dimera

Analiza koncentracije D-dimera na CS-2100i temelji na principu imuno-turbidimetrije. Uporabili smo reagenčni komplet TriniLIA Auto Dimer (Axis-Shield, Dundee, Irska). Glavna sestavina reagenta so delci lateksa, na katere so vezana monoklonska protitelesa proti D-dimeru. Specifične in navzkrižne povezave antigen-protitelo privedejo do nastanka premreženih kompleksov (aglutinativ), ki sipajo svetlobo določene valovne dolžine. V aparatu je shranjena kalibracijska krivulja, na podlagi katere analizator transmitanco pretvori v koncentracijo D-dimera. Razmerje med koncentracijo in transmitanco je obratno sorazmerno.

3.2.4 Analiza celokupnega hemostatskega potenciala

Analizo CHP s parametri CHP, CKP in CFP smo izvedli po principu, kot ga je prvotno opisala He s sodelavci (8, 10).

Reagenti

- Pufer Tris-HCl (Lekarna UKC Ljubljana), pH = 7,5, shranjen v hladilniku pri 2-8 °C
- Kalcijev klorid (320 mM) (Lekarna UKC Ljubljana), shranjen v hladilniku pri 2-8 °C
- Normalna zmesna plazma (NZP), volumen 500-700 µL/epruveto, shranjena pri -75 °C
- Goveji trombin (Thrombin from bovine plasma, Sigma-Aldrich®, St.Louis, ZDA), koncentracija 100 NIH/mL, 50-100 µL/epruveto, shranjen pri -75 °C
- Rekombinantni t-PA (Actilyse® (Alteplase), Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Nemčija), koncentracija 1 mg/mL, 50 µL/epruveto, shranjen pri -75 °C

Oprema in pripomočki

- Spektrofotometer za mikrotitrne plošče Sunrise™ (Tecan, Männedorf, Švica)
- Mikrotitrne plošče (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, ZDA)
- Računalnik s programsko opremo Microsoft Office Excel (Microsoft, Redmond, ZDA) in Magellan™ (Tecan, Männedorf, Švica)
- Mešalnik z možnostjo regulacije temperature Thermomixer® comfort (Eppendorf, Hamuburg, Nemčija) z nastavitvijo 800 obratov/min, 37 °C
- Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Vibracijski mešalnik TopMix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA) z nastavitvijo 30 x100 obratov/min
- Enokanalne elektronske pipete za prostornine 1-5 mL, 10-300 µL, 100-1000µL ter enokanalna mehanska pipeta 0,1-10 µL (vse Sartorius Biohit, Göttingen, Nemčija)
- Večkanalna elektronska pipeta (Sartorius Biohit, Göttingen, Nemčija)
- Nastavki za pipete
- Vsebniki za pripravo delovnih raztopin
- Plastični kadički

Priprava NZP

NZP smo pripravili iz citratne plazme kontrolnih vzorcev. Najprej smo s pasteurjevo pipeto posrkali plazmo nad stolpcem krvnih celic in jo prenesli v večjo plastično posodo. Rahlo smo premešali in pripravili 700-mikrolitrske alikvote NZP. Hipno smo jih zamrznili v tekočem dušiku in shranili v zamrzovalni omari pri $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Priprava trombina

Po navodilih smo v redestilirani vodi raztopili liofiliziran reagent govejega trombina. Tako raztopljen reagent je imel koncentracijo trombina 1000 NIH/mL, zato smo ga redčili z redestilirano vodo v razmerju 1:10. Nato smo pripravili alikvote, ki so vsebovali 100 μL govejega trombina končne koncentracije 100 NIH/mL. Shranili smo jih v zamrzovalni skrinji pri temperaturi $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Priprava t-PA

Uporabili smo rekombinantni t-PA (alteplaza) s koncentracijo 1 mg/mL. Razpipetirali smo ga v 50-mikrolitrske alikvote in do analize hranili pri $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Priprava delovnih raztopin

- 1750 μL pufra Tris-HCl in 235 μL kalcijevega klorida za pripravo reagenta s trombinom
- 1750 μL pufra Tris-HCl in 235 μL kalcijevega klorida za pripravo reagenta s trombinom in t-PA
- 450 μL pufra Tris-HCl za razredčitev trombina (1:10)
- 90 μL pufra Tris-HCl za razredčitev t-PA (1:10)

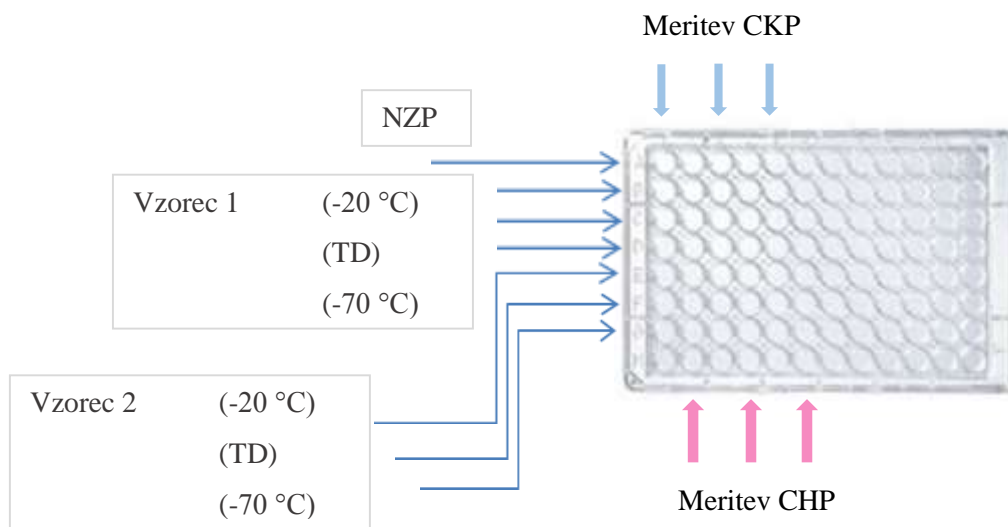
Vse razredčine in reagente smo standardizirano vrtinčili na vibracijskem mešalniku 3 sekunde.

CHP nismo merili v svežih vzorcih, saj tudi v laboratoriju preiskavo izvedejo na krajši čas zamrznjenih vzorcih (v seriji). Temu so prilagojene tudi referenčne vrednosti. Pred nanosom na mikrotitrsko ploščico smo alikvote preiskovancev in alikvot NZP še enkrat kratko zvrtnčili na vibracijskem mešalniku. NZP je v prvi vrstici služila kot kontrola, nato pa sta sledila vzorca preiskovancev in sicer v standardiziranem zaporedju glede na pogoj zamrzovanja (Slika 4). Vsak alikvot smo nanесли v volumnu 60 μL v 6 vdolbinic v eni vrstici.

Nato smo iz zamrzovalne skrinje prinesli trombin in t-PA, ter ju namestili v mešalnik pri 37 °C. Reagenčne mešanice smo pripravili na naslednji način:

- t-PA smo talili točno 3 minute, ga zvrtnčili in kratko centrifugirali. Še enkrat smo ga zvrtnčili in ga 10 µL odpipetirali v epruveto z 90 µL pufra. Po vrtinčenju smo 15 µL razredčenega t-PA z delovno koncentracijo 0,1 mg/mL prenesli v eno izmed pripravljenih reagenčnih mešanic s pufrom in kalcijem ter vrtinčili.
- Trombin smo tipično odtajali do 5 minut in ga zvrtnčili. 50 µL trombina smo odpipetirali v epruveto s 450 µL pufra ter zopet zvrtnčili. Pripravljen reagent z delovno koncentracijo trombina 10 NIH/mL smo v volumnu 2-krat 18 µL prenesli v obe pripravljene delovni raztopini s pufrom in kalcijem. Pri tem smo pazili, da smo trombin vedno najprej dodali v reagenčno mešanico, ki še ni imela dodanega t-PA. Obe reagenčni mešanici smo končno dobro zvrtnčili.

Sledil je nanos po 50 µL reagenčne mešanice na mikrotitrsko ploščo z vzorci s pomočjo elektronske večkanalne pipete. Reagenčni mešanici smo izlili vsako v svojo kadičko. V prvi, tretji in peti stolpec smo nanесли reagenčno mešanico s trombinom (meritev CKP), v drugi, četrti in šesti pa reagenčno mešanico s trombinom in t-PA (meritev CHP) (Slika 4). Ploščico smo čim hitreje vstavili v predhodno ogreti (37 °C) čitalec mikrotitrskih ploščic in pričeli z meritvijo, ki je trajala 40 minut. V tem času je analizator pri valovni dolžni (λ) 405 nm vsako minuto odčital absorbanco v vsaki vdolbinici. Programska oprema Magellan™ nam je omogočala spremljanje poteka reakcije in meritev na ploščici.

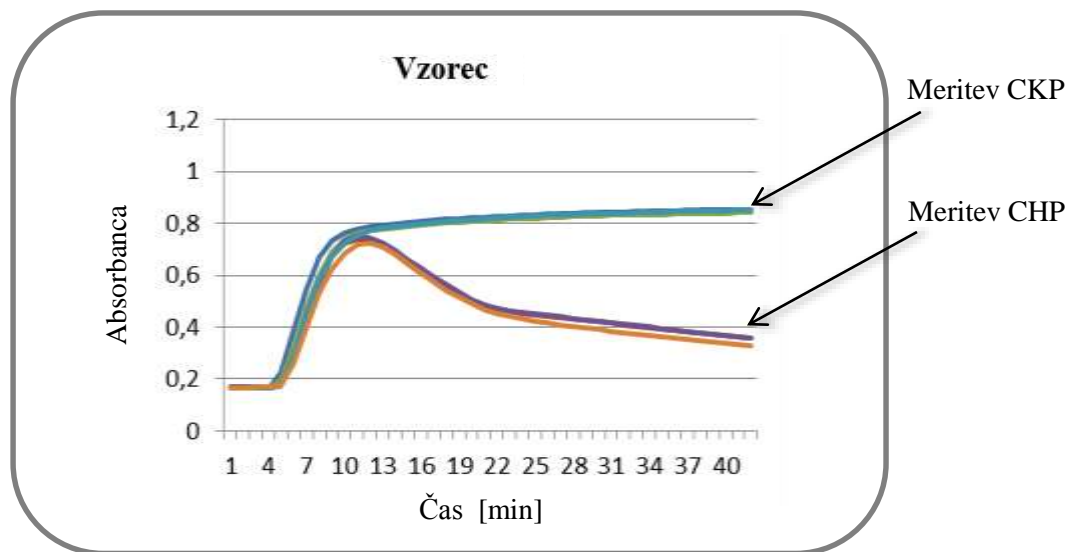


Slika 4: Razporeditev vzorcev in meritev parametrov celokupnega hemostatskega potenciala na mikrotitrski ploščici

Po koncu analize so se odčitane absorbance avtomatično prenesle v program Excel. Te podatke smo prenesli v predpripravljeno Excelovo matrico, ki je samodejno izvršila izračun parametrov celokupnega hemostatskega potenciala:

- povprečne vrednosti CKP in CHP alikvota
- CFP posameznega alikvota
- koeficient variacije med paralelkami meritev CKP in CHP alikvota.

Prav tako so se samodejno izrisali tudi grafi absorbanca(čas) za vsako vdolbinico na ploščici.



Graf 2: Potek analize celokupnega hemostatskega potenciala v programu Excel

Pregledali smo rezultate in izključili kakšno izmed meritev, če smo opazili nenavadno obliko krivulje ali pa visok koeficient variacije (nad 15 %) med paralelkami meritev v istem alikvotu. Pred preučevanjem vrednosti analize CHP v alikvotih vzorca smo vedno pregledali še vrednosti parametrov CHP pri NZP. Te smo vnesli v posebno preglednico, kjer smo preko analiz opazovali ponovljivost meritev kontrolnega vzorca in na ta način sklepali na pravilno izvedeno analizo. Vrednosti parametrov CKP, CHP ter CFP pa so rahlo nihale tudi kot posledica novih serij NZP, trombina in t-PA.

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili statistični program GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, ZDA).

Pred statistično analizo smo vse rezultate pregledali. V primerih, ki so pojasnjeni v nadaljevanju, smo rezultatom preiskav sami določili (dogovorjene) vrednosti, nekatere meritve v paralelkah pa smo tudi izključili. Če je čas do nastanka strdka »*in vitro*« prekorlačil merilno območje koagulacijskega analizatorja, smo rezultatom pripisali dogovorjene mejne vrednosti: 180,0 sekund pri APTČ, 7,00 INR pri PČ. Vzorcev, ki niso imeli rezultatov določene preiskave pri vseh pogojih shranjevanja (premajhen volumen vzorca, napaka pri meritvi ipd.), smo zaradi bolj

optimalne statistične analize iz te skupine rezultatov izločili. Kriterije za izključitev rezultatov analize CHP smo opisali že v prejšnjem poglavju (Laboratorijske preiskave – CHP). Dodatno smo parametroma CKP in CHP v primerih vrednosti pod 4,2, zaradi nenatančnosti meritve nizkih vrednosti, pripisali vrednost 0. Na podlagi tega smo ročno izračunali tudi novo vrednost CFP. Kadar so bile vrednosti CHP, CKP ali CFP posameznega vzorca pri vseh pogojih shranjevanja 0, smo vzorec zgolj iz te skupine rezultatov izključili. Večje število enakih rezultatov bi pri statistični analizi namreč zmanjšalo variabilnost. V primeru deficitnih plazem smo imeli samo en vzorec v petih razredčinah, zato vrednosti 0 v tem primeru nismo izključili.

Za opredelitev normalnosti porazdelitve rezultatov smo uporabili Kolmogorov – Smirnov test, saj ta ne predpostavi porazdelitve podatkov vnaprej. V večini primerov smo ugotovili, da rezultati posamezne preiskave pri posameznem pogoju shranjevanja niso sledili trendu normalne oziroma Gaussove porazdelitve. Na podlagi tega smo se odločili za nadaljnjo uporabo neparametričnih statističnih testov, pri katerih smo za stopnjo tveganja vedno izbrali 5 %.

V vseh skupinah vzorcev smo pri vsaki posamezni preiskavi in pogoju shranjevanja izvedli teste opisne statistike – določili smo mediano, prvi in tretji kvartil, najnižjo in najvišjo vrednost. Pri bolnikih smo pri vseh pogojih shranjevanja prešteli še število rezultatov, ki so bili izven meja referenčnih vrednosti za posamezno preiskavo ter bi zato predstavljali klinično pomemben rezultat.

Znotraj istega časovnega intervala shranjevanja (1 teden in 6 tednov) smo pri vsaki skupini vzorcev preverili, ali se rezultati posamezne preiskave po shranjevanju pri različnih pogojih med seboj statistično pomembno razlikujejo. Za ugotavljanje teh razlik smo različne pogoje shranjevanja med seboj primerjali s Friedmanovim testom, za »*post hoc*« analizo razlik pa smo izbrali Dunnov test. Friedman test je neparametrična alternativa ANOVA testu in nam je povedal le, če so med analiziranimi skupinami obstajale statistično pomembne razlike. S pomočjo Dunnovega testa smo ugotovili, med katerimi skupinami so bile razlike in kakšna je bila njihova statistična pomembnost. V programu GraphPad Prism kot rezultat Dunnovega testa dobimo različno število znakov *, ki predstavljajo okvirne vrednosti p:

- * $p \leq 0,05$
- ** $p < 0,01$

- *** $p < 0,001$
- **** $p < 0,0001$

Za ugotavljanje vpliva časa shranjevanja (1 teden proti 6 tednov) smo pri bolnikih med seboj primerjali rezultate dveh različnih skupin vzorcev, ki sta bili shranjeni pri enakih pogojih. Primerjali smo ju z Mann-Whitney U-testom, ki je neparametrični. Pri kontrolni skupini in deficitnih plazmah, kjer so bili vzorci po eno-tedenskem in šest-tedenskem shranjevanju izvorno enaki, smo za primerjavo uporabili Wilcoxonov parni test. Tudi ta test je neparametrični, vendar ima zaradi primerjanja parov rezultatov večjo statistično moč.

4 REZULTATI

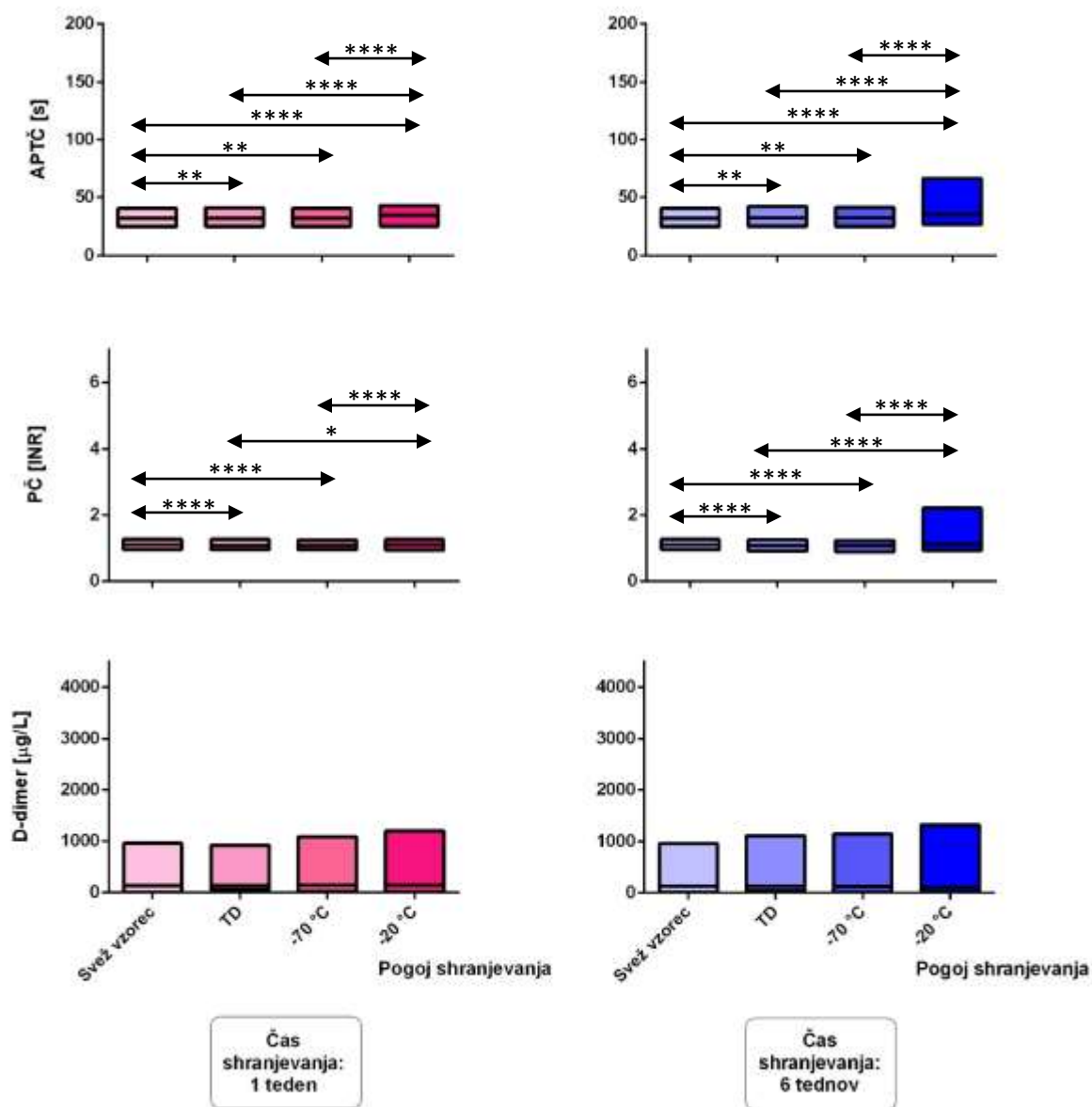
V nadaljevanju so predstavljeni rezultati osnovnih preiskav hemostaze in analize CHP v kontrolni skupini, skupini bolnikov ter pri deficitnih plazmah.

4.1 REZULTATI IZBRANIH PREISKAV HEMOSTAZE V KONTROLNI SKUPINI

APTČ se je po eno-tedenskem shranjevanju pri TD in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ statistično pomembno skrajšal, pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa statistično pomembno podaljšal. Po šestih tednih je bil v primerjavi s svežimi vzorci v vseh skupinah statistično pomembno daljši, še zlasti pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Znotraj prvega in šestih tednov pomembnih razlik ni bilo zgolj med TD in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po šestih tednih shranjevanja pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ je bil APTČ statistično pomembno daljši od APTČ po prvem tednu shranjevanja pri enakih pogojih (Graf 3, Preglednica IV).

PČ se je pri TD in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ v primerjavi s svežimi vzorci statistično pomembno skrajšal. Pomembnih razlik v vrednostih PČ ni bilo med svežimi vzorci in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter med TD in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Omenjeni trend razlik smo ugotovili tako znotraj prvega kot tudi šestih tednov shranjevanja. Med prvim in šestim tednom pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa se je PČ statistično pomembno podaljšal (Graf 3, Preglednica IV).

Vrednosti D-dimera se niso statistično pomembno spremenile niti pri različnih pogojih zamrzovanja niti po daljšem času shranjevanja (Graf 3, Preglednica IV).



Graf 3: Osnovne preiskave hemostaze pri kontrolni skupini

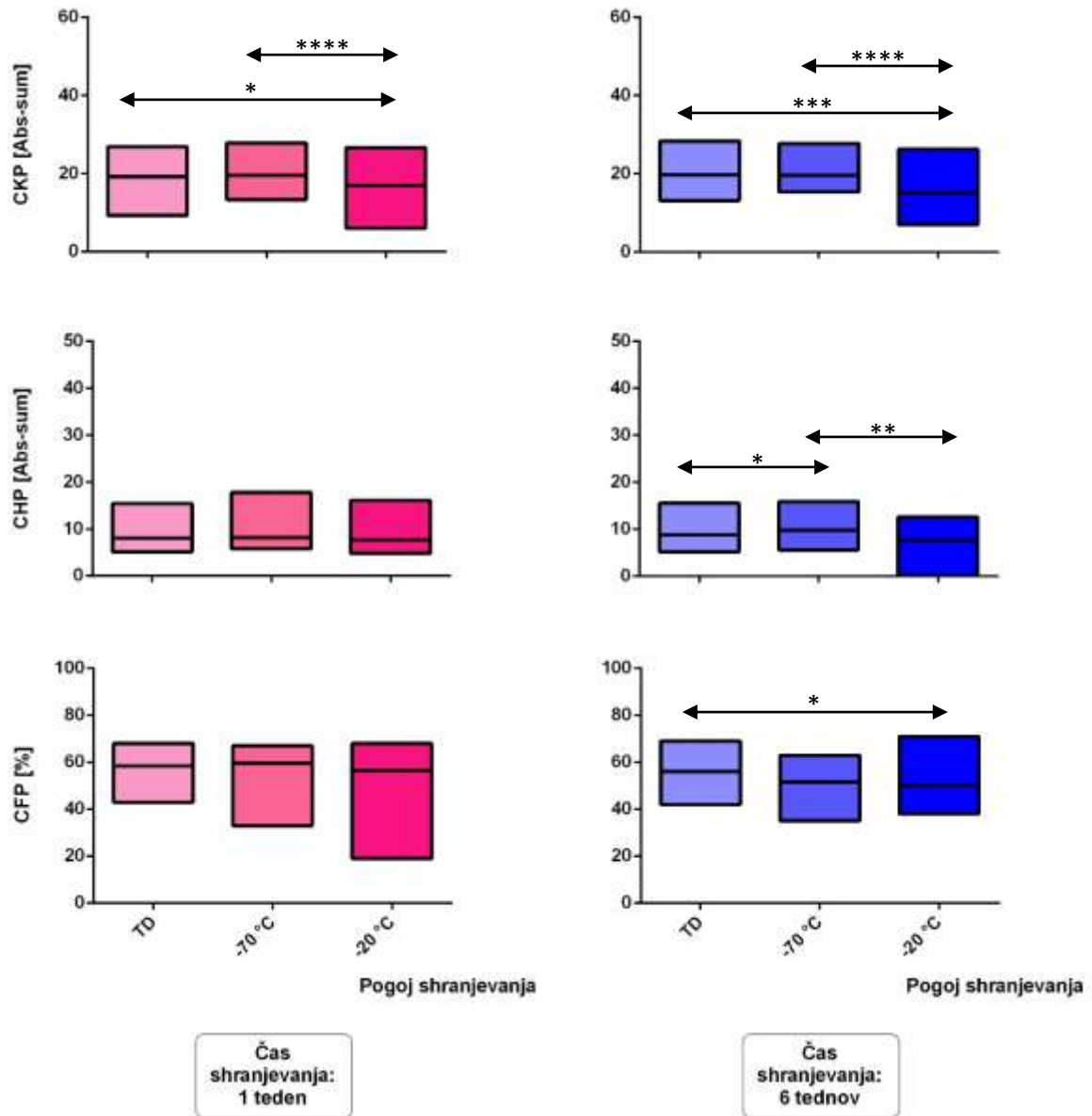
Posamezen stolpec je omejen z najmanjšo in najvišjo vrednostjo v skupini, v njem je vrisana mediana. Puščice s pripadajočimi znaki (nad njimi) prikazujejo statistično pomembne razlike med skupinami (rezultati Dunnovega testa).

Razpon vrednosti na ordinatni osi je širok z namenom lažje primerjave rezultatov med kontrolno skupino in skupino bolnikov.

Vrednosti CKP so bile pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ znotraj prvega in šestih tednov shranjevanja statistično pomembno nižje od vrednosti v skupinah $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter TD, ki pa se med seboj nista statistično pomembno razlikovali. Med prvim in šestim tednom shranjevanja pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se je CKP še dodatno statistično pomembno znižal (Graf 4, Preglednica V).

Razlike v CHP pri različnih pogojih zamrzovanja smo ugotovili zgolj po šestih tednih shranjevanja, kjer je bil CHP pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ statistično pomembno višji od CHP pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter TD. Med prvim in šestim tednom shranjevanja so se vrednosti CHP pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter TD statistično pomembno povišale (Graf 4, Preglednica V).

Različni pogoji zamrzovanja so statistično pomembno vplivali na vrednosti CFP po prvem in šestih tednih shranjevanja, vendar smo z Dunnovim testom statistične razlike dokazali samo po šestih tednih – CFP pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je bil statistično pomembno nižji od CFP pri TD, ne pa od CFP pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Med prvim in šestim tednom shranjevanja pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter TD so se vrednosti CFP statistično pomembno znižale (Graf 4, Preglednica V).



Graf 4: Celokupni hemostatski potencial pri kontrolni skupini

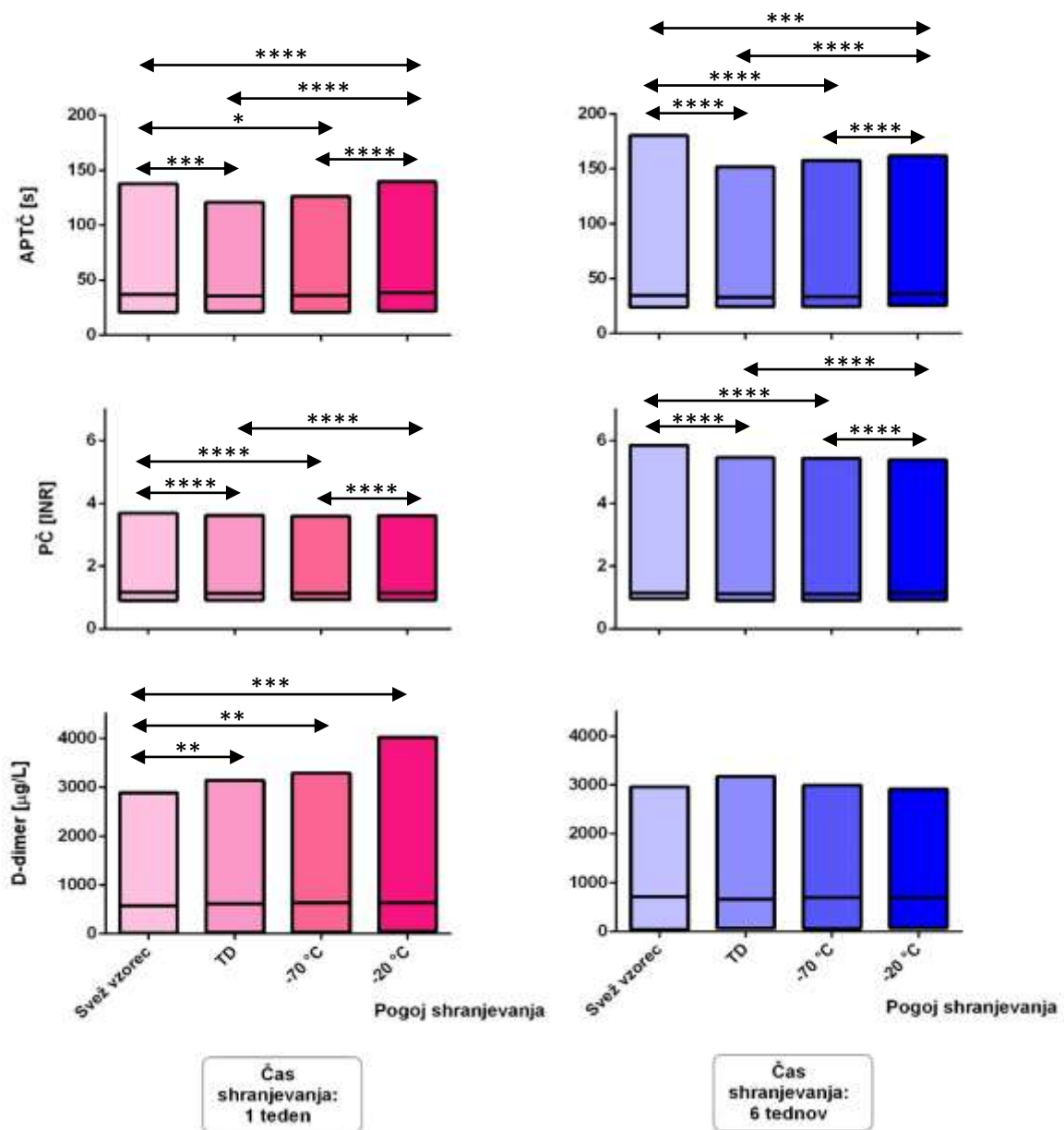
Posamezen stolpec je omejen z najmanjšo in najvišjo vrednostjo v skupini, v njem je vrisana mediana. Puščice s pripadajočimi znaki (nad njimi) prikazujejo statistično pomembne razlike med skupinami (rezultati Dunnovega testa).

4.2 REZULTATI IZBRANIH PREISKAV HEMOSTAZE V SKUPINI BOLNIKOV

APTČ se je pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter TD statistično pomembno skrajšal, pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa statistično pomembno podaljšal. Skupini $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in TD sta bili edini, med katerima ni bilo statistično pomembnih razlik. Opisani trend je bil enak znotraj prvega in šestih tednov. Med prvim in šestim tednom shranjevanja pri enakih pogojih zamrzovanja se vrednosti APTČ niso statistično pomembno spremenile (Graf 5, Preglednica VI).

PČ je bil pri TD in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ statistično pomembno krajši v primerjavi s svežimi vzorci in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Statistično pomembnih razlik ni bilo med svežimi vzorci in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter med TD in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Trend opisanih razlik je bil enak tako po prvem kot tudi šestih tednih. Med prvim in šestim tednom shranjevanja pri enakih pogojih zamrzovanja se vrednosti PČ niso statistično pomembno spremenile (Graf 5, Preglednica VI).

Vrednosti D-dimera so bile po eno-tedenskem shranjevanju pri vseh pogojih zamrzovanja statistično pomembno višje od vrednosti v svežih vzorcih, po šestih tednih pa razlik nismo dokazali. Med prvim in šestim tednom shranjevanja pri enakih pogojih zamrzovanja se vrednosti D-dimera niso statistično pomembno spremenile (Graf 5, Preglednica VI).



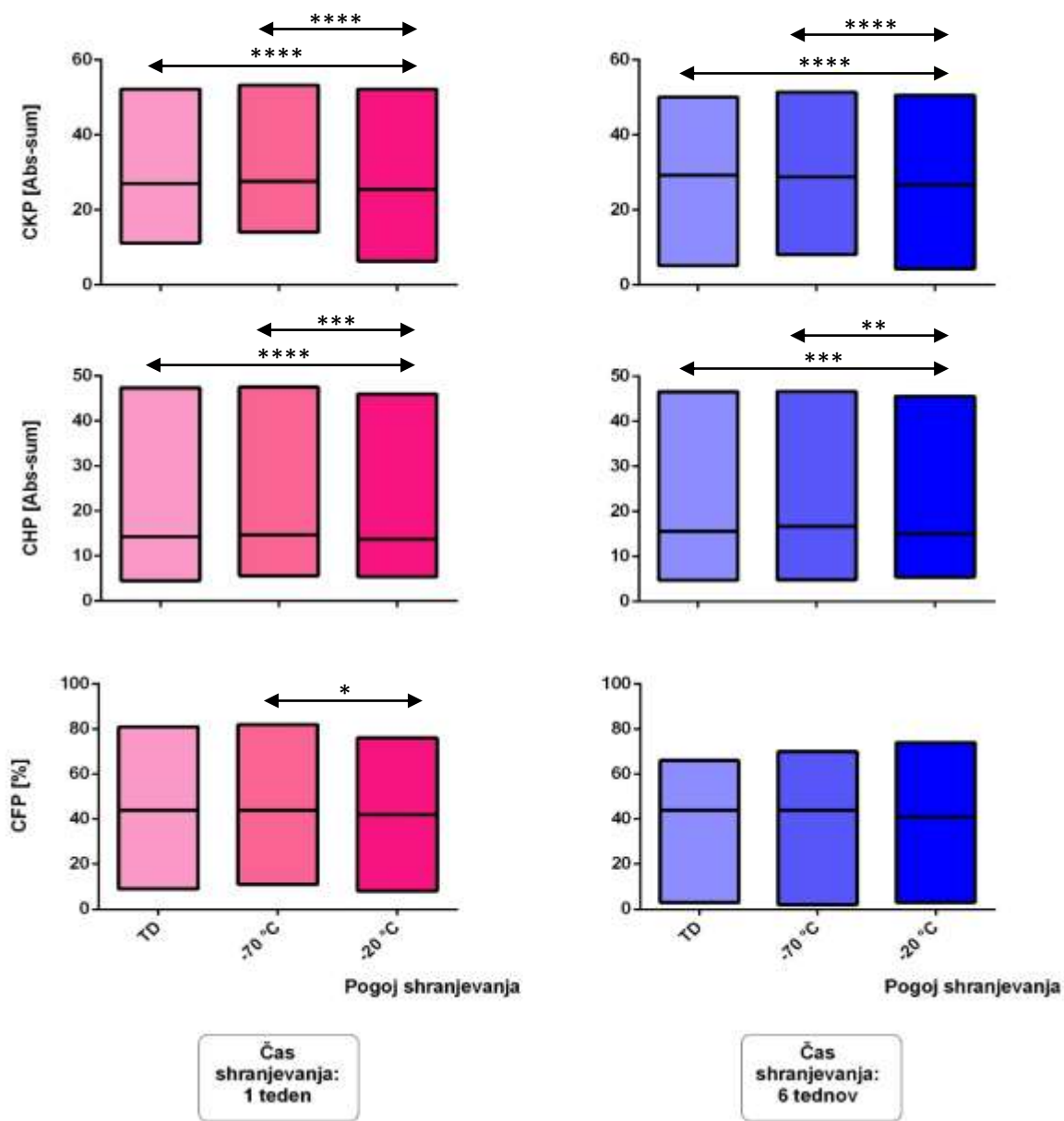
Graf 5: Osnovne preiskave hemostaze pri bolnikih

Posamezen stolpec je omejen z najmanjšo in najvišjo vrednostjo v skupini, v njem je vrisana mediana. Puščice s pripadajočimi znaki (nad njimi) prikazujejo statistično pomembne razlike med skupinami (rezultati Dunnovega testa).

Vrednosti CKP pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ so bile statistično pomembno nižje v primerjavi s skupinama TD in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, med katerima pa statistično pomembnih razlik ni bilo. Omenjene razlike so bile enake tako znotraj prvega kot tudi šestih tednov. Med prvim in šestim tednom shranjevanja pri enakih pogojih zamrzovanja se CKP ni statistično pomembno spremenil (Graf 6, Preglednica VII).

Statistično pomembno nižje vrednosti CHP smo ugotovili pri primerjavi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ s skupinama TD in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, med katerima pa razlik ni bilo. Opisani trend razlik je bil enak znotraj prvega in šestih tednov. CHP se med prvim in šestim tednom shranjevanja pri enakih pogojih zamrzovanja ni statistično pomembno spremenil (Graf 6, Preglednica VII).

CFP se je statistično pomembno spremenil le pri različnih pogojih eno-tedenskega shranjevanja. Pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ so bile vrednosti CFP statistično pomembno nižje v primerjavi z $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, med $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in TD pa statistično pomembnih razlik ni bilo. Med prvim in šestim tednom shranjevanja pri enakih pogojih zamrzovanja se CFP ni statistično pomembno spremenil (Graf 6, Preglednica VII).



Graf 6: Celokupni hemostatski potencial pri bolnikih

Posamezen stolpec je omejen z najmanjšo in najvišjo vrednostjo v skupini, v njem je vrisana mediana. Puščice s pripadajočimi znaki (nad njimi) prikazujejo statistično pomembne razlike med skupinami (rezultati Dunnovega testa).

4.2.1 Vrednosti izven referenčnih območij

V skupini bolnikov smo pri vseh preiskavah in pogojih shranjevanja prešteli vzorce, katerih rezultati so padli izven referenčnega območja za posamezno preiskavo (v nadaljevanju tudi izstopajoče vrednosti). Upoštevali smo zgolj tista odstopanja, ki bi pomembno vplivala na klinične odločitve. Kriteriji za te vrednosti so bili:

- APTČ > 36,0 s
- PČ > 1,30 INR
- D-dimer > 250 µg/L
- CKP < 15,1 in > 31,7 Abs-sum
- CHP < 4,2 in > 15,8 Abs-sum
- CFP < 44 in > 71 %

Pri osnovnih preiskavah hemostaze smo število izstopajočih vrednosti primerjali s skupino svežih vzorcev, pri analizi CHP pa s skupino TD, ker meritve v svežih vzorcih nismo izvedli.

Po eno-tedenskem shranjevanju smo pri TD določili 3 lažno normalne rezultate APTČ (3,7 %), pri -70 °C pa dva lažno normalna rezultata (2,5 %). Razlika v enem rezultatu je bila pri meji referenčnega območja APTČ (35,6 s pri TD, 36,4 s pri -70 °C). Pri -20 °C smo določili 3 dodatne izstopajoče rezultate (3,7 %). Po šestih tednih smo pri TD določili 11 izstopajočih rezultatov (7,7 %) manj, pri -70 °C pa 9 (6,3 %) manj. Ponovno je bila razlika blizu meje referenčnega območja (35,6 s pri TD ter 36,3 pri -70 °C; 35,7 s pri TD ter 37,2 s pri -70 °C). Pri -20 °C smo 10 dodatnim vzorcem (7 %) določili izstopajoče rezultate APTČ (Preglednica III).

Pri TD in -70 °C sta po prvem tednu shranjevanja izven referenčnega območja PČ padla 2 rezultata (2,4 %) manj, pri -20 °C pa en rezultat (1,2 %) več. Po šestih tednih smo pri TD določili 4 izstopajoče rezultate (2,8 %) manj, pri -70 °C pa 5 (3,5 %) manj. Do odstopanja je prišlo pri meji referenčnega območja (1,31 INR pri TD ter 1,29 INR pri -70 °C). Pri -20 °C smo po šestih tednih dvema dodatnima vzorcema (1,4 %) določili rezultate znotraj referenčnega območja (Preglednica III).

Pri analizi D-dimera smo po prvem tednu shranjevanja izven referenčnega območja ugotovili pri TD en rezultat (1,3 %) več, pri -70 °C dva (2,5 %) več, pri -20 °C pa so bili izstopajoči 4

dodatni rezultati (5 %). Po šestih tednih je bil pri TD in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nad zgornjo referenčno mejo en dodaten rezultat (0,7 %), pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa 3 dodatni rezultati (2,1 %) (Preglednica III).

Pri CKP smo po enem tednu shranjevanja pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ določili 2 izstopajoča rezultata (2,8 %) manj, pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa dva (2,8 %) več. Po 6-tedenskem shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ so bili izven referenčnega območja 4 rezultati (4 %) manj, pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa dva (2 %) manj. Zamrzovanje pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je močno vplivalo na razmerje med izstopajočimi vrednostmi pri obeh referenčnih mejah – po shranjevanju je več vrednosti padlo pod spodnjo referenčno mejo in manj jih je ostalo nad zgornjo referenčno mejo (Preglednica III).

Pri CHP smo po eno-tedenskem shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ določili 1 izstopajoč rezultat (1,5 %) manj, pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa 5 rezultatov (7,4 %) manj. Po šestih tednih shranjevanja so izven referenčnega območja pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ izstopali dodatni 4 rezultati (4 %), pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa dva rezultata (2 %) manj (Preglednica III).

Po prvem tednu shranjevanja pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ je bila izstopajoča vrednost CFP ena (1,5 %) manj, pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa je izstopalo dodatnih 5 (7,5 %) rezultatov. Po šestih tednih shranjevanja je bil pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 (1,1 %) izstopajoč rezultat več, v skupini $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa kar 12 (13 %) več (Preglednica III).

Preglednica III: Število rezultatov izven referenčnega območja in število vseh rezultatov po enem (predzadnji stolpec) in po šestih tednih shranjevanja (zadnji stolpec) v skupini bolnikov

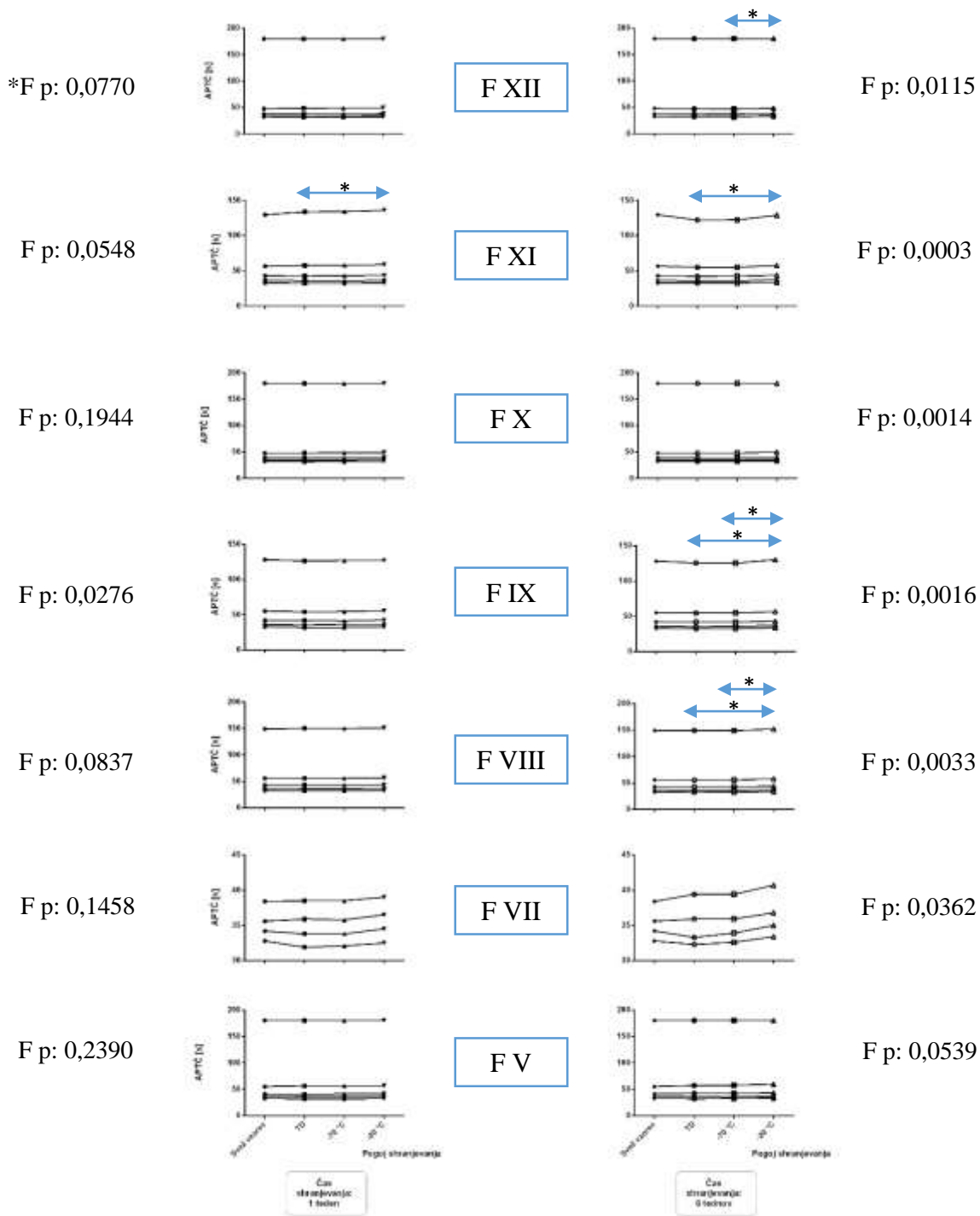
		1 teden	6 tednov
Preiskava	Pogoj shranjevanja	Izven RV / Vsi preiskovanci	Izven RV / Vsi preiskovanci
APTČ	Svež vzorec	42 / 81	62 / 143
	TD	39 / 81	51 / 143
	-70 °C	40 / 81	53 / 143
	-20 °C	45 / 81	72 / 143
PČ	Svež vzorec	19 / 82	31 / 144
	TD	17 / 82	27 / 144
	-70 °C	17 / 82	26 / 144
	-20 °C	20 / 82	29 / 144
D-dimer	Svež vzorec	55 / 80	112 / 142
	TD	56 / 80	113 / 142
	-70 °C	57 / 80	113 / 142
	-20 °C	59 / 80	115 / 142
CKP	TD	25 (3 + 22) / 72	40 (8 + 32) / 99
	-70 °C	23 (2 + 21) / 72	36 (5 + 31) / 99
	-20 °C	27 (11 + 16) / 72	38 (11 + 27) / 99
CHP	TD	30 (0 + 30) / 68	48 (0 + 48) / 98
	-70 °C	29 (0 + 29) / 68	52 (0 + 52) / 98
	-20 °C	25 (0 + 25) / 68	46 (0 + 46) / 98
CFP	TD	34 (32 + 2) / 67	44 (44 + 0) / 93
	-70 °C	33 (31 + 2) / 67	45 (45 + 0) / 93
	-20 °C	39 (37 + 2) / 67	56 (55 + 1) / 93

4.3 REZULTATI IZBRANIH PREISKAV HEMOSTAZE V PLAZMAH BREZ POSAMIČNIH FAKTORJEV KOAGULACIJE

Po prvem tednu shranjevanja smo statistično pomembne razlike v APTČ med različnimi pogoji zamrzovanja ugotovili pri plazmah brez F IX in F XI. Sledila sta jima plazmi brez F XII in F VIII, ki sta imeli p vrednosti Friedman testa malo nad mejo, ki je definirala statistične razlike. Pri plazmah brez F V, F VII, F X razlik nismo dokazali. Po šestih tednih shranjevanja smo pomembne razlike v APTČ med različnimi pogoji zamrzovanja ugotovili pri vseh preučevanih plazmah z izjemo plazme brez F V. V splošnem smo pri posamezni deficitni plazmi, ne glede na čas shranjevanja, razlike ugotovili med skupino -20 °C, kjer je bil APTČ statistično pomembno daljši, v primerjavi s skupinama TD in -70 °C (Graf 7, Preglednice VIII-XIV).

Po prvem tednu shranjevanja statistično pomembnih razlik v PČ med različnimi pogoji zamrzovanja nismo dokazali zgolj pri plazmi brez F VIII, po šestih tednih pa pri plazmi brez F V. Kjer je Dunnov test pokazal razlike, je bil PČ pri -20 °C statistično pomembno daljši od PČ svežih vzorcev. Dodatno je bil PČ v plazmi brez F XI pomembno daljši še po eno-tedenskem shranjevanju pri TD v primerjavi s svežimi vzorci (Graf 8, Preglednice VIII-XIV).

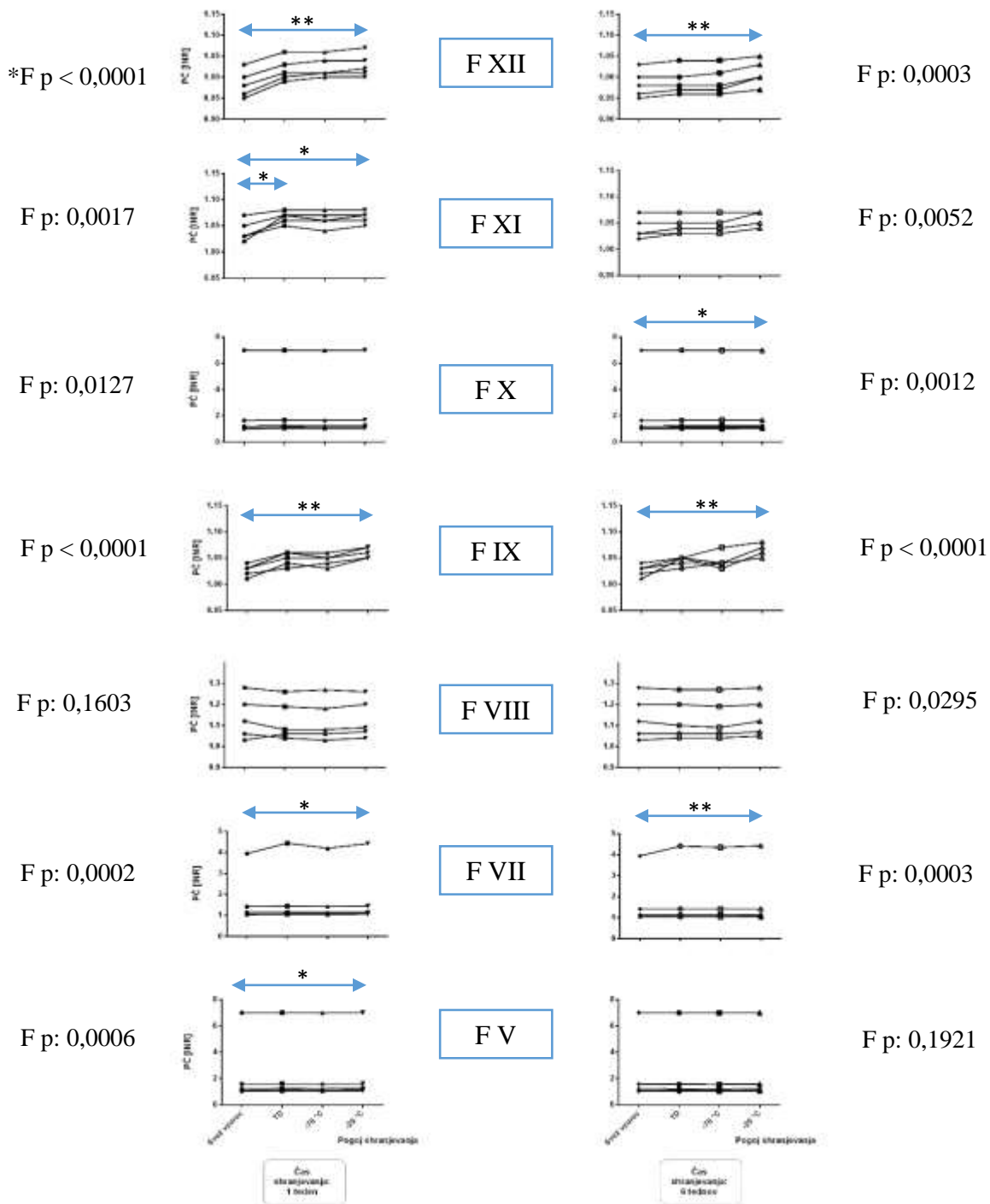
Med prvim in šestim tednom shranjevanja pri enakih pogojih zamrzovanja se rezultati PČ in APTČ v plazmah brez posamičnih faktorjev koagulacije niso statistično pomembno spremenili.



Graf 7: Aktivirani parcialni trombotični čas plazem brez posamičnega faktorja koagulacije

(*F p: p vrednost Friedman testa)

Posamezna črta na grafu prikazuje, kako se je APTČ pri eni razredčini posamezne deficitne plazme spremenil po shranjevanju pri različnih pogojih. Puščice s pripadajočimi znaki (nad njimi) prikazujejo statistično pomembne razlike med skupinami (rezultati Dunnovega testa).

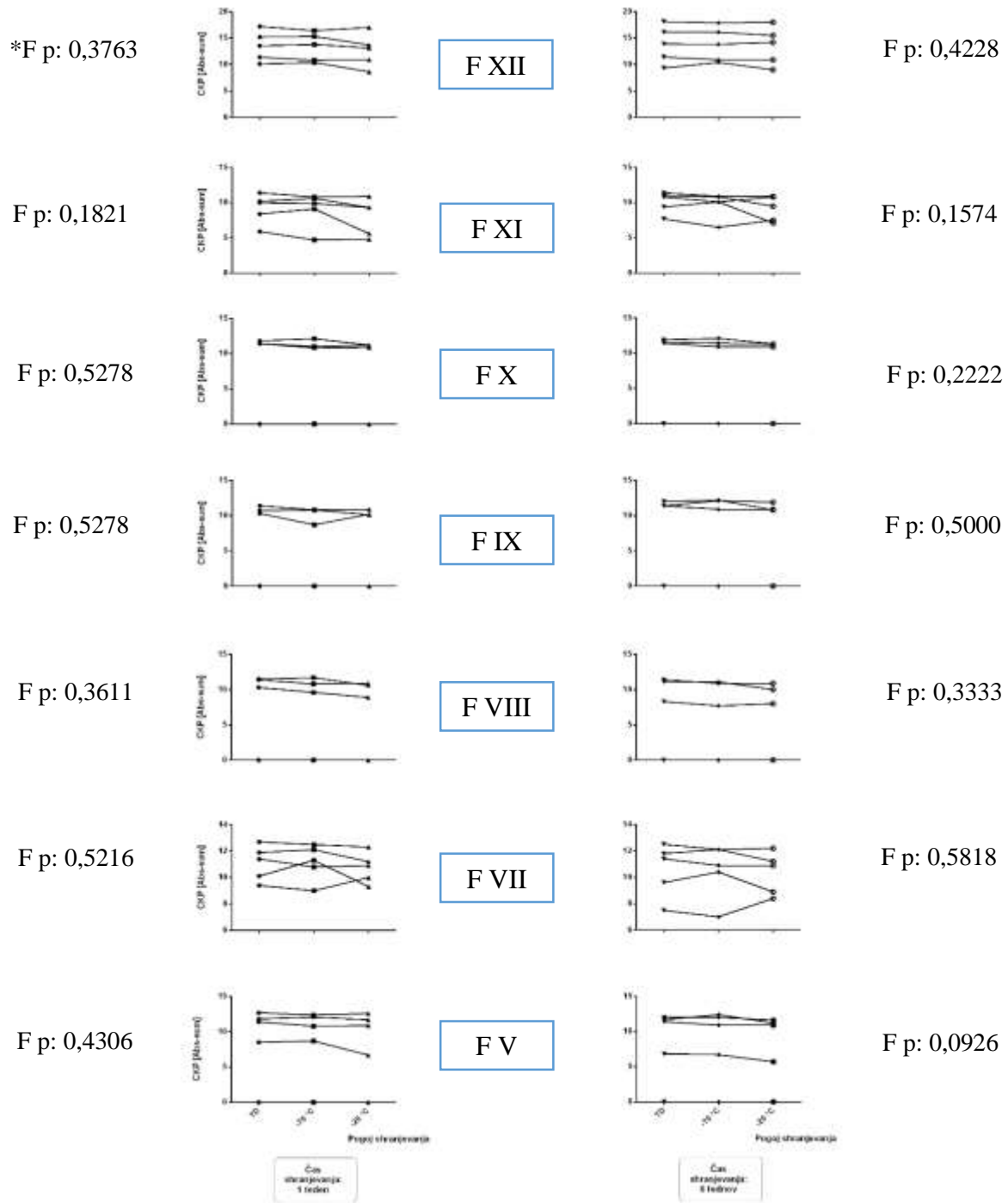


Graf 8: Protrombinski čas plazem brez posamičnega faktorja koagulacije

(*F p: p vrednost Friedman testa)

Posamezna črta na grafu prikazuje, kako se je PČ pri eni razredčini posamezne deficitne plazme spremenil po shranjevanju pri različnih pogojih. Puščice s pripadajočimi znaki (nad njimi) prikazujejo statistično pomembne razlike med skupinami (rezultati Dunnovega testa).

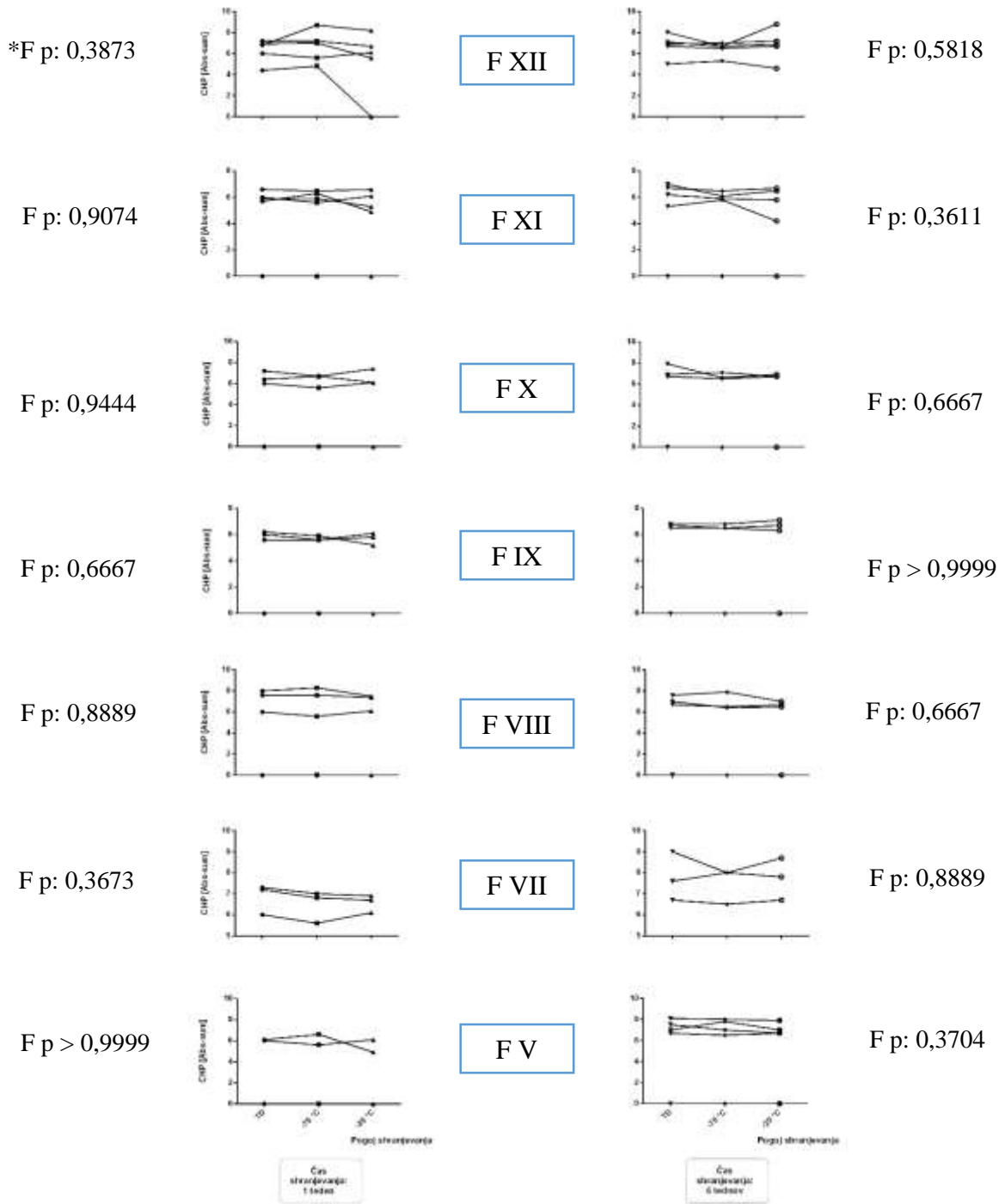
Pri parametrih analize CHP (CKP, CHP, CFP) nismo ugotovili statistično pomembnih razlik niti zaradi vplivov različnih pogojev zamrzovanja, niti zaradi vpliva časa shranjevanja (Graf 9-11, Preglednice VIII-XIV).



Graf 9: Celokupni koagulacijski potencial plazem brez posamičnega faktorja koagulacije

(*F p: p vrednost Friedman testa)

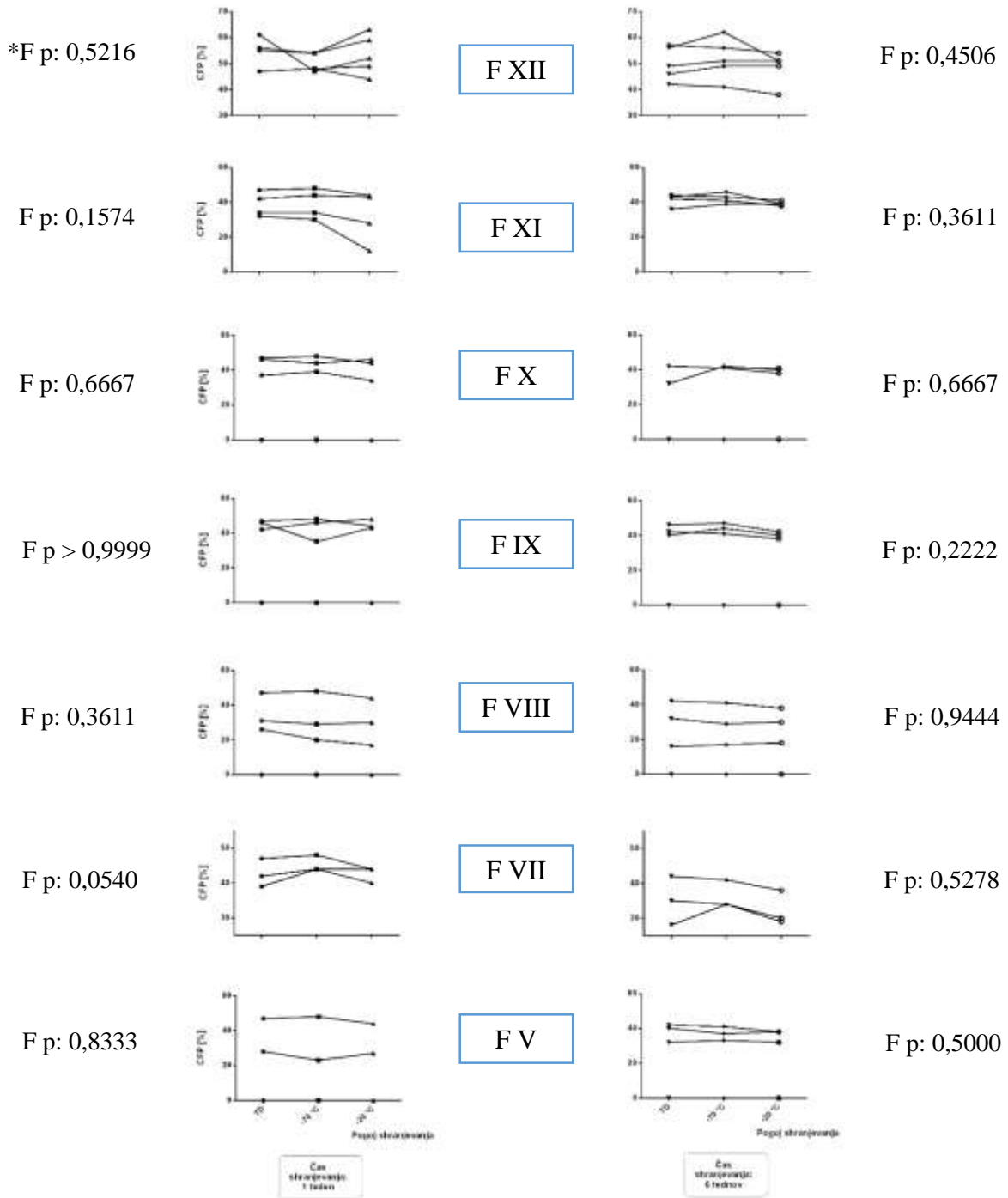
Posamezna črta na grafu prikazuje, kako se je CKP pri eni razredčini posamezne deficitne plazme spremenil po shranjevanju pri različnih pogojih. Puščice s pripadajočimi znaki (nad njimi) prikazujejo statistično pomembne razlike med skupinami (rezultati Dunnovega testa).



Graf 10: Celokupni hemostatski potencial plazem brez posamičnega faktorja koagulacije

(*F p: p vrednost Friedman testa)

Posamezna črta na grafu prikazuje, kako se je CHP pri eni razredčini posamezne deficitne plazme spremenil po shranjevanju pri različnih pogojih. Puščice s pripadajočimi znaki (nad njimi) prikazujejo statistično pomembne razlike med skupinami (rezultati Dunnovega testa).



Graf 11: Celokupni fibrinolitikni potencial plazem brez posamičnega faktorja koagulacije

(*F p: p vrednost Friedman testa)

Posamezna črta na grafu prikazuje, kako se je CFP pri eni razredčini posamezne deficitne plazme spremenil po shranjevanju pri različnih pogojih. Puščice s pripadajočimi znaki (nad njimi) prikazujejo statistično pomembne razlike med skupinami (rezultati Dunnovega testa).

5 RAZPRAVA

Shranjevanju vzorcev se v vsakdanji laboratorijski praksi včasih ne moremo izogniti. Priporočila CLSI glede zamrzovanja vzorcev za preiskave hemostaze so skopa in splošna (14, 18). Vpliv shranjevanja na posamezne komponente in s tem preiskave hemostaze še ni v zadostni meri pojasnjen, saj so si tudi rezultati raziskav na tem področju velikokrat nasprotujoči. Maloštevilne raziskave so imele še druge pomanjkljivosti – na primer metodološko šibkost, poenostavljeno statistično obdelavo rezultatov, majhne in slabo raznolike statistične vzorce (samo zdrave preiskovance, samo bolnike z določeno motnjo v hemostazi oziroma samo bolnike na terapiji z določenim zdravilom) (20, 42). Merjeni parametri so se lahko med shranjevanjem, pod vplivom različnih bolezenskih stanj oziroma zdravilnih učinkovin v plazmi, spreminjali z različno dinamiko (1, 14). Dodatno smo pri opredelitvi najdaljših priporočenih časov shranjevanja vzorcev z zamrzovanjem naleteli še na razkorak med statistično in klinično pomembnimi razlikami v rezultatih. Raziskave si namreč niso bile enotne o največjem odstopanju, ki še ne bi vplivalo na klinično obravnavo preiskovancev. Besselaar in sod. so izpostavili še vprašanje stabilnosti reagentov in analizatorjev ter s tem ponovljivosti meritev (33). Zlasti problematične so bile dolgoročne raziskave, kjer je pogosto prišlo do zamenjave celotnega reagenčnega kompleta (33, 37). Nekateri strokovnjaki so menili, da je imela nenatančnost v meritvah na rezultate celo večji vpliv kot sama stabilnost vzorca med shranjevanjem (26, 43). Prav tako obsežnih ugotovitev o stabilnosti koagulacijskih beljakovin v plazmi za transfuzijo ne moremo neposredno aplicirati na področje hemostaze (14, 18). Vsak laboratorij naj bi torej sam, glede na svoj običajen protokol obravnave vzorcev in pogoje shranjevanja, preveril in potrdil stabilnost posameznih komponent hemostaze ter njihov vpliv na rezultate koagulacijskih preiskav (14, 20, 25).

V naši raziskavi smo preučevali vpliv dveh najpogosteje uporabljenih temperatur zamrzovanja (-20 °C, -70 °C) in prednosti hipnega zamrzovanja v tekočem dušiku na pravilnost rezultatov osnovnih preiskav hemostaze in CHP v do 6 tednov shranjenih vzorcih. V raziskavo smo vključili tako navidezno zdrave preiskovance kot bolnike z različnimi srčnožilnimi obolenji. S pomočjo deficitnih plazem smo želeli definirati tudi koagulacijske faktorje, ki so bili na izbrane pogoje najbolj občutljivi in so zato pomembno vplivali na pravilnost rezultatov preiskav hemostaze po shranjevanju.

5.1 STABILNOST VZORCEV V KONTROLNI SKUPINI

Eno-tedensko shranjevanje pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ je APTČ statistično pomembno skrajšalo, pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa podaljšalo. Po šestih tednih se je APTČ pri vseh pogojih zamrzovanja statistično pomembno podaljšal, najbolj izrazito pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mediana APTČ skupine 6 tednov shranjenih vzorcev pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se je od mediane svežih vzorcev razlikovala za več kot 10 %, kar so v nekaterih raziskavah šteli kot klinično pomembno različen rezultat (17, 19). Samo pri vzorcih, ki smo jih pred shranjevanjem pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hipno zamrznili (skupina TD), med prvim in šestim tednom nismo zaznali statistično daljšega APTČ.

Postopno daljšanje APTČ, ki je bilo še posebej izrazito po hranjenju vzorcev pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, so v vzorcih zdravih preiskovancev ugotovili tudi mnogi drugi raziskovalci (18, 21, 30, 31, 32, 44). Rezultati teh raziskav so se razlikovali v najdaljšem času, ko statistično pomembnih razlik še niso zaznali (od 6 h (21, 31) do dveh tednov (18)), kar je bila verjetno posledica različno velikih skupin vzorcev, različnih reagentov v kombinaciji z analizatorji, višje koncentracije antikoagulantna (18, 31) in različnih statističnih metod. Kljub temu lahko sklepamo, da je bil glavni vzrok podaljšanja APTČ po zamrzovanju v termolabilnosti koagulacijskih faktorjev, med katerimi izstopata zlasti F VIII in F V (2, 14, 15, 18, 19, 26). Skladno z našimi ugotovitvami so Alesci in sod. manjše razlike APTČ v primerjavi s svežimi vzorci ugotovili po enakem času shranjevanja pri temperaturi $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v primerjavi z $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) ter pri vzorcih, ki so jih pred shranjevanjem hipno zamrznili. Statistično pomembnih razlik od svežega vzorca niso ugotovili zgolj po hipnem zamrzovanju in shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do mesca dni (30). Pri nas so bile razlike v medianah med svežimi vzorci in skupinama TD in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po prvem tednu shranjevanja zelo majhne. Menili smo, da so bile posledica nihanja v ponovljivosti meritev med serijami oziroma manjše aktivacije koagulacije med procesi zamrzovanja in taljenja.

Pomembnih razlik v APTČ zdravih preiskovancev že prvi teden po zamrzovanju pa niso ugotovili v vseh raziskavah (17, 18). Woodhams in sod. so stabilnost APTČ, z največ 10-odstotno razliko od svežega vzorca, določili za najmanj 8 mesecev pri $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter vsaj dve leti pri $-74\text{ }^{\circ}\text{C}$. Njihovi vzorci so bili odvzeti s plazmaferezo v večji količini zgolj 6 zdravim preiskovancem, po odvzemu dodatno centrifugirani, vsebniki pa so imeli tudi večjo koncentracijo antikoagulantna (0,129 mol/L) (18). Foshat s sod. je pri statistični analizi razlike

ugotavljal med rezultati APTČ posameznega svežega vzorca in vzorca po zamrzovanju in ne splošno med skupinama svežih vzorcev in vzorcev po zamrzovanju. Po eno-tedenskem shranjevanju pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ statistično pomembnih razlik v APTČ niso odkrili, po dveh tednih pa se je APTČ statistično pomembno podaljšal pri dveh vzorcih (od skupno 23), vendar so bile povprečne razlike vedno manjše od 10 % (17).

PČ se po zamrzovanju pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ od svežega vzorca ni statistično pomembno razlikoval niti po enem niti po šestih tednih shranjevanja, je bil pa statistično pomembno daljši po šestih tednih v primerjavi s prvim tednom shranjevanja. Po zamrzovanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ se je PČ statistično pomembno skrajšal ne glede na hitrost zamrzovanja in čas shranjevanja.

Tudi večina drugih raziskovalnih skupin je pri zdravih preiskovancih sorazmerno s časom shranjevanja pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ opazila daljšanje PČ (18, 30, 32). Po raziskavi Woodhams in sod. je bil PČ z največ 10-odstotno razliko od svežega vzorca dlje časa stabilen pri nižji temperaturi zamrzovanja (1 leto pri $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 leti pri $-74\text{ }^{\circ}\text{C}$) (18). Odsotnost statistično pomembno daljšega PČ pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v primerjavi s svežim vzorcem je bila v naši raziskavi morda posledica krajšega časa hranjenja (18, 30) in manjše skupine preiskovancev (32) kot v omenjenih raziskavah.

V nasprotju z našimi rezultati so statistično pomembno daljši PČ po shranjevanju pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v primerjavi s svežim vzorcem nekateri raziskovalci pričeli opazati že po 12. urah oziroma najkasneje v času enega tedna (17, 31, 32). Morda so razlike dokazali prej zaradi uporabe parametričnih statističnih metod z večjo statistično močjo in večjih skupin preiskovancev (največ 50). Alesci s sod. in Woodhams s sod. so daljšo stabilnost PČ oziroma kasnejši pojav statističnih razlik ugotovili po shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ v primerjavi z $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (18, 30). Pri vzorcih, ki so jih pred shranjevanjem pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hipno zamrznili, po prvem mesecu podaljšanje še ni bilo statistično pomembno, pri počasi zamrznjenih vzorcih pa že. Po shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ so po dveh mesecih opazili prehodno, statistično pomembno daljši PČ, po treh mesecih pa so se razlike zmanjšale pod mejo statistične pomembnosti ter znova narasle po 4 mesecih shranjevanja. Pri tej temperaturi je bilo podaljšanje statistično pomembno ne glede na hitrost zamrzovanja, razlike pa so bile manjše po hitrem zamrzovanju (30). Kot sem že navedla pri APTČ, so bili vzorci iz raziskave Woodhams in sod. bistveno drugačni od naših, zato rezultatov raziskav nismo mogli neposredno primerjati. Alesci in sod. so v raziskavo vključili zgolj 16

zdravih nekadilcev, pri naši kontrolni skupini pa podatkov o kajenju nimamo. V splošnem so razlike v stabilnosti PČ med laboratoriji v veliki meri povezane tudi z uporabo tromboplastinskih reagentov različne občutljivosti v kombinaciji z različnimi analizatorji (15, 20, 37).

Statistično pomembno skrajšanje PČ pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo pripisali aktivaciji koagulacijske kaskade po zunanji poti. Hladna aktivacija F VII je po raziskavah sicer pogostejša pri temperaturi okrog $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter naj bi se ji z zamrzovanjem vzorca pod $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ izognili (1, 14, 15, 41). Naša zamrzovalna omara je imela stalno temperaturo pod $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, zato je do aktivacije najverjetneje prišlo med procesi zamrzovanja oziroma taljenja (1, 15, 18). Posledica hladne aktivacije F VII je skrajšanje PČ, poraba koagulacijskih faktorjev zunanje in skupne poti pa dodatno lahko vodi v podaljšanje APTČ (15). To se tudi delno sklada z rezultati naše raziskave. Krajšanje PČ pa lahko povzročijo tudi preostale celice v plazmi. Nizke temperature poškodujejo celične membrane, predvsem trombocite pa sestavljajo tako fosfolipidi kot tudi mnoge prokoagulantne snovi v zrnih. Poškodovani levkociti lahko skrajšajo PČ preko izražanja tkivnega faktorja (1, 2, 45). Ta vzrok krajšega PČ je za naše vzorce malo verjeten, saj smo učinkovitost odstranitve celic s centrifugiranjem preverili s štejetjem celic v vseh kontrolnih vzorcih (št. trombocitov $<5\times 10^9/\text{L}$; št. levkocitov $0\times 10^9/\text{L}$; št. eritrocitov $<0,02\times 10^{12}/\text{L}$).

Niti čas shranjevanja (do 6 tednov) niti način in temperatura zamrzovanja nista statistično pomembno vplivala na rezultate koncentracije **D-dimera**.

Tudi rezultati drugih raziskav pri zdravih preiskovancih so D-dimer označili kot zelo stabilen analit (17, 18). Pri vseh meritvenih točkah v času dveh tednov pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ so Foshat in sod. opazili visoko variabilne razlike v odstopanju od svežega vzorca, ki niso bile statistično pomembne in so jih pripisali analitični občutljivosti analizatorja (17). Woodhams in sod. po kar dveh letih shranjevanja pri $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ oziroma $-74\text{ }^{\circ}\text{C}$ niso odkril niti klinično niti statistično pomembnih razlik v koncentraciji D-dimera (18). Zelo dobro stabilnost analita smo pripisali njegovi sestavi – majhna, dimerna molekula D-dimera je povezana s kovalentno vezjo, ki je relativno odporna na razgradnjo. Tudi imunološki princip meritve je eden izmed razlogov za zelo dobro ponovljive in pravilne rezultatov, saj merimo zgolj koncentracijo in ne aktivnosti.

Analize CHP v svežih vzorcih nismo izvedli, ker metoda ni avtomatizirana in se vedno izvaja v serijah. Tudi referenčne vrednosti v laboratoriju so prilagojene analizi po hipnem zamrzovanju in čim krajšem shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (< 1 teden). Zato nismo mogli točno določiti, kateri pogoj zamrzovanja je na vrednosti parametrov CKP, CHP in CFP najbolj oziroma najmanj vplival. Ker je CHP novejša preiskava, ki se še ne izvaja v rutinski klinični praksi, v literaturi tudi ni podatkov o stabilnosti njenih parametrov med shranjevanjem. Opremo se lahko le na splošne smernice CLSI ter sklepamo na podlagi podatkov o stabilnosti posameznih komponent koagulacije in fibrinolize.

Zamrzovanje pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je vplivalo na statistično pomembno nižji **CKP** od vrednosti pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po prvem in šestih tednih shranjevanja. Po šest-tedenskem shranjevanju pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ so bile vrednosti še dodatno statistično pomembno nižje od vrednosti po prvem tednu shranjevanja. Hipno zamrzovanje na stabilnost parametra ni statistično pomembno vplivalo.

Parameter CKP nam pove koagulacijsko sposobnost plazme ter odraža nivo nastalega trombina in fibrina. Sklepali smo, da so bile nižje vrednosti CKP pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ posledica vpliva temperature zamrzovanja na koagulacijske faktorje, katerih aktivnost se je s časom shranjevanja postopno še zniževala (15, 18, 19). Možnost pospešene koagulacije pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ zaradi prisotnih celic v plazmi smo z dokazom učinkovitosti centrifugiranja izključili.

Statistično pomembnih razlik v **CHP** po prvem tednu zamrzovanja nismo odkrili, po šestih tednih pa je počasno zamrzovanje pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ povzročilo statistično pomembno višji CHP v primerjavi s preostalima skupinama. Dodatno je bila vrednost CHP po šestih tednih v skupinah TD in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ statistično pomembno višja od vrednosti po prvem tednu shranjevanja.

Parameter CHP prav tako kot CKP odraža koncentracijo nastalega trombina in fibrina v vzorcu s to razliko, da nanjo vplivata tako koagulacija kot fibrinoliza, saj vzorcu dodamo tudi t-PA. Po šestih tednih pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ je bila bodisi pospešena koagulacija bodisi zavrti fibrinoliza. Ker so bile vrednosti CHP v skupini TD statistično pomembno nižje od skupine $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, je bilo počasnejše zamrzovanje pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ očitno tisto, ki je prispevalo pomembno razliko v primerjavi s svežim vzorcem. Ker celic v vzorcu ni bilo, so koagulacijo lahko ojačali s počasnim zamrzovanjem aktivirani koagulacijski faktorji (npr. F VII) (1, 2, 15). Na drugi strani je bila oslABLJENA fibrinoliza pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ lahko posledica poškodbe ali razgradnje beljakovine plazminogen, ki je

t-PA ni mogel več pretvoriti v aktiven plazmin in se je s časom shranjevanja stopnjevala. Tudi pomembna konformacijska sprememba fibrinogena oziroma fibrina lahko aktivnemu plazminu onemogoči delovanje. Woodhams in sod. so za fibrinogen in plazminogen pri največji 10 % razliki od svežega vzorca pri -70 °C dokazali vsaj dve-letno stabilnost (18). Vzroke za te razlike bo potrebno pojasniti in potrditi z nadaljnjimi raziskavami.

Statistično pomembno različne **CFP** smo dokazali po prvem in šestih tednih shranjevanja, z Dunnovim testom pa smo razlike med skupinami ugotovili samo po šestih tednih – CFP pri -20 °C je bil statistično pomembno nižji od CFP pri TD. Dodatno se je CFP pri TD in -70°C statistično pomembno znižal med prvim in šestim tednom shranjevanja.

Ker je CFP matematični izračun na osnovi CKP in CHP, je bilo sipanje rezultatov (kot vsota sipanj rezultatov CKP in CHP) precejšnje, zato nam o stabilnosti komponent in s tem procesov koagulacije ter fibrinolize med zamrzovanjem ni dal jasnih rezultatov. Po pričakovanjih smo opazili, da je bil trend rezultatov CFP v večji meri navadno nasproten CHP.

5.2 STABILNOST VZORCEV V SKUPINI BOLNIKOV

Vzorci v skupini bolnikov so bili naključni in zato zelo raznoliki – bolniki so imeli različne motnje v procesih hemostaze in/ali so prejeli terapijo z različnimi zdravili. Na podlagi omenjenih spremenljivk vzorcev nismo ločili v posamezne skupine, ker smo želeli opredeliti optimalne in splošne pogoje shranjevanja, pri katerih je vpliv na patološke vzorce v klinični praksi najmanjši.

Pri bolnikih se je, podobno kot pri kontrolni skupini, **APTČ** po shranjevanju pri -70 °C statistično pomembno skrajšal, pri -20 °C pa podaljšal. Hipno zamrzovanje pravilnosti APTČ po shranjevanju ni statistično pomembno spremenilo. Razlike med skupinami so bile enake po prvem in šestih tednih shranjevanja.

Za razliko od kontrole skupine se je APTČ pri bolnikih po shranjevanju pri -70 °C statistično pomembno skrajšal tako po prvem kot tudi šestih tednih shranjevanja. Razlog za ujemanje razlik smo pripisali večji skupini bolnikov ter vplivu različnih bolezenskih stanj in prisotnosti zdravilnih učinkovin v plazmi. Med naključnimi vzorci bolnikov je bilo veliko takšnih (večina

podaljšanih APTČ), pri katerih je šlo za spremljanje terapije s heparini. Slednje štejemo med antikoagulacijske zdravilne učinkovine, ki so občutljive na nizke temperature zamrzovanja in pri tem izgubijo del svoje aktivnosti. Dodatno v vzorcih, ki vsebujejo heparin, pri zamrzovanju lahko pride do njegove nevtralizacije preko sproščanja trombocitnega faktorja 4 iz trombocitnih granul α (15, 17, 23, 45, 46). Posledica zmanjšane heparinske aktivnosti je krajši čas do nastanka strdka. Ker smo učinkovito odstranitev celic s centrifugiranjem dokazali pri vseh kontrolnih vzorcih, smo pri nespremenjenih pogojih centrifugiranja to upoštevali tudi pri vzorcih bolnikov in zato izključili verjetnost kontaminacije plazme s celicami. Awad in sod. so pri bolnikih na terapiji s heparinom meritev APTČ priporočali samo takoj po odvzemu vzorca (21).

Razlog za daljši APTČ pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je bil v skupini bolnikov verjetno enak kot pri kontrolni skupini (18, 19). Rezultati študije Woodhamsa in sod. pa so pokazali, da se upad aktivnosti labilnih faktorjev koagulacije zgodi tudi pri nizkih temperaturah zamrzovanja, le da je manjši in se stopnjuje počasneje (18). Nedavno sta tako Gosselin in Dwyre v svoji študiji tudi po hipnem zamrzovanju in eno-tedenskem shranjevanju vzorcev pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ugotovila statistično pomemben upad aktivnosti F V in F VIII ter posledično statistično pomembno daljši APTČ. (19). Študija Gosselina in Dwyra je zajela 51 naključnih bolnikov. Glede na rezultate in ugotovitve smo sklepali, da njuna preiskovana skupina ni vsebovala veliko bolnikov na terapiji s heparini, kot je bilo to v našem primeru.

Obstaja zelo malo raziskav, ki so po zamrzovanju vzorcev bolnikov določile pravilne rezultate APTČ s statistično nepomembnim odstopanjem od svežega vzorca. Foshat in sod. so analizirali APTČ v vzorcih bolnikov, ki so prejeli terapijo z AVK in pri bolnikih z jetrnimi boleznimi. V nasprotju z našimi rezultati po dveh tednih shranjevanja pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v splošnem niso ugotovili pomembnih razlik v APTČ. Pri nekaj vzorcih so po 4-ih in 48-ih urah shranjevanja sicer opazili statistično pomembne razlike v rezultatih, ki bi morda lahko vplivale na klinično obravnavo posameznih preiskovancev. Vpliv shranjevanja so določili pri vsakem posameznem bolniku in ne v celotni skupini (17). Znatno bolj pravilni rezultati APTČ po shranjevanju so bili pri tej raziskavi lahko tudi posledica izbranih vzorcev, v katerih ni bilo heparinov.

Trend PČ pri posameznem pogoju shranjevanja je v skupini bolnikov sledil že ugotovljenemu trendu v kontrolni skupini – PČ se je po shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ statistično pomembno skrajšal

v primerjavi s skupinama svežih vzorcev in vzorcev pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, med katerima pa razlik ni bilo. Hipno zamrzovanje ni statistično pomembno vplivalo na pravilnost rezultatov preiskave po shranjevanju. Razlike med skupinami so bile enake po prvem in šestih tednih shranjevanja.

Tudi Gosselin in Dwyre sta v vzorcih 56 naključnih bolnikov z normalnimi in podaljšanimi koagualcijskimi časi ugotovila statistično pomembne razlike PČ že po tednu dni shranjevanja pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki pa so bile manjše od 10 % (19). Pri tej temperaturi je očitno prišlo do aktivacije koagulacije po zunanji poti. Ker so bili sicer rezultati med kontrolno skupino in bolniki skladni, smo sklepali, da PČ ni bil tako občutljiv na različne motnje v koagulaciji oziroma prisotnost zdravil v plazmi.

Veliko drugih raziskovalcev pa je bolj pravilne rezultate PČ v splošnem ugotovilo pri nižjih temperaturah zamrzovanja (pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ v primerjavi z $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) (17, 33, 47). Raziskovalna skupina Van den Besselaar in sod. je opazila, da je stabilnost komponent preiskave PČ z nižanjem temperature shranjevanja naraščala. Iz plazme bolnikov na terapiji z AVK in plazme zdravih preiskovancih so pripravili 6 zmesnih plazem z različno vrednostjo INR. PČ je imel v teh plazmah sprejemljivo odstopanje od svežega vzorca pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do treh let (razlike $\pm 2\%$), medtem ko se je v zmesnih plazmah, ki so bile shranjene pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, podaljševal relativno sorazmerno s časom shranjevanja. Vsi vzorci pa so bili pred shranjevanjem na ciljni temperaturi zamrznjeni v zamrzovalni omari s temperaturo $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (33). Grau in sod. pri bolnikih na terapiji z AVK niso ugotovili pomembnih razlik INR po eno-mesečnem shranjevanju pri $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (47). Foshat in sod. so vzorce 18 bolnikov na terapiji z AVK in bolnikov z jetrnimi boleznimi shranjevali do dva tedna pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po dveh dneh so ugotovili samo prehodno statistično pomembno daljši PČ (17). Omenjene raziskave so imele majhne skupine in/ali slabo raznolike vzorce, saj so zajeli le nekaj bolezenskih stanj in zdravilnih učinkovin iz vsakodnevne klinične prakse. Razlik med prvim in šestim tednom pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v naši raziskavi morda nismo ugotovili tudi zaradi uporabe manj občutljivega neparametričnega statističnega testa. Prav tako bi bile razlike morda bolj očitne po daljšem shranjevanju.

Za razliko od kontrolne skupine je bila koncentracija **D-dimera** pri bolnikih po enem tednu shranjevanja pri vseh pogojih zamrzovanja statistično pomembno višja od vrednosti v svežih

vzorcih, po šestih tednih pa razlike nismo zaznali, čeprav je bila blizu meje statistične pomembnosti ($p = 0,07$).

Prehodno povišanje koncentracije D-dimera, ki se je po dveh tednih znižala na izhodno raven, je pri sicer zdravih preiskovancih opisal že Foshat s sod. (17). Opažene spremembe bi lahko bile posledica povečane motnosti v plazmi (precipitacija beljakovin, zdravilnih učinkovin med zamrzovanjem/taljenjem) in specifičnosti protiteles, ki se na primer lahko vežejo na z zamrzovanjem spremenjeno zdravilno učinkovino, ter s tem napačne meritve. V vseh teh primerih bi statistično pomembne razlike sicer pričakovali tudi po šestih tednih shranjevanja. Za natančno opredelitev vzroka razlik bodo potrebne dodatne raziskave.

Večina raziskav pomembnih razlik v koncentraciji D-dimera zaradi zamrzovanja ni odkrila (17, 27, 48). Rezultati raziskave Foshata in sod. pri bolnikih na terapiji z AVK ter bolnikih z jetrnimi boleznimi v času dveh tednov pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ niso pokazali statistično pomembnih razlik (17). Božič in Stegnar sta pri bolnikih s sumom na globoko vensko trombozo po hipnem zamrzovanju in najmanj dvo-dnevnem shranjevanju vzorcev pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ opazili rahel porast koncentracije, ki pa ni bil statistično pomemben (48). Schutgens in sod. v skupini bolnikov z različnimi motnjami koagulacije tudi po dve-letnem shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ niso zaznali nobenih pomembnih sprememb v koncentraciji D-dimera (27).

CKP je bil tudi v skupini bolnikov po shranjevanju pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ statistično pomembno nižji od vrednosti CKP po shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tako po prvem, kot tudi šestih tednih shranjevanja. Hipno zamrzovanje stabilnosti parametra ni pomembno spremenilo.

Rezultati so potrdili zgoraj opisano hipotezo o občutljivosti heparina na nizke temperature, saj v prisotnosti heparina CKP ni bil merljiv in so bili tako v statistično analizo vključeni samo vzorci brez heparina.

Za razliko od kontrole skupine smo pri bolnikih ugotovili, da je bil **CHP** pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ statistično pomembno nižji v primerjavi s CHP pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po prvem in šestih tednih shranjevanja. Hipno zamrzovanje ni statistično pomembno vplivalo na stabilnost parametra.

Pri nižji temperaturi zamrzovanja je bila bodisi pospešena koagulacija bodisi zavrtta fibrinoliza. Poleg že navedenih vzrokov pri kontrolni skupini, smo pri širšem pregledu rezultatov opazili

skupen trend med rezultati CHP in CKP. Nižja vrednost CKP pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je kazala na zavrto koagualcijo, ki smo jo pripisali temperaturni občutljivosti koagulacijskih beljakovin. Posledično je bil v plazmi prisoten manjši fibrinski strdek, zato je bila nižja tudi vrednost CHP. Predpostavili smo, da so bile koagulacijske beljakovine oziroma na splošno proces koagulacije bolj občutljivi na spremembe v temperaturi. Proces fibrinolize je odvisen od procesa koagulacije, zato je sledil njegovemu trendu. Neskladne ugotovitve med kontrolno skupino in skupino bolnikov smo pripisali slabše reprezentativnim rezultatom v relativno majhni kontrolni skupini. Poleg tega so bili rezultati v kontrolni skupini bolj homogeni (z majhnim razponom) in je bilo zato razlike težje statistično dokazati kot pri širokem razponu rezultatov CHP v skupini bolnikov.

V nasprotju z rezultati pri kontrolni skupini smo statistično pomembne razlike v **CFP** dokazali samo po eno-tedenskem shranjevanju – CFP pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je bil statistično pomembno nižji od vrednosti v skupini $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzrok za neskladne rezultate brez izrazitega trenda je bil v velikem sipanju parametra CFP, ki smo ga opisali že pri kontrolni skupini.

5.2.1 Vrednosti izven referenčnih območij

V naši raziskavi smo za klinično pomembne razlike šteli tiste, pri katerih je rezultat preiskave posameznega vzorca po shranjevanju spremenil svoj neposredni klinični pomen – bodisi je v primerjavi s svežim vzorcem padel v ali izven referenčnega območja za posamezno preiskavo. Razlike v številu vrednosti izven referenčnega območja pri posamezni preiskavi in pogoju shranjevanja so v glavnem sledile trendu, ki smo ga že opisali pri skupini bolnikov.

Že po eno-tedenskem shranjevanju pri različnih pogojih smo diagnostično neustrezne vrednosti APTČ izmerili 2,5 – 3,7 % bolnikom, po dolgoročnem shranjevanju pa kar 6,3 – 7,7 % bolnikom. Pri PČ smo najmanj razlik ugotovili po shranjevanju pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ – približno 1,3 % bolnikom smo po enem tednu določili lažno povišano vrednost INR, po šestih tednih pa lažno normalno. Neskladje v rezultatih je bilo posledica vrednosti INR blizu referenčne meje ter najverjetneje tudi variabilnosti znotraj osebkov. Po shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo 2,4 % (1 teden) – 3,5 % bolnikom (6 tednov) določili lažno normalno vrednost PČ. Pri D-dimeru smo najmanj klinično pomembno višjih rezultatov izmerili po shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po prvem (1,3 – 2,5

%) in šestih tednih shranjevanja (0,7 %). Po shranjevanju pri -20 °C smo neustrezne vrednosti D-dimera po prvem tednu določili 5 % bolnikom, po šestih tednih pa 2,1 % bolnikom.

Število vrednosti CKP, CHP in CFP izven referenčnega območja pri nobenem pogoju shranjevanja ni pokazalo jasnega trenda. Pri istem pogoju zamrzovanja (npr. -20 °C) je bilo število vrednosti CKP izven referenčnih meja po prvem tednu višje, po šestih tednih pa nižje. Večje razlike so bile v glavnem vidne po šest-tedenskem shranjevanju ter predvsem pri CFP, kjer se je združilo sipanje v rezultatih CKP in CHP (po šestih tednih pri -20 °C smo kar 13 % bolnikom pripisali klinično pomembno različne vrednosti CFP). Menili smo, da so bili tako raznoliki rezultati posledica biološke variabilnosti znotraj osebkov, različnih zdravilnih učinkovin v plazmi ter pomanjkljivosti različnih komponent hemostaze.

Rezultati raziskave so pokazali, da rezultatov preiskav oziroma parametrov hemostaze po shranjevanju ne moremo neposredno primerjati z referenčnimi vrednostmi, ki so bile določene na veliki populaciji svežih vzorcev, saj to vodi v napačne klinične odločitve. V ta namen bi bilo potrebno na vzorcih, ki bi bili obdelani, shranjeni in analizirani na enak način kot vzorci bolnikov v vsakdanji klinični praksi, določiti nove oziroma prilagoditi obstoječe referenčne vrednosti.

5.3 STABILNOST PLAZEM BREZ POSAMIČNIH FAKTORJEV KOAGULACIJE

Občutljivosti ključnih koagulacijskih faktorjev smo določali na osnovi naslednje predpostavke: če določenega koagulacijskega faktorja v plazmi ni bilo, so pomembne razlike med različnimi pogoji shranjevanja kazale na občutljivost drugih, v tem vzorcu prisotnih koagulacijskih faktorjev.

Preko analize APTČ smo opredelili občutljivost faktorjev notranje in skupne poti koagulacije. Na osnovni zgoraj navedene predpostavke smo sklepali, da je na pravilnost preiskave APTČ po zamrzovanju najbolj vplivala nestabilnost F V. Glede na p vrednosti Friedman testa mu je sledil F X, njemu pa F VIII in F XII. Na različne pogoje zamrzovanja sta bila po naših rezultatih najmanj občutljiva F XI in F IX. Ugotovljene razlike so bile posledica statistično pomembno

daljšega APTČ pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v primerjavi z $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tako po prvem kot tudi šestih tednih shranjevanja.

O občutljivosti faktorjev zunanje in skupne poti koagulacije smo sklepali na osnovi rezultatov PČ. Za najbolj nestabilna sta se ponovno izkazala F V in F VIII, medtem ko so bili drugi faktorji relativno stabilni. Kljub temu, da F VIII ni neposredno udeležen pri zunanji poti koagulacije, novejši izsledki kažejo na posredno aktivacijo notranje poti preko F VII. Pri primerjavi različnih pogojev zamrzovanja je izstopal statistično pomembno daljši PČ plazem brez posamičnih koagulacijskih faktorjev po shranjevanju pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v primerjavi s svežimi plazmami. V skupini bolnikov in kontrol pa smo ravno med svežimi vzorci in vzorci po shranjevanju pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ določili najboljše ujemanje. Vendar sveži vzorci pri analizi deficitnih plazem niso bili sveži vzorci, ampak sveže raztopljeni liofilizirani reagenti, ki smo jih redčili v različnih razmerjih.

Statistična analiza parametrov preiskave CHP (CKP, CHP, CFP) pri nobeni deficitni plazmi ni pokazala statistično pomembnih razlik med različnimi pogoji shranjevanja. Vzrok je lahko bil v manjšem številu meritev ter že omenjeni uporabi liofiliziranih reagentov.

Večina raziskovalcev je skladno z našimi rezultati za najbolj labilne koagulacijske faktorje ugotovila faktorje notranje poti koagulacije. V labilnosti je izrazito vodil F VIII, ki sta mu sledila F V in F X (18, 19, 21, 26, 36). Tudi Woodhams in sod. so ugotovili, da sta bila pri $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ najbolj nestabilna F VIII in F X, saj se je 10-odstotna razlika od svežega vzorca pojavila že po 3-4 mesecih (18). Naša raziskava na plazmah brez posamičnih koagulacijskih faktorjev tudi potrjuje najboljšo stabilnost koagulacijskih faktorjev pri nižjih temperaturah zamrzovanja (18, 19). Po rezultatih mnogih raziskav se je statistično in klinično pomemben upad v koncentraciji beljakovin oziroma aktivnosti koagulacijskih faktorjev pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pojavil prej in s časom shranjevanja napredoval hitreje (18, 19, 49). Gosselin in Dwyre sta sicer tudi že teden dni po hipnem zamrzovanju in shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ugotovila statistično pomemben upad aktivnosti F V in F VIII, ki pa ne bi vplival na klinično obravnavo preiskovancev ($<15\%$ razlika APTČ od svežega vzorca) (19). Torej kljub temu, da so se statistično pomembne razlike v aktivnosti labilnih koagulacijskih faktorjev pojavile že mnogo prej, so Woodhams in sod. v plazmi, odvzeti s plazmaferezo, pri $-74\text{ }^{\circ}\text{C}$ večini koagulacijskih faktorjev določili vsaj dve-letno stabilnost, F VIII in XI pa največ leto in pol (razlike od svežega vzorca manjše od 10%) (18). Za natančno

analizo aktivnosti F VIII ter v izogib napačnim kliničnim odločitvam pa so Awad in sod. priporočili meritev samo v svežih vzorcih. V skupini 10 zdravih preiskovancev so po 24 urah pri -40 °C namreč opazili kar 40 – 45 % upad aktivnosti F VIII (21).

Kot že omenjeno, je Woodhams s sod. večjo občutljivost po shranjevanju pri -24 °C določil tudi F IX in XI, česar pa mi nismo ugotovili (18). F V in F VIII sta bila tudi bolj stabilna v plazmi, ki je bila zamrznjena hipno oziroma čim hitreje (29, 36). Rezultati teh raziskav so bili izvedeni na plazmah, ki so jo s postopkom plazmafereze odvzeli v večjem volumnu manjšemu številu zdravih preiskovancev (do 12). Akerbloom in sod. so aktivnost F VIII določali v plazmi z antikoagulantom CPD, Swärd-Nilsson s sod. pa v plazmi z večjo koncentracijo natrijevega citrata (razmerje 1:16) (29, 36). Aktivnost koagulacijskih faktorjev so določali tudi s povsem drugačnimi, bolj občutljivimi analiznimi metodami kot v naši raziskavi (18, 29, 36).

5.4 PREDLOGI ZA NADALJNJE RAZISKAVE

Idealno bi bilo, če bi vpliv časa shranjevanja pri enakem pogoju zamrzovanja v vzorcih bolnikov določali s primerjavo dveh skupin parnih vzorcev – vzorci istih bolnikov shranjeni pri različnih pogojih 1 teden in 6 tednov. S tem bi povečali moč statistične primerjave. Žal je bil v naši raziskavi volumen vzorca posameznega bolnika iz rutinske klinične prakse za takšno primerjavo premajhen.

Analizirali smo vzorce z eno samo koncentracijo antikoagulanta (natrijevega citrata), čeprav se v klinični praksi lahko uporabljata dve različni. Prav tako so bile epruvete, reagenti in aparat od enega proizvajalca. Obstaja možnost, da so bili naši rezultati deloma specifični za kombinacijo omenjenih pogojev (vzorec, epruvete, reagenčni komplet, analizator) oziroma naš protokol analize ter bi se pri drugačnih pogojih razlikovali.

6 SKLEP

Rezultati naše raziskave kažejo, da shranjevanje vzorca z zamrzovanjem pomembno vpliva na stabilnost ključnih komponent hemostaze ter s tem na pravilnost rezultatov preiskav. Razlike med različnimi pogoji shranjevanja z zamrzovanjem v največji meri izvirajo iz občutljivosti koagulacijskih faktorjev na nizke temperature zamrzovanja. V plazmi bolnikov na stabilnost vzorcev poleg omenjenega vplivajo tudi sočasno prisotne zdravilne učinkovine ter različni bolezenski procesi (predvsem koagulopatije).

V splošnem so rezultati izbranih preiskav hemostaze v do 6 tednov shranjenih vzorcih bolj pravilni, če vzorce shranimo pri temperaturi pod $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ v primerjavi z $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Višja temperatura zamrzovanja ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) je ustrežnejša zgolj za kratko shranjevanje vzorcev za analizo PČ (manj kot 6 tednov), medtem ko je D-dimer stabilen oziroma na pogoje zamrzovanja odporen analit. Parameter CKP kaže postopen upad koagulacijske sposobnosti plazme pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, parameter CHP pa bodisi pospešeno koagulacijo bodisi zavrto fibrinolizo po 6 tednih pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Slednje bo potrebno dodatno raziskati. Vse navedene ugotovitve lahko podpremo z dokazano najbolje ohranjeno aktivnostjo koagulacijskih faktorjev po eno-tedenskem shranjevanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. F V in F VIII sta resnično najbolj temperaturno labilna koagulacijska faktorja, ki pomembno vplivata na rezultate preiskav hemostaze.

Poleg temperature zamrzovanja na stabilnost komponent hemostaze pomembno vplivata tudi način in čas shranjevanja. Hipno zamrzovanje pred shranjevanjem pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomembno izboljša stabilnost komponent notranje poti koagulacije, kar postane pomembno po daljšem času shranjevana. Z daljšanjem shranjevanja se stabilnost komponent hemostaze in s tem pravilnost rezultatov koagulacijskih preiskav, z izjemo D-dimera, še dodatno zmanjšuje.

Nenazadnje je zelo pomembna tudi ugotovitev, da je razlaga rezultatov koagulacijskih preiskav na vzorcih po zamrzovanju lahko zavajajoča. Če referenčne vrednosti za sveže vzorce uporabimo neposredno za interpretacijo rezultatov na vzorcih po zamrzovanju, lahko pridemo do napačne klinične odločitve. Referenčna območja bi bilo zato potrebno prilagoditi oziroma pri izdajanju rezultatov slednjim dodati ustrezno opozorilo za previdnost pri interpretaciji.

7 LITERATURA

1 Moore G, Blann AD, Knight G: Hematology, Haemostasis in health and disease. Fundamentals of Biomedical Science, Oxford University Press, Oxford, 2010: 433-612.

2 Stegnar M: Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Klinični oddelek za žilne bolezni (Interna klinika, KC Ljubljana), Ljubljana, 2005.

3 DeLoughery TG: Hemostasis and Thrombosis (2. izdaja). Landes Bioscience, Vademecum, Georgetown, Texas, 2004.

4 Practical-hemostasis.com. URL:

<http://practical-haemostasis.com/index.html> (Dostopano september 2015)

5 The medical biochemistry page/blood coagulation. URL:

<http://themedicalbiochemistrypage.org/blood-coagulation.php> (Dostopano september 2015)

6 Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Mirta K, Černelč P (ur.: Andoljšek D): Interna medicina, Bolezni krvi in krvotvornih organov, Hemostaza. Littera picta, Ljubljana, 2011 (dop.2014): 1360-1389.

7 Van Geffen M, Van Heerde WL: Global haemostasis assays, from bench to bedside. Thromb Res 2012; 129: 681-87.

8 He S, Bremme K, Blombäck M: A laboratory method for determination of overall haemostatic potential in plasma. I. Method design and preliminary results. Thromb Res 1999; 96: 145-56.

9 Curnow JL, Morel-Kopp M-C, Roddie C, Aboud M, Ward CM: Reduced fibrinolysis and increased fibrin generation can be detected in hypercoagulable patients using overall hemostatic potential assay. J Thromb Haemost 2007; 5: 528-34.

10 He S, Antovic A, Blombäck M: A simple and rapid laboratory method for determination of haemostasis potential in plasma. II. Modification for use in routine laboratories and research work. Thromb Res 2001; 103: 355-61.

11 Antovic A: The overall hemostasis potential: A laboratory tool for the investigation of global hemostasis. Semin Thromb Haemost 2010; 36(7): 772-9.

- 12** Antovic A, Blömbäck M, Bremme K, Van Rooijen M, He S: Increased haemostasis potential persists in women with previous thromboembolism with or without APC resistance. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2531-5.
- 13** Antovic JP, Antovic A, Sten-Linder M, Wramsby M, Blömbäck M: Overall hemostatic potential (OHP) assay – a possible tool for determination of prothrombotic pattern in F XII deficiency. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2058-60.
- 14** CLSI: Collection, transport, and processing of blood samples for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays. Approved guideline: 5th ed. (H21-A5). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008; 28(5).
- 15** Adcock Funk DM, Lippi G, Favaloro EJ: Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38: 576-85.
- 16** Favaloro EJ, Adcock Funk DM, Lippi G: Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *Lab Med* 2012; 43 (2): 1-10.
- 17** Foshat M et al.: Effect of freezing plasma at -20°C for 2 weeks on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, Dilute Russell Viper Venom Time, activated protein C resistance, and D-dimer levels. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015, 21(1): 41-47.
- 18** Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y: Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 229-36.
- 19** Gosselin RC, Dwyre DW: Determining the effect of freezing on coagulation testing: comparison of results between fresh and once frozen-thawed plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015; 26: 69-74.
- 20** Van Geest-Daalderop JH, Mulder AB, Boonman-de Winter LJ, Hoekstra MM, van den Besselaar AM: Preanalytical variables and off-site blood collection: Influences on the result of the prothrombin time/International Normalized Ratio test and implications for monitoring of oral anticoagulant therapy. *Clin Chem* 2005; 51(3): 561-8.
- 21** Awad MA, Sharaf Eldeen OA, Ibrahim HA: Stability of activated partial thromboplastin time (APTT) test under different storage conditions. *Hematology* 2006; 11(5/6): 311-15.

- 22** Heil W, Grunewald R, Amend M, Heins M: Influence of time and temperature on coagulation analytes in stored plasma. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36(7): 459-62.
- 23** Adcock D, Kressin D, Marlar RA: The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests, *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9(6): 463-70.
- 24** CLSI: Quantitative D-dimer for the exclusion of venous thromboembolic disease. Approved guideline (H59-A). Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute, 2011; 31(6).
- 25** Zhao Y, Lv G: Influence of temperature and storage duration on measurement of activated partial thromboplastin time, D-dimers, fibrinogen, prothrombin time and thrombin time, in citrate-anticoagulated whole blood specimens. *Int Jnl Lab Hem* 2013; 35: 566-70.
- 26** Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L: Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb and Haemost* 2008; 99(2): 416-26.
- 27** Schutgens REG et al.: No influence of heparin plasma and other (pre)analytic variables on D-dimer determinations. *Clin Chem* 2002; 48(9): 1611-13.
- 28** Kemkes-Matthes B, Fischer R, Peetz D: Influence of 8 and 24-h storage of whole blood at ambient temperature on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, thrombin time, antithrombin and D-dimer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011; 22(3).
- 29** Swärd-Nilsson AM, Persson PO, Johnson U, Lethagen S: Factors influencing factor VIII activity in frozen plasma. *Vox Sang*, 2006; 90: 30-39.
- 30** Alesci S, Borggreffe M, Dempfle CE: Effect of freezing method and storage at -20°C and at -70°C on prothrombin time, aPTT and plasma fibrinogen levels. *Thromb Res* 2009; 124: 121-26.
- 31** Rao LV, Okorodudu AO, Peterson JR, Elghetany MT: Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests under different storage conditions. *Clinica Chimica Acta*, 2000; 300: 13-21.

- 32** Hassan NA, Ali EW, Mohammed NA, Ibrahim IK, Khalil HB: The effect of freezing storage of citrated plasma on prothrombin time and activated partial thromboplastin time. *Asian journal of biomedical & pharmaceutical sciences*, 2013; 3(23): 18-19.
- 33** Van der Besselaar AMHP, Witteveen E, van der Meer FJM: Long-term stability of frozen pooled plasmas stored at -70°C, -40°C, and -20°C for prothrombin time and International Normalized Ratio (INR) assessment. *Thrombosis research* 2013; 131: 349-51.
- 34** Lewis MR, Callas PW, Jenny NS, Tracy RP: Longitudinal stability of coagulation, fibrinolysis and inflammation factors in stored plasma samples. *Thromb Hemost*, 2001; 86: 1495-500.
- 35** NCCLS: Determination of factor coagulant activities; Approved guideline (H48-A). Wayne, PA: The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997; 17(4).
- 36** Åkerblom O et al.: Freezing technique and quality of fresh-frozen plasma. *Infusionsther Transfusionmed* 1992; 19: 283-87.
- 37** Davis KD, Danielson CFM, May LS, Han Z: Use of different thromboplastin reagents causes greater variability in international normalized ratio results than prolonged room temperature storage of specimens. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 972-77.
- 38** Von Heymann C et al.: Thawing procedures and the time course of clotting factor activity in fresh frozen plasma. *Anesth Analg* 2006; 103(4): 969-74.
- 39** Valeri CR, Ragno G: The effect of storage of fresh-frozen plasma at -80° for as long as 14 years on plasma clotting proteins. *Transfusion* 2005; 45: 1829-30.
- 40** Simon TL: Changes in plasma coagulation factors during blood storage. *Plasma therapy & transfusion technology* 1988; 9(3): 309-15.
- 41** Omran S et al: Effect of cold storage on the haemostatic cascade systems. *Transfus Sci*, 1996; 17(3): 407-414.
- 42** Christensen TD, Jensen C, Larsen TB, Maegaard M, Christiansen K, Sørensen B: International normalized ratio (INR), coagulation factor activities and calibrated automated

thrombin generation – influence of 24h storage at ambient temperature. *Int Jnl Lab Hem* 2010; 32: 206-14.

43 Feng L, Zhao Y, Zhao H, Shao Z: Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep.* 2014; 4: 3868.

44 Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Poli G, Guidi GC: Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *International Journal of laboratory hematology* 2009; 31:462-467.

45 Lippi G et al.: Influence of residual platelet count on routine coagulation, factor VIII, and factor IX testing in postfreeze-thaw samples. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(7): 835-39.

46 Anstall HB, Grove-Rasmussen M: The influence of low temperature-storage on the heparin tolerance of human plasma. *Transfusion* 1961; 1: 94-8.

47 Grau E et al.: Monitoring oral anticoagulant treatment from plasma stored for up to 48 hours and frozen plasma. *Hematologica* 1999; 84(7): 633-36.

48 Božič M, Stegnar M: Validation of an automated immunoturbidimetric assay for measurement of plasma D-dimer. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41 (7): 958-962.

49 Klasen IS, Reichert LJM, de Kat Angelino CM, Wetzels JFM: Quantitative determination of low and high molecular weight proteins in human urine: influence of temperature and storage time. *Clin Chem* 1999; 45(3): 430-2.

8 VIRI SLIK

Slika 3: Vsebniki za vzorce. URL:

<http://www.clker.com/clipart-white-eppendorf.html> (Dostopano september 2015)

Slika 4: Mikrotitrna ploščica. URL:

http://thco1.so-buy.com/front/bin/ptdetail.phtml?Part=B-NUNC_Microtiter-UVplate

(Dostopano januar 2016)

9 PRILOGE

Preglednica IV: Rezultati osnovnih preiskav hemostaze pri kontrolni skupini

		1 teden	6 tednov	
Preiskava	Pogoj shranjevanja	Mediana (1.-3. kvartil)	Mediana (1.-3. kvartil)	W p*
APTČ [s]	Svež vzorec	32,1 (28,8 – 34,1)		
	TD	32,0 (29,6 – 34,9)	32,5 (30,3 – 35,0)	0,1565
	-70 °C	32,0 (29,6 – 35,0)	32,4 (30,4 – 34,9)	0,0469
	-20 °C	34,6 (30,5 – 37,0)	35,5 (32,5 – 38,8)	< 0,0001
Friedman p*		< 0,0001	< 0,0001	
PČ [INR]	Svež vzorec	1,09 (1,08 – 1,14)		
	TD	1,07 (1,04 – 1,09)	1,06 (1,01 – 1,08)	0,1076
	-70 °C	1,06 (1,03 – 1,08)	1,06 (1,01 – 1,08)	0,3801
	-20 °C	1,09 (1,04 – 1,15)	1,10 (1,05 – 1,17)	0,0136
Friedman p		< 0,0001	< 0,0001	
D-dimer [µg/L]	Svež vzorec	130 (94 – 245)		
	TD	133 (81 – 235)	128 (81 – 232)	0,3558
	-70 °C	136 (81 – 214)	123 (65 – 220)	0,2129
	-20 °C	143 (81 – 263)	103 (63 – 268)	0,5902
Friedman p		0,0760	0,6203	

* Friedman p: p vrednost Friedman testa; W p: p vrednost Wilcoxonovega parnega testa

Preglednica V: Rezultati celokupnega hemostatskega potenciala pri kontrolni skupini

Preiskava	Pogoj shranjevanja	1 teden Mediana (1.-3. kvartil)	6 tednov Mediana (1.-3. kvartil)	W p*
CKP [Abs-sum]	TD	19,3 (16,2 – 20,3)	19,7 (16,3 – 20,7)	0,1622
	-70 °C	19,5 (17,3 – 22,5)	19,6 (17,1 – 21,2)	0,6400
	-20 °C	17,0 (15,3 – 20,3)	15,2 (11,6 – 19,7)	0,0218
Friedman p*		< 0,0001	< 0,0001	
CHP [Abs-sum]	TD	8,1 (6,6 – 8,6)	8,8 (6,9 – 10,3)	0,0054
	-70 °C	8,2 (7,1 – 9,6)	9,8 (7,9 – 11,1)	0,0014
	-20 °C	7,7 (6,2 – 9,9)	7,6 (5,9 – 10,1)	0,3687
Friedman p		0,9275	0,0041	
CFP [%]	TD	59 (57 – 62)	56 (50 – 61)	0,0059
	-70 °C	60 (55 – 63)	52 (48 – 58)	0,0005
	-20 °C	57 (49 – 60)	50 (44 – 58)	0,1307
Friedman p		0,0366	0,0250	

* Friedman p: p vrednost Friedman testa; W p: p vrednost Wilcoxonovega parnega testa

Preglednica VI: Rezultati osnovnih preiskav hemostaze pri bolnikih

		1 teden	6 tednov	
Preiskava	Pogoj shranjevanja	Mediana (1.-3. kvartil)	Mediana (1.-3. kvartil)	MW p*
APTČ [s]	Svež vzorec	36,5 (30,9 – 41,1)	34,6 (30,4 – 43,1)	0,4867
	TD	35,6 (30,9 – 41,3)	33,0 (29,2 – 41,3)	0,1040
	-70 °C	36,0 (30,8 – 41,6)	33,2 (29,2 – 42,2)	0,1068
	-20 °C	38,3 (32,7 – 44,5)	36,3 (31,5 – 44,8)	0,2714
Friedman p*		< 0,0001	< 0,0001	
PČ [INR]	Svež vzorec	1,15 (1,06 – 1,28)	1,14 (1,05 – 1,26)	0,4814
	TD	1,12 (1,04 – 1,26)	1,11 (1,02 – 1,22)	0,3254
	-70 °C	1,12 (1,02 – 1,26)	1,10 (1,02 – 1,22)	0,3333
	-20 °C	1,14 (1,05 – 1,30)	1,15 (1,05 – 1,28)	0,4156
Friedman p		< 0,0001	< 0,0001	
D-dimer [µg/L]	Svež vzorec	571 (192 – 1334)	707 (292 – 1458)	0,2021
	TD	617 (203 – 1302)	657 (284 – 1473)	0,2788
	-70 °C	635 (203 – 1317)	692 (284 – 1459)	0,2961
	-20 °C	641 (213 – 1292)	690 (293 – 1457)	0,4506
Friedman p		0,0002	0,0745	

* Friedman p: p vrednost Friedman testa; MW p: p vrednost Mann-Whitney U-testa

Preglednica VII: Rezultati celokupnega hemostatskega potenciala pri bolnikih

Preiskava	Pogoj shranjevanja	1 teden Mediana (1.-3. kvartil)	6 tednov Mediana (1.-3. kvartil)	MW p*
CKP [Abs-sum]	TD	27,0 (20,3 – 32,4)	29,3 (22,9 – 33,6)	0,3598
	-70 °C	27,6 (21,3 – 32,3)	28,8 (23,4 – 34,4)	0,3060
	-20 °C	25,5 (17,3 – 31,2)	26,6 (21,7 – 32,0)	0,2287
Friedman p*		< 0,0001	< 0,0001	
CHP [Abs-sum]	TD	14,3 (11,7 – 20,8)	15,5 (12,1 – 21,8)	0,5299
	-70 °C	14,7 (11,6 – 21,1)	16,7 (12,3 – 21,6)	0,4020
	-20 °C	13,7 (10,9 – 19,1)	15,0 (11,7 – 20,5)	0,2768
Friedman p		< 0,0001	< 0,0001	
CFP [%]	TD	44 (32 – 54)	44 (29 – 51)	0,4873
	-70 °C	44 (30 – 52)	44 (32 – 50)	0,5464
	-20 °C	42 (27 – 51)	41 (30 – 49)	0,9622
Friedman p		0,0198	0,0637	

* Friedman p: p vrednost Friedman testa; MW p: p vrednost Mann-Whitney U-testa

Preglednica VIII: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F XII

F XII		1 teden	6 tednov	
Preiskava	Pogoj shranjevanja	Mediana (1. – 3. kvartil)	Mediana (1. – 3. kvartil)	W p*
APTČ [s]	Svež vzorec	37,5 (32,7 – 114,0)		
	TD	37,8 (32,6 – 114,4)	37,6 (33,0 – 113,6)	> 0,9999
	-70 °C	38,2 (32,8 – 114,6)	37,1 (32,3 – 113,4)	0,2500
	-20 °C	38,5 (33,7 – 114,8)	38,3 (34,1 – 114,2)	0,6250
Friedman p*		0,0770	0,0115	
PČ [INR]	Svež vzorec	0,98 (0,96 – 1,02)		
	TD	1,01 (1,00 – 1,05)	0,98 (0,97 – 1,02)	0,0625
	-70 °C	1,01 (1,01 – 1,05)	0,98 (0,97 – 1,03)	0,0625
	-20 °C	1,02 (1,01 – 1,06)	1,00 (0,99 – 1,04)	0,0625
Friedman p		< 0,0001	0,0003	
CKP [Abs-sum]	TD	13,5 (10,8 – 16,2)	13,9 (10,4 – 17,1)	0,3750
	-70 °C	13,8 (10,6 – 15,9)	13,8 (10,7 – 17,0)	0,2500
	-20 °C	13,1 (9,8 – 15,4)	14,2 (10,0 – 16,8)	0,1250
Friedman p		0,3673	0,4228	
CHP [Abs-sum]	TD	6,8 (5,2 – 7,1)	6,9 (5,9 – 7,6)	0,2500
	-70 °C	7,0 (5,2 – 8,0)	6,7 (5,9 – 6,9)	> 0,9999
	-20 °C	6,1 (2,8 – 7,5)	6,9 (5,7 – 8,0)	0,0625
Friedman p		0,3873	0,5818	
CFP [%]	TD	55 (47 – 59)	49 (44 – 57)	0,2500
	-70 °C	48 (48 – 54)	51 (45 – 59)	> 0,9999
	-20 °C	52 (47 – 61)	51 (44 – 53)	0,1875
Friedman p		0,5216	0,4506	

* Friedman p: p vrednost Friedmanovega testa; W p: p vrednost Wilcoxonovega parnega testa

Preglednica IX: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F XI

F XI		1 teden	6 tednov	
Preiskava	Pogoj shranjevanja	Mediana (1. – 3. kvartil)	Mediana (1. – 3. kvartil)	W p*
APTČ [s]	Svež vzorec	42,9 (34,7 – 93,0)		
	TD	42,8 (34,0 – 95,6)	42,0 (34,1 – 88,5)	0,1875
	-70 °C	43,2 (34,1 – 95,9)	42,6 (34,2 – 88,6)	0,1875
	-20 °C	43,7 (34,4 – 97,4)	43,8 (35,3 – 93,3)	0,7500
Friedman p*		0,0548	0,0003	
PČ [INR]	Svež vzorec	1,03 (1,03 – 1,06)		
	TD	1,07 (1,06 – 1,08)	1,04 (1,03 – 1,06)	0,0625
	-70 °C	1,06 (1,05 – 1,08)	1,04 (1,03 – 1,06)	0,0625
	-20 °C	1,07 (1,06 – 1,08)	1,05 (1,04 – 1,07)	0,1250
Friedman p		0,0017	0,0052	
CKP [Abs-sum]	TD	10,0 (7,2 – 10,8)	10,8 (8,6 – 11,2)	0,1250
	-70 °C	9,9 (6,9 – 10,7)	10,1 (8,3 – 10,9)	0,0625
	-20 °C	9,3 (5,2 – 10,1)	9,5 (7,3 – 10,9)	0,1250
Friedman p		0,1821	0,1574	
CHP [Abs-sum]	TD	5,9 (2,9 – 6,3)	6,2 (2,7 – 6,9)	0,3750
	-70 °C	5,9 (2,8 – 6,4)	5,9 (2,9 – 6,3)	> 0,9999
	-20 °C	5,3 (2,5 – 6,4)	5,8 (2,1 – 6,6)	> 0,9999
Friedman p		0,9074	0,3611	
CFP [%]	TD	38 (33 – 46)	43 (38 – 44)	0,6250
	-70 °C	39 (31 – 47)	42 (40 – 45)	0,6250
	-20 °C	36 (16 – 44)	39 (38 – 41)	0,6250
Friedman p		0,1574	0,3611	

* Friedman p: p vrednost Friedmanovega testa; W p: p vrednost Wilcoxonovega parnega testa

Preglednica X: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F X

F X		1 teden	6 tednov	
Preiskava	Pogoj shranjevanja	Mediana (1 – 3. kvartil)	Mediana (1 – 3. kvartil)	W p*
APTČ [s]	Svež vzorec	39,2 (33,8 – 114,1)		
	TD	38,7 (33,4 – 114,1)	38,5 (33,5 – 114,0)	0,8750
	-70 °C	38,7 (33,4 – 114,4)	38,5 (33,7 – 114,0)	0,8750
	-20 °C	39,2 (34,0 – 114,4)	39,4 (34,5 – 115,0)	0,2500
Friedman p*		0,1944	0,0014	
PČ [INR]	Svež vzorec	1,21 (1,06 – 4,33)		
	TD	1,24 (1,08 – 4,35)	1,23 (1,08 – 4,34)	0,3750
	-70 °C	1,26 (1,09 – 4,34)	1,23 (1,08 – 4,34)	0,5000
	-20 °C	1,25 (1,09 – 4,35)	1,24 (1,09 – 4,34)	0,3750
Friedman p		0,0127	0,0012	
CKP [Abs-sum]	TD	11,4 (0,0 – 11,6)	11,4 (0,0 – 11,8)	0,5000
	-70 °C	10,8 (0,0 – 11,6)	10,9 (0,0 – 11,8)	0,5000
	-20 °C	10,9 (0,0 – 11,2)	10,9 (0,0 – 11,3)	0,5000
Friedman p		0,5278	0,2222	
CHP [Abs-sum]	TD	6,0 (0,0 – 6,8)	6,7 (0,0 – 7,4)	0,2500
	-70 °C	5,6 (0,0 – 6,7)	6,5 (0,0 – 6,9)	0,5000
	-20 °C	6,1 (0,0 – 6,8)	6,7 (0,0 – 6,8)	0,5000
Friedman p		0,9444	0,6667	
CFP [%]	TD	37 (0 – 47)	32 (0 – 42)	0,2500
	-70 °C	39 (0 – 46)	41 (0 – 42)	0,7500
	-20 °C	34 (0 – 45)	38 (0 – 41)	> 0,9999
Friedman p		0,6667	0,6667	

* Friedman p: p vrednost Friedmanovega testa; W p: p vrednost Wilcoxonovega parnega testa

Preglednica XI: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F IX

F IX		1 teden	6 tednov	
Preiskava	Pogoj shranjevanja	Mediana (1 – 3. kvartil)	Mediana (1 – 3. kvartil)	W p*
APTČ [s]	Svež vzorec	42,0 (34,4 – 91,6)		
	TD	42,0 (33,6 – 90,2)	42,1 (33,8 – 90,1)	0,8750
	-70 °C	41,4 (34,2 – 90,7)	41,5 (34,2 – 90,1)	> 0,9999
	-20 °C	42,3 (34,3 – 91,2)	43,0 (35,3 – 93,4)	0,0625
Friedman p*		0,0276	0,0016	
PČ [INR]	Svež vzorec	1,03 (1,02 – 1,04)		
	TD	1,05 (1,04 – 1,06)	1,05 (1,04 – 1,05)	0,7500
	-70 °C	1,05 (1,04 – 1,06)	1,04 (1,04 – 1,06)	> 0,9999
	-20 °C	1,06 (1,05 – 1,07)	1,06 (1,05 – 1,08)	0,7500
Friedman p		< 0,0001	< 0,0001	
CKP [Abs-sum]	TD, -70 °C	10,3 (0,0 – 11,1)	11,4 (0,0 – 11,7)	0,5000
	-70 °C	8,7 (0,0 – 10,8)	10,9 (0,0 – 12,2)	0,2500
	-20 °C	10,1 (0,0 – 10,6)	10,8 (0,0 – 11,4)	0,5000
Friedman p		0,5278	0,5000	
CHP [Abs-sum]	TD	5,6 (0,0 – 6,1)	6,5 (0,0 – 6,8)	0,2500
	-70 °C	5,6 (0,0 – 5,8)	6,5 (0,0 – 6,7)	0,2500
	-20 °C	5,2 (0,0 – 6,0)	6,3 (0,0 – 6,9)	0,2500
Friedman p		0,6667	> 0,9999	
CFP [%]	TD	42 (0 – 47)	40 (0 – 44)	0,5000
	-70 °C	35 (0 – 47)	41 (0 – 46)	0,7500
	-20 °C	43 (0 – 46)	38 (0 – 41)	0,2500
Friedman p		> 0,9999	0,2222	

* Friedman p: p vrednost Friedmanovega testa; W p: p vrednost Wilcoxonovega parnega testa

Preglednica XII: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F VIII

F VIII		1 teden	6 tednov	
Preiskava	Pogoj shranjevanja	Mediana (1 – 3. kvartil)	Mediana (1 – 3. kvartil)	W p*
APTČ [s]	Svež vzorec	43,0 (34,9 – 102,6)		
	TD	43,2 (34,4 – 103,0)	43,0 (34,3 – 102,5)	0,3125
	-70 °C	43,2 (34,4 – 103,1)	42,9 (34,5 – 102,4)	0,4375
	-20 °C	43,3 (34,8 – 103,8)	43,9 (35,5 – 104,9)	0,0625
Friedman p*		0,0837	0,0033	
PČ [INR]	Svež vzorec	1,12 (1,05 – 1,24)		
	TD	1,08 (1,05 – 1,23)	1,10 (1,05 – 1,24)	0,4375
	-70 °C	1,08 (1,05 – 1,23)	1,09 (1,05 – 1,23)	0,6250
	-20 °C	1,09 (1,06 – 1,23)	1,12 (1,06 – 1,24)	0,3750
Friedman p		0,1603	0,0295	
CKP [Abs-sum]	TD	10,3 (0,0 – 11,5)	8,3 (0,0 – 11,3)	0,5000
	-70 °C	9,6 (0,0 – 11,3)	7,7 (0,0 – 11,0)	0,5000
	-20 °C	8,9 (0,0 – 10,8)	8,0 (0,0 – 10,5)	0,5000
Friedman p		0,3611	0,3333	
CHP [Abs-sum]	TD	6,0 (0,0 – 7,8)	6,7 (0,0 – 7,3)	> 0,9999
	-70 °C	5,6 (0,0 – 8,0)	6,4 (0,0 – 7,2)	0,7500
	-20 °C	6,1 (0,0 – 7,5)	6,5 (0,0 – 6,9)	0,7500
Friedman p		0,8889	0,6667	
CFP [%]	TD	26 (0 – 39)	16 (0 – 37)	0,5000
	-70 °C	20 (0 – 39)	17 (0 – 35)	0,5000
	-20 °C	17 (0 – 37)	18 (0 – 34)	> 0,9999
Friedman p		0,3611	0,9444	

* Friedman p: p vrednost Friedmanovega testa; W p: p vrednost Wilcoxonovega parnega testa

Preglednica XIII: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F VII

F VII		1 teden	6 tednov	
Preiskava	Pogoj shranjevanja	Mediana (1 – 3. kvartil)	Mediana (1 – 3. kvartil)	W p*
APTČ [s]	Svež vzorec	34,9 (33,2 – 37,7)		
	TD	34,9 (32,4 – 37,9)	34,6 (32,6 – 38,5)	0,3750
	-70 °C	34,8 (32,5 – 37,8)	34,9 (32,9 – 38,5)	0,0625
	-20 °C	35,5 (33,0 – 38,4)	35,9 (33,8 – 39,7)	0,0625
Friedman p*		0,1458	0,0362	
PČ [INR]	Svež vzorec	1,13 (1,04 – 2,68)		
	TD	1,14 (1,06 – 2,94)	1,13 (1,05 – 2,92)	0,1250
	-70 °C	1,13 (1,06 – 2,81)	1,13 (1,05 – 2,88)	> 0,9999
	-20 °C	1,14 (1,07 – 2,93)	1,14 (1,06 – 2,93)	0,5000
Friedman p		0,0002	0,0003	
CKP [Abs-sum]	TD	11,4 (9,8 – 12,3)	11,4 (8,6 – 12,2)	0,1250
	-70 °C	11,3 (9,9 – 12,3)	10,9 (8,7 – 12,1)	0,2500
	-20 °C	10,9 (9,7 – 11,8)	10,9 (8,7 – 11,7)	0,2500
Friedman p		0,5216	0,5818	
CHP [Abs-sum]	TD	7,2 (6,0 – 7,3)	7,6 (6,7 – 9,0)	0,2500
	-70 °C	6,8 (5,6 – 7,0)	8,0 (6,5 – 8,0)	0,2500
	-20 °C	6,7 (6,1 – 6,9)	7,8 (6,7 – 8,7)	0,2500
Friedman p		0,3673	0,8889	
CFP [%]	TD	42 (39 – 47)	35 (28 – 42)	0,2500
	-70 °C	44 (44 – 48)	34 (34 – 41)	0,2500
	-20 °C	44 (40 – 44)	30 (29 – 38)	0,2500
Friedman p		0,0540	0,5278	

* Friedman p: p vrednost Friedmanovega testa; W p: p vrednost Wilcoxonovega parnega testa

Preglednica XIV: Rezultati izbranih preiskav hemostaze v razredčinah plazme brez F V

F V		1 teden	6 tednov	
Preiskava	Pogoj shranjevanja	Mediana (1 – 3. kvartil)	Mediana (1 – 3. kvartil)	W p*
APTČ [s]	Svež vzorec	41,2 (34,4 – 117,6)		
	TD	40,8 (34,0 – 118,2)	42,2 (33,9 – 118,6)	0,3750
	-70 °C	41,4 (33,9 – 118,3)	42,0 (34,0 – 118,8)	0,2500
	-20 °C	41,8 (34,3 – 118,4)	43,0 (35,1 – 119,7)	0,1250
Friedman p*		0,2390	0,0539	
PČ [INR]	Svež vzorec	1,21 (1,05 – 4,29)		
	TD	1,23 (1,09 – 4,31)	1,19 (1,06 – 4,28)	0,1250
	-70 °C	1,22 (1,08 – 4,30)	1,19 (1,06 – 4,28)	0,1250
	-20 °C	1,25 (1,09 – 4,31)	1,21 (1,07 – 4,29)	0,1250
Friedman p		0,0006	0,1921	
CKP [Abs-sum]	TD	11,4 (4,3 – 12,3)	11,4 (3,4 – 11,9)	0,2500
	-70 °C	10,8 (4,4 – 12,3)	10,9 (3,4 – 12,2)	0,6250
	-20 °C	10,9 (3,4 – 12,2)	10,9 (2,9 – 11,4)	0,2500
Friedman p		0,4306	0,0926	
CHP [Abs-sum]	TD	6,0 (0,0 – 6,1)	7,0 (3,4 – 7,8)	0,5000
	-70 °C	5,6 (0,0 – 6,6)	7,0 (3,3 – 7,9)	0,5000
	-20 °C	4,9 (0,0 – 6,1)	6,7 (3,4 – 7,5)	0,5000
Friedman p		> 0,9999	0,3704	
CFP [%]	TD	28 (0 – 47)	36 (8 – 42)	/**
	-70 °C	23 (0 – 48)	35 (8 – 40)	/
	-20 °C	27 (0 – 44)	35 (8 – 38)	/
Friedman p		0,8333	0,5000	

* Friedman p: p vrednost Friedmanovega testa; W p: p vrednost Wilcoxonovega parnega testa

** Izračun ni bil mogoč zaradi napak pri analizi in posledično premalo rezultatov za statistični izračun