

## KOAGULACIONA AKTIVNOST ODSTAJALE KRVI (na +4°C.)

I. ŠIMONVIĆ, Lj. PUREC, V. HÄUSLER i A. ADAMEC

*Interna klinika Medicinskog fakulteta, Zagreb, Skola narodnog zdravlja Medicinskog fakulteta i Institut za medicinska istraživanja Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti, Zagreb*

*(Primljeno 27. XI. 1957.)*

U ovom je radu ispitana koagulaciona aktivnost uskladištene krvi na +4°C. Primijenjeno je osam koagulacionih testova, a promjene koagulacione aktivnosti prikazane su grafički. Testiranje je izvršeno odmah nakon vađenja krvi, te drugi, sedmi i četrnaesti dan. Rezultati autora isporučeni su s rezultatima iz literature.

Boljim poznavanjem hemostatskog mehanizma i otkrivanjem novih koagulacionih faktora omogućena je sve točnija dijagnostika hemoragijskih sindroma. Gotovo jedini racionalni način terapije kod poremećenja koagulacionog mehanizma sastoji se u dodavanju faktora koagulacije koji nedostaju. Primjena izoliranih i pročišćenih faktora znatno je rjeđa od primjene pune krvi i plazme, koje sadržavaju sve faktore. Za uspješnu supstitucionu terapiju poremećene koagulacije krvi potrebno je poznavati dvije činjenice: aktivnost određenog faktora u transfundiranoj krvi i vrijeme preživljavanja u primaocu. O stabilnosti pojedinih faktora »in vitro« postoje brojni podaci (1-8 i t. d.), ali se oni ne slažu potpuno. Nejednaki rezultati dobiveni su vjerojatno zbog specifičnih uvjeta vađenja i konzerviranja krvi u različitim centrima.

Naša je namjera bila ispitati koagulacione sposobnosti odstajale krvi, koja je izvađena i konzervirana u Zavodu za transfuziju krvi u Zagrebu. Na taj smo način pokušali dobiti za nas specifične podatke.

### *Materijal i metode*

Promatranje promjena koagulacione aktivnosti izvršeno je na 8 boca krvi. Svi su postupci vađenja i konzerviranja krvi bili onakvi, kakvi se svakodnevno upotrebljavaju u Zavodu za transfuziju krvi u Za-

grebu. Nakon venepunkcije krv je skupljana gravitacionom metodom u standardne staklene boce. Davaocima je izvađeno 150-300 ccm krvi. Za vrijeme vađenja krv je smjesta izmiješana sa 100 ccm otopine A.C.D. (citrične kiseline 0,66 g, glukoze 2,2 g, natrijeva citrata 3 g i destilirane vode do 100 g). Igle za venepunkciju i boce nisu bile silikonirane. Odmah nakon vađenja krv je transportirana u naš laboratorij, gdje je izvršeno prvo testiranje. Za vrijeme pokusa krv se nalazila u hladnjaku na temperaturi +4° C. Samo za vrijeme vađenja uzoraka krv je stajala na sobnoj temperaturi. Nismo primijetili znakove hemolize.

Uzorci krvi za testiranje vađeni su iz boca silikoniranim iglama istog lumena i silikoniranim špicama od 20 ccm. Igle su bile sterilne. Prije vađenja uzoraka krv je u bocama izmiješana blagim prevrtanjem (10 puta), a gumeni je čep prije punkcije dezinficiran 70%–alkoholom. Izvađeni uzorci krvi i odcentrifugirana plazma održavani su od početka određenog testa u ledenoj kupelji.

Svaka je krv testirana četiri puta u dva tjedna. Prvo je testiranje izvršeno odmah nakon vađenja, drugo idući dan, treće sedmi, a četvrto četrnaesti dan.

Za svako testiranje primijenjeno je ovih osam testova:

1. Vrijeme koagulacije rekalcificirane krvi (9)
2. Protrombinsko vrijeme u jednom stadiju (10)
3. Test potrošnje protrombina (8)
4. Direktno brojenje trombocita u faznom mikroskopu prema Lempertovoj metodi (11)
5. Aktiviranje krvnog tromboplastina (12)
6. Kvantitativno određivanje antihemofilnog globulina (3)
7. Kvantitativno određivanje labilnog faktora (F.V.) (4)
8. Kvantitativno određivanje stabilnog faktora (F. VII.) (15 i 16)

Svaki je test izveden s najmanje dva uzorka krvi, odnosno plazme, a kao rezultat uzeta je srednja vrijednost.

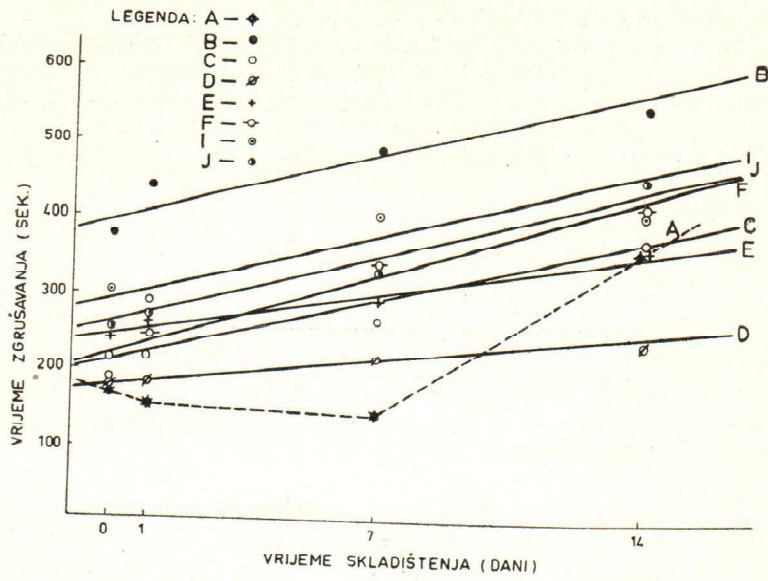
### *Rezultati*

#### *Urijeme koagulacije rekalcificirane krvi (sl. 1)*

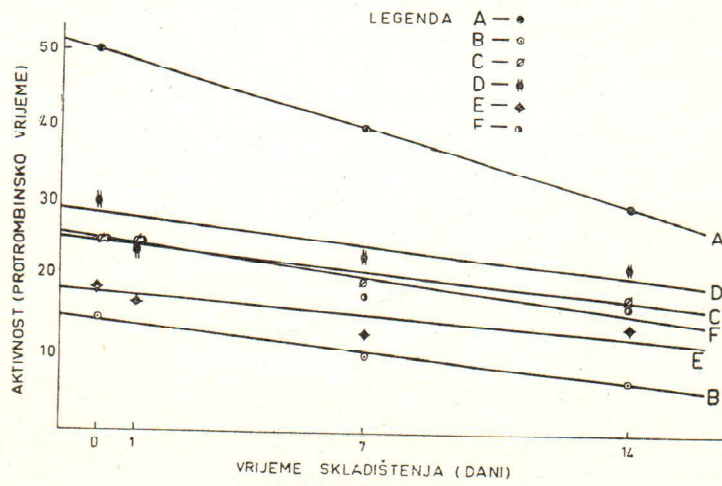
Testiranje je izvršeno na 8 boca. U sedam slučajeva vrijeme zgrušavanja se produžuje linearno, a samo je jednom (boca »A«) tok promjena bio nepravilan. Brzina porasta vremena zgrušavanja zavisi od početne vrijednosti.

#### *Protrombinsko vrijeme u jednom stadiju (sl. 2)*

Testiranje je izvršeno na 6 boca. Rezultati protrombinskog vremena preračunani su prema baždarnoj krivulji na »protrombinsku aktivnost«. Iz prikazanih se rezultata vidi, da je pad »protrombinske aktivnosti« linearna funkcija trajanja uskladištenja krvi. Čini se, da je brzina opadanja aktiviteta u toku vremena stalna bez obzira na početnu aktivnost.



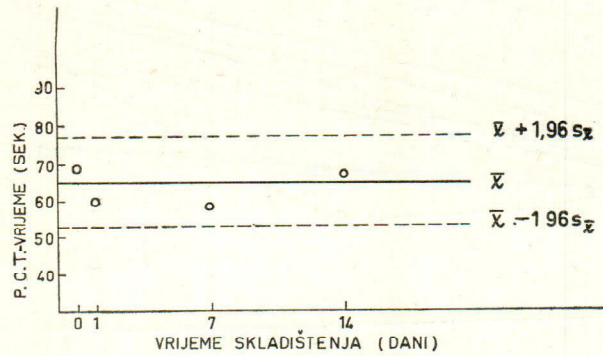
Sl. 1



Sl. 2

*Test potrošnje protrombina (P.C.T.) (sl. 3)*

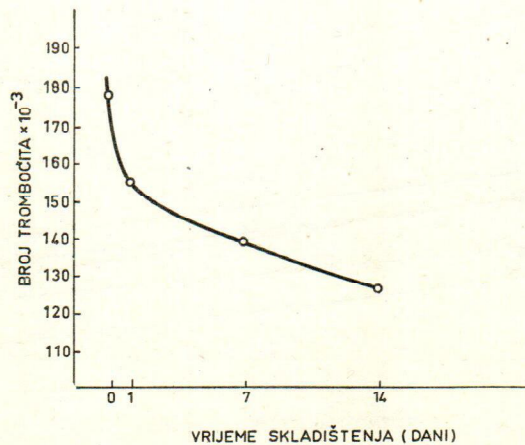
Testiranje je izvršeno na 8 boca. Srednja vrijednost svih rezultata prikazana je na slici pravcem  $\bar{x}$ . Statistički je izračunano područje neznačajnih odklona i označeno gornjim i donjim isprekidanim pravcem ( $\bar{x} + 1,96$  i  $\bar{x} - 1,96$ ). Srednje vrijednosti rezultata neznatno se među sobom razlikuju i nema statistički značajnih razlika.



Sl. 3

*Broj trombocita (sl. 4)*

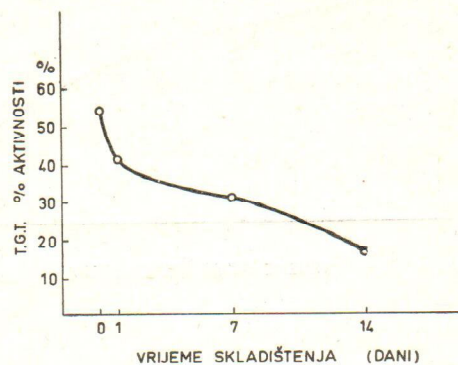
Direktno brojenje trombocita izvršeno je iz 8 boca. Najveći je pad trombocita bio u prvom danu uskladištenja, a kasnije je sve manji. Ukupni broj očuvanih trombocita u vremenu od 14 dana bio je velik (oko 125.000 u ccm). Ukupni pad trombocita, isporučujući brojenje iz boce, iznosio je samo 3%.



Sl. 4

*Aktiviranje krvnog tromboplastina (sl. 5)*

Testiranje je izvršeno iz 8 boca. Za taj test upotrebljeni su serum i plazma ispitivane krvi. Za svaki pokus upotrebljeni su svježi trombociti zdravog čovjeka. Prema tome, naši rezultati tog testa prikazuju relativne mogućnosti aktiviranja krvnog tromboplastina samo s obzirom na serum i plazmu ispitivane krvi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka aktivnosti.



Sl. 5

Na slici 5 vidi se, da postotak aktivnosti stalno opada. Tok opadanja aktivnosti nije pravilan. Najbrži je pad u prvom danu. Nakon 14 dana aktivnost iznosi oko 20%.

*Antihemofilički globulin (A.H.G.) (sl. 6)*

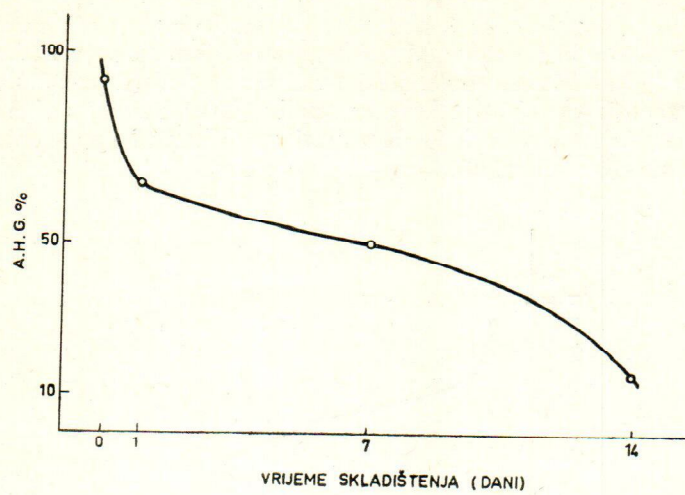
Testiranje je izvršeno iz 8 boca. Naši rezultati vjerojatno pokazuju samo aktivnost antihemofiličkog globulina, jer je prisutnost labilnog faktora bila osigurana dodavanjem jednakih količina hemofilične plazme.

Aktivnost antihemofiličkog globulina s vremenom stalno opada. Pad je u početku vrlo brz, a kasnije sporiji. Od ukupnog pada aktivnosti 1/3 otpada na prvih 24 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotaka aktivnosti.

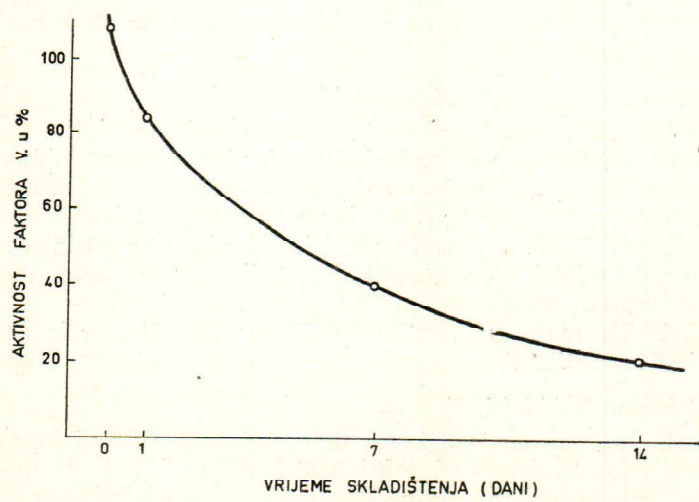
Oblik krivulje aktivnosti antihemofiličnog globulina vrlo je sličan obliku krivulje iz slike 5.

*Labilni faktor (F.U.) (sl. 7)*

Testiranje je izvršeno iz 8 boca. Rezultati su prikazani kao postoci srednjih vrijednosti aktivnosti. Aktivnost labilnog faktora stalno opada za vrijeme čitavog pokusa. Krivulja opadanja aktivnosti ima pravilan izgled, ali se sastoji iz nejednakih nagiba, a kasnije pokazuje tendenciju izravnavanja. Nakon 1 dana aktivnost opada na 80%, nakon 7 dana na 40%, a nakon 14 dana na 20%.



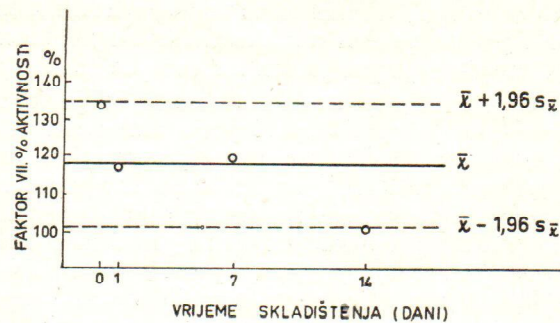
Sl. 6



Sl. 7

*Stabilni faktor (F. VII.) (sl. 8)*

Testiranje je izvršeno iz 8 boca. Rezultati su prikazani istom metodom kao na slici 3. Ovdje je srednja vrijednost svih aktivnosti stabilnog



Sl. 8

faktora za vrijeme pokusa. Prve 3 vrijednosti, dakle aktivnosti za vrijeme prvih 7 dana, padaju u područje neznačajnih razlika. Rezultat četrnaestog dana nalazi se neznatno, ali ipak u području značajnih razlika.

*Komentar*

U našim su pokusima koagulacioni testovi izvršeni s krvi, koja je sadržavala obilan suvišak antikoagulansa. Testovi su izvršeni prema originalnim propisima metodike, i nismo primjenjivali sistem optimalne rekalcifikacije. Takav postupak može utjecati na ocjenu apsolutnih vrijednosti u smislu prividnog sniženja. Mi smo htjeli dobiti uvid u opadanje aktivnosti koagulacionih faktora za vrijeme uskladištenja, pa su nam zato bile mnogo važnije relativne vrijednosti. Baš zbog toga smo naše rezultate obradili i prikazali u prvom redu po kriteriju relativnih odnosa u toku vremena. Iz istih razloga nismo izvršili korekciju pH. krvi, osim kod testa aktiviranja krvnog tromboplastina, kvantitativnog određivanja antihemofiličkog globulina i kvantitativnog određivanja stabilnog i labilnog faktora. Kod tih se testova ne radi o izuzetnoj korekciji metode, nego taj postupak primjenjujemo rutinski.

Naši rezultati u smislu malog produžavanja vremena koagulacije rekalcificirane krvi mogu se tumačiti suviškom antikoagulasa. Na taj način možda cijeli sistem postaje osjetljiviji i odražuje promjene u toku vremena. Soulier (7) je u svojim pokusima primjenjivao optimum rekalcifikacije i dobio skraćivanje vremena koagulacije, a Mustard (4) nije vidio nikakvih promjena.

Protrombinsko vrijeme u jednom stadiju zavisi od labilnog i stabilnog faktora, protrombina i fibrinogena. Mnogi su autori našli, da su protrombin, fibrinogen i stabilni faktor tako dobro ušćuvani za razdoblje od 14 ili nešto više dana, da ne remete bitno rezultat protrombinskog vremena (8, 3, 6, 1, 7). Prema tome pad »protrombinske aktivnosti« može se tumačiti jedino padom aktivnosti labilnog faktora. Niski početni aktivitet vjerojatno je posljedica nedovoljne rekalcifikacije.

Rezultati testa potrošnje protrombina ostali su praktički nepromijenjeni čitavo vrijeme pokusa. Unatoč padu aktivnosti nekih koagulacionih faktora tromboplastinske faze, test nije pokazivao značajne promjene u potrošnji protrombina. U našem bi pokusu smanjena potrošnja protrombina ukazivala uglavnom na manjak antihemofiličnog globulina. Riggs (17) smatra, da antihemofilični globulin mora pasti ispod 10%, da bi utjecao na rezultat potrošnje protrombina. U našem slučaju krv je sadržavala i nakon 14 dana više antihemofiličkog globulina od te granične vrijednosti. Prema tome jasan je i rezultat testa. Naši rezultati ovog testa slažu se s Mustardovim rezultatima (4).

Od svih formiranih elemenata krvi trombociti su najosjetljiviji na izmjenu sredine (5). Osim toga, Mustard (18) je pokazao, da promijenjeni tromboplastinski faktori uskladištene krvi imaju trombocitopenični efekt kod primaoca. Zbog velike važnosti trombocita u procesu hemostaze mnogi su autori obrađivali problem njihova konzerviranja. Mnogi su našli brzo propadanje trombocita u uskladištenoj krvi (19, 20, 21, 22 i t. d.). Za razliku od ovih nalaza Soulier (7) i Mustard (4) postigli su znatno bolje rezultate. Naši su rezultati očuvanja broja trombocita vrlo dobri. Nakon 14 dana mogli smo utvrditi kao srednju vrijednost 125.000 trombocita u ccm, a prosječni pad od prvog brojenja u boci iznosio je svega oko 30%. Zbog opterećenja ostalim testovima nismo mogli ispitati njihovu funkcionalnu sposobnost.

Mi smo određivali sposobnost aktiviranja krvnog tromboplastina u plazmi i serumu u isto vrijeme. Nismo posebno ispitivali serum, jer je iz literature poznato, na njegova aktivnost ostaje dobro očuvana (4, 8). Prema tome, naši rezultati pokazuju aktivnost plazme. Oblik krivulje, opadanja aktivnosti krvnog tromboplastina (slika 5), gotovo je identičan s oblikom krivulje, koja pokazuje opadanje aktivnosti antihemofiličnog globulina (slika 6). Na osnovu toga možemo zaključiti, da aktivnost stvaranja krvnog tromboplastina u uskladištenoj krvi opada zbog opadanja aktivnosti antihemofiličnog globulina. Naši se rezultati slažu s rezultatima Mustarda (4), a ne slažu se s rezultatima Kettenborga (3). Teško je protumačiti Kettenborgove rezultate. On je naime u isto vrijeme našao jaki pad aktivnosti antihemofiličkog globulina, uz potpuno sačuvanu sposobnost plazme za aktiviranje krvnog tromboplastina. Prema teorijskim pretpostavkama i prema interpretaciji stvaraoća testa (17) nemoguće je pretpostaviti normalno aktiviranje krvnog tromboplastina uz istodobno jak pad antihemofiličnog globulina.



Za aktivnu hemostazu kod hemofilije A potreban je visoki nivo antihemofilicnog globulina u plazmi (barem 35%) (6). Test vremena koagulacije krvi, koji se redovno primjenjuje, otkriva samo vrlo veliki manjak antihemofilicnog globulina (aktivnost manja od 5%). Prema tome, u praksi je važno znati koliko krv ili plazma, koja se daje hemofilicar, sadržava antihemofilicnog globulina, jer test zgrušavanja krvi ne može poslužiti kao kriterij korekcije defekta. Labilnost antihemofilicnog globulina odavno je poznata. U novije vrijeme to shvaćanje potvrdili su mnogi autori (3, 4, 7, 8, 23, 24 i t. d.). Stefanini (8) i Spaet (2) našli su, da se antihemofilicni globulin može bolje očuvati u citratnoj nego u oksalatnoj plazmi. Mi smo pokušali kvantitativno izraziti kretanje aktivnosti antihemofilicnog globulina. Ispoređujući naše rezultate s drugima, može se reći, da je aktivnost AHG-a pod našim uvjetima bila relativno dobro očuvana. Unatoč tome kod teških hemofilija terapijski će biti efikasna samo sasvim svježa krv ili plazma. Nagli pad AHG-a u prvih 24 sata zahtijeva, naimc, primjenu znatno većih količina krvi ili plazme.

Podaci iz literature uglavnom se slažu o aktivnosti labilnog faktora u uskladištenoj krvi (1, 3, 4, 7, 8 i t. d.). Naši su rezultati pokazali stalni pad aktivnosti, a brzina opadanja bila je u početku veća.

Stabilni je faktor dobio svoj naziv baš na temelju pretpostavke o stabilnosti. Soulier (7) je našao, da aktivnost stabilnog faktora ne opada 3 tjedna, a Kettenborg (3) i Stefanini (8) našli su lagani pad aktivnosti. Naši se rezultati donekle podudaraju s podacima te druge grupe autora. Čini se, da se radi o vrlo umjerenom opadanju aktivnosti. I jedni i drugi podaci govore o relativno dobrom očuvanju stabilnog faktora, a to u praktičnoj primjeni znači, da se za korekciju manjka stabilnog faktora može uspješno upotrebiti i uskladištena krv.

Zbog praktičnih i teorijskih interesa mnogi su autori istraživali aktivnost koagulacionog sistema u uskladištenoj krvi. Većina se rezultata u osnovi slaže. Razlike, koje ipak postoje, vjerojatno su nastale zbog različite specifične tehnike skupljanja i skladištenja krvi. Još uvijek nije jasno, koji faktori imaju odlučujuću ulogu u tim procedurama.

Zahvaljujemo Komisiji za medicinsko naučno istraživanje, Beograd, koja je omogućila ovaj rad.

#### Literatura

1. Fahey, J., Ware, A. and Seegers, W.: Am. J. Physiol. 154 (1948) 123.
2. Spaet, T. and Garner, E.: J. Lab. clin. Med. 46 (1955) 111.
3. Kettenborg, H., De Vries, S. and Van Der Pol, E.: Rev. belge Pathol. Med. exp. 24 (1955) 136.
4. Mustard, J.: Brit. J. Haemat. 2 (1956) 17.
5. Grozdanić, . i Simonović, B.: Med. Glas 8 (1954) 175.
6. Biggs, R. and Macfarlane, R.: Human blood coagulation and its disorders, Blackwell, Oxford 1957.

7. Soulier, J., Larrieu, M. et Wartelle, O.: *Sem. Hop.* 30 (1954) 3117.
8. Stefanini, M. and Dameshek, W.: *The hemorrhagic disorders*, Grune and Stratton, New York 1955.
9. Nikolić, B.: *Današnje shvatanje koagulacije krvi i njenih poremećaja*, Medicinska knjiga, Beograd - Zagreb 1955.
10. Quick, A.: *The hemorrhagic disease and the physiology of hemostasis*, C. C. Thomas, Illinois 1942.
11. Lempert, H.: *Lancet* 1 (1935) 151.
12. Biggs, R. and Douglas, A.: *J. Clin. Path.* 6 (1953) 23.
13. Pitney, W.: *Brit. J. Haemat.* 2 (1956) 250.
14. Dacie, J.: *Practical haematology*, Churchill, London 1956.
15. Owren, P.: *Scand. J. clin. lab. Invest.* 1 (1949) 81.
16. Owren, P. and Aas, K.: *Scand. J. clin. lab. Invest.* 3 (1951) 201.
17. Biggs, R.: *Brit. med. Bull.* 11 (1955) 5.
18. Mustard, J.: *Acta haemat.* 18 (1957) 80.
19. Kolmer, J.: *Amer. J. med. Sci.* 197 (1939) 442.
20. Mollison, P.: *Blood transfusion in clinical medicine*, Blackwell, Oxford 1951.
21. Whitby, L. and Britton, C.: *Disorders of the Blood*, Churchill, London 1953.
22. Bell, W.: *Med. Clin. N. Amer.* 37 (1953) 1843.
23. Shinowara, G.: *Fed. Proc.* 13 (1954) 296.
24. Spaet, T. and Kinsell, B.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 84 (1953) 314.

### Summary

#### COAGULATION ACTIVITY OF STORED BLOOD AT +4°C

The coagulation activity of blood stored at 4°C was investigated. Eight different clotting tests were used. The changes in the coagulation activity are presented graphically. The testing was performed immediately after the blood was taken from the vein and then after the first, seventh and fourteenth day of storage. The authors compare their results with the data reported in literature.

On each figure the time of storage in days is marked on the abscissa. The ordinate indicates the clotting time in sec. (Fig. 1), the prothrombin time in sec. (Fig. 2), the prothrombin consumption test in sec. (Fig. 3), the number of platelets  $\times 10^{-3}$  (Fig. 4), the tromboplastin generation test, % activity (Fig. 5), the antihemophilic globulin % (Fig. 6), factor V activity % (Fig. 7), factor VII activity % (Fig. 8).

*Department of Medicine,  
Faculty of Medicine, University of Zagreb*

*Received for publication  
November 27, 1957*

*School of Public Health,  
Faculty of Medicine, University of Zagreb*

*Institute for Medical Research, Zagreb*