

ОЦЕНКА НА НЕОПРЕДЕЛЕНОСТТА НА ИЗМЕРВАНИЯТА С РОТАЦИОНЕН ТРОМБЕЛАСТОМЕТЪР ROTEM®

А. Станчева¹, Л. Ламбрева² и К. Цачев²

¹Университетска болница "Лозенец", Централна клинична лаборатория – София, България

²Катедра по клинична лаборатория и имунология, Медицински университет – София, България

EVALUATION OF THE UNCERTAINTY OF THE ANALYSIS WITH ROTATION THROMBELOSTOMETRY ANALYZER ROTEM®

A. Stancheva¹, L. Lambreva² и K. Tsachev²

¹University Hospital "Lozenets", Central Clinical Laboratory – Sofia, Bulgaria

²Department of Clinical Laboratory and Immunology, Medical University – Sofia, Bulgaria

Резюме: Ротационният тромбеластометричен метод ROTEM® дава възможност за хемостазно мониториране на коагулационната и фибринолитичната активност. Оценката на аналитичната надеждност на ротационната тромбеластометрия е особено важна за адекватната интерпретация на резултатите и надеждното им клинично приложение. Целта на изследването е да се извърши оценка на неопределеността на измерванията с ротационен тромбеластометричен анализатор ROTEM®. При определяне на невъзпроизводимост в серия с цитратна кръв за тестове INTEM, EXTEM и FIBTEM (CT, CFT, MCF и α -ъгъл) на един измервателен канал, на четири измервателни канала и на три апарата ROTEM® са установени несигнификантни разлики ($p < 0,05$) и $CV \leq 7,9\%$. Определена е значимо по-добра невъзпроизводимост в серия с цитратна кръв ($CV \leq 5,9\%$) в сравнение с цитратна плазма ($CV \leq 15,6\%$). Намерена е добра недостоверност при отчитане обхвата на неопределеност. Контролният материал показва приемлива невъзпроизводимост в серия ($CV \leq 11,4\%$). Невъзпроизводимостта е добра до шестия час от вземане на пробата. Определените при използване на цитратна кръв аналитични характеристики на ротационния тромбеластометричен метод ROTEM® позволяват неговото прилагане за клинични и научноизследователски цели.

Ключови думи: ротационна тромбеластометрия ROTEM®, аналитична надеждност

Адрес за кореспонденция: д-р Ася Станчева, Централна клинична лаборатория, Университетска болница "Лозенец", ул. "Козяк" № 1, 1407 София, e-mail: assiastancheva@yahoo.com

Summary: The rotation thrombelastometry method ROTEM gives the possibility for hemostatic monitoring of the coagulation and fibrinolytic activities. The assessment of the analytical reliability of the rotation thrombelastometry is extremely important for the adequate interpretation of the results and their clinical application. Aim of the study was to perform an evaluation of the uncertainty of the analyses performed with rotation thrombelastometry analyzer ROTEM®. The assignment of the imprecision in series with citrated blood for tests INTEM, EXTEM and FIBTEM (CT, CFT, MCF and α -angle) performed on one detecting channel, on four detection channels and on three analyzers ROTEM, assessed insignificant differences ($p < 0,05$) and $CV \leq 7,9\%$. It was determined significantly better imprecision in series with citrated blood ($CV \leq 5,9\%$) in comparison with series with citrated plasma ($CV \leq 15,6\%$). Good uncertainty was found in assessing the span of indetermination. The control materials indicate good imprecision in series ($CV \leq 11,4\%$). The imprecision is good to the sixth hour after taking the blood assay. The determined analytical characteristics of the rotation thrombelastograph ROTEM®, when using citrated blood, enables its application for clinical, scientific and investigative purposes.

Key words: rotation thrombelastometry ROTEM®, analytical reliability

Address for correspondence: Assya Stancheva, MD, Central Clinical Laboratory, University Hospital "Lozenets", 1 Koziak str., Bg – 1407 Sofia, e-mail: assiastancheva@yahoo.com

ВЪВЕДЕНИЕ

Осигуряването на качеството в клиничната лаборатория изисква планирани и системни действия във всички етапи на лабораторно-диагностичния процес с цел установяване съответствието на клиничнолабораторните резултати с определени регламентирани изисквания за качество [1]. При определяне на аналитичната

надеждност на конвенционалните и тромбеластометричните хемостазни параметри се проследява както влиянието на патологичния процес и терапевтичните въздействия, така и на лабораторните грешки в преданалитичния, аналитичния и следаналитичния етап [2].

С развитието на ротационния тромбеластометричен метод ROTEM® става възможно про-

веждането на разширен хемостазен контрол на първичната и вторичната хемостаза и на фибринолитичната активност. Диференциално се диагностицират хиперфибринолитични и хиперкоагулационни състояния. Обсъжда се коригираща медикаментозна и субституираща терапия. Проследява се резултатът от проведеното лечение [7].

При тромбеластометричните изследвания, разглеждани в последно време като обект на клиничната лаборатория, се поставя въпросът за валидиране на метода [11]. Оценката на аналитичната надеждност на ротационната тромбеластометрия е особено важна за адекватната интерпретация на резултатите и надеждното им клинично приложение.

Анализира се преданалитичното стандартизиране на начина на вземане на пробата – пропорциите на антикоагуланта, температурата, точността на накапващата пипета [7], времето от вземане на пробата до стартиране на анализа [5, 12]. Според съвременни автори за пълно преданалитично инхибиране на коагулационните процеси в пробата при тромбеластометрия са необходими 30 min [3, 15].

Установява се влиянието на вида на изследвания материал върху невъзпроизводимостта и недостоверността на метода. При определяне на хемостазни показатели с конвенционални коагулационни методи в цитратна плазма е определен допустим CV < 10% [13]. Тромбеластометър ROTEM® може да извършва анализи в пълна кръв, цитратна кръв и цитратна плазма [8]. Резултатите, получени с цитратна кръв и цитратна плазма, се различават значимо [7, 11]. Качествен контрол на ROTEM® за EXTEM, INTEM и NATEM тест се извършва с лиофилизиран контролен материал (цитратна плазма) RO-TROL N, Pentapharm GmbH. Като контролен материал може да се използва и замразена богата на тромбоцити плазма, съхранявана на – 80°, която е стабилна 4 месеца и по време на първите 30 минути след разтопяване [6].

Съществува необходимост от задълбочен анализ на аналитичната надеждност на ротационния тромбеластометричен метод ROTEM® за прилагането му за клинични и научноизследователски цели.

ЦЕЛ

Да се извърши оценка на неопределеността на измерванията с ротационен тромбеластометричен анализатор ROTEM®.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За оценка на невъзпроизводимостта и обхвата на неопределеност на измерванията при определяне с ROTEM® са използвани:

➤ Контролен материал ROTROL N Pentapharm GmbH, Munich (Germany). (Lot № 407638, Lot № 407138, Lot № 407268) с обявена стойност, проследим до референтен материал Quality Certificate REF 503-24 CE. Съдържа лиофилизирана човешка плазма с тринатриев цитрат (4% w/v) и посочени стойности за INTEG, EXTEG и FIBTEG тестове (CT, CFT, MCF, α). Анализите са изработени след 30-ата минута и до 2 часа от реконституиране на лиофилизата [16].

➤ Пул от цитратна кръв на здрави донори с PT, APTT, TT, фибриноген и тромбоцитен брой в референтни граници (след венепункция с вакуетейнер Terumo, Loeven, Belgium; 0.129 M тринатриев цитрат). Анализите са извършени след 30-ата min и до 2 часа след вземане на материала [16].

Определени са:

1. Невъзпроизводимост в серия на 1 канал с цитратна кръв за тестове INTEM, EXTEM и FIBTEM (CT, CFT, MCF и α), n = 20.

2. Невъзпроизводимост в серия на 4 канала на един апарат ROTEM® с цитратна кръв за тестове INTEM, EXTEM и FIBTEM (CT, CFT, MCF и α), n = 20.

3. Невъзпроизводимост в серия на 3 апарата ROTEM®, с цитратна кръв за тестове INTEM, EXTEM и FIBTEM (CT, CFT, MCF и α), n = 20.

4. Невъзпроизводимост в серия на 1 канал на ROTEM®, с контролен материал RO-TROL N, Lot 407268 QC V-0003 – за тестове INTEM, EXTEM и FIBTEM (CT, CFT, MCF и α), n = 20.

5. Невъзпроизводимост в серия с цитратна кръв и цитратна плазма на един апарат ROTEM® – за тестове INTEG, EXTEG, FIBTEG (CT, CFT, MCF и α).

6. Стабилността на пробите до осмия час от вземане на пробата – в пул от цитратна кръв, определяне на 60 min на тестове INTEM, EXTEM и FIBTEM (CT, CFT, MCF и α). Материалът се съхранява на 4°C.

7. Невъзпроизводимост от ден в ден с контролна плазма RO – TROL N, Lot № 407638, REF 503-24, Pentapharm GmbH, Munich, Germany, за тестове INTEG и EXTEG, параметри CT, CFT, MCF и α – 3 порции контролна плазма RO – TROL N, на един апарат, в продължение на 10 дни.

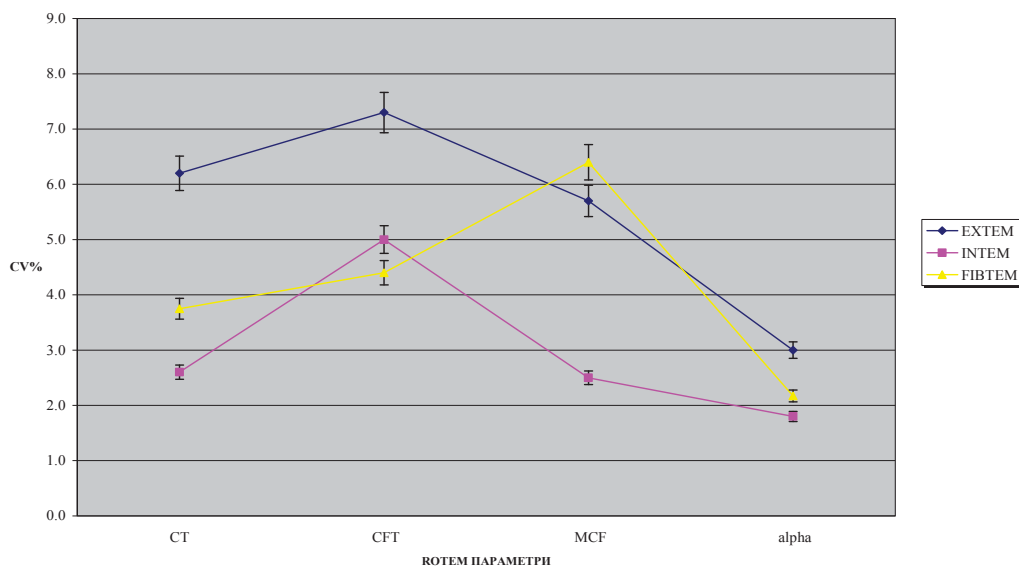
8. Аналитичната недостоверност с контролен материал ROTROL N за тестове INTEG, FIBTEG и EXTEG (CT, CFT, MCF и α) на един апарат, n = 30. Изчислен е обхватът на неопределеност на метода с посочените от производителя стойности за контролния материал.

Ротационните тромбеластометрични измервания са извършени с анализатор ROTEM® (Pentapharm GmbH Munich, Germany) с реактиви на Pentapharm GmbH, Munich, Germany. Новият методологичен подход при ROTEM® анализите включва активирани тестове, повлияващи различни компоненти от хемостазния механизъм (тромбoplastин-тъканен фактор (TF) за EXTEM, контактен активатор (ellagic acid) за INTEM, антитромбоцитни реагенти (anti IIb/IIIa) за FIBTEM, аprotinin за APTEM, хепариназа за HEPTEM и есарин activator за ECATEM). Резултатът се изразява графично с реакционна крива (ТЕМОграма) и цифрово – чрез параметри, изчислени с математически анализ от кривата.

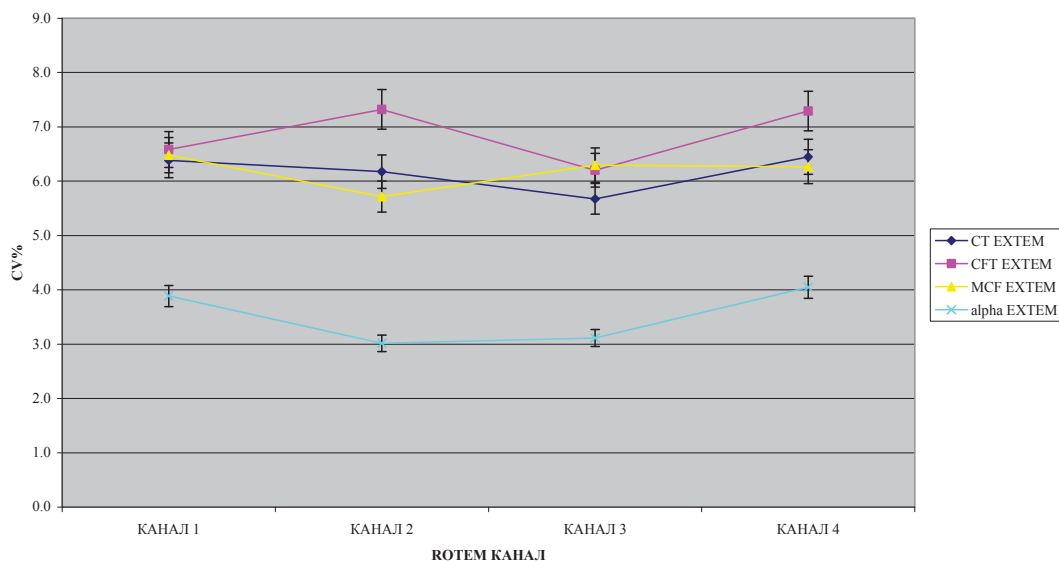
РЕЗУЛТАТИ

При определяне на невъзпроизводимост в серия в цитратна кръв на един измервателен канал на ROTEM® най-ниска серийна вариация е определена за тест INTEM – ($CV \leq 5,0\%$) и параметър α – ($CV \leq 1,8\%$). Установени са $CV \leq 7,3\%$ (фиг. 1).

При определяне на невъзпроизводимостта на четири измервателни канала на един апарат ROTEM® в цитратна кръв не се установява сигнификантна разлика ($p < 0,05$) между стандартните отклонения на всеки от четирите канала на апарат ROTEM®, за тестове INTEM, EXTEM и FIBTEM (параметри CT, CFT, MCF и α -ъгъл). Изчислени са $CV \leq 7,9\%$ (фиг. 2).



Фиг. 1. Определяне на невъзпроизводимост в серия с цитратна кръв на един измервателен канал



Фиг. 2. Определяне на невъзпроизводимост в серия за EXTEM на четири измервателни канала

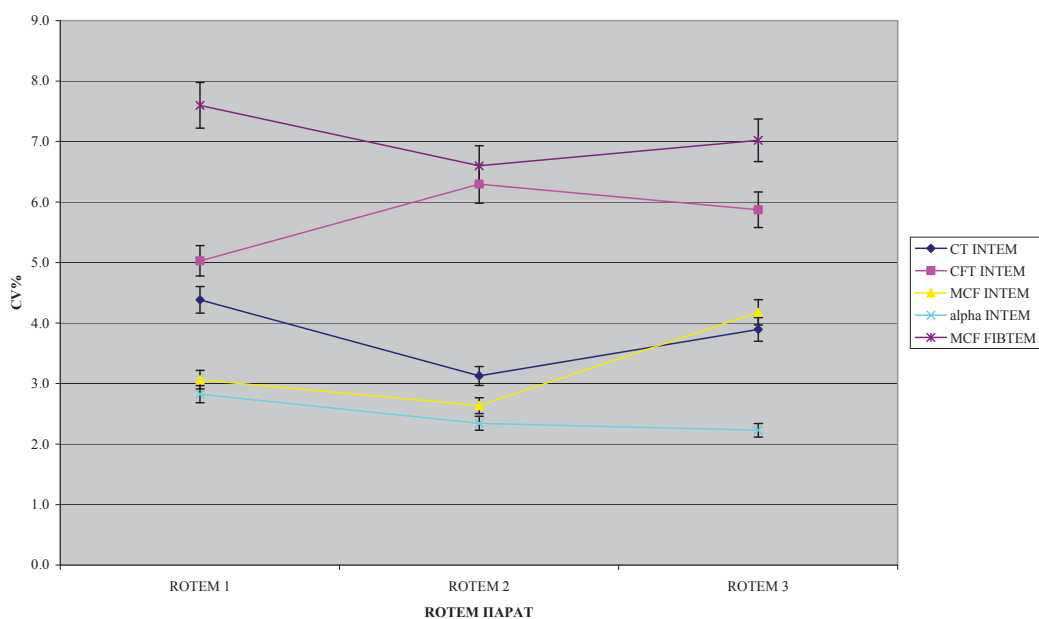
При определяне на невъзпроизводимост в серия на три аппарата ROTEM® с цитратна кръв не се установява сигнификантна разлика ($p < 0,05$) между стандартните отклонения на трите аппарата ROTEM®, за тестове INTEM, EXTEM и FIBTEM (параметри CT, CFT, MCF и α -ъгъл). Получени са $CV \leq 7,8\%$ (фиг. 3).

При определяне на невъзпроизводимост в серия са установени по-високи вариационни коефициенти при определяне с контролна плаз-

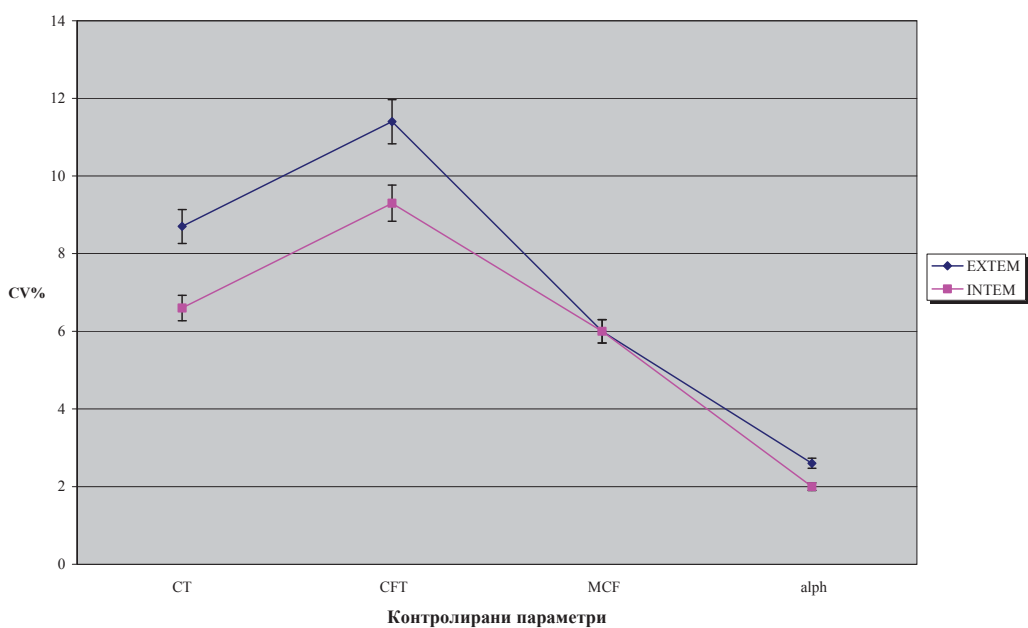
ма RO – TROL N ($CV \leq 1,4\%$), отколкото с цитратна кръв ($CV \leq 7,3\%$) (фиг. 4).

При определяне на невъзпроизводимост в серия, в цитратна кръв и в цитратна плазма, е установена сравнително по-висока серийна вариация при прилагане на цитратна плазма ($CV \leq 15,6\%$) в сравнение с цитратна кръв ($CV \leq 5,9\%$). Установените разлики са сигнификантни ($p < 0,05$) (фиг. 5).

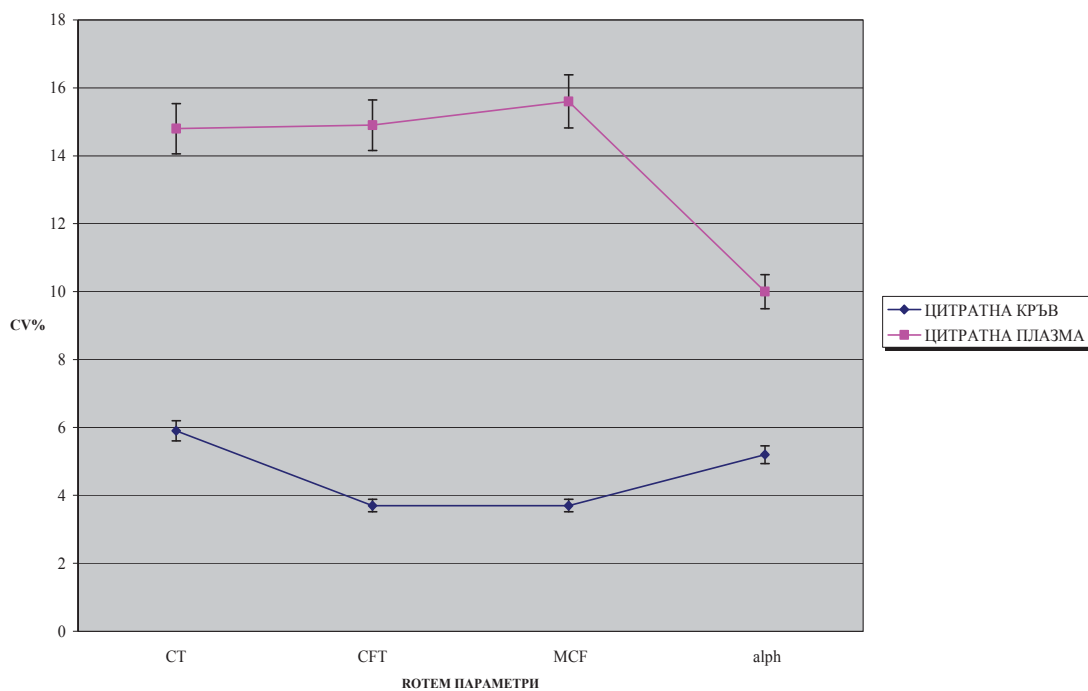
При определяне на невъзпроизводимост от ден в ден с контролна плазма са намерени $CV \leq 14\%$ (фиг. 6).



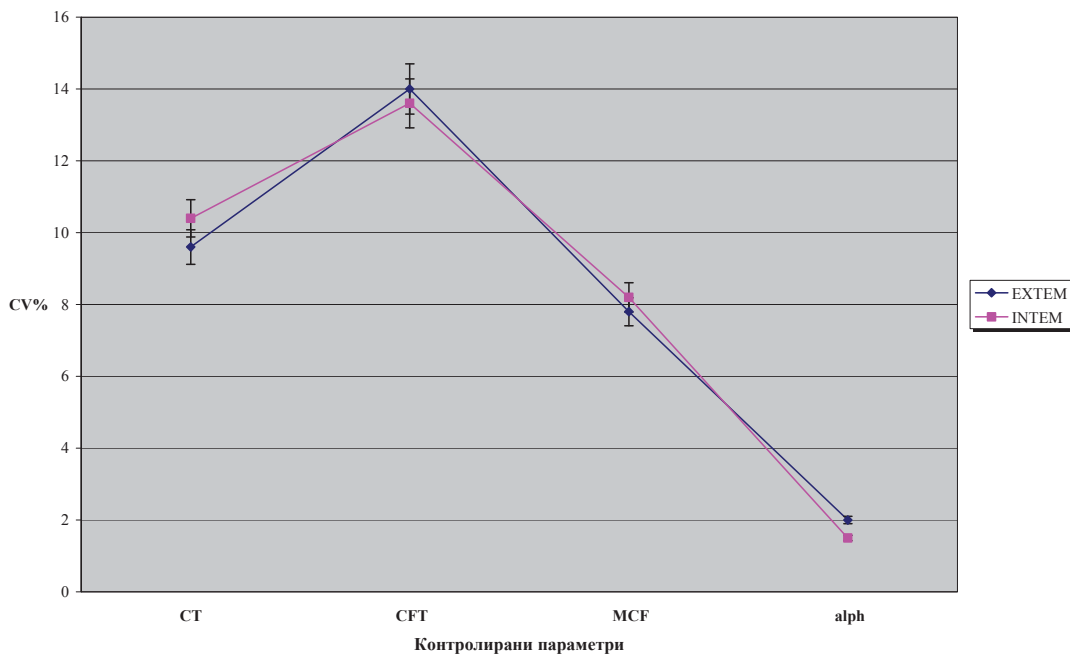
Фиг. 3. Определяне на невъзпроизводимост в серия за INTEM и FIBTEM на три аппарата ROTEM®



Фиг. 4. Определяне на невъзпроизводимост в серия с контролна плазма ROTROL N



Фиг. 5. Определяне на невъзпроизводимост в серия с цитратна кръв и цитратна плазма



Фиг. 6. Определяне на невъзпроизводимост от ден в ден с контролна плазма RO-TROL N

Поради отсъствие на референтен метод и утвърден стандарт аналитичната надеждност е определена чрез отчитане обхвата на неопределеност (табл. 1).

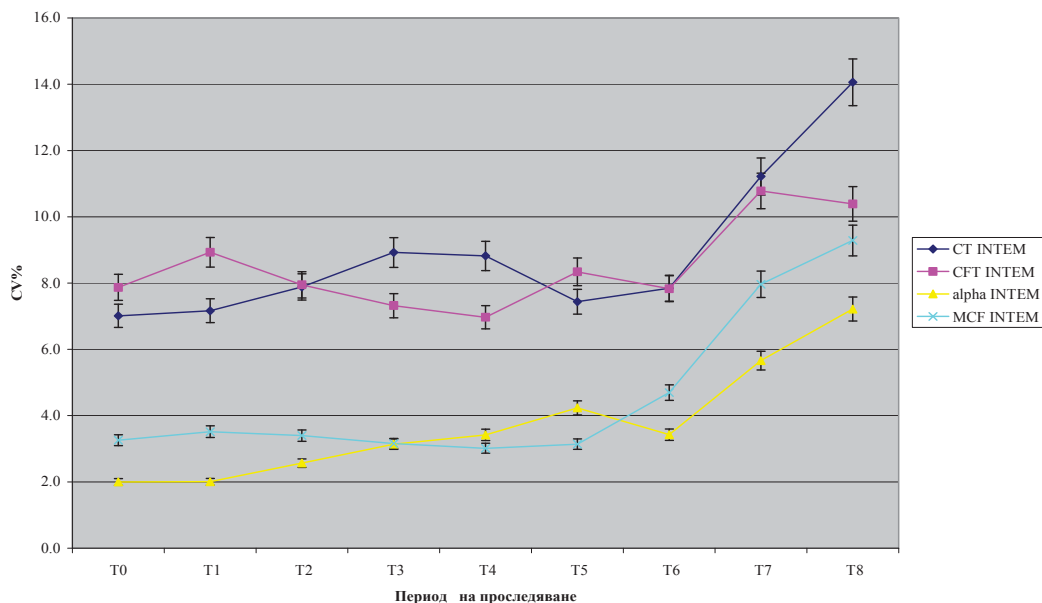
Получените от нас стойности в определения обхват на неопределеност са в посочените за контролния материал граници и представените от нас доверителни интервали (95% д.и.) – сравними с тези, определени от производителя.

Таблица 1. Определяне на аналитичната недостоверност на тестове INTEG и EXTEG (параметри СТ, CFT, MCF и α) с контролна плазма ROTROL N

Контролна плазма ROTROLN	Lot № 407638	Lot № 407138	Lot № 407268		Lot № 407638	Lot № 407138	Lot № 407268
INTEM	I	II	III	EXTEG	I	II	III
Доверителен интервал на производителя/ INTEM_CT	98-179 s	98-179 s	98-179 s	Доверителен интервал на производителя/ EXTEM_CT	18-42 s	18-42 s	18-42 s
mean	125,6	123,9	127,7	mean	31,4	31	33,1
± SD	13,1	12,8	13,4	± SD	3,0	3,1	3,8
CV	10,4	10,3	10,5	CV	9,6	10,0	11,5
Наш доверителен интервал (mean ± 2 SD)	99,3 -151,9	98,3 -149,5	100,9 -154,5	Наш доверителен интервал (mean ± 2 SD)	25,3 – 37,5	24,8 – 37,2	25,5 – 40,7
Доверителен интервал на производителя/ INTEM_CFT	9-19 s	9-19 s	9-19 s	Доверителен интервал на производителя/ EXTEM_CFT	7-15 s	7-15 s	7-31 s
mean	13,4	12,8	12,1	mean	11,7	11,6	11,4
± SD	2,0	1,5	1,5	± SD	1,6	1,7	1,7
CV	14,6	12,1	12,6	CV	14,0	14,8	15,0
Наш доверителен интервал (mean ± 2 SD)	9,5-17,3	9,7- 15,9	9,1- 15,1	Наш доверителен интервал (mean ± 2 SD)	8,4-15,0	8,2-15,0	8,0-14,8
Доверителен интервал на производителя/ INTEM_MCF	42-60 mm	42-60 mm	42-60 mm	Доверителен интервал на производителя/ EXTEM_MCF	40-61 mm	40-61 mm	40-61 mm
mean	51,6	52,3	50,8	mean	52,3	51,4	52,4
± SD	4,2	3,8	4,5	± SD	4,1	3,9	4,2
CV	8,2	7,2	8,9	CV	7,8	7,5	8,0
Наш доверителен интервал (mean ± 2 SD)	43,2-60,0	44,8-59,8	41,7-59,9	Наш доверителен интервал (mean ± 2 SD)	44,2 -60,4	43,7-59,1	44,0- 60,8
Доверителен интервал на производителя/ INTEM_α	86-88 (°)	86-88 (°)	86-88 (°)	Доверителен интервал на производителя/ EXTEM_α	86-88 (°)	86-88 (°)	86-88 (°)
mean	87,4	87,2	87,8	mean	87,4	87,5	87,5
± SD	1,0	1,0	0,9	± SD	1,2	0,7	1,1
CV	1,1	1,2	1,0	CV	1,3	0,8	1,2
Наш доверителен интервал (mean ± 2 SD)	85,5-89,3 (°)	85,1-89,3	86,0-89,6 (°)	Наш доверителен интервал (mean ± 2 SD)	85,1-89,7 (°)	86,1-88,9 (°)	85,3-89,7 (°)
Определяния/n	10	10	10		10	10	10

Стабилността на съхраняваните проби е добра до 6-ия час (Т6) ($CV > 2\% < 10,7\%$), след което серийната вариация нараства (Т8) ($CV > 5,7\% < 16,7\%$) и се установяват значими проме-

ни в ROTEM® параметрите – понижение на средните стойности на некинетичните параметри α -ъгъл и MCF и повишаване на средните стойности на кинетичните СТ и CFT (фиг. 7).



Фиг. 7. Промяна на CV при определяне стабилността на пробите с INTEM

ОБСЪЖДАНЕ

При определяне на невъзпроизводимост в серия с цитратна кръв за тестове INTEM, EXTEM и FIBTEM (CT, CFT, MCF и α -ъгъл) на един измервателен канал, на 4 канала и на три апарата ROTEM® са установени много добри коефициенти на невъзпроизводимост ($CV \leq 7,9\%$). Най-добра е невъзпроизводимостта при INTEM ($CV \leq 6,3\%$), следвана от EXTEM ($CV \leq 7,8\%$). Наблюденията ни са съпоставими с проучванията на P. Haneke и сътр., които установяват за INTEM $CV \leq 4,6\%$ и за EXTEM $CV \leq 6\%$ [7].

При оценка на невъзпроизводимостта на параметрите най-нисък CV е получен при параметър α ($CV > 1,8\% < 3,6\%$), следван от MCF ($CV > 1,1\% < 5,7\%$). Определената от нас невъзпроизводимост е по-висока за кинетичните параметри CT и CFT ($CV > 2,6 < 7,3\%$) и за FIBTEM_MCF ($CV > 6,1\% < 7,9\%$). Получените резултати са съпоставими с резултатите на T. Lang и сътр., които установяват по-нисък CV за INTEM_MCF и EXTEM_MCF ($CV < 5\%$), но по-висок за кинетичните параметри CT и CFT ($CV < 12\%$) и за FIBTEM_MCF ($CV < 13\%$) [10].

Не са установени сигнификантни разлики при сравнителните измервания на четирите канала и на три ROTEM апарата, с което потвърждаваме изследванията на H. Kolde и сътр. [9].

Според D. Prisco и сътр. при определяне на фибриноген и протромбиново време в цитратна плазма се допуска $CV < 10\%$ [13], който е съпоставим с определените от нас CV на кинетичните ROTEM® параметри CT и CFT ($CV \leq 7,3\%$), въп-

реки разликите в методиките. Намерената невъзпроизводимост в серия с контролна плазма RO – TROL N е умерена ($CV \leq 11,4\%$) за кинетичните параметри CT и CFT и много добра за INTEM $_{\alpha}$ и EXTEM $_{\alpha}$ ($CV \leq 2,6\%$). Нашите резултати са съпоставими със съобщените от A. Calatzis и сътр. [4].

Установените от нас сигнификантно по-ниски стойности при определяне на невъзпроизводимост в цитратна кръв ($CV \leq 5,9\%$) спрямо стойностите в цитратна плазма ($CV \leq 15,6\%$) определят цитратната кръв като подходящ материал за тромбеластометрични измервания. Нашите резултати потвърждават проучването на P. Haneke и сътр., които установяват $CV < 6\%$ (за CT, CFT и MCF_EXTEM) при анализ в цитратна кръв и много висок CV при определяне с цитратна плазма: CT_EXTEM – $CV < 8,1\%$, CFT_EXTEM – $CV < 17\%$, и MCF_EXTEM – $CV < 19,9\%$ [7]. Значима разлика в ROTEM® резултатите от кръв и от плазма получават Zamburini и сътр. [16]. Като възможна причина за тези разлики приемаме наличието на неплазмени компоненти в цитратната кръв и различното количество начален тромбин.

Предоставеният контролен материал от лиофилизирана цитратна плазма RO-TROL N показва невъзпроизводимост от ден в ден $CV \leq 15\%$ и в серия $CV \leq 11,4\%$. Според Ch. Samama, който намира сходни резултати, една от следващите стъпки за валидиране на тромбеластометричните коагулационни анализи е определяне на проследим контролен материал с по-ниска невъзпроизводимост [14].

Определената недостоверност на метода е добра, като получените от нас стойности в определения обхват на неопределеност са в посочените за контролния материал граници (представените от нас доверителни интервали са сравними с определените от производителя) [9].

Установената от нас добра стабилност на съхраняваните проби до 6-ия час (VC и средна стойност) потвърждава изследванията на T. Lang и сътр. [10]. Наблюденията на V. Camenzid и сътр. обаче приемат периода до осмия час след декалцификация като подходящ за извършване на тромбеластометрични изследвания [5]. Установеното от нас сигнификантно понижение на средните стойности на α и MCF и повишение на CT и CFT след 6-ия час отразява забавено образуване и намалена стабилност на съсирека, дължащи се вероятно на понижената във времето концентрация на коагулационните фактори и на тромбоцитни промени. Получените резултати могат да са основание за извършването на тромбеластометрични анализи до шестия час от вземане на кръвта.

ИЗВОДИ

1. Извършената оценка на невъзпроизводимост в серия и сравнителни измервания на различни измервателни канали и ROTEM® апарати с цитратна кръв за тестове INTEM, EXTEM и FIBTEM установяват ниски вариационни коефициенти ($CV \leq 7,9\%$) и несигнификантни разлики ($p < 0,05$).

2. Получените от нас сигнификантно пониски стойности ($p < 0,05$) на CV при определяне на невъзпроизводимост в цитратна кръв я определят като подходящ материал за тромбеластометрични измервания.

3. Използваният контролен материал от лиофилизирана цитратна плазма показва приемлива невъзпроизводимост ($CV \leq 15\%$) от ден в ден и в серия.

4. Определената недостоверност на метода е добра.

5. Не е препоръчително извършването на тромбеластометрични анализи след шестия час от вземане на кръвта.

6. Определените при използване на цитратна кръв аналитични характеристики на ротаци-

онния тромбеластометричен метод ROTEM® позволяват неговото прилагане за клинични и научноизследователски цели.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Ламбрева, Л. Възможности за оценка на ефективността на основни програми за качествен контрол на клинично-лабораторните резултати в НРБ. (Дисертация) С., МА, 1988.
2. Цачев, К. Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория. Апарати за измерване и анализатори. (Под ред. на проф. Т. Цветкова и проф. Ст. Данев), С., 2001, 115-120.
3. Bowrick, V. A., D. Mikhailidis et G. Stansby. The use of citrated whole blood in thrombelastography. – *Anesth. Analg.*, **90**, 2000, 1086-1088.
4. Calatzis, A. N. et al. Thrombelastographic coagulation monitoring during cardiovascular surgery with the ROTEG coagulation analyzer. – *Cardiovasc. Surg.*, 2000, 215-226.
5. Camenzid, V. et al. Citrate storage effects thrombelastography analysis. – *Anesthesiology*, **92**, 2000, 1242-1249.
6. Christiansen, K., B. Sorensen et J. Ingerslev. Sample management and quality control in ROTEG thrombelastography. – *J. Thromb. Haemost.*, **1**, 2003, Suppl. 1, 1590.
7. Klooche, M. et P. Haneke. Thrombelastography today: practicability and analytical power. *Transfusion Med. Hemother.*, **34**, 2007, 421-428.
8. Kolde, H. ROTEG analysis: a versatile tool for rapid diagnosis of hemostasis disorders in whole blood and for clinical research and drug development. Copenhagen, Pentapharm GmbH, 2003.
9. Kolde, H. RoTROL. Berlin, Pentapharm GmbH, 2004.
10. Lang, T. et al. Multi-center investigation on reference ranges for ROTEM thrombelastometry. – *Blood Coagul. Fibrinol.*, **16**, 2005, 301-310.
11. Luddington, R. Thrombelastography/Thrombelastometry. – *Clin. Lab. Haem.*, **27**, 2005, 81-90.
12. Manspeizer, H. E. et al. Arterial and venous thrombelastograph variables differ during cardiac surgery. – *Anesth. Analg.*, **93**, 2001, 277-281.
13. Prisco, P. et R. Paniccia. Point-of-care testing of haemostasis in cardiac surgery. – *Thromb. J.*, **1**, 2003, № 1, 1.
14. Samama, Ch. Thromboelastography: The Next Step. – *Anesth. Analg.*, **92**, 2001, 563-564.
15. Vig, S. et al. Thrombelastography- a reliable test. – *Blood Coagul. Fibrinol.*, **12**, 2001, 555-561.
16. Zamburini, A. et al. Thrombelastography with citrated blood: comparability with native whole blood, stability of citrate storage and effect of repeat sampling. – *Blood Coagul. Fibrinol.*, **15**, 2004, 103-107.
17. Zillmann, A. et al. Platelet associated tissue factor contributes to the collagen triggered activation of blood coagulation – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 2001, № 2, 603-609.