

КОАГУЛОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.111.7.084

Мансурова Д.А., Жунуспекова А.С., Каражанова Л.К.

РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Государственный медицинский университет города Семей, 071400, Семей, Казахстан

В настоящей статье изложены установленные нами средние значения и референсные интервалы агрегации тромбоцитов у практически здоровых людей на оптическом агрегометре AggRAM (Helena BioSciences Europe). Референсные интервалы агрегационной активности тромбоцитов с 5 мкг/мл аденозин-5'-дифосфатом и площадь под агрегационной кривой составили 67,4–92,5% и 54,5–85,3; референсные интервалы активности тромбоцитов с 10 мкг/мл аденозин-5'-дифосфатом и площадь под кривой агрегации составили 76,8–97,2 и 68,8–90,4%. Полученные значения показателей могут быть использованы в качестве референсных в клинико-диагностической лаборатории Университетского госпиталя Государственного медицинского университета города Семей.

Ключевые слова: референсные значения; агрегация тромбоцитов; площадь под кривой; аденозин-5'-дифосфат; тестирование функции тромбоцитов.

Для цитирования: Мансурова Д.А., Жунуспекова А.С., Каражанова Л.К. Референсные значения агрегации тромбоцитов у здоровых лиц. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 549-552. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-549-552>

Mansurova J.A., Zhunuspekova A.S., Karazhanova L.K.

REFERENCE VALUES OF PLATELET AGGREGOMETRY IN HEALTHY SUBJECTS

Semey State Medical University, 071400, Semey, Kazakhstan

In this article, we set forth the average values and reference intervals of platelet aggregation in practically healthy individuals on the AggRAM optical aggregometer. The reference intervals of platelet aggregation activity with 5 µg/ml adenosine-5'-diphosphate and the area under the aggregation curve were 67,4-92,5% and 54,5-85,3; the reference intervals of platelet activity with 10 µg/ml adenosine-5'-diphosphate and the area under the aggregation curve were 76,8-97,2% and 68,8-90,4. The obtained values of indicators can be used as reference in the clinical diagnostic laboratory of the University Hospital of Semey State Medical University.

Key words: reference values; platelet aggregation; area under curve; adenosine-5'-diphosphate; platelet function tests.

For citation: Mansurova J.A., Zhunuspekova A.S., Karazhanova L.K. Reference values of platelet aggregometry in healthy subjects. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (9): 549-552 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-549-552>

For correspondence: Mansurova J.A., Master of Medical sciences, doctoral student PhD, assistant of department of therapy internship; e-mail: mansurova_dzhami@mail.ru

Information about authors:

Mansurova J.A., <https://orcid.org/0000-0003-2439-2056>

Zhunuspekova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-2413-317X>

Karazhanova L.K., <http://orcid.org/0000-0002-4719-6034>

Conflict of interests. The authors declare the absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 30.03.2018
Accepted 25.05.2018

Тестирование функции тромбоцитов широко используется для диагностики причин различных видов кровотечений. В настоящее время исследование агрегационной активности тромбоцитов актуально для контроля эффективности и безопасности терапии антитромбоцитарными препаратами [1]. Наибо-

лее сложной проблемой с точки зрения тестирования функции тромбоцитов для определения ответа на антитромбоцитарные препараты, по-видимому, является отсутствие корреляции между результатами большинства доступных в настоящее время тестов [2, 3]. Оптическая агрегатометрия, введенная в начале 1960-х годов, остаётся золотым стандартом в оценке функциональной активности тромбоцитов. Метод основан на регистрации изменений светопропускания богатой тромбоцитами плазмы в ответ на стимуляцию

Для корреспонденции: Мансурова Джамия Анваровна, магистр мед. наук, докторант PhD, ассистент кафедры интернатуры по терапии; e-mail: mansurova_dzhami@mail.ru

Агрегационная функция тромбоцитов у мужчин и женщин

| Показатель | Мужчины (n = 16; 45,7%) | Женщины (n = 19; 54,3%) | p |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------|
| АТц с 5 мкг/мл АДФ, % | 81,9 (23,4) (67,2–90,6) | 88,0 (10,4) (67,9–92,6) | 0,385* |
| AUC с 5 мкг/мл АДФ | 74,0 (21,3) (49,5–84,6) | 79,4 (9,9) (58,6–85,9) | 0,230* |
| | Мужчины (n = 18; 51,4%) | Женщины (n = 17; 48,6%) | |
| АТц с 10 мкг/мл АДФ, % | 86,7 ± 5,4 (75,0–93,6) | 87,3 ± 5,2 (76,5–94,7) | 0,757** |
| AUC с 10 мкг/мл АДФ | 78,9 ± 6,1 (63,7–86,1) | 80,4 ± 4,9 (70,4–88,2) | 0,525** |

Примечание. Здесь и табл. 2: параметры показателей представлены в виде: * – Me (IQR) – медиана (межквартильный диапазон), ** – $M \pm SD$ (среднее арифметическое и стандартное отклонение), min и max значения, АТц – активность тромбоцитов, AUC – площадь под кривой агрегации тромбоцитов, АДФ – аденозин-5'-дифосфат, $p < 0,05$.

несколькими агонистами в разных концентрациях [2, 4, 5]. Несмотря на трудоёмкость и технические сложности, в каждой клинической лаборатории рекомендовано устанавливать свои референсные интервалы (РИ) [3, 5, 6]. Характеристики референсных популяций и уровень выполненных аналитических процедур в лабораториях в используемых источниках должны быть сопоставимы [7-9]. Однако в реальности лаборатории часто используют опубликованные РИ, установленные на других измерительных системах и для другой популяции, что может привести к значительным ошибкам при интерпретации результатов исследования [8].

Цель исследования – установить референсные значения агрегации тромбоцитов у практически здоровых людей на агрегометре AggRAM.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 45 здоровых добровольцев в возрасте от 25 до 79 лет в период с июня 2016 г. по ноябрь 2016 г. Критерии исключения: наличие соматической патологии, приём антиагрегационных и нестероидных противовоспалительных препаратов в течение 2 нед. Предварительно с целью стандартизации преаналитического этапа участники были ознакомлены с инструкцией по подготовке к анализу, медицинский персонал – с инструкцией по взятию крови и транспортировке пробирок, ежедневной калибровке аппарата согласно инструкции по эксплуатации прибора. До включения в исследование все участники дали информированное согласие. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом Государственного медицинского университета г. Семей (ГМУ г.Семей) (№ 4 от 14.10.2015г.).

Забор крови производили утром натощак из локтевой вены в вакуумные пробирки с 3,8% цитратом натрия (в соотношении 9:1) с кратковременным наложением жгута, диаметр иглы 0,8 мм. В течение 20–30 мин образцы крови доставлялись в лабораторию и анализировались около 40 мин с момента поступления. Плазму, богатую тромбоцитами, получали с использованием центрифуги ОПн-3.02 «Дастан» (Киргизия) при 1000 об/мин. в течение 10 мин, бедную тромбоцитами плазму получали центрифугированием при 3000 об/мин до 15 мин. Функциональную активность тромбоцитов в одном образце крови определяли на оптическом агрегометре AggRAM (Helena BioSciences Europe), в котором имеется 4 независимых канала для одновременного измерения основных типов антиагрегантов при времени считывания до 10 мин. Использовались реагенты: аденозин-5'-дифосфат (АДФ) 5 и 10 мкг/мл (фирмы «Технология-Стандарт», Россия). Результаты исследования функции тромбоцитов оценивались по максимальному проценту агрегации (max %) в ответ на стимуляцию индукторами и площадью под агрегационной кривой (AUC – area under curve), которую в инструкции фирмы-производителя рекомендуют вычислять в научно-исследовательских целях.

Статистический анализ. Статистическая обработка проводилась с использованием программы SPSS (версия 20.0): описательные статистики (M – среднее арифметическое и SD – стандартное отклонение, минимальное и максимальное значения, Me – медиана, IQR – межквартильный диапазон), критерий Колмогорова–Смирнова, U-тест Манна–Уитни для независимых выборок, корреляционный анализ Спирмана между max% агрегации тромбоцитов (АТц) и AUC. Различия между сравниваемыми переменными считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Средний возраст всех участников составил 46 лет (минимальный возраст 25 лет, максимальный – 79 лет). Среди них 25(55,6%) мужчин в возрасте 46 лет (минимальный возраст 25 лет, максимальный – 79 лет) и 20 (44,4%) женщин в возрасте 45 лет (минимальный возраст 27 лет, максимальный – 73 года). Исследование состояло из двух этапов. На первом этапе выявляли и исключали из дальнейшего исследования статистические выбросы по результатам определения агрегационной функции тромбоцитов с 5 и 10 мкг/мл АДФ (ГОСТ Р 53022.3-2008). С помощью метода Тьюки из исследования исключили по 10 результатов определения агрегационной функции тромбоцитов с 5 и 10 мкг/мл АДФ и AUC соответственно, что составило 22,2%.

На втором этапе исследования определяли средние показатели АТц и AUC у мужчин и женщин, выявляли наличие различий (табл. 1).

Средние значения функциональной активности тромбоцитов у женщин оказались несколько выше, однако статистической значимости не было выявлено. Референсные значения фирмы-производителя, а также РИ, выявленные в исследованиях с другими анализаторами, установлены для всей референсной популяции, следовательно, полученные нами результаты сопоставимы [9,10]. Однако в исследовании М. Otahbachi и соавт. [11] с использованием агрегометра

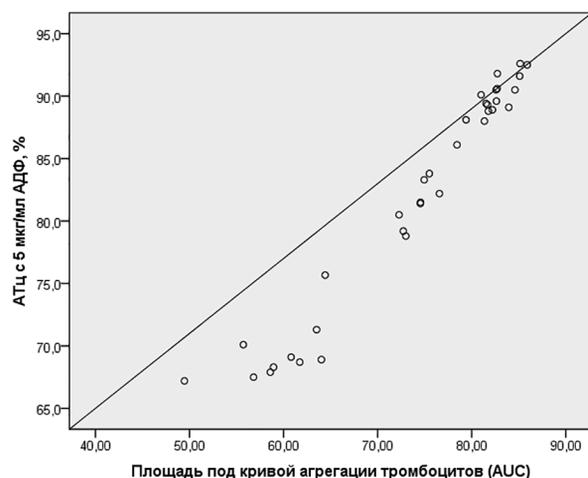


Рис.1. Корреляция между АТц с АДФ 5 мкг/мл и площадью под кривой агрегации (AUC).

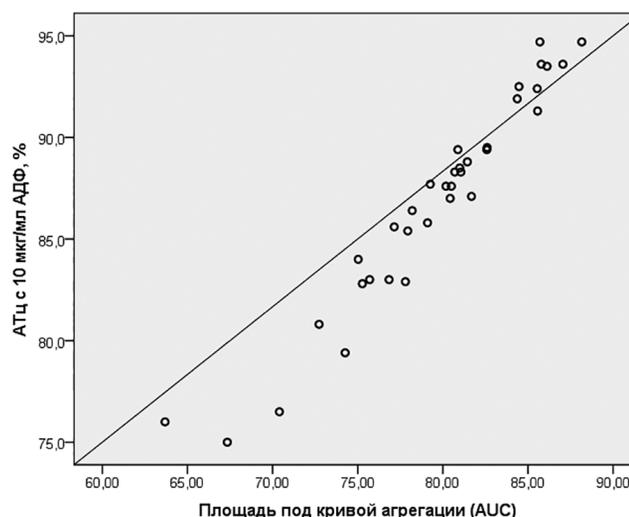


Рис.2. Корреляция между АТц с АДФ 10 мкг/мл и площадью под кривой агрегации (AUC).

Таблица 2

Сравнение полученных показателей АТц с 10 и 5 мкг/мл АДФ и AUC с РИ фирмы-производителя

| Показатель | Ме (min–max) (n = 35) | Полученный РИ (n = 35) | РИ фирмы-производителя, (n = 20) |
|------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|
| АТц с 5 мкг/мл АДФ, % | 83,8 (67,2–92,6) | 67,4–92,5* | Более 60 |
| AUC с 5 мкг/мл АДФ, | 76,6 (49,5–85,9) | 54,5–85,3* | - |
| АТц с 10 мкг/мл АДФ, % | 87,6 (75,0–94,7) | 76,8–97,2** | Более 60 |
| AUC с 10 мкг/мл АДФ | 80,5 (63,7–88,2) | 68,8–90,4** | - |

Примечание. Ме (медиана), min и max значения, * – РИ представлены в виде перцентилей 5–95-й, ** – РИ в виде $M \pm 1,96SD$.

Chrono-Log Co с участием 36 здоровых лиц независимо от этнической принадлежности активность тромбоцитов в ответ на все тестируемые агонисты была выше у женщин, чем у мужчин. В результате проведенного популяционного исследования Т. Intermann и соавт. установили, что различные лабораторные методы и референсные популяции могут привести к несоответствию результатов [12]. Таким образом, учитывая вышеизложенное, объединив мужчин и женщин, можно проводить расчёт РИ для всей референсной группы.

Расчёт РИ зависит от количества лиц в группе и типа распределения значений АТц. В небольшой референсной группе (менее 40 человек) при нормальном распределении показателей рекомендовано использовать параметрический метод для оценки РИ, который рассчитывается по формуле $M \pm 1,96SD$, а при ненормальном распределении переменных РИ рассчитывается в виде перцентилей 5–95-й, согласно которому у 90% здоровых лиц выявляются нормальные лабораторные показатели и у 10% – ненормальные (ГОСТ Р 53022.3-2008) [13]. В исследовании правильность распределения выборки была определена с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Распределение АТц с 5 мкг/мл АДФ и AUC соответственно было ненормальным и РИ рассчитывался в виде перцентилей 5–95-й. Распределение АТц с 10 мкг/мл

АДФ и AUC соответственно было нормальным, РИ рассчитывался по формуле $M \pm 1,96SD$. В табл. 2 представлены полученные референсные значения в сравнении с РИ фирмы-производителя.

Из табл. 2 видно, что референсные значения в нашем исследовании получились выше нижней границы фирмы-производителя. Так как AUC рекомендуется вычислять в научно-исследовательских целях, то РИ для этого показателя не указаны и их сравнение не представляется возможным. Однако между АТц (5 и 10 мкг/мл) АДФ и AUC, соответственно, получена очень высокая линейная корреляция ($Rho = 0,968$ и $Rho = 0,973$; $p < 0,001$) (рис. 1, 2), что делает необходимым использование обоих показателей в клинической практике.

Заключение. Таким образом, в результате нашего исследования установлено, что пол не влияет на средние значения АТц и AUC. Выявленная очень высокая линейная корреляция ($Rho = 0,968$ и $Rho = 0,973$; $p < 0,001$) между АТц (5 и 10 мкг/мл) АДФ и AUC соответственно делает необходимым дополнительно к АТц анализировать AUC. Референсные интервалы АТц с 5 мкг/мл АДФ и AUC составили 67,4–92,5% и 54,5–85,3; АТц с 10 мкг/мл АДФ и AUC составили 76,8–97,2% и 68,8–90,4. Установленные интервалы АТц и AUC могут быть использованы в качестве референсных в клинико-диагностической лаборатории

Университетского госпиталя ГМУ г. Семей. Каждая лаборатория должна иметь свои референсные значения, и наш опыт может быть полезен в лабораториях, где используются аналогичные аналитические системы (автоматический агрегометр AggRAM Helena BioSciences Europe).

Ограничением нашего исследования является небольшой размер выборки, в связи с чем не учитывалась расовая принадлежность.

Благодарность. Авторы выражают благодарность проф. А.Ю. Гаспаряну за ценные комментарии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–6, 10–13 см. REFERENCES)

7. Воробьева И.И. Современные методы оценки функции тромбоцитов и их клиническое значение у больных с острым коронарным синдромом. *Креативная кардиология*. 2012; 1: 50–63.
8. Казакова М.С., Луговская С.А., Долгов В.В. Референсные значения показателей общего анализа крови взрослого работающего населения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 6: 43–9.
9. Петрова О.В., Шашин С.А., Жукова Е.Р., Панова Е.В., Грачева Н.П. Референсные значения агрегации тромбоцитов у взрослого населения Астраханской области на агрегометре Multiplate. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(1): 46–8.

REFERENCES

1. Sambu N., Curzen N. Monitoring the effectiveness of antiplatelet therapy: opportunities and limitations. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2017; 72(4): 683–96.
2. Koltai K., Kesmarky G., Feher G., Tibold A., Toth K. Platelet

Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *Int. J. Mol. Sci.*; 2017; 18(8).

3. Gasparyan A.Y. Aspirin and clopidogrel resistance: methodological challenges and opportunities. *Vasc. Health. Risk. Manag.* 2010; 6:109–12.
4. Hvas A.M., Favalaro E.J. Platelet Function Analyzed by Light Transmission Aggregometry. *Methods in molecular biology*. 2017; 1646: 321–31.
5. Cattaneo M., Cerletti C., Harrison P., Hayward CPM, Kenny D., Nugent D. et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11(6): 1183–9.
6. Falcone M., Granero R. Platelet aggregation reference interval for healthy individuals. *Acta bioquímica clinica Latinoam.* 2012; 46(4): 655–9.
7. Vorob'eva I. I. Sovremennye metody otsenki funktsii trombocitov i ikh klinicheskoe znachenie u bol'nykh s ostrym koronarnym sindromom. *Kreativnaya kardiologiya*. 2012; 1: 50–63. (in Russian)
8. Kazakova M.S., Lugovskaia S.A., Dolgov V. V. The reference values of indicators of total blood analysis of adult working population. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 6: 43–9. (in Russian)
9. Petrova O.V., Shashin S.A., Tarasov D.G. Reference Values of Platelet Aggregation in Impedance Aggregometry with Adenosine Diphosphoric Acid on Aggregometer Multiplate. *Sovrem. Tehnol. v Med.* 2016; 8(3):100–4.
10. Beyan C., Kaptan K., Ifran A., Savasci S., Ozturk Y., Okmen B. Effect of sex difference on platelet aggregation using an optical method in healthy subjects. *Clin. Lab. Haematol.* 2006; 28(1):14–6.
11. Otahbachi M., Simoni J., Simoni G., Moeller J.F., Cevik C., Meyerrose G.E. et al. Gender differences in platelet aggregation in healthy individuals. *J. Thromb. Thrombolysis*. 2010; 30(2):184–91.
12. Ittermann T., Roser M., Wood G., Preez H., Lüdemann J., Völzke H. et al. Reference intervals for eight measurands of the blood count in a large population based study. *Clin. Lab.* 2010; 56(1–2): 9–19.
13. Horowitz G.L. Estimating Reference Intervals. *Am. J. Clin. Pathol.*; 2010; 133(2):175–7.

Поступила 30.03.18
Принята к печати 25.05.18