

РЕФЕРЕНТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ИМПЕДАНСНЫМ МЕТОДОМ С АДЕНОЗИНДИФОСФОРНОЙ КИСЛОТОЙ НА АГРЕГОМЕТРЕ MULTIPLATE

DOI: 10.17691/stm2016.8.3.11
УДК 612.111.7–083:616.126–089
Поступила 24.04.2015 г.



О.В. Петрова, к.м.н., зав. клинко-диагностической лабораторией;
С.А. Шашин, д.м.н., сердечно-сосудистый хирург;
Д.Г. Тарасов, к.м.н., главный врач

Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Астрахань, 414011, ул. Покровская роща, 4

Современные международные стандарты рекомендуют каждой лаборатории разработать или подтвердить имеющиеся в литературе референтные интервалы для каждого лабораторного показателя. В клинко-диагностической лаборатории Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии Министерства здравоохранения РФ у 128 практически здоровых мужчин и женщин Астраханской области (Россия) была изучена агрегационная функция тромбоцитов. Исследование выполняли импедансным методом на агрегометре Multiplate (Verum Diagnostica, Германия), в качестве индуктора использовали аденозиндифосфорную кислоту. Возраст и пол статистически значимого влияния на значения агрегации тромбоцитов не оказывали. Референтный интервал агрегации тромбоцитов с аденозиндифосфорной кислотой на агрегометре Multiplate у здорового взрослого населения Астраханской области составил 598,0–1120,0 AU·min, где AU·min — площадь под кривой агрегации.

Установленный интервал агрегации тромбоцитов у взрослого населения может быть использован как референтный в лабораториях Астраханской области при работе на аналогичных аналитических системах (автоматическом агрегометре Multiplate), так как он был разработан с учетом всех особенностей формирования референтных групп и со стандартизацией всех этапов лабораторных исследований.

Ключевые слова: референтный интервал; агрегация тромбоцитов; индуктор; аденозиндифосфорная кислота; автоматический агрегометр Multiplate.

Как цитировать: Petrova O.V., Shashin S.A., Tarasov D.G. Reference values of platelet aggregation in impedance aggregometry with adenosine diphosphoric acid on aggregometer Multiplate. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(3): 100–104, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.3.11>

English

Reference Values of Platelet Aggregation in Impedance Aggregometry with Adenosine Diphosphoric Acid on Aggregometer Multiplate

O.V. Petrova, MD, PhD, Head of Clinical and Diagnostic Laboratory;
S.A. Shashin, MD, DSc, Cardiovascular Surgeon;
D.G. Tarasov, MD, PhD, Chief Doctor

Federal Center for Cardiovascular Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation, 4 Pokrovskaya roshcha St., Astrakhan, 414011, Russian Federation

Current international standards recommend every laboratory to develop or confirm the existing in literature reference intervals for each laboratory value. We studied aggregation platelet function in 128 apparently healthy men and women of Astrakhan region (Russia) in clinical and diagnostic laboratory of Federal Center for Cardiovascular Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation. The study involved impedance technique using aggregometer Multiplate (Verum Diagnostica, Germany), adenosine diphosphoric acid being used as an inductor. Age and gender had no significant effect on platelet aggregation values. Reference interval of platelet aggregation with

Для контактов: Петрова Ольга Владимировна, e-mail: students_asma@mail.ru

adenosine diphosphoric acid on the aggregometer Multiplate in adult population of Astrakhan region was found to be 598.0–1120.0 AU·min, where AU·min is the area under aggregation curve.

The stated platelet aggregation interval in adult population can be used as reference in Astrakhan region laboratories when working with similar analytical systems (automatic aggregometer Multiplate), since it was developed considering all peculiarities of developing reference groups and standardization of all laboratory research stages.

Key words: reference interval; platelet aggregation; inductor; adenosine diphosphoric acid; automatic aggregometer Multiplate.

Тромбоциты играют большую роль в тромбообразовании у больных, перенесших кардиохирургические операции. Для профилактики и лечения тромбозов используются антитромботические (антиагрегантные) препараты [1].

К антиагрегантам относят разные по химической структуре лекарственные препараты, обладающие способностью угнетать функции тромбоцитов с помощью различных механизмов. Пациентам с риском развития кровотечений и тромбозов необходимо контролировать применение антиагрегантных препаратов (их дозировку, результаты) с помощью исследования агрегационной функции тромбоцитов. Так, например, при использовании клопидогреля (Плавикса) и Прасургреля контроль осуществляется с помощью исследования агрегационной функции тромбоцитов в присутствии активатора — аденозиндифосфорной кислоты [2–5].

В настоящее время в лабораторной практике для оценки агрегационной функции тромбоцитов используются агрегометры [1–3]. В основе метода определения агрегационной функции тромбоцитов лежит способность тромбоцитов под действием индукторов активизироваться и образовывать агрегаты, которые и анализирует агрегометр. По типу исследуемого материала агрегометры делятся на анализаторы, в которых используется цельная кровь, и анализаторы, в которых исследуется обогащенная тромбоцитами плазма. По типу регистрации изменений агрегатометрия делится на импедансную и оптическую [4, 5].

В последние годы современные импедансные агрегометры пришли на смену оптическим. Они в отличие от оптических не требуют специального обучения специалистов лабораторной диагностики и подготовки биологического материала, технически просты в эксплуатации, позволяют сократить время исследования крови.

Для оценки результатов лабораторного исследования используют референтный интервал (РИ). Этот показатель — ориентир, справочная информация, которая необходима врачу для правильной трактовки результата лабораторного исследования. Верхняя и нижняя границы РИ служат линиями раздела между здоровьем и болезнью в лабораторном смысле [6, 7].

Отсутствие регионарных РИ-показателей исследования агрегационной функции тромбоцитов ограничивает использование современных импедансных агрегометров в клинической практике.

Кроме того, современные отечественные и международные стандарты рекомендуют каждой лаборатории установить РИ для каждого лабораторного параметра или подтвердить имеющиеся в справочной литературе данные о РИ [6–8].

Цель исследования — установить референтные интервалы агрегации тромбоцитов в присутствии аденозиндифосфорной кислоты на агрегометре Multiplate на примере взрослого населения Астраханской области.

Материалы и методы. Для установления РИ использовали классический подход к расчету РИ с применением строгих критериев включения в исследование и исключения из него [6, 7].

Критерий включения в исследование — практически здоровые лица.

Критерии исключения пациентов из исследования: наличие соматической патологии, влияющей на состояние гемостаза; прием антитромботических препаратов.

Обследования проводили в рамках профилактического медицинского осмотра в Федеральном центре сердечно-сосудистой хирургии (Астрахань).

Референтная группа была сформирована следующим образом: 70 здоровых мужчин и 70 здоровых женщин — жителей Астраханской области в возрасте от 40 до 60 лет.

Качество лабораторного исследования зависит от преаналитического, аналитического и постаналитического этапов [9], в связи с чем все этапы нашего исследования мы стандартизировали.

Стандартизация преаналитического долабораторного этапа была обеспечена международными и отечественными стандартами, а также локальными документами, разработанными в Федеральном центре сердечно-сосудистой хирургии (Астрахань).

Образцы крови для исследования собирали путем пункции кубитальной вены после наложения жгута (не более 1 мин) в положении пациента лежа с помощью двухкомпонентных систем для забора крови — одноразовых полипропиленовых пробирок с 17 ЕД/л литий-гепарина (Sarstedt, Германия).

Образцы крови доставляли в лабораторию в течение 15–20 мин после венопункции и анализировали через 30–35 мин с момента поступления биологического материала в клиничко-диагностическую лабораторию.

Контроль качества поступающего в лабораторию биологического материала был обеспечен на преана-

литическом лабораторном этапе согласно международным и отечественным стандартам.

Стандартизация аналитического этапа была обеспечена:

ежегодным техническим обслуживанием автоматического агрегометра Multiplate (Verum Diagnostica, Германия);

ежедневной проверкой точности (правильности) работы измерительных частей (электродов) с помощью электронного контроля качества согласно инструкции по эксплуатации прибора;

ежедневным контролем качества импедансной агрегометрии с использованием сертифицированных контрольных материалов для проведения внутрилабораторного контроля качества согласно инструкции по эксплуатации анализатора;

наличием лабораторной информационной системы.

Исследование агрегационной функции тромбоцитов проводили в цельной крови импедансным способом, согласно инструкции производителя, на автоматическом агрегометре Multiplate (Verum Diagnostica, Германия). В качестве индуктора использовали аденозиндифосфорную кислоту, конечная концентрация которой составила 6,5 мкМ. Результаты исследования агрегации тромбоцитов представлены в виде площади под кривой агрегации (AU·min).

Все статистические процедуры выполняли с помощью программного пакета Statistica 6.0 for Windows (StatSoft, Inc., США). Вычисляли \bar{X} — среднее арифметическое и SD — стандартное отклонение, а также медиану, 5-й и 95-й процентиля распределения. Проводили одномерный двухфакторный дисперсионный анализ, в котором пол и возраст выступали фиксированными факторами; агрегация тромбоцитов в присутствии аденозиндифосфорной кислоты — зависимой переменной. Тип распределения определяли по критерию Колмогорова–Смирнова. Для оценки различий средних тенденций между группами использовали критерий Манна–Уитни (U). Разделения считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Для определения РИ использовали статистические подходы, рекомендованные ГОСТ Р 53022.3–2008 и стандартом Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) A28-3 [6, 7].

Исследование проводили в два этапа. На первом этапе определяли и исключали из дальнейшей работы статистические выбросы при изучении агрегационной функции тромбоцитов с аденозиндифосфорной кислотой. Выбросы определяли с помощью метода Тьюки на основе интервала «нормальных» значений: $[Q1 - 1,5 \cdot IQR, Q3 + 1,5 \cdot IQR]$, где $Q1, Q3$ — границы первого и третьего квартилей, $IQR = Q3 - Q1$ — межквартильный размах. С помощью метода Тьюки из исследования исключили 12 результатов определения агрегационной функции тромбоцитов, что составило 11,7%.

С учетом данных о половых и возрастных разли-

чиях агрегационной функции тромбоцитов [10] на втором этапе мы определяли целесообразность выделения групп по полу и возрасту при расчете РИ с помощью одномерного двухфакторного дисперсионного анализа.

Результаты исследования. Результаты одномерного двухфакторного дисперсионного анализа целесообразности выделения групп по полу и возрасту при расчете РИ агрегации тромбоцитов в присутствии аденозиндифосфорной кислоты представлены в табл. 1 и 2.

Статистически значимых различий в агрегации тромбоцитов в присутствии аденозиндифосфорной кислоты (средняя площадь под кривой) у мужчин и женщин не выявлено (см. табл. 1).

Статистически значимых различий в средних значениях агрегации тромбоцитов в присутствии аденозиндифосфорной кислоты у мужчин и женщин в зависимости от возраста также не выявлено (см. табл. 2).

Результаты одномерного двухфакторного дисперсионного анализа показали нецелесообразность деления взрослого населения Астраханской области по полу и возрасту при установлении РИ агрегационной функции тромбоцитов.

В связи с этим данные определения агрегации тромбоцитов у мужчин и женщин объединили в одну группу для того, чтобы рассчитать среднее значение и стандартное отклонение и сравнить полученные данные с данными, указанными в инструкции производителя.

В табл. 3 представлены значения РИ, установленные нами у взрослого населения Астраханской области, и данные из инструкции производителя.

Т а б л и ц а 1

Результаты одномерного двухфакторного дисперсионного анализа целесообразности выделения групп по полу при расчете референтного интервала агрегации тромбоцитов с аденозиндифосфорной кислотой

Пол	n	$\bar{X} \pm SD, AU \cdot min$	p
Мужчины	63	871,3 ± 141,2	>0,05
Женщины	65	880,8 ± 141,1	>0,05

Т а б л и ц а 2

Результаты одномерного двухфакторного дисперсионного анализа целесообразности выделения групп по возрасту при расчете референтных интервалов агрегации тромбоцитов с аденозиндифосфорной кислотой

Возраст, лет	$\bar{X} \pm SD, AU \cdot min$	
	Мужчины	Женщины
40–50	874,4 ± 143,5 (n=30)	889,0 ± 149,2 (n=35)
51–60	880,9 ± 138,9 (n=33)	890,1 ± 150,5 (n=30)

Таблица 3

Значения референтного интервала агрегации тромбоцитов с аденозиндифосфорной кислотой

Результаты	Собственные результаты (n=128)	Данные фирмы-производителя [11–13] (n=150)
Хср, AU·min	870,9	—
SD	141,5	—
Me	860,0	830,0
5-й процентиль	620,0	548,0
95-й процентиль	1120,0	1167,0
PI [Me; 5; 95], AU·min*	620,0–1120,0	548,0–1167,0
PI (Хср±1,96SD), AU·min**	598,0–1120,0	—

* — значения PI, полученные в соответствии с инструкцией фирмы-производителя агрегометра; ** — значения PI, приведенные в соответствии с рекомендациями ГОСТ Р 53022.3–2008.

Установленный нами PI агрегации тромбоцитов в виде 5–95% практически не отличался от PI, указанного фирмой-производителем в инструкции к набору реактивов.

Сравнить значение PI в виде Хср±1,96SD не представляется возможным, так как производитель не указал его в инструкции к наборам реактивов.

Обсуждение. Согласно известным стандартам, способ (метод) расчета PI зависит от численности референтной группы и типа распределения значений лабораторного показателя. При численности группы менее 120 человек и ненормальном распределении лабораторных показателей используется расчет PI в виде 5–95%, согласно которому у 90% здоровых лиц обнаруживаются нормальные лабораторные показатели и у 10% — ненормальные. При численности группы более 120 человек и нормальном распределении лабораторных показателей используется расчет PI в виде Хср±1,96SD, согласно которому у 95% здоровых лиц обнаруживаются нормальные лабораторные показатели и у 5% — ненормальные [6, 7].

Производитель в инструкции к наборам реактивов указал PI в виде 5–95% при численности референтной группы 150 человек (см. табл. 3), это может указывать на ненормальное распределение значений агрегации тромбоцитов.

В нашем исследовании распределение агрегации тромбоцитов было нормальным и численность референтной группы составила 128 человек. Согласно стандарту CLSI A28-3 и ГОСТ Р 53022.3–2008 при нормальном распределении PI должен быть рассчитан по формуле Хср±1,96SD [6, 7]. В этой ситуации PI агрегации тромбоцитов в присутствии индуктора аденозиндифосфорной кислоты составляет 598,0–1120,0 AU·min.

Кроме того, пол и возраст не оказывают статистиче-

ски значимого влияния на значения агрегации тромбоцитов в присутствии аденозиндифосфорной кислоты. Это отличается от данных, представленных в работе [10], которые выявили возрастные и половые отличия при установлении PI агрегации тромбоцитов.

В заключение следует еще раз отметить следующее. В последние годы клиничко-диагностические лаборатории лечебных учреждений активно оснащаются современными анализаторами. Однако отсутствие региональных PI для лабораторных показателей затрудняет применение последних. Использование PI, указанных в инструкции по эксплуатации анализатора, может привести к неправильной интерпретации результата лабораторного исследования, так как эти PI были установлены для другой популяции.

Кроме того, в современных отечественных справочниках по лабораторной диагностике практически нет данных по PI агрегационной функции тромбоцитов, которые можно брать за основу.

В то же время, несмотря на наличие PI в инструкциях по эксплуатации анализаторов, производители лабораторного оборудования рекомендуют устанавливать PI лабораторных показателей для населения конкретного региона, которое обслуживается данным прибором.

В связи с этим мы провели процедуру установления PI агрегации тромбоцитов в присутствии аденозиндифосфорной кислоты на агрегометре Multiplate для взрослого населения Астраханской области. Референтный интервал агрегации тромбоцитов с аденозиндифосфорной кислотой на агрегометре Multiplate у здорового взрослого населения Астраханской области составил 598,0–1120,0 AU·min.

Заключение. Установленный интервал агрегации тромбоцитов у взрослого населения может быть использован как референтный в лабораториях Астраханской области при работе на аналогичных аналитических системах (автоматическом агрегометре Multiplate), так как он был разработан с учетом всех особенностей формирования референтных групп и со стандартизацией всех этапов лабораторных исследований.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках НИИ, проводимого Федеральным центром сердечно-сосудистой хирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Литература/References

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М; 2008; 292 с. Barkagan Z.S., Momot A.P. *Diagnostika i kontroliruemaya terapiya narusheniy gemostaza* [Diagnostics and controlled therapy of hemostasis]. Moscow, 2008; 292 p.
2. Чарная М.А., Морозов Ю.А. Современные антиагрегантные препараты и их применение в клинике (об-

зор литературы). Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия 2009; 2(1): 34–40. Charnaya M.A., Morozov Yu.A. Current antiplatelet drugs and their application in clinical practice (literature review). *Kardiologiya i serdechno-sosudistaya khirurgiya* 2009; 2(1): 34–40.

3. Siller J.M., Haberl K., Prillinger K., Panzer S., Lang I., Jilma B. The effect of antiplatelet drugs clopidogrel and aspirin is less immediately after stent implantation. *Thromb Res* 2009; 123(6): 874–880, <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2008.11.005>.

4. Вавилова Т.В. Гемостазиология в клинической практике. СПб; 2005. Vavilova T.V. *Gemostaziologiya v klinicheskoy praktike* [Hemostasiology in clinical practice]. Saint Petersburg; 2005.

5. Долгов В.В., Свиринов В.П. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. Тверь; 2005; 277 с. Dolgov V.V., Svirin V.P. *Laboratornaya diagnostika narusheniy gemostaza* [Laboratory diagnostics of hemostasis impairments]. Tver'; 2005; 277 p.

6. Казакова М.С., Луговская С.А., Долгов В.В. Референсные значения показателей общего анализа крови взрослого работающего населения. Клиническая лабораторная диагностика 2012; 6: 43–49. Kazakova M.S., Lugovskaya S.A., Dolgov V.V. The reference values of indicators of total blood analysis of adult working population. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2012; 6: 43–49.

7. ГОСТ Р 53022.3–2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки информативности лабораторных тестов. 2009. GOST R 53022.3–2008. *Tekhnologii laboratornye klinicheskie. Trebovaniya k kachestvu klinicheskikh laboratornykh issledovaniy. Chast' 3. Pravila otsenki informativnosti laboratornykh testov* [GOST R 53022.3–

2008. Clinical laboratory technologies. Requirements of quality of clinical laboratory tests. Part 3. Assessment of laboratory tests clinical significance]. 2009.

8. Clinical and Laboratory Standards Institute. *EP28-A3c. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory, approved guideline — third edition*. 2010.

9. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. М; 2007; 800 с. Kishkun A.A. *Rukovodstvo po laboratornym metodam diagnostiki* [Manual for laboratory diagnostic techniques]. M; 2007; 800 p.

10. Симонова О.И., Гордеева О.Б., Намазова-Баранова Л.С., Ботвиньева В.В., Горинова Ю.В., Солошенко М.А. Способ диагностики нарушений агрегации тромбоцитов при муковисцидозе у детей. Патент РФ №2533287. 2006. Simonova O.I., Gordeeva O.B., Namazova-Baranova L.S., Botvin'eva V.V., Gorinova Yu.V., Soloshenko M.A. *Sposob diagnostiki narusheniy agregatsii trombotsitov pri mukovistsidoze u detey*. Patent RF №2533287 [Diagnostic technique of platelet aggregation impairment in cystic fibrosis in children]. Patent RF No.2533287. 2006.

11. Valarche V., Desconclois C., Boutekedjiret T., Dreyfus M., Proulle V. Multiplate whole blood impedance aggregometry: a new tool for von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2011; 9(8): 1645–1647, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04400.x>.

12. Tóth O., Calatzis A., Penz S., Losonczy H., Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2006; 96(6): 781–788, <http://dx.doi.org/10.1160/th06-05-0242>.

13. Johnson A., Dovlatova N., Heptinstall S. Multiple electrode aggregometry and P2Y₁₂ antagonists. *Thromb Haemost* 2008; 99(6): 1127–1129, <http://dx.doi.org/10.1160/th08-01-0054>.