

Определение референсных значений для анализа агрегации тромбоцитов в автоматическом режиме на анализаторе Sysmex CS-5100

Ю. П. Ковальчук¹, М. И. Кадинская¹, М. С. Пименов², И. Ю. Ефимова¹

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

²ООО «Сисмекс РУС», Москва

РЕЗЮМЕ

Исследование функции тромбоцитов методом световой трансмиссионной агрегометрии (LTA) на специальном приборе – агрегометре требует значительных затрат времени и является трудоемким. В настоящем исследовании оценивалась автоматизированная агрегометрия с целью определения референсных интервалов. На анализаторе Sysmex CS-5100 проводились измерения агрегации с использованием нескольких агонистов в определенной концентрации – АДФ (2 мкмоль/л), арахидоновой кислоты (1 ммоль/л), коллагена (2 мкг/мл), ристоцетина (1,2 мг/мл), эpineфрина (5 мкмоль/л). Для каждого агониста измерялись максимальная агрегация, конечная точка агрегации, Lag-фаза, площадь под агрегационной кривой. На 40 образцах здоровых участников определены референсные интервалы для стандартной панели активаторов в рекомендуемых международным сообществом по тромбозу и гемостазу концентрациях. На анализаторах Sysmex серии CS может быть использована стандартная панель агонистов (АДФ, арахидоновая кислота, коллаген, ристоцетин, эpineфрин), поэтому данные аналитической системы могут заменить специализированные агрегометры или выполнять агрегацию тромбоцитов там, где этот анализ в настоящее время не проводится.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: агрегация тромбоцитов, функциональный тест тромбоцитов, тромбоциты, ревохем, LTA, агрегометрия.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Determination of reference ranges for automated platelet aggregometry on Sysmex CS-5100 analyzer

Yu. P. Kovalchuk¹, M. I. Kadinskaya¹, M. S. Pimenov², I. Yu. Efimova¹

¹First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

²Sysmex RUS Co, Moscow, Russia

SUMMARY

Measurement of platelet function by light transmission aggregometry (LTA) using a special device – an aggregometer requires significant time and is time-consuming. In this study, an automated LTA procedure was evaluated to establish the reference ranges. On the Sysmex CS-5100 analyzer, aggregation measurements were performed using several agonists at a certain concentration: ADP (2 μmol/L); arachidonic acid (1 mmol/L); collagen (2 μg/ml); ristocetin (1.2 mg/ml); epinephrine (5 μmol/L). For each agonist, the maximum and final aggregation, the Lag phase and the Area under the aggregation curve were measured. Reference ranges for a standard panel of activators were determined on 40 samples of healthy subjects in the concentrations recommended by the International Society on Thrombosis and Haemostasis. A standard panel of agonists can be used on Sysmex CS series analyzers: ADP, arachidonic acid; collagen; ristocetin, epinephrine, so these devices can replace specialized aggregometers or perform platelet aggregation where this investigation is not currently performed.

KEY WORDS: platelet aggregation; platelet function test, platelets, aggregometry, LTA, revocem.

CONFLICT OF INTEREST. The authors declare no conflict of interest.

Введение

Световая трансмиссионная агрегометрия (LTA) – наиболее распространенный метод оценки функциональной активности тромбоцитов. Принцип метода основан на изменении светопропускания в перемешиваемой богатой тромбоцитами плазме (БТП), которое увеличивается в ходе агрегации тромбоцитов после добавления индукторов. На основе полученных данных строится график образования тромбоцитарных агрегатов. Интерпретация результатов проводится по изменению параметров кривой агрегации.

Этот метод мало изменился с тех пор, как был впервые описан Борном и О’Брайеном в начале 1960-х годов [1, 2], а анализ агрегации тромбоцитов, вызванной рядом агонистов (индукторов), играет важную роль в исследовании нарушений функции тромбоцитов [3]. Измерение агрегации тромбоцитов методом агрегометрии – практически единственный лабораторный инструмент оценки

функциональной активности тромбоцитов [4], который доступен в специализированных лабораториях, занимающихся диагностикой нарушений системы гемостаза. Этот анализ не распространен повсеместно, так как процесс подготовки образцов, сам анализ и интерпретация полученных результатов и графиков (кривых агрегаций) требуют значительного опыта и знаний, чтобы правильно оценить выявленные нарушения. Исследование функции тромбоцитов методом световой трансмиссионной агрегометрии на специальном приборе – агрегометре является трудоемким, требует значительных затрат времени. В настоящее время доступно проведение световой агрегометрии в автоматическом режиме на анализаторах Sysmex серии CS, что позволяет улучшить подходы к стандартизации исследований, повысить качество и скорость выполнения анализа, снизить нагрузку на персонал лабораторий.

Целью данного исследования являлось определение референсных интервалов для стандартной панели агонистов (АДФ, арахидоновая кислота, коллаген, ристоцин и эпинефрин) в автоматическом режиме на анализаторе Sysmex CS-5100.

Материалы и методы

Пациенты и контроли

В данное исследование были включены 40 здоровых добровольцев обоих полов в равной пропорции. К донорам применяли следующие критерии включения: отсутствие в анамнезе эпизодов тромбоза, кровотечений и других нарушений системы гемостаза, возраст от 18 до 60 лет, результаты скрининг-коагулограммы (протромбиновое время, МНО, АЧТВ, фибриноген и тромбиновое время) находились в пределах референсных значений. Критерии исключения: лица, принимающие антикоагулянты и антиагреганты.

Кровь забирали натощак в утренние часы (до 11 часов) из средней локтевой вены в вакуумные пробирки Vacuette с двойной стенкой с цитратом натрия 3,2% (Greiner-Bio-One, Австрия) с использованием игл Vacuette 22-го калибра (Greiner-Bio-One, Австрия) в условиях минимального венозного застоя. Количество тромбоцитов измерялось с помощью гематологического анализатора Sysmex XN 1010A и составило 140 000–410 000/л, уровень гематокрита находился в пределах 30–50%.

Все образцы дважды центрифугировали: для получения богатой тромбоцитами плазмы – 10 минут при 200 g, а для получения бедной тромбоцитами плазмы – 15 минут при 1500 g [3].

Оборудование и реагенты

Процесс формирования тромбоцитарных агрегатов происходит под воздействием индукторов агрегации. В физиологических условиях самым мощным индуктором агрегации тромбоцитов является тромбоксан A₂ (TXA₂), менее сильными – АДФ, адреналин, серотонин, гистамин, тромбин, коллаген и др. В лабораторных исследованиях чаще всего используют АДФ, коллаген, ристоцетин, адреналин, реже – арахидоновую кислоту, тромбин и др.

Для проведения исследования использовали анализатор плазменного и тромбоцитарного гемостаза CS-5100i (Sysmex Corporation, Япония) и реагенты (HYPHEN BioMed, Франция).

Тест-агрегация тромбоцитов с коллагеном в концентрации 2 мкг/мл – «Ревохем Коллаген» (Revohem Collagen).

Тест-агрегация тромбоцитов с эпинефрином в концентрации 5 мкмоль/л – «Ревохем Эпинефрин» (Revohem Epinephrine).

Тест-агрегация тромбоцитов с АДФ в концентрации 2 мкмоль/л – «Ревохем АДФ» (Revohem ADP).

Тест-агрегация тромбоцитов с арахидоновой кислотой в концентрации 1 ммоль/л – «Ревохем Арахидоновая кислота» (Revohem Arachidonic acid).

Тест-агрегация тромбоцитов с ристоцетином в концентрации 1,2 мг/мл – «Ревохем Ристоцетин» (Revohem Ristocetin).

Вышеуказанные концентрации индукторов агрегации, примененные в исследовании, были выбраны как начальные в соответствии с рекомендациями Международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH) [3]. Запись агрегации на приборе проводилась в течение 6 минут, скорость перемешивания БТП составила 800 об./мин. Исследование агрегации проводилось в течение 2 часов от момента взятия крови из вены.

Анализ данных

Статистическая обработка производилась с использованием программного обеспечения MedCalc версии 19.1 (MedCalc Software, Бельгия).

Метод Тьюки был использован для оценки выбросов. Референсный интервал параметров агрегации тромбоцитов вычисляли процедурой непараметрического бутстрэпа. В качестве референсных интервалов принимали 95%-ный интервал в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [5].

Результаты

Полученные данные теста агрегации тромбоцитов с различными агонистами «Ревохем» проверили на выбросы двусторонним методом Тьюки. После анализа данных не было обнаружено выпадающих значений, поэтому при подсчете референсных интервалов значения не исключались. Нормальные значения рассчитывались для следующих параметров: максимальная агрегация, конечная точка агрегации, Lag-фаза, площадь под агрегационной кривой.

Максимальная агрегация – максимальный процент агрегации, который был достигнут в процессе анализа; конечная точка – максимальный процент агрегации в момент окончания анализа, характеризующий устойчивость агрегации тромбоцитов и процесс дезагрегации; Lag-фаза – время задержки процесса агрегации тромбоцитов от момента добавления индуктора до начала агрегации тромбоцитов; площадь под агрегационной кривой (AUC) – область под агрегационной кривой, характеризующая скорость и устойчивость агрегации тромбоцитов.

Полученные результаты нормальных значений приведены в *таблицах 1–5*.

Низкие концентрации АДФ (до 2,5 мкмоль/л) вызывают первичную (обратимую) агрегацию, некоторое увеличение абсорбции вследствие изменения формы тромбоцитов, а также после первой фазы агрегации может наблюдаться дезагрегация. Нормальные значения максимальной агрегации тромбоцитов для АДФ составили 57–100%. Также видно, что для данного активатора в концентрации 2 мкмоль/л может наблюдаться дезагрегация со значением в конечной точке от 31%. Время задержки ответа тромбоцитов на добавление активатора составляет 10–50 секунд.

Арахидоновая кислота, активируя тромбоциты, приводит к дозозависимому изменению их формы, к первой волне, а затем ко второй волне агрегации. Нормальные значения максимальной агрегации тромбоцитов для арахидоновой кислоты в концентрации 1 ммоль/л составили 76–99%. Арахидоновая кислота достаточно устойчиво активирует тромбоциты. Значения в конечной точке 72–95% подтверждают отсутствие процесса дезагрегации. Так как арахидо-

Таблица 1
Референсный интервал для теста агрегация тромбоцитов с АДФ в концентрации 2 мкмоль/л

Параметр	Референсный интервал (2,5–97,5%)
Максимальная агрегация, % [90%-ный ДИ]	57 [52–63%] – 100 [94–105%]
Конечная точка агрегации, % [90%-ный ДИ]	40 [31–51%] – 105 [93–115%]
Lag-фаза, с [90%-ный ДИ]	10 [3–19 с] – 50 [42–57 с]
Площадь под агрегационной кривой, %/с [90%-ный ДИ]	8881 [7174–10 788%/с] – 22 518 [21 022–23 800%/с]

Примечание: здесь и далее ДИ – доверительный интервал.

Таблица 2
Референсный интервал для теста агрегация тромбоцитов с арахидоновой кислотой в концентрации 1 ммоль/л

Параметр	Референсный интервал (2,5–97,5%)
Максимальная агрегация, % [90%-ный ДИ]	76 [73–79%] – 99 [96–102%]
Конечная точка агрегации, % [90%-ный ДИ]	72 [69–75%] – 95 [92–97%]
Lag-фаза, с [90%-ный ДИ]	12 [0–32 с] – 123 [103–142 с]
Площадь под агрегационной кривой, %/с [90%-ный ДИ]	11 978 [10 478–13 582%/с] – 22 884 [21 337–24 332%/с]

Таблица 3
Референсный интервал для теста агрегация тромбоцитов с коллагеном в концентрации 2 мкг/мл

Параметр	Референсный интервал (2,5–97,5%)
Максимальная агрегация, % [90%-ный ДИ]	71 [67–75%] – 104 [99–108%]
Конечная точка агрегации, % [90%-ный ДИ]	65 [61–69%] – 99 [94–103%]
Lag-фаза, с [90%-ный ДИ]	51 [47–56 с] – 88 [83–92 с]
Площадь под агрегационной кривой, %/с [90%-ный ДИ]	13 295 [12 372–14 324%/с] – 21 339 [20 127–22 419%/с]

Таблица 4
Референсный интервал для теста агрегация тромбоцитов с эпинефрином в концентрации 5 мкмоль/л

Параметр	Референсный интервал (2,5–97,5%)
Максимальная агрегация, % [90%-ный ДИ]	67 [63–71%] – 95 [92–99%]
Конечная точка агрегации, % [90%-ный ДИ]	62 [59–65%] – 90 [86–93%]
Lag фаза, с [90%-ный ДИ]	0 [0–9 с] – 198 [162–228 с]
Площадь под агрегационной кривой, %/с [90%-ный ДИ]	7051 [5346–9050%/с] – 20 168 [18 207–21 755%/с]

Таблица 5
Референсный интервал для теста агрегация тромбоцитов с ристоцетином в концентрации 1,2 мг/мл

Параметр	Референсный интервал (2,5–97,5%)
Максимальная агрегация, % [90%-ный ДИ]	71 [68–74%] – 98 [94–101%]
Конечная точка агрегации, % [90%-ный ДИ]	70 [67–73%] – 97 [94–100%]
Lag фаза, с [90%-ный ДИ]	15 [10–21 с] – 64 [57–70 с]
Площадь под агрегационной кривой, %/с [90%-ный ДИ]	14 703 [13 438–16 017%/с] – 24 266 [23 090–25 375%/с]

новая кислота является активатором тромбоцитов, который без участия специфических рецепторов проникает внутрь клетки и превращается в активные метаболиты – тромбоксан A2 и простагландины H2 и G2, то задержка ответа тромбоцитов может составлять длительное время – 12–123 с.

Агрегации в ответ на стимуляцию коллагеном предшествует фаза задержки (Lag-фаза), длящаяся от 10 с до нескольких минут. Длительность Lag-фазы обратно пропорциональна концентрации индуктора и реактивности тромбоцитов. Далее следует единственная волна агрегации, возникающая вследствие активации пути арахидоновой кислоты и высвобождения гранул.

Нормальные значения максимальной агрегации тромбоцитов для коллагена составили 71–104%. Для данного активатора в концентрации 2 мкг/мл также не выявлена дезагрегация, и процент агрегации в конечной точке составил 65–99%. Lag-фаза ответа тромбоцитов на добавление индуктора составила 51–88 с.

Эпинефрин, в зависимости от дозы, вызывает обратимую или необратимую двухволновую агрегацию. Выраженность активации эпинефрином зависит от концентрации кальция в окружающей тромбоциты среде. Эпинефрин обладает выраженными потенцирующими свойствами, то есть усиливает стимулирующее действие других агонистов, которые появляются в процессе получения БТП. Нормальные значения максимальной агрегации тромбоцитов для эпинефрина, который является естественным агентом, стимулирующим тромбоциты через α_2 -адренергический рецептор, ведущий к экспрессии комплекса GpIIb / IIIa и последующему синтеза тромбоксана A2, составили 67–95%. Эпинефрин в концентрации 5 мкмоль/л в норме вызывает устойчивую агрегацию тромбоцитов, что подтверждается отсутствием снижения процента агрегации в конечной точке (62–90%). Время задержки ответа тромбоцитов для эпинефрина было самым длительным среди всех индукторов и составляло до 198 с.

В основе метода лежит способность антибиотика ристоцетина способствовать взаимодействию фактора Виллебранда и рецептора тромбоцитов GP Ib *in vitro*, в результате чего он индуцирует склеивание (агглютинацию) тромбоцитов. Ристоцетин не активирует ни один из путей активации и не вызывает высвобождения содержимого гранул тромбоцитов. Референсные значения максимальной агрегации тромбоцитов для ристоцетина составили 71–98%. Для данного агониста в концентрации 1,2 мг/мл проявление дезагрегации нехарактерно, о чем свидетельствует процент агрегации в конечной точке 70–97%. Lag-фаза ответа тромбоцитов на добавление ристоцетина составляет 15–64 с.

Обсуждение

Использование метода световой трансмиссионной агрегометрии в качестве «золотого стандарта» [7] для определения функциональной активности тромбоцитов диктует необходимость аккуратного и внимательного подхода при проведении данного анализа. Базовым принципом применения лабораторных методов диагностики является выведение локальных референсных значений [5].

Различия в составе активаторов и оборудовании, на котором выполняется измерение, не позволяют принять общие

Уровень агрегации тромбоцитов (PAL)*

Порог для прогнозирования тромботического и геморрагического риска у пациента, получающего моно- или двойную антитромбоцитарную терапию

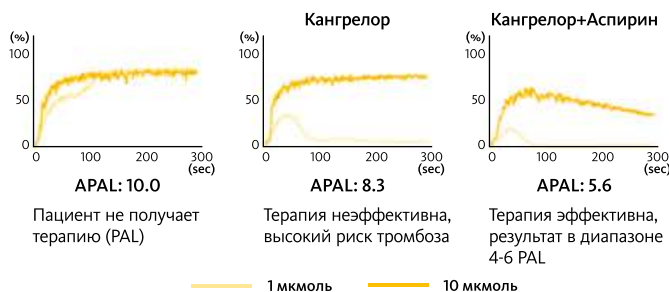
Риск
кровотечения
< 4.0 PAL

Терапевтический
диапазон
4.0 - 6.0 PAL

Риск
артериального
тромбоза
> 6.0 PAL

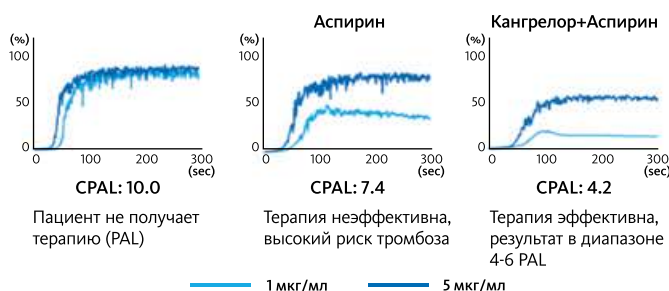
АДФ-индуцированный PAL (APAL):

специфически измеряет эффективность ингибитора рецептора P2Y₁₂
(Клопидогрель, Тикагрелор и Прасугрель)



Коллаген-индуцированный PAL (CPAL):

специфически измеряет эффективность ингибитора циклоксиогеназы
(Аспирин)



* T. SAKAYORI et al. Evaluating the Utility of a Novel Research Use Index in Platelet Aggregation Analysis Featured in an Automated Blood Coagulation Analyzer to Confirm the Effect of Antiplatelet Drugs. Sysmex Journal International. Volume 29. No.1 (2019)

(международные) нормальные значения для оценки функциональной активности тромбоцитов методом световой агрегометрии. Международные стандарты и руководства обязательно рекомендуют локальное выведение или валидацию референсных интервалов в каждой лаборатории [3, 5, 7].

Полученные результаты соответствуют недавнему многоцентровому клиническому исследованию по выведению референсных значений для АДФ, арахидоновой кислоты и эпинефрина и приближены к ним для параметров «коллаген» и «риостоцетин» [6].

Выводы

Определены референсные интервалы для стандартной панели активаторов в рекомендуемых международным сообществом по тромбозу и гемостазу концентрациях АДФ (2 мкмоль/л), арахидоновой кислоты (1 ммоль/л), коллагена (2 мкг/мл), ристомина (1,2 мг/мл) и эпинефрина (5 мкмоль/л) для параметров «максимальная агрегация», «конечная точка агрегации», «Lag-фаза», «площадь по агрегационной кривой».

Список литературы / References

1. Born G, Cross M. The aggregation of blood platelets. *J Physiol*. 1963; 168: 178–95.
2. O'Brien J. Platelet aggregation: part II. Some results from a new method of study. *J Clin Pathol*. 1962; 15: 452–5.
3. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, 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: 1183–9.
4. Филькова А. А., Пантелеев М. А., Свешникова А. Н. Обратимая агрегация тромбоцитов в присутствии ионов кальция: механизмы и потенциальная значимость. *Вопросы гематологии / онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2019; 18 (3): 120–129.
5. Filkova A. A., Panteleev M. A., Sveshnikova A. N. Reversible platelet aggregation in the presence of calcium ions: mechanisms and potential relevance. *Issues of hematology / oncology and immunopathology in pediatrics*. 2019; 18 (3): 120–129.
6. CLSI document C28-A3; Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
7. Patton S, McCormick A, Bukht M, Gurney D, Holding I, Moore GW. A multicenter study to evaluate automated platelet aggregometry on Sysmex CS-series coagulation analyzers—preliminary findings. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018 Aug 30; 2 (4): 778–789.
8. Ling LQ, Liao J, Niu Q, Wang X, Jia J, Zuo CH, Jiang H, Zhou J. Evaluation of an automated light transmission aggregometry. *Platelets*. 2017 Nov; 28 (7): 712–719.
9. CLSI document H58-A; Platelet Function Testing by Aggregometry; Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

Статья поступила / Received 12.03.2021
Получена после рецензирования / Revised 19.03.2021
Принята в печать / Accepted 26.03.2021

Сведения об авторах

Ковальчук Юрий Павлович, к.м.н., зам. гл. врача клиники по лабораторной диагностике¹

Кадинская Маргарита Ивановна, к.м.н., зав. лабораторией клинической гемостазиологии отделения лабораторной диагностики¹

Пименов Максим Сергеевич, ст. менеджер по направлению «гемостаз» и научному маркетингу². E-mail: pimenov.maxim@sysmex-europe.com

Ефимова Ирина Юрьевна, врач лаборатории клинической гемостазиологии отделения лабораторной диагностики¹

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург
²ООО «Сисмекс РУС», Москва

Автор для переписки: М. С. Пименов, E-mail: pimenov.maxim@sysmex-europe.com

Для цитирования: Ковальчук Ю. П., Кадинская М. И., Пименов М. С., Ефимова И. Ю. Определение референсных значений для анализа агрегации тромбоцитов в автоматическом режиме на анализаторе Sysmex CS 5100. *Медицинский алфавит*. 2021; (13): 42–46. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-13-42-46>

About authors

Kovalchuk Yuri P., PhD Med, deputy chief clinic doctor for laboratory diagnostics¹

Kadinskaya Margarita I., PhD Med, head of Laboratory of Clinical Hemostatology at Dept of Laboratory Diagnostics¹

Pimenov Maxim S., senior manager for hemostasis and scientific marketing². E-mail: pimenov.maxim@sysmex-europe.com

Efimova Irina Yu., physician of Laboratory of Clinical Hemostatology at Department of Laboratory Diagnostics¹

¹First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

²Sysmex RUS Co, Moscow, Russia

Corresponding author: M. S. Pimenov, E-mail: pimenov.maxim@sysmex-europe.com

For citation: Kovalchuk Yu. P., Kadinskaya M. I., Pimenov M. S., Efimova I. Yu. Determination of reference ranges for automated platelet aggregometry on Sysmex CS 5100 analyzer. *Medical alphabet*. 2021; (13): 42–46. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-13-42-46>



I Международный
междисциплинарный конгресс

Менеджмент крови пациента в клинической медицине

Гибридный формат
1–2 июня 2021 года

Москва, Олимпийский проспект, д. 18/1 AZIMUT
Отель Олимпик Москва



Национальная ассоциация специалистов
менеджмента крови пациента



ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр
акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика
В.И. Кулакова» Минздрава РФ

По вопросам участия в конгрессе:
managermkp@medguru.studio
+7 967 003-69-46

