

О.Б. Гордеева^{1, 2}, М.С. Карасева¹, В.А. Ластовка³, Н.Д. Вашакмадзе^{1, 2},
М.А. Солошенко¹, Г.В. Ревуненков¹, К.А. Валялов¹, В.В. Алтунин¹

¹ НИИ педиатрии и охраны здоровья детей НКЦ №2 ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»,
Москва, Российская Федерация

² РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Российская Федерация

³ Морозовская ДГКБ ДЗМ, Москва, Российская Федерация

Комплексный подход к разработке референсных показателей для оценки функции тромбоцитов на начальном этапе исследования

Автор, ответственный за переписку:

Гордеева Ольга Борисовна, кандидат медицинских наук, заведующая отделом научных основ гемостаза НИИ педиатрии и охраны здоровья детей НКЦ №2 ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», доцент кафедры факультетской педиатрии педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»

Адрес: 117593, Москва, Литовский бульвар, д. 1А, тел./факс: +7 (495) 427-55-77, тел.: +7 (963) 782-02-06, e-mail: obr@yandex.ru

Обоснование. Тромбоцитопатии являются актуальной проблемой в педиатрической практике. Нарушения функции тромбоцитов клинически проявляются как тромботические и геморрагические события различной степени тяжести и локализации. Оценить функцию тромбоцитов можно с помощью агрегатометрии. Нормативные параметры для агрегатометрии могут использоваться в педиатрической практике в качестве стандарта для оценки функционирования тромбоцитов в периферической крови. Подобные исследования у детей в Российской Федерации ранее не осуществлялись. **Цель исследования** — обосновать значимость разработки референсных интервалов (РИ) для агрегатометрии тромбоцитов в педиатрии. **Методы.** В исследовании приняли участие 30 условно здоровых пациентов в возрасте от 1 до 18 лет. Лабораторные методы обследования включали клинический анализ крови на автоматическом гематологическом анализаторе. Агрегацию тромбоцитов в цельной крови исследовали с помощью импедансного агрегометра, показатели плазменного звена гемостаза (протромбин по Квику), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), фибриноген — на автоматическом коагулографе, молекулярно-генетическое исследование полиморфизмов в генах тромбоцитарного звена гемостаза проводилось методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Для исследования агрегации тромбоцитов использовались несколько индукторов: активатор рецепторов тромбина (TRAP-тест), аденозиндифосфорная кислота (АДФ), арахидоновая кислота (ASPI-тест). Инструментальные методы исследования включали электрокардиографию, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, мочевыделительной системы, щитовидной железы. **Результаты.** В исследование были включены 16 девочек и 14 мальчиков. Медиана возраста составила 9,4, межквартильный интервал (IQR) — 6,5; 14,1. В результате исследования для каждого индуктора агрегации (тромбин, АДФ, арахидоновая кислота) были определены РИ показателей агрегации тромбоцитов. **Заключение.** Полученные данные позволяют в дальнейшем, основываясь на результатах проводимого исследования, оптимизировать подход к диагностике нарушений функции тромбоцитов с учетом установленных референсных интервалов. Результаты дальнейшего исследования могут способствовать разработке алгоритма контроля антиагрегантной терапии для пациентов, имеющих противопоказания или генетически обусловленную низкую чувствительность к ингибиторам агрегации тромбоцитов на основе ацетилсалициловой кислоты.

Ключевые слова: тромбоциты, агрегация, референсные интервалы, гемостаз, антиагреганты, дети, тромбоз, тромбоцитопатия, агрегометр

Для цитирования: Гордеева О.Б., Карасева М.С., Ластовка В.А., Вашакмадзе Н.Д., Солошенко М.А., Ревуненков Г.В., Валялов К.А., Алтунин В.В. Комплексный подход к разработке референсных показателей для оценки функции тромбоцитов на начальном этапе исследования. *Педиатрическая фармакология*. 2023;20(2):102–111. doi: <https://doi.org/10.15690/pf.v20i2.2530>

ОБОСНОВАНИЕ

Определение популяционных особенностей нормативных параметров даст возможность выявления скрытых форм тромбоцитопатий. Данный факт особенно актуален на фоне отягощенного семейного анамнеза, когда у нескольких членов семьи имеются полиморфизмы в генах тромбоцитарного звена гемостаза. Подобные исследования у детей в Российской Федерации ранее не осуществлялись. Важной задачей является определение референсных интервалов (РИ) для оценки агрегатограммы с различными индуктора-

ми. Нормативные параметры для агрегатометрии могут использоваться в педиатрической практике в качестве стандарта для оценки функционирования тромбоцитов в периферической крови. Изначально предпочтение отдавалось оптической агрегатометрии, однако в настоящее время более физиологичным исследованием считается импедансный метод. Принцип данного метода заключается в графическом отображении изменения импеданса (сопротивления) во времени после добавления определенного индуктора агрегации к цельной крови.

Известно, что плазматическая мембрана тромбоцитов состоит из слоя фосфолипидов и белков. Углеводные остатки гликопротеидов и гликолипидов данной мембраны образуют внешнюю оболочку — гликокаликс. Среди органелл тромбоцитов выделяют аппарат Гольджи, пероксисомы, митохондрии, вакуоли и три типа гранул: α -гранулы, плотные гранулы и лизосомы. Плотные гранулы (δ -гранулы) содержат аденозиндифосфат, аденозинтрифосфат, серотонин, ионы кальция (Ca^{2+}); α -гранулы содержат фактор роста тромбоцитов. В состав β -гранул входят тромбоглобулин, фактор VIII, антиген фактора Виллебранда, фактор V, фибриноген, тромбоспондин, фибронектин, лизосомальные гранулы (фосфатазы, кислые гидролазы) [1]. От количества и функциональной активности органелл в тромбоцитах зависит способность тромбоцитов реализовывать свои агрегационные свойства при различных условиях [2]. В нормальных условиях тромбоциты, циркулирующие в крови, не взаимодействуют со слоем эндотелиальных клеток. При повреждении сосуда они контактируют с внутренними (субэндотелиальными) слоями сосудистой стенки. Тромбоциты в результате адгезии прикрепляются к компонентам субэндотелия сосуда, взаимодействуя со специфическими рецепторами к коллагену и фактору Виллебранда. Также в зоне повреждения появляются индукторы агрегации тромбоцитов — тромбин, АДФ, тромбосан А2 (ТХА2). Тромбин образуется в результате активации плазменного звена гемостаза, в то время как высвобождение АДФ и ТХА2 происходит из тромбоцитов или из поврежденных клеток крови.

На первом этапе активации тромбоцитов адгезия тромбоцитов реализуется через фактор Виллебранда. В дальнейшем он через рецептор гликопротеина GP IIb/IX/V на поверхности тромбоцитов взаимодействует с коллагеном на стенках эндотелия [3]. Реакция приводит к активации клеток через рецепторы гликопротеина GP IIb/IIIa и $\alpha 2\beta 1$. Из тромбоцитов при дегрануляции высвобождается АДФ, образуется тромбосан, и происходит активация рецепторов GP IIb/IIIa. При нарушении функционирования этапов взаимодействия клеток наряду с дефектами в рецепторном аппарате тромбоцитов возникают нарушения функции адгезии и агрегации тромбоцитов, приводящие к различным клиническим проявлениям.

Известно, что тромбоциты участвуют в реакции воспаления и восстановления [4], поэтому в результате воспалительных реакций активированные тромбоциты взаимодействуют с лейкоцитами через белки клеточной адгезии (Р-селектин и гликопротеин IIb-IIIa), направляя их в зону повреждения. Тромбоцитопатии, возникающие в результате какого-либо дефекта тромбоцитов, могут повышать риск развития как геморрагического синдрома, так и усиленного тромбообразования.

Терапия с использованием препаратов из группы антиагрегантов в настоящее время играет ведущую роль в лечении и профилактике тромботических состояний. Однако использование антиагрегантов без динамического контроля терапии может приводить к геморрагическому синдрому и даже фатальным кровотечениям [5].

Olga B. Gordeeva^{1, 2}, Maria S. Karaseva¹, Vasily A. Lastovka³, Nato G. Vashakmadze^{1, 2}, Margarita A. Soloshenko¹, Gregory V. Revunenko¹, Kirill A. Valyalov¹, Viktor V. Altunin¹

¹ Research Institute of Pediatrics and Children's Health in Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

³ Morozovskaya Children's City Hospital, Moscow, Russian Federation

Comprehensive Approach to Developing Baseline Reference Ranges for Platelet Function

Background. Thrombocytopathies are topical issues of pediatrics. Platelet dysfunction clinically manifests as thrombotic and hemorrhagic events of various severity and location. Platelet function can be evaluated via aggregatometry. Specified parameters for aggregatometry can be used in pediatrics as a standard for evaluating platelet function in peripheral blood. There were no similar studies in children in Russian Federation. **Objective. The aim of the study is** — to justify the significance of reference ranges (RR) development for platelet aggregatometry in pediatrics. **Methods.** The study included 30 relatively healthy patients aged from 1 to 18 years. Laboratory tests included complete blood count via automatic hematological analyzer; platelet aggregation in whole blood was evaluated via impedance aggregometer; plasmic hemostasis component (Quick prothrombin), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), and fibrinogen were evaluated on automatic coagulation analyzer; molecular genetic study of platelet genes polymorphisms was performed via real-time PCR. Several inducers were used to study platelet aggregation: thrombin receptor activating peptide (TRAP), adenosine diphosphate (ADP), arachidonic acid (ASPI). Instrumental methods included electrocardiography, ultrasound of abdomen, urinary system, and thyroid gland. **Results.** The study included 16 girls and 14 boys. The median age was 9.4, interquartile range (IQR) was 6.5; 14.1. RR for platelet aggregation indicators were determined for all aggregation inducers (thrombin, ADP, arachidonic acid) as a result of the study. **Conclusion.** The obtained data will allow to improve the diagnosis approach for platelet dysfunction regarding the established reference ranges. The results of further research may contribute in the development of the algorithm for controlling antiplatelet therapy in patients with contraindications or with genetically determined low sensitivity to thrombocyte aggregation inhibitors based on acetylsalicylic acid

Keywords: platelets, aggregation, reference ranges, hemostasis, antiaggregants, children, thrombosis, thrombocytopathia, aggregometer

For citation: Gordeeva Olga B., Karaseva Maria S., Lastovka Vasily A., Vashakmadze Nato G., Soloshenko Margarita A., Revunenko Gregory V., Valyalov Kirill A., Altunin Viktor V. Comprehensive Approach to Developing Baseline Reference Ranges for Platelet Function. *Pediatricheskaya farmakologiya — Pediatric pharmacology*. 2023;20(2):102–111. (In Russ). doi: <https://doi.org/10.15690/pf.v20i2.2530>

Поэтому определение нормативных параметров агрегатогаммы является востребованным и актуальным исследованием в педиатрической практике для выявления различных тромбоцитопатий и возможности контроля антиагрегантной терапии у детей.

Цель исследования

Обосновать значимость комплексного подхода к разработке РИ на начальном этапе исследования для агрегатометрии тромбоцитов в педиатрии.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено одномоментное проспективное исследование согласно международным стандартам [6, 7]. Стандартизация преаналитического долабораторного этапа также была обеспечена международными и отечественными стандартами [8–10]. Дизайн исследования представлен на рис. 1. В дизайне указан возраст пациентов запланированных на весь период исследования (3 года).

Условия проведения исследования

Исследование проходило на базе КДЦ НИИ педиатрии и охраны здоровья детей ЦКБ РАН в период с октября

по декабрь 2021 г. Анализ был проведен в зависимости от гендера, но значимой разницы не было получено. До включения в исследование все участники и/или их законные представители предоставили информированное согласие.

Критерии соответствия

Описание критериев соответствия (диагностические критерии)

Критерии включения: условно здоровые пациенты в возрасте от 1 до 18 лет. Учитывая короткий временной интервал начального этапа исследования, дети в возрасте от 1 до 5 лет не вошли в исследование, так как фактически не попали под наблюдение. Исследование продолжается, и в дальнейшем будут сформированы возрастные группы в интервале от 1 года до 18 лет.

Подбор участников в группы

При клиническом осмотре каких-либо грубых отклонений в состоянии здоровья пациентов выявлено не было. Каких-либо тромботических, ишемических, геморрагических событий у пациентов и их ближайших родственников не отмечено.

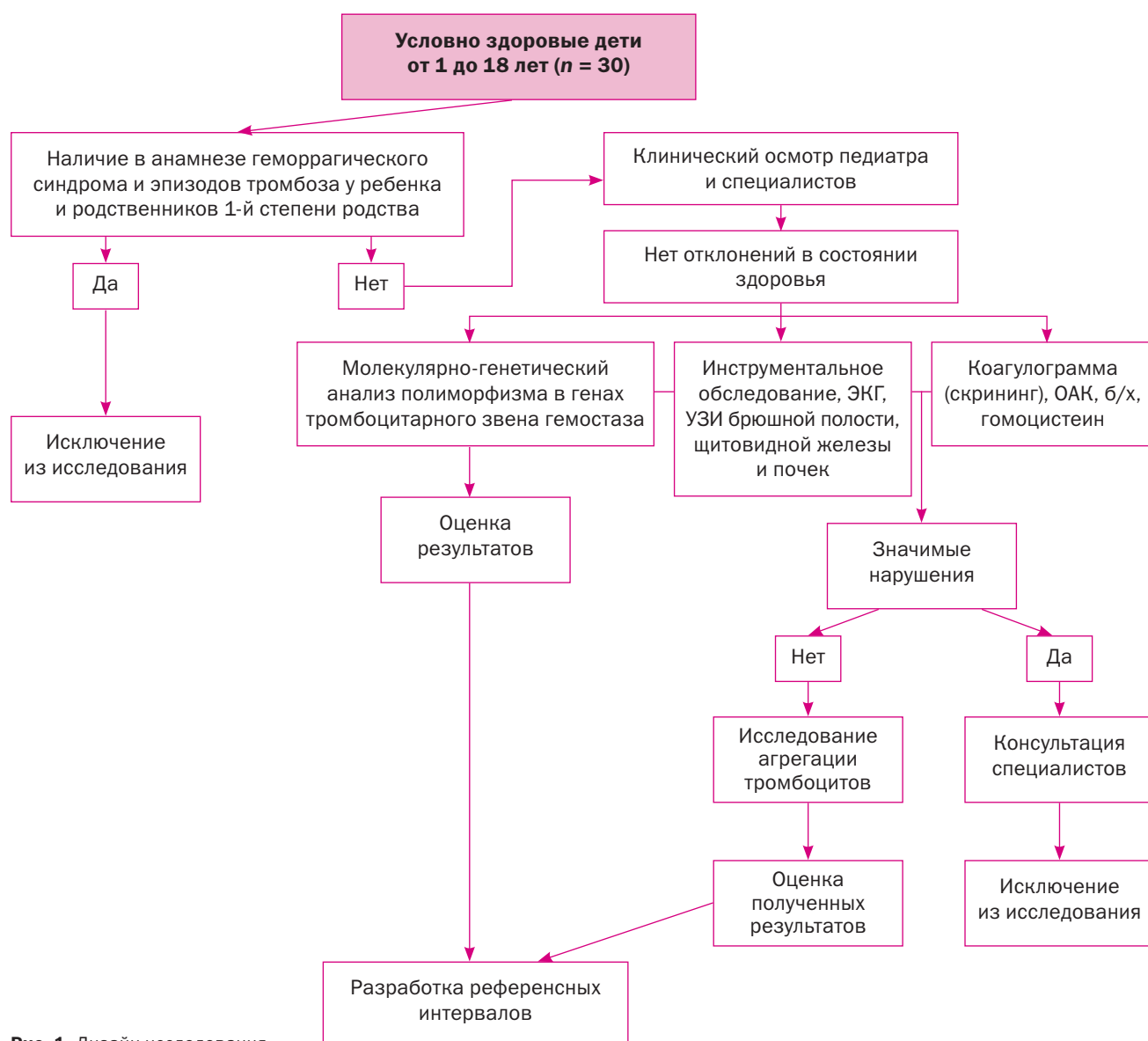


Рис. 1. Дизайн исследования

Fig. 1. Study design

Целевые показатели исследования

Основной показатель исследования

Основными показателями являлись РИ, вычисленные в зависимости от пола. Для каждого пациента проводили оценку агрегации тромбоцитов трехкратно из пробирок с разными веществами в качестве антикоагулянтов (гирудин, литий-гепарин и цитрат натрия), поскольку степень агрегации тромбоцитов в цельной крови может иметь различные значения в зависимости от химического вещества-антикоагулянта в пробирке.

Дополнительные показатели исследования

В качестве дополнительных показателей исследования использовали результаты клинического осмотра детей специалистами, анализа крови, панелей тестов коагулограммы, результаты молекулярно-генетического исследования полиморфизмов в генах тромбоцитарного звена гемостаза.

Также использовали результаты ультразвукового (УЗИ) и инструментального обследования пациентов. Инструментальные методы обследования включали проведение электрокардиографии, УЗИ органов брюшной полости, почек, щитовидной железы.

Методы измерения целевых показателей

Лабораторные методы обследования включали: клинический анализ крови, исследование агрегации тромбоцитов с помощью импедансного агрегометра Multiplate (Roche, Франция), исследование показателей плазменного звена гемостаза (протромбин по Квику, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), фибриноген) на автоматическом коагулографе CompactMax (Stago, Франция), молекулярно-генетическое исследование полиморфизмов в генах тромбоцитарного звена гемостаза с использованием ПЦР-анализа.

Импедансный агрегометр необходим для оценки агрегации тромбоцитов в цельной крови: изменение импеданса соответствует способности тромбоцитов к агрегации. Прибор автоматически устанавливает нулевой уровень, автоматически регистрирует скорость агрегации, ее максимум и проводит все вычисления [11]. Для удобства сравнения данных и унификации результатов введены условные единицы AUC (площадь под агрегационной кривой). Все результаты, нормы и клинические рекомендации выдаются в единицах измерения — Unit (U).

Образцы крови для исследования собирали путем пункции кубитальной вены после наложения жгута (не более 1 мин) с помощью двухкомпонентных систем для забора крови — одноразовых полипропиленовых пробирок с гирудином (Sarstedt, Германия), литий-гепарином и цитратом натрия 3,2% (BD, Vacutainer, США).

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

В качестве индукторов использовали тромбин-активирующий пептид (TRAP-тест), аденозиндифосфорную кислоту (АДФ), арахидоновую кислоту (ASPI-тест). Использование TRAP-теста с реагентом в концентрации 0,02 мМ позволяет измерить максимальную способность к агрегации у пациента. Действие данного индуктора не блокируется антиагрегантами, и дает возможность оценить функции рецепторов тромбоцитов PAR-1.

АДФ в концентрации 2 мкг/мл использовали для обнаружения ингибирования тромбоцитарных рецепторов P2Y₁₂ [12].

ASPI — тест с арахидоновой кислотой в концентрации 15 мМ применяли для обнаружения ингибирования циклооксигеназы тромбоцитов и рецепторов GpIIb/IIIa на мембране тромбоцитов.

Исследование полиморфизмов в генах коагуляции проводилось на образцах ДНК, выделенных из цельной венозной крови методом ПЦР в режиме реального времени.

Исследован ряд полиморфизмов в генах агрегационных факторов системы свертывания крови: *GP1BA* (тромбоцитарный гликопротеин 1B) -5 T>C; *GP1BA* (тромбоцитарный гликопротеин 1B) T145 C>T, rs2243093; *ITGB3* (тромбоцитарный рецептор фибриногена) L33P T>C, rs6065; *SELPLG* (P-селектин лиганд гликопротеина) M62I A>G, rs2228315.

Переменные (предикторы, конфаундеры, модификаторы эффекта)

На начальном этапе сформирована база данных пациентов, проведены лабораторные и инструментальные методы исследования, консультации специалистами 30 включенных в исследование пациентов, соответствующие планам обследования. Исследование планируется продолжить на большей выборке детей.

Статистические процедуры

Принципы расчета размера выборки

Расчет объема выборки не проводился.

Критерии включения

1. Условно здоровые пациенты — без отклонений в функции свертывающей системы в анамнезе в количестве 30 человек в возрасте от 1 года до 18 лет.

2. Подписанное информированное согласие родителем / законным представителем и пациентом старше 15 лет.

Обследованное количество пациентов не позволяет рассчитать необходимые интервалы. Были определены границы РИ агрегации тромбоцитов в цельной крови с различными индукторами агрегации в пробирках с различными веществами в качестве стабилизаторов крови, также определяли медианы значений каждого индуктора агрегации.

Статистические методы

Статистический анализ был выполнен с использованием языка программирования R, версия 4.1.3.

Количественные показатели проверяли на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро – Уилка (при $n < 50$). Для вычисления различий между количественными признаками, для проверки различий между двумя выборками парных или независимых измерений по уровню количественного признака использовали критерий Вилкоксона.

Для сравнения распределения категориальных признаков применяли критерий хи-квадрат Пирсона и точный критерий Фишера (при числе наблюдений в одной из ячеек таблицы $2 \times 2 \leq 5$).

Расчет РИ показателей осуществлялся посредством статистического пакета Reference Intervals версии 1.3.0, который представляет собой набор инструментов, позволяющих рассчитать соответствующие эталонные диапазоны (РИ) с доверительными интервалами (ДИ) для медицинских диагностических целей. Пакет был сформирован в соответствии с гайдлайнами для определения РИ в клинической лаборатории [13]. Выбросы набора данных мы определяли путем вычис-

ления Q-критерия Диксона. Этот метод может определять выбросы только для наборов данных размером $3 \leq n \leq 30$.

ЭТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА

Исследование было согласовано с Локальным независимым этическим комитетом (протокол № 148 от 15.01.2021).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристики выборки (групп) исследования

Все пациенты были отобраны в исследование как условно здоровые дети. При клиническом осмотре каких-либо грубых отклонений в состоянии здоровья не выявлено. Каких-либо тромботических, ишемических, геморрагических событий у пациентов и их ближайших родственников не наблюдалось. Учитывая малый объем выборки, фактически в исследование оказались включены дети в возрасте от 5 до 18 лет. В исследовании все показатели анализировались отдельно в зависимости от пола (в исследование включено 16 девочек и 14 мальчиков. Медиана возраста составила 9,4, межквартильный интервал (IQR) — 6,5; 14,1. В процессе исследования определяли скорость агрегации тромбоцитов по кривой агрегации и площади под кривой (U), которая рассчитывалась автоматически с тремя различными индукторами агрегации (TRAP-реагент — 0,02 мМ, АДФ — 2 мкг/мл, арахидоновая кислота — 15 мМ) [14–16].

Основные результаты исследования

Клиническое обследование, включающее в себя тщательный сбор анамнеза жизни и болезни, жалобы пациента, общий осмотр пациента с использованием методов пальпации, перкуссии, аускультации, измерения артериального давления, а также определение сатурации с использованием пульсоксиметра, не выявило значимых отклонений в состоянии здоровья детей.

При исследовании клинического анализа крови отклонений от референсных значений в исследуемой группе не выявлено. В плазменном звене гемостаза показатели коагулограммы не выявили каких-либо отклонений.

Для исследования агрегации тромбоцитов использовались несколько индукторов: активатор рецепто-

ров тромбина (TRAP-тест), аденозиндифосфорная кислота (АДФ), арахидоновая кислота (ASPI-тест). Тромбин действует на тромбоциты за счет необратимого связывания с клеточными PAR-рецепторами (protease activated receptors). АДФ содержится в плотных гранулах тромбоцита, которые начинают секретироваться при его активации. Активация тромбоцита с помощью АДФ приводит к выбросу незначительного количества тромбосана А2 и последующей быстрой агрегации тромбоцитов. Превращение арахидоновой кислоты регулируется с помощью фермента циклооксигеназы (ЦОГ). Влияние ацетилсалициловой кислоты на активность ЦОГ-1 необратимое и длится в течение всей жизни тромбоцитов.

В ходе анализа данных нами не были получены статистически значимые различия в зависимости от возраста (табл. 1) и пола (табл. 2), в связи с чем отдельно РИ были вычислены для всей детской когорты в целом.

В табл. 2 представлен сравнительный анализ агрегации тромбоцитов с различными индукторами и стабилизаторами крови в зависимости от пола. Как видно из таблицы, статистически значимых различий результатов агрегации тромбоцитов в зависимости от пола на данном этапе выявлено не было.

В табл. 3 представлены РИ для агрегации тромбоцитов в крови с гирудином.

В табл. 4 представлены границы РИ для оценки агрегационной функции тромбоцитов с различными индукторами активации тромбоцитов в цельной крови с цитратом натрия в качестве стабилизирующего агента в пробирке.

В табл. 5 представлены границы РИ для оценки агрегационной функции тромбоцитов с различными индукторами активации тромбоцитов в цельной крови с литий-гепарином в качестве стабилизирующего агента в пробирке.

При молекулярно-генетическом исследовании полиморфизмы в генах тромбоцитарного звена гемостаза были выявлены в 63,3% случаев ($n = 19$). Полиморфизмы встречались в основном в гетерозиготном состоянии, причем у мальчиков чаще, чем у девочек. Однако мутация в гомозиготном состоянии гена рецептора фибриногена встретилась у 1 девочки. В табл. 6 представлены данные о наличии полиморфизмов в генах у обследованных пациентов.

Таблица 1. Сравнение результатов агрегации тромбоцитов в зависимости от возрастной группы

Table 1. Comparison of platelet aggregation results by age groups

Показатель	5–9 лет ($n = 16$), Me (IQR)	10–18 лет ($n = 14$), Me (IQR)	p^*
Гирудин агрегация с TRAP	74 (68; 96)	92 (81; 100)	0,61
Гирудин агрегация с АДФ	56 (42; 75)	56 (47; 76)	0,708
Гирудин агрегация с ASPI	94 (84; 106)	96 (86; 110)	0,917
Цитрат агрегация с TRAP	82 (54; 92)	76 (66; 86)	0,787
Цитрат агрегация с АДФ	50 (38; 62)	51 (41; 68)	0,755
Цитрат агрегация с ASPI	74 (64; 87)	66 (61; 83)	0,519
Литий-гепарин агрегация с TRAP	90 (83; 116)	106 (77; 117)	0,884
Литий-гепарин агрегация с АДФ	70 (50; 81)	69 (50; 100)	0,868
Литий-гепарин агрегация с ASPI	90 (83; 116)	102 (86; 124)	0,533

Примечание. TRAP — тест с активатором рецепторов тромбина; АДФ — тест с аденозиндифосфорной кислотой; ASPI — тест с арахидоновой кислотой. Me — медиана; IQR — межквартильный интервал. <*> — критерий Вилкоксона.

Note. TRAP — thrombin receptor activating peptide test; ADP (АДФ) — adenosine diphosphate test; ASPI — arachidonic acid test. Me — mediane; IQR — interquartile range. <*> — Wilcoxon signed-rank test.

Таблица 2. Сравнение результатов агрегации тромбоцитов в зависимости от пола**Table 2.** Comparison of platelet aggregation results by gender

Показатель	Мальчики (n = 16), Me (IQR)	Девочки (n = 14) Me (IQR)	p*
Гирудин агрегация с TRAP	76 (68, 94)	94 (75, 100)	0,253
Гирудин агрегация с АДФ	63 (44, 78)	52 (43, 73)	0,533
Гирудин агрегация с ASPI	94 (86, 110)	96 (81, 106)	0,755
Цитрат агрегация с TRAP	82 (62, 92)	76 (65, 86)	0,868
Цитрат агрегация с АДФ	50 (37, 70)	50 (41, 62)	0,901
Цитрат агрегация с ASPI	74 (65, 89)	67 (61, 78)	0,360
Литий-гепарин агрегация с TRAP	100 (86, 122)	94 (77, 117)	0,589
Литий-гепарин агрегация с АДФ	70 (50, 86)	69 (52, 86)	0,755
Литий-гепарин агрегация с ASPI	96 (83, 118)	94 (85, 114)	> 0,999

Примечание. TRAP — тест с активатором рецепторов тромбина; АДФ — тест с аденозиндифосфорной кислотой; ASPI — тест с арахидоновой кислотой. Me — медиана; IQR — межквартильный интервал. <*> — критерий Вилкоксона.

Note. TRAP — thrombin receptor activating peptide test; ADP (АДФ) — adenosine diphosphate test; ASPI — arachidonic acid test. Me — mediane; IQR — interquartile range. <*> — Wilcoxon signed-rank test.

Таблица 3. Результаты вычислений референсных интервалов для агрегации тромбоцитов в крови с гирудином и 90% ДИ для верхнего и нижнего референсных значений**Table 3.** Results of reference ranges calculation for platelet aggregation in blood with hirudin, 90% CI for upper and lower reference ranges

Показатели агрегации для различных индукторов в крови, стабилизированной гирудином	Значения РИ для различных индукторов в крови, стабилизированной гирудином
Агрегация тромбоцитов в крови с гирудином и АДФ	РИ: 33; 106 ДИ для нижнего референса: 29; 33 ДИ для верхнего референса: 106; 116
Агрегация тромбоцитов в крови с гирудином и ASPI	РИ: 68; 165 ДИ для нижнего референса: 60; 68 ДИ для верхнего референса: 165; 210
Агрегация тромбоцитов в крови с гирудином и TRAP	РИ: 56; 143 ДИ для нижнего референса: 52; 56 ДИ для верхнего референса: 143; 170

Примечание. АДФ — тест с аденозиндифосфорной кислотой; ASPI — тест с арахидоновой кислотой; TRAP — тест с активатором рецепторов тромбина. РИ — референсный интервал; ДИ — доверительный интервал.

Note. ADP (АДФ) — adenosine diphosphate test; ASPI — arachidonic acid test; TRAP — thrombin receptor activating peptide test. RR (РИ) — reference range; CI (ДИ) — confidence interval.

Таблица 4. Результаты вычислений референсных интервалов для агрегации тромбоцитов в крови с цитратом натрия и 90% ДИ для верхнего и нижнего референсных значений**Table 4.** Results of reference ranges calculation for platelet aggregation in blood with sodium citrate, 90% CI for upper and lower reference ranges

Показатели агрегации для различных индукторов в крови, стабилизированной цитратом	Значения РИ для различных индукторов в крови, стабилизированной цитратом
Агрегация тромбоцитов в крови с цитратом и АДФ	РИ: 33; 87 ДИ для нижнего референса: 32; 33 ДИ для верхнего референса: 87; 93
Агрегация тромбоцитов в крови с цитратом и ASPI	РИ: 49; 108 ДИ для нижнего референса: 46; 49 ДИ для верхнего референса: 108; 114
Агрегация тромбоцитов в крови с цитратом и TRAP	РИ: 40; 117 ДИ для нижнего референса: 30; 40 ДИ для верхнего референса: 117; 137

Примечание. АДФ — тест с аденозиндифосфорной кислотой; ASPI — тест с арахидоновой кислотой; TRAP — тест с активатором рецепторов тромбина. РИ — референсный интервал; ДИ — доверительный интервал.

Note. ADP (АДФ) — adenosine diphosphate test; ASPI — arachidonic acid test; TRAP — thrombin receptor activating peptide test. RR (РИ) — reference range; CI (ДИ) — confidence interval.

Таблица 5. Результаты вычислений референсных интервалов для агрегации тромбоцитов в крови с литий-гепарином и 90% ДИ для верхнего и нижнего референсных значений

Table 5. Results of reference ranges calculation for platelet aggregation in blood with lithium heparin, 90% CI for upper and lower reference ranges

Показатели агрегации для различных индукторов в крови, стабилизированной литий-гепарином	Значения РИ для различных индукторов в крови, стабилизированной литий-гепарином
Агрегация тромбоцитов в крови с литий-гепарином и АДФ	РИ: 30; 136 ДИ для нижнего референса: 22; 30 ДИ для верхнего референса: 136; 166
Агрегация тромбоцитов в крови с литий-гепарином и ASPI	РИ: 60; 193 ДИ для нижнего референса: 51; 60 ДИ для верхнего референса: 193; 231
Агрегация тромбоцитов в крови с литий-гепарином и TRAP	РИ: 62; 172 ДИ для нижнего референса: 53; 62 ДИ для верхнего референса: 172; 203

Примечание. АДФ — тест с аденозиндифосфорной кислотой; ASPI — тест с арахидоновой кислотой; TRAP — тест с активатором рецепторов тромбина. РИ — референсный интервал; ДИ — доверительный интервал.
Note. ADP (АДФ) — adenosine diphosphate test; ASPI — arachidonic acid test; TRAP — thrombin receptor activating peptide test. RR (РИ) — reference range; CI (ДИ) — confidence interval.

Таблица 6. Полиморфизмы в генах тромбоцитарного звена в группе обследованных детей
Table 6. Platelet genes polymorphisms in the examined group of children

Полиморфизм	Вариант	Девочки	Мальчики	Количество, п / % от общего числа пациентов
GP1BA (тромбоцитарный гликопротеин 1B) -5 T>C	TC	3	5	8/27
GP1BA (тромбоцитарный гликопротеин 1B) T145 C>T, rs2243093	CT	0	2	2/6,7
ITGB3 (тромбоцитарный рецептор фибриногена), L33P T>C, rs6065	TC	4	2	6/20
	CC	1		1/3,3
SELPLG (P-селектин лиганд гликопротеина) M62I G>A, rs2228315	GA	1	1	2/6,7

Дополнительные результаты исследования

При УЗИ у 13% пациентов ($n = 4$) были выявлены реактивные изменения поджелудочной железы. У 6,7% ($n = 2$) выявлено удвоение почки; увеличение объема щитовидной железы с расширенными фолликулами выявлено у 10% ($n = 3$). Выявленные незначительные нарушения не являлись критериями исключения из исследования.

ОБСУЖДЕНИЕ

Резюме основного результата исследования

Результаты работы позволили уточнить роль комплексного подхода к формированию группы исследования для разработки референсных значений агрегационной функции тромбоцитов наряду с оценкой данных инструментального обследования и наличия различных вариантов полиморфизмов в генах тромбоцитарного ряда в достижении оптимальных РИ для возможной оценки эффективности и безопасности персонализированной антиагрегантной терапии.

Ограничения исследования

В работе возникли ограничения, связанные с количественной выборкой исследования и возрастными группами. Учитывая, что результаты представлены по начальному этапу исследования, число пациентов недостаточно для установления популяционных значений референсных интервалов в различных возрастных группах. В продолжающееся исследование планируется включить 300 детей различных возрастных групп (от 1 мес до 18 лет) для выполнения поставленных целей и задач с комплексной оценкой результатов молекулярно-генетического исследования в целях обнаружения полиморфизмов в генах тромбоцитарного звена. Наличие

определенных полиморфизмов может способствовать назначению антиагрегантной терапии или изменению тактики ее применения.

Интерпретация результатов исследования

По итогам исследований на первом (промежуточном) этапе сформирована первая часть базы данных пациентов, проведены лабораторные и инструментальные исследования, консультации специалистами 30 включенных в исследование пациентов, соответствующие планам обследования.

При исследовании состояния периферического кровотока и системы плазменного гемостаза отклонений выявлено не было.

В результате исследования для каждого индуктора агрегации (тромбин, АДФ, арахидоновая кислота) были определены показатели агрегации тромбоцитов в различных возрастных группах с учетом пола. Учитывая, что выборка пациентов не позволяет определить широкий диапазон РИ, полученные данные на этом этапе можно расценивать в пределах межквартильного интервала, в дальнейшем экстраполируя их на большую выборку пациентов с учетом показателей в пределах 90% ДИ.

Так как в основе различных тромбоцитопатий обычно лежат нарушения агрегационной функции тромбоцитов, исследование агрегации тромбоцитов является необходимым аспектом в дифференциальной диагностике нарушений первичного этапа гемостаза. Клинические рекомендации по лечению тромбозов у детей включают в себя исследование агрегационной функции тромбоцитов и динамическое наблюдение за ними на фоне терапии антиагрегантами.

Однако проблема стандартизации нормативных параметров для диагностики нарушений тромбоцитарного звена гемостаза является в настоящее время чрезвычайно актуальной, так как в нашей стране отсутствуют нормативные критерии оценки нарушений функции тромбоцитов в цельной крови.

При оценке результатов начального этапа исследования установлены медианы значений агрегации тромбоцитов с различными индукторами в двух возрастных группах, статистически значимо отличающиеся в пробах с различными антикоагулянтами.

Выявленные полиморфизмы в генах тромбоцитарного гемостаза могут predispose к различным нарушениям при неблагоприятных условиях (травмы, операции, гормональная терапия, онкозаболевания) [17]. Более чем у половины пациентов выявлены полиморфизмы в гетерозиготном состоянии. При этом преобладали полиморфизмы в гене *GP1BA*, что может оказывать защитное противоишемическое действие.

Полиморфизмы в гене тромбоцитарного рецептора фибриногена обнаружены у каждой пятой девочки. При этом необходимо учесть, что при неблагоприятных условиях данные полиморфизмы могут способствовать развитию кардиоваскулярной патологии.

Полиморфизмы в гене *GP1BA* (тромбоцитарного гликопротеина 1b) -5 T>C, в гомозиготном состоянии могут способствовать развитию инсульта ишемического генеза. Однако в нашей группе таких пациентов не было. Генотип TC (гетерозиготный вариант) обладает защитным противоишемическим действием. Полиморфизмы в гене *GP1BA* (тромбоцитарного гликопротеина 1b) T145 C>T, rs2243093 являются предикторами формирования тромбоза в коронарных артериях наряду с риском развития инсульта, а также могут провоцировать гиперагрегацию тромбоцитов с последующим образованием тромбов.

Полиморфизмы в гене *ITGB3* (тромбоцитарный рецептор фибриногена), L33P T>C, rs6065 являются прогностическими маркерами риска развития кардиоваскулярной патологии в раннем возрасте. Также данные полиморфизмы позволяют определить заболевания сердца в последующих поколениях [18].

Тромбоциты при наличии полиморфизмов в генах тромбоцитарного звена гемостаза имеют predisposition к гиперагрегации, что увеличивает риск развития тромботических событий в сосудах. Однако при этом отмечается эффективность препаратов на основе ацетилсалициловой кислоты в терапии. При наличии полиморфизмов в гене *SELPLG* (P-селектин лиганд гликопротеина) M62I G>A, rs2228315 высока вероятность лейкоцитарной агрегации при отсутствии воспаления. Учитывая достаточно высокую частоту встречаемости определенных полиморфизмов в генах тромбоцитарного звена гемостаза, необходимо продолжить исследование функции тромбоцитов и оценить их взаимосвязь с полиморфизмами на большей выборке пациентов.

Выявленные полиморфизмы и их возможное прогностическое влияние на различные события смогут быть оценены, когда будут собраны все данные.

Полученные результаты позволят усовершенствовать алгоритм диагностики нарушений тромбоцитарного звена гемостаза и тактику наблюдения за пациентами на основании динамического контроля клинических данных, результатов агрегационной функции тромбоцитов с учетом полиморфизмов генов тромбоцитарного звена гемостаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее подобные исследования у детей в Российской Федерации не осуществлялись. Учитывая высокий риск развития осложнений при своевременно не диагностированной тромбоцитопатии, важной задачей является определение РИ для оценки агрегатограммы с различными индукторами. Эти исследования позволяют установить возможные возрастные и гендерные особенности.

Используемые в настоящее время РИ были установлены на незначительной выборке детей в странах Европы, при этом возможные погрешности интерпретации результатов могут стать причиной отсутствия точного диагноза и своевременного адекватного лечения, а в дальнейшем — отсутствия достаточного эффекта терапии на этапе реабилитации.

В нашей стране в доступной литературе представлены результаты работ нескольких авторов о разработке РИ, но у пациентов старше 18 лет [19].

На следующих этапах работы в рамках проводимого исследования планируется обозначить терапевтические диапазоны для переключения терапии между различными препаратами при антикоагулянтной и сопутствующей антиагрегантной терапии. Данный подход возможен в комплексе с оценкой результатов молекулярно-генетического исследования для обнаружения полиморфизмов в генах тромбоцитарного звена, поскольку наличие определенных полиморфизмов может способствовать назначению более низких доз аспирина.

ВКЛАД АВТОРОВ

О.Б. Гордеева — сбор данных, обзор научных публикаций по теме статьи, проведение анализа данных, написание текста рукописи и утверждение окончательного варианта для публикации.

М.С. Карасева — обзор научных публикаций по теме статьи, работа со списком литературы.

В.А. Ластовка — обзор научных публикаций по теме статьи.

Н.Д. Вашакмадзе — участие в редактировании рукописи, разработка дизайна исследования.

М.А. Солошенко — проведение статистического анализа данных.

AUTHORS' CONTRIBUTION

Olga B. Gordeeva — data collection, review of scientific publications on the manuscript topic, data analysis, manuscript writing, and approval of the final version for publication.

Maria S. Karaseva — review of scientific publications on the manuscript topic, working with the reference list.

Vasily A. Lastovka — review of scientific publications on the manuscript topic.

Nato G. Vashakmadze — manuscript editing, study design.

Margarita A. Soloshenko — statistical data analysis.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Отсутствует.

FINANCING SOURCE

Not specified.

РАСКРЫТИЕ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

DISCLOSURE OF INTEREST

Not declared.

ORCID

О.Б. Гордеева

<https://orcid.org/0000-0001-8311-9506>

М.С. Карасева

<https://orcid.org/0000-0002-9883-0445>

В.А. Ластовка

<https://orcid.org/0000-0002-3395-2812>

Н.Д. Ватакмадзе

<https://orcid.org/0000-0001-8320-2027>

М.А. Солошенко

<https://orcid.org/0000-0002-6150-0880>

Г.В. Ревуненков

<https://orcid.org/0000-0001-7834-213X>

В.В. Алтунин

<https://orcid.org/0000-0001-6492-2539>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов: монография. — М.: Литтерра; 2011. — 456 с. [Mazurov A.V. *Fiziologiya i patologiya trombocitov*: Monography. Moscow: Litterra; 2011. 456 p. (In Russ).]
2. Свешникова А.Н., Якушева А.А. Ряхов О.Е. и др. Современные представления о регуляции тромбоцитарного гемостаза // Креативная кардиология. — 2018. — Т. 12. — № 3. — С. 260–274. — doi: <https://doi.org/10.24022/1997-3187-2018-12-3-260-274> [Sveshnikova AN, Yakusheva AA, Ryabikh AA, et al. Modern views on the regulation of platelet-dependent hemostasis. *Creative Cardiology*. 2018;12(3):260–274. (In Russ). doi: <https://doi.org/10.24022/1997-3187-2018-12-3-260-274>]
3. Васина Л.В., Петрищев Н.Н., Власов Т.Д. Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2017. — Т. 16. — № 1. — С. 4–15. — doi: <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2017-16-1-4-15> [Vasina LV, Petrishchev NN, Vlasov TD. Markers of endothelial dysfunction. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2017;16(1):4–15. (In Russ). doi: <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2017-16-1-4-15>]
4. Савченко А.П., Медведев И.Н. Механизмы функционирования тромбоцитарного гемостаза // Фундаментальные исследования. — 2009. — № 10. — С. 28–30. [Savchenko AP, Medvedev IN. Mekhanizmy funktsionirovaniya trombocitarnogo gemostaza. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2009;(10):28–30. (In Russ).]
5. Карахалис Н.Б., Ефимочкин Г.А., Шадрин А.К., Синьков С.В. Анти тромботическая терапия у детей // Анестезиология и реаниматология. — 2018. — Т. 63. — № 1. — С. 46–55. — doi: <http://doi.org/10.18821/0201-7563-2018-63-1-46-55> [Karakhalis NB, Efimochkin GA, Shadrin AK, Sinkov SV. Antithrombotic Therapy in Children. *Anesteziologiya i Reanimatologiya = Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology*. 2018;63(1):46–55. (In Russ). doi: <http://doi.org/10.18821/0201-7563-2018-63-1-46-55>]
6. CLSI. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory*: Approved Guideline. 3rd ed. CLSI document C28-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
7. CLSI. *Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays*: Approved Guideline, 5th ed. CLSI document H21-A5. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
8. ГОСТ Р 15195-2006 «Лабораторная медицина. Требования к лабораториям референтных изменений». Дата введения 01.01.2008. [All Union State Standard P 15195-2006 “Laboratory medicine. Requirements for reference measurements laboratories”. Date of validity January 01, 2008. (In Russ).] Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200053110>. Ссылка активна на 17.09.2022.
9. ГОСТ Р 53022.1-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа». Дата введения 01.01.2010. [All Union State Standard P 53022.1-2008 “Medical laboratory technologies. Requirements for quality of clinical laboratory tests. Part 4. Rules for development of requirements for timeliness of laboratory information submitting”. Date of validity January 01, 2010. (In Russ).] Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200069395>. Ссылка активна на 17.09.2022.
10. Детская гематология: клинические рекомендации / под ред. А.Г. Румянцев, А.А. Масчан, Е.В. Жуковской. — М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015. — 656 с. [Detskaya gematologiya: Clinical guidelines. Rumyantsev AG, Maschan AA, Zhukovskaya EV, eds. Moscow: GEOTAR-Media; 2015. 656 p. (In Russ).]
11. Ling LQ, Liao J, Niu Q, et al. Evaluation of an automated light transmission aggregometry. *Platelets*. 2017;28(7):712–719. doi: <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1265923>
12. Петрова О.В., Шашин С.А., Тарасов Д.Г. Референтные значения агрегации тромбоцитов при исследовании импедансным методом с аденозиндифосфорной кислотой на агрегометре Multiplate // Современные технологии в медицине. — 2016. — Т. 8. — № 3. — С. 100–104. — doi: <http://doi.org/10.17691/stm2016.8.3.11> [Petrova OV, Shashin SA, Tarasov DG. Reference values of platelet aggregation in impedance aggregometry with adenosine diphosphoric acid on aggregometer multiplate. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2016;8(3):100–104. (In Russ). doi: <http://doi.org/10.17691/stm2016.8.3.11>]
13. NCCLS. *How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory*: Approved Guideline. 2nd ed. NCCLS document C28-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2000.
14. Halimeh S, Angelis G, Sander A, et al. Multiplate® Whole Blood Impedance Point of Care Aggregometry Preliminary Reference Values in Healthy Infants, Children and Adolescents. *Klin Padiatr*. 2010;22(3):158–163. doi: <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249081>
15. 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. — С. 42–46. — doi: <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-13-42-46> [Kovalchuk YuP, Kadinskaya MI, Pimenov MS, Efimova IYu. Determination of reference ranges for automated platelet aggregometry on Sysmex CS-5100 analyzer. *Medical alphabet*. 2021;(13):42–46. (In Russ). doi: <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-13-42-46>]
16. Platon S, McCormick Á, Bukht M, et al. A multicenter study to evaluate automated platelet aggregometry on Sysmex CS-series coagulation analyzers-preliminary findings. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018;2(4):778–789. doi: <https://doi.org/10.1002/rth2.12140>
17. Отто Н.Ю., Сагитова Г.Р., Ледяев М.Я. и др. Тромбозы у детей (клинические случаи) // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2020. — № 2. — С. 182–184. — doi: [https://doi.org/10.19163/1994-9480-2020-2\(74\)-182-184](https://doi.org/10.19163/1994-9480-2020-2(74)-182-184) [Otto NYu, Sagitova GR, Ledyayev MYa, et al. Thrombosis in children (clinical cases). *Journal of Volgograd State Medical University*. 2020;(2):182–184. (In Russ). doi: [https://doi.org/10.19163/1994-9480-2020-2\(74\)-182-184](https://doi.org/10.19163/1994-9480-2020-2(74)-182-184)]
18. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). In: *National Library of Medicine*. 15 Sep 2022. Available online <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Accessed on September 16, 2022.
19. Мансурова Д.А., Жунуспекова А.С., Каражанова Л.К. Референтные значения агрегации тромбоцитов у здоровых лиц // Клиническая лабораторная диагностика. — 2018. — Т. 63. — № 9. — С. 549–552. — doi: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-549-552> [Mansurova JA, Zhunuspekova AS, Karazhanova LK. Reference values of platelet aggregometry in healthy subjects. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2018;63(9):549–552. (In Russ). doi: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-549-552>]

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Гордеева Ольга Борисовна, к.м.н. [*Olga B. Gordeeva*, MD, PhD]; **адрес:** 119333, г. Москва, ул. Фотиевой, д. 10, стр. 1
[**address:** 10, build 1, Fotievoy street, Moscow, 119333, Russian Federation]; **телефон:** +7 (499) 400-47-33;
eLibrary SPIN: 2562-7725

Карасева Мария Сергеевна [*Maria S. Karaseva*, MD]; **eLibrary SPIN:** 8370-3480

Ластовка Василий Анатольевич, к.м.н. [*Vasily A. Lastovka*, MD, PhD]

Вашакмадзе Нато Джумберовна, д.м.н., профессор [*Nato D. Vashakmadze*, MD, PhD, Professor];
eLibrary SPIN: 2906-9190

Солошенко Маргарита Александровна, к.м.н. [*Margarita A. Soloshenko*, MD, PhD]; **eLibrary SPIN:** 2954-9873

Ревуненков Григорий Валерьевич, к.м.н. [*Grigory V. Revunenkov*, MD, PhD]; **e-mail:** rgv07@mail.ru;
eLibrary SPIN: 9754-3642

Валялов Кирилл Андреевич [*Kirill A. Valyalov*, MD]; **eLibrary SPIN:** 9171-1721

Алтунин Виктор Викторович, к.м.н. [*Viktor V. Altunin*, MD, PhD]; **eLibrary SPIN:** 4818-6385