

АНАЛИЗ МЕЖИНДИВИДУАЛЬНОЙ ВАРИАЦИИ И РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТЕСТА ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Золотова Е. А.¹, Мельничникова О. С.¹, Симакова М. А.¹,
Жиленкова Ю. И.¹, Сироткина О. В.^{1,2,3}, Вавилова Т. В.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Золотова Екатерина Алексеевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: katerinazolotova1@gmail.com

Статья поступила в редакцию 21.10.2022
и принята к печати 28.11.2022.

Резюме

Актуальность. Тест генерации тромбина (ТГТ) как интегральный метод анализа каскада активации естественных про- и антикоагулянтов имеет практическое значение в оценке риска тромботических состояний и кровотечений. Однако применение метода ограничивает отсутствие стандартизации. **Цель.** Определить референтные интервалы внутри лаборатории и оценить межиндивидуальную вариацию показателей ТГТ для различных технологий. **Материалы и методы.** В исследование вошли 20 доноров. ТГТ проведен с помощью двух технологий: калиброванной автоматизированной тромбограммы на полуавтоматическом флуориметре (Технология 1) и автоматического измерения ГТ на коагулометре (Технология 2). Рассчитывались стандартные показатели ТГТ. Полученные результаты нормировались относительно пулированной нормальной плазмы. **Результаты.** Параметры тромбограммы показали высокий CVG (коэффициент межиндивидуальной вариации): от 14 до 32 % для Технологии 1 и от 7 до 36 % для Технологии 2. CVG значимо не менялся после нормализации данных ТГТ. Отмечены значимые различия ключевого показателя ЕТР (эндогенный тромбиновый потенциал). Референтные интервалы для Технологии 1 составили: ЕТР 1478,0–2595,0 нмоль/мин и пиковая концентрация тромбина (Peak thr.) 221,6–412,0 нмоль. РИ для Технологии 2: ЕТР 2451,00–3161,00 нмоль/мин и Peak thr. 161,60–479,30 нмоль. **Заключение.** Сравнение двух лабораторных технологий ТГТ выявило высокую межиндивидуальную вариацию. В связи с различиями в методиках постановки ТГТ, абсолютные значения отдельных параметров статистически значимо различаются за исключением LT. Таким образом, параметры ТГТ индивидуальны, и использование исследования в динамике для каждого конкретного индивида, вероятно, имеет большую информативность, чем применение РИ, полученных в общей популяции. Динамическое наблюдение за пациентом необходимо выполнять с применением одной технологии.

Ключевые слова: генерация тромбина, калиброванная автоматизированная тромбограмма, референтные интервалы, тест генерации тромбина.

Для цитирования: Золотова Е.А., Мельничникова О.С., Симакова М.А., Жиленкова Ю.И., Сироткина О.В. Вавилова Т.В. Анализ межиндивидуальной вариации и референтные интервалы показателей теста генерации тромбина при использовании различных технологий. Трансляционная медицина. 2022;9(5):78-86. DOI: 10.18705/2311-4495-2022-9-5-78-86.

ANALYSIS OF INTER-INDIVIDUAL VARIATION AND REFERENCE INTERVALS OF THROMBIN GENERATION TEST PARAMETERS USING DIFFERENT TECHNOLOGIES

Ekaterina A. Zolotova¹, Olga S. Melnichnikova¹,
Maria A. Simakova¹, Yulia I. Zhilenkova¹, Olga V. Sirotkina^{1, 2, 3},
Tatiana V. Vavilova¹

Corresponding author:

Ekaterina A. Zolotova,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: katerinazolotova1@gmail.com

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Saint Petersburg, Russia

³ First Pavlov State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Received 21 October 2022; accepted
28 November 2022.

Abstract

Background. The thrombin generation test (TGT) as an integral method for analyzing the activation cascade of natural pro- and anticoagulants is of practical importance in assessing the risk of thrombotic conditions and bleeding, however its application is limited by the lack of standardization. **Objective.** To define reference intervals within the laboratory and assess inter-individual variation in TGT values for different technologies. **Design and methods.** The study included 20 donors. TGT was performed using two technologies: a calibrated automated thrombogram on a semi-automatic fluorometer (Technology 1) and automatic measurement of GT on a coagulometer (Technology 2). Obtained results were normalized to pooled normal plasma. **Results.** Thrombogram parameters showed a high CVG (coefficient of interindividual variation): 14–32 % for Technology 1 and 7–36 % for Technology 2. CVG did not change significantly after normalization. Significant differences in ETP (endogenous thrombin potential) were noted. The reference intervals for Technology 1 were: ETR 1478.0–2595.0 nmol/min and peak thrombin concentration (Peak thr.) 221.6–412.0 nmol. RI for Technology 2: ETP 2451.00–3161.00 nmol/min and Peak thr. 161.60–479.30 nmol. **Conclusion.** Comparison of the two laboratory TGT technologies revealed high inter-individual variation. Thus, the use of a study in dynamics for each specific individual is likely to be more informative than the use of RI obtained in the general population. Dynamic monitoring of the patient must be performed using one technology.

Key words: calibrated automated thrombogram, reference intervals, thrombin generation, thrombin generation test.

For citation: Zolotova EA, Melnichnikova OS, Simakova MA, Zhilenkova YuI, Sirotkina OV, Vavilova TV. Analysis of inter-individual variation and reference intervals of thrombin generation test indicators using different technologies. *Translyatsionnaya meditsina*=Translational Medicine. 2022;9(5):78-86. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2022-9-5-78-86.

Список сокращений: ГТ — генерация тромбина, КАТ — калиброванная автоматизированная тромбограмма, ТГТ — тест генерации тромбина, ТФ — тканевой фактор, ЕТР (от англ. endogenous thrombin potential) — эндогенный тромбоиновый потенциал, LT (от англ. Lag time) — время инициации коагуляции, Peak thr. (от англ. Peak thrombin) — максимальная концентрация тромбина в образце, ttPeak (от англ. time to peak) — время достижения пика тромбина, VI (от англ. velocity index) — индекс скорости образования тромбина.

Введение

Тест генерации тромбина (ТГТ) — интегральный тест оценки кинетики образования тромбина в единицу времени после добавления в образцы плазмы реагентов, иницирующих каскад коагуляции. Впервые метод был описан в начале 1950-х годов, однако был полностью ручным, имел высокую погрешность и низкую воспроизводимость [1]. В последующем методика была модифицирована Н. Hemker с соавторами и стала полуавтоматической [2, 3]. В последние годы были введены несколько технологий для измерения образования тромбина. Классическим методом определения ГТ остается калиброванная автоматизированная тромбограмма (КАТ), преимуществом которой являются различные вариации применяемого материала: бедной (PPP) и богатой тромбоцитами плазмы (PRP), цельной крови, а также изучение активности системы протеина С и прокагулянтной активности микрочастиц. Однако эта технология обладает большой вариабельностью результатов теста, отсутствием контролей, единого протокола для преаналитического этапа, отсутствием стандартной концентрации и способа получения триггерных реагентов, что затрудняет ее применение в клинической практике. В последнее время появляются новые полностью автоматизированные приборы для ТГТ, такие как система ST Genesia (Diagnostica Stago), ЕТР innovance в коагулометрах Siemens BCS и BCS XP, Ceveron Alpha TGA (Technoclone). Вопрос стандартизации для этих технологий все еще остается открытым.

В условиях клиническо-диагностической лаборатории, несомненно, удобен и применим прибор, который способен выполнять коагулологические исследования (коагуляционные, хромогенные и турбидиметрические анализы) наряду с ТГТ, не прерывая основной работы. Таким прибором является автоматический анализатор Ceveron Alpha TGA (Technoclone, Австрия), который имеет модуль для измерения ГТ флуорогенным способом. Существенным преимуществом анализатора

Ceveron является наличие калибраторов и контрольных материалов с высокой и низкой активностями тромбообразования, а также определенные референтные интервалы, что позволяет применять его в клинической практике. Учитывая, что многие лабораторные исследования системы гемостаза требуют разработки собственных референтных значений для конкретной лаборатории, в том числе в соответствии с особенностями обследуемой популяции, заявленные производителем интервалы нуждаются в валидации. Поэтому целью работы явилось определение референтных интервалов внутри лаборатории и оценка межиндивидуальной вариации показателей ТГТ в различных технологиях выполнения.

Материалы и методы

В исследование вошли 20 доноров (46,13 [38,75–54,50] лет, 11 мужчин, 9 женщин) без сердечно-сосудистых заболеваний и тромбоэмболических эпизодов в анамнезе, не принимающих препараты, которые влияют на функцию системы гемостаза. Образцы крови получали в вакуумные пробирки с 3,2 % цитратом натрия в качестве антикоагулянта путем пункции кубитальной вены.

Для получения PPP материал центрифугировали при 2000×g 18 °C в течение 10 минут с последующим центрифугированием полученного супернатанта при 10 000×g в течение 10 минут [4]. Аликвоты хранили при температуре -80 °C. Перед постановкой пробы размораживались на водяной бане при 37 °C.

Технология 1: ТГТ проводился по методу калиброванной автоматизированной тромбограммы, предложенному Н. Hemker с соавторами [2] на приборе Fluoroscant Ascent (ThermoFisher Scientific, США). В каждую лунку 96-луночного планшета добавлялись коммерческий реактив PPP при конечной концентрации тканевого фактора 5 пмоль/л и фосфолипидов 4 ммоль/л (REF 86193, Diagnostica Stago, Франция) в объеме 20 мкл и образцы плазмы в объеме 80 мкл. Смесь специфичного субстрата (REF 86197) (Diagnostica Stago, Франция), меченного флуорогенным аминотетилкумарином (Z-Gly-Gly-Arg-AMC), и буфера (REF 86197, Diagnostica Stago, Франция) автоматически добавлялась в исследуемую плазму. В результате активации коагуляции и образования тромбина в образцах плазмы происходит расщепление субстрата и высвобождение флуоресцентной метки, сигнал от которой регистрируется с помощью флуориметра Fluoroscant Ascent. Результаты рассчитывались относительно калибратора с активностью тромбина 825 нМ (REF 86192, Diagnostica Stago, Франция).

Технология 2: ГТ определялась на оптическом приборе Severon Alpha TGA (Technoclone, Австрия). Принцип метода аналогичен предыдущему, но все этапы автоматизированы. Для активации каскада коагуляции использовали триггерный реагент RC Low (REF 5006013, Technoclone, Австрия) с низким содержанием тканевого фактора и фосфолипидов. ГТ измеряется с помощью специально адаптированного флуориметрического модуля ТГТ. В постановке использовалась контрольная плазма с низкой и высокой активностью тромбообразования (Technoclone, Австрия). Конечные объемы в исследуемом образце: 40 мкл плазмы в 20 мкл буфера и 40 мкл флуорогенного субстрата, 15 мкл триггерного реагента RC Low и 35 мкл раствора хлорида кальция [5, 6]. При тестировании PPP на реактиве RC Low у 100 практически здоровых доноров производителем были определены следующие РИ: Peak thr. 84–626 нмоль; ETP 1299–3145 нмоль/мин.

В ходе исследования ГТ с помощью встроенного программного обеспечения рассчитывались следующие показатели тромбограммы: максимальная концентрация тромбина в образце (Peak), нмоль; площадь под кривой — эндогенный тромбиновый потенциал (ETP), нмоль/мин; время инициации коагуляции (LagTime), мин; время достижения пика (ttPeak), мин. Скорость образования тромбина считалась по формуле: $VI = \text{Peak}/(\text{ttPeak} - \text{LagTime})$, нмоль/мин [7]. Для устранения аналитической ошибки и стандартизации данных в каждой серии ставилась пулированная нормальная плазма (ПНП), полученная от 20 здоровых доноров, средний возраст которых составил 25 [24–31] лет. Согласно современным исследованиям, для улучшения стандартизации требуется нормализация относительно контрольной плазмы [8–10], в связи с чем полученные результаты нормировались относительно ПНП и представлены в процентах: $((\text{значения показателя донора})/(\text{значения ПНП}) \times 100)$.

Полученные данные обрабатывались в программе Statistical2.0. Проверка нормальности распределения осуществлялась с помощью теста Шапиро-Уилка. Количественные данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей (Me [Q1-Q3]). Коэффициент ранговой корреляции Спирмена использовался для оценки взаимосвязи между количественными переменными. Межиндивидуальная вариабельность оценивалась по коэффициенту вариации (% CVG) и рассчитывалась для каждой переменной как $\text{CVG} = \sigma/\mu \times 100\%$, где σ — стандартное отклонение, μ — среднее арифметическое. Референтные интервалы

были рассчитаны с использованием непараметрических методов в соответствии с рекомендациями CLSI [11]. Нижняя граница референтного интервала оценивалась как 2,5-й перцентиль, а верхняя граница — как 97,5-й перцентиль распределения. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты сравнения количественных и временных параметров ТГТ, выполненного двумя технологиями, а также CVG представлены в таблице 1.

Параметры тромбограммы показали высокую межиндивидуальную вариабельность, а коэффициенты вариации находились в пределах от 14 до 32 % в Технологии 1 и от 7 до 36 % в Технологии 2. Так, CVG для показателя LT составил 18,45 % на приборе Fluoroscan Ascent (Технология 1) и 18,19 % на коагулометре Severon Alpha (Технология 2). Коэффициенты вариации показателей Peak thr. и ttPeak были ниже в Технологии 1 (15,74 % и 14,35 % соответственно), чем в Технологии 2 (20,68 % и 18,14 % соответственно). Значимое различие CVG двух технологий наблюдалось по показателю ETP. Коэффициент вариации показателя ETP в Технологии 2 (7,1 %) в два раза ниже, чем в Технологии 1 (15,47 %) ($p = 0,035$). Наибольший коэффициент вариации был получен для индекса скорости образования тромбина VI: 32,17 % в Технологии 1 и 36,8 % в Технологии 2. CVG показателей ТГТ после нормализации снижается при постановке ТГТ на Severon Alpha и практически не изменяется (LT, ETP) или повышается (Peak thr., ttPeak, VI) при исследовании на Fluoroscan Ascent, но статистически значимых различий после нормализации данных не было выявлено, что согласуется с результатами, полученными другими авторами [9].

В ходе сравнения параметров ТГТ на двух приборах было показано, что ETP двух методик значимо отличается как в абсолютных значениях ($p = 0,0001$), так и после нормализации ($p = 0,001$). Также абсолютные значения LT в Технологии 1 достоверно выше, чем в Технологии 2 ($p = 0,02$).

Корреляционный анализ выявил прямую положительную связь по временному показателю LT, отражающему чувствительность технологий к генерации стартового количества тромбина, в двух методиках ($p < 0,05$) (данные не представлены).

В ходе исследования были получены РИ для двух технологий (табл. 2). Полученные РИ соответствуют значениям, заявленным производителем, что подтверждает воспроизводимость методики в нашей лаборатории.

Обсуждение

В настоящее время лаборатории часто используют свои собственные протоколы проведения ТГТ, источник и концентрацию тканевого фактора и/или фосфолипидов, тип и концентрацию субстрата, что приводит к плохой стандартизации протокола проведения ГТ [12]. Отсутствие аттестованных контрольных материалов также затрудняет сравнение данных, полученных в разных лабораториях. По данным литературы, вариабельность теста затрагивает и преаналитический этап (тип иглы и пробирки для взятия крови, условия хранения, режим центрифугирования, время хранения пробы до центрифугирования), что

может повлиять на воспроизводимость методики и увеличить вариацию результатов [13].

В настоящем исследовании CVG в Технологии 1 варьировал от 14 до 32 %, а в Технологии 2 от 7 до 36 %. Самый высокий коэффициент вариации наблюдался для показателя VI в обеих технологиях. Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях. Высокий коэффициент вариации (< 15 %) был показан в 2003 году Н. Hemker при модификации метода, что подтверждается многочисленными исследованиями. Так, G. Rudež с коллегами показали, что CVG варьирует от 24 до 34 % [14]. A. Maïresse и соавторы в недавнем исследовании биологической вариации параметров

Таблица 1. Межиндивидуальная вариабельность генерации тромбина в бедной тромбоцитами плазме у здоровых доноров

Table 1. Inter-individuals variation of thrombin generation in donors' platelet-poor plasma

Показатель	Me [Q1-Q3]			CVG, %
	T1	T2	p	T1
LagTime, мин	2,50 [2,35–2,92]	2,10 [1,88–2,35]	0,02	18,45
ETP, нмоль/мин	1822,00 [1650,00–2070,00]	2778,85 [2690,25–3016,05]	0,0001	15,47
Peak thr., нмоль	279,70 [253,90–294,60]	333,9 [237,9–434,2]	0,135	15,74
ttPeak, мин	6,33 [5,60–6,83]	5,70 [5,08–6,60]	0,521	14,35
VI, нмоль/мин	74,54 [66,27–90,42]	90,60 [57,05–131,20]	0,531	32,17
Данные после нормализации				
LagTime, %	93,63 [87,83–108,70]	90,91 [81,82–100,0]	0,152	18,17
ETP, %	110,83 [101,84–125,00]	99,27 [95,98–107,1]	0,001	15,76
Peak thr., %	109,35 [100,04–121,41]	92,88 [73,78–120,8]	0,023	16,93
ttPeak, %	97,38 [86,16–105,2]	99,47 [89,03–108,1]	0,697	15,86
VI, %	108,01 [96,66–135,25]	89,71 [61,81–129,9]	0,33	35,07

Примечания: T1 — технология 1 (Fluoroscans Ascent), T2 — технология 2 (Ceveron Alpha), медиана (Me) и интерквартильный размах измерений [Q1–Q3], CVG — коэффициент межиндивидуальной (групповой) вариации.

Notes: T1 — technology 1 (Fluoroscans Ascent), T2 — technology 2 (Ceveron Alpha), median (Me) and interquartile range of measurements [Q1–Q3], CVG — coefficient of interindividual (group) variation.

ТГТ также получили сходные высокие значения CVG — от 10,4 % до 28,4 % [15]. В нашем исследовании увеличение коэффициента вариации может быть обусловлено возрастной группой доноров (старше 45 лет). Контрольная группа была выбрана в соответствии с используемыми реактивами

(RC Low и PPP-реагент), рассчитанными на определение склонности к тромбообразованию, характерной для старшей возрастной группы. В работе W. Jun с соавторами показали, что увеличение возраста коррелирует с повышением ГТ (LT $r = -0,6583$, $p < 0,0001$; Peak thr. $r = 0,4863$, $p < 0,0001$;

Таблица 2. Референтные диапазоны генерации тромбина в бедной тромбоцитами плазме у здоровых доноров

Table 2. Reference intervals of thrombin generation in donors' platelet-poor plasma

Показатель	Me [Q1–Q3]	
	РИ T1	РИ T2
LagTime, мин	2,33–4,10	1,60–3,00
ETP, нмоль/мин	1478,00–2595,00	2451,00–3161,00
Peak thr., нмоль	221,60–412,00	161,60–479,30
ttPeak, мин	4,86–8,33	4,80–8,80
VI, нмоль/мин	49,13–154,90	26,80–170,50

Примечания: РИ — референтный интервал, T1 — технология 1 (Fluoroscan Ascent), T2 — технология 2 (Ceveron Alpha), медиана (Me) и интерквартильный размах измерений [Q1–Q3], РИ Ceveron Alpha — РИ из инструкции к реагенту.

Notes: RI — reference interval, T1 — technology 1 (Fluoroscan Ascent), T2 — technology 2 (Ceveron Alpha), median (Me) and interquartile range [Q1–Q3], Ceveron Alpha RI — RI from reagent instructions.

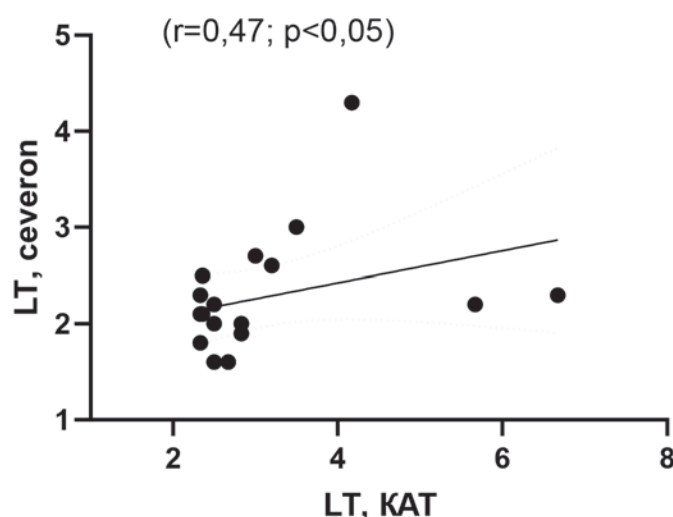


Рис. 1. Положительная прямая корреляция между LT (Ceveron) и LT (KAT) в постановке ТГТ на PPP на разных приборах

Figure 1. Positive direct correlation between LT (Ceveron) and LT (CAT) in the setting of TGT on PPP on different devices

ETP $r = 0,3608$, $p < 0,0001$; ttPeak $r = -0,6313$, $p < 0,0001$) [16]. Результаты работы Н. Haidl и коллег подтверждают, что величина образования тромбина зависит от возраста [17].

Следует отметить, что в нашем исследовании мы работали с образцами замороженной плазмы. В исследовании L. E. Kausche и соавторами было показано, что Peak thr. в свежих и замороженных образцах PPP совпадал примерно в 50 % образцов, а ETP совпадал почти в двух третях образцов. Кинетика образования тромбина была ниже в замороженных образцах по сравнению со свежей плазмой. Однако с практической точки зрения при использовании полуавтоматических технологий следует предпочесть замороженные пробы [18].

В результате сравнения данных на двух приборах были обнаружены статистически значимые отличия по показателям ETP и LT. Различия могут быть обусловлены разными методиками постановки. Технология 1 является полуавтоматической (смешивание реагента и исследуемой плазмы производится в 96-луночном планшете исследователем, флуорогенный субстрат добавляется автоматически), в то время как анализ ГТ в Технологии 2 происходит в автоматическом режиме. Показатели ТГТ чувствительны к изменениям температурного режима [19], поэтому вариация результатов может наблюдаться и из-за разности приборной составляющей, поскольку адекватного термостатирования проще добиться в кюветном сегменте, представленном в Severon Alpha (Технология 2). Еще одним отличием является процентное содержание плазмы в исследуемой смеси. В Технологии 2 используется 40 мкл плазмы в общем объеме 100 мкл (40 % плазмы), тогда как в Технологии 1 используется 80 мкл плазмы в общем объеме 120 мкл (67 % плазмы). По мере уменьшения процента объема плазмы в аналитической смеси образование тромбина увеличивается, достигая пика, когда объем плазмы составляет примерно 20–30 %, а затем снижается при меньших объемах плазмы [20]. Также методики различаются и в калибровке: в Технологии 2 используется человеческий тромбин (1 мкмоль л⁻¹) в буфере с бычьим сывороточным альбумином, в то время как в Технологии 1 используется человеческий $\alpha 2M$ -тромбин (0,5–1,0 мкмоль л⁻¹) с последующей коррекцией результатов [21]. Как показано в литературе, концентрация и происхождение тканевого фактора и фосфолипидов сильно влияют на параметры ТГТ [3]. В Технологии 1 используется триггерный реагент со средней концентрацией тканевого фактора (5 пмоль), а пусковой реагент RC Low содержит с низкую концентрацию ТФ.

Основными параметрами, анализируемыми в литературе, являются эндогенный тромбиновый потенциал и пиковая концентрация тромбина. В ходе исследования были разработаны внутрिलाбораторные референтные интервалы для двух технологий. РИ для Технологии 1: ETP 1478,0–2595,0 нмоль/мин и Peak thr. 221,6–412,0 нмоль. РИ для Технологии 2: ETP 2451,00–3161,00 нмоль/мин и Peak thr. 161,60–479,30 нмоль. Полученный диапазон РИ соответствует РИ производителя, что свидетельствует о воспроизводимости результатов, полученных Технологией 2, в нашей лаборатории.

Ограничения исследования

В крупном межцентровом исследовании показано, что нормализация данных снижает межлабораторную вариацию данных [22], однако в настоящем исследовании мы не получили достоверных изменений CVG при нормализации данных ТГТ, выполненных в Технологии 1. CVG некоторых параметров ТГТ в Технологии 2 снижался после нормализации.

Для уменьшения вариации данных ТГТ рекомендуется использовать эталонную лиофилизированную контрольную плазму. В нашем исследовании применялась локальная референсная плазма. Ранее было показано, что вариация результатов не уменьшается при использовании локальной референсной плазмы, но может снижаться при использовании референсной плазмы от производителя [9]. Использование локальной референсной плазмы является ограничением исследования. Для разработки РИ необходима выборка пациентов более 120 человек, в настоящем исследовании выборка составила 20 человек, что также является ограничением работы.

Заключение

В настоящее время внедрение методики измерения ГТ в клиническую практику востребовано, но ограничивается из-за отсутствия единых рекомендаций по стандартизации преаналитического этапа и вариабельности протоколов проведения теста в разных лабораториях.

Сравнение двух лабораторных технологий ТГТ демонстрирует высокие результаты межиндивидуальной вариации. При этом CVG показателя ETP в Технологии 2 в два раза ниже, чем в Технологии 1.

Таким образом, параметры ТГТ индивидуальны и использование исследования в динамике для каждого конкретного индивида, вероятно, имеет большую информативность, чем применение РИ, полученных в общей популяции. Динамическое наблюдение за пациентом должно выполняться с применением одной и той же технологии.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgments

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20132, <https://rscf.ru/project/22-25-20132>. Выражаем благодарность компании «БиоХимМак» за предоставленную возможность выполнения исследования на автоматическом анализаторе Ceveron Alpha TGA. / The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Foundation No. 22-25-20132, <https://rscf.ru/project/22-25-20132>. We would like to express our gratitude to BioHimMak for the opportunity to perform research on the Ceveron Alpha TGA automatic analyzer.

Список литературы / References

- Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol.* 1953; 6(1):3–8. DOI: 10.1136/jcp.6.1.3.
- Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002; 32(5–6):249–253. DOI: 10.1159/000073575.
- Depasse F, Binder NB, Mueller J, et al. Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. *J Thromb Haemost.* 2021; 19(12):2907–2917. DOI: 10.1111/jth.15529.
- Loeffen R, Kleinegris MC, Loubele ST, et al. Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(12):2544–2554. DOI: 10.1111/jth.12012.
- Wagner L, Luddington R, Wiens L, Grigorov A, Hrachovinová I, Binder B. First Experiences with the Measurement of Thrombin Generation (TGA) on the Ceveron Alpha in the Routine Lab. *Blood.* 2008; 112(11):4089–4089. DOI: 10.1182/blood.V112.11.4089.4089.
- Pfreppe C, Behrendt LC, Bönigk H, et al. Influence of direct oral anticoagulants on thrombin generation on Ceveron TGA. *Int J Lab Hematol.* 2022; 44(1):193–201. DOI: 10.1111/ijlh.13721.
- Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* 2016; 62(5):699–707. DOI: 10.1373/clinchem.2015.248625.
- Binder NB, Depasse F, Mueller J, et al. Clinical use of thrombin generation assays. *J Thromb Haemost.* 2021; 19(12):2918–2929. DOI: 10.1111/jth.15538.
- Perrin J, Depasse F, Lecompte T, et al. Large external quality assessment survey on thrombin generation with CAT: further evidence for the usefulness of normalisation with an external reference plasma. *Thromb Res.* 2015; 136(1):125–130. DOI: 10.1016/j.thromres.2014.
- Dargaud Y, Wolberg AS, Gray E, et al. Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2017; 15(8):1704–1707. DOI: 10.1111/jth.13743.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory - Approved Guideline - Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne: PA, USA, 2010.
- Melnichnikova OS, Zhilenkova YI, Zolotova EA, et al. Thrombin generation test as an integral analysis of the hemostasis system: technical capabilities and application in laboratory practice. *Russ J Pers Med.* 2022; 2(3):119–128. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-119-128.
- de Laat-Kremers RMW, Ninivaggi M, Devreese KMJ, et al. Towards standardization of thrombin generation assays: Inventory of thrombin generation methods based on results of an International Society of Thrombosis and Haemostasis Scientific Standardization Committee survey. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(8):1893–1899. DOI: 10.1111/jth.14863.
- Rudez G, Meijer P, Spronk HM, et al. Biological variation in inflammatory and hemostatic markers. *J Thromb Haemost.* 2009; 7(8):1247–1255. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03488.x.
- Mairesse A, Bayart JL, Desmet S, et al. Biological variation data and analytical specification goal estimates of the thrombin generation assay with and without thrombomodulin in healthy individuals. *Int J Lab Hematol.* 2021; 43(3):450–457. DOI: 10.1111/ijlh.13388.
- Wu J, Zhao HR, Zhang HY, et al. Thrombin generation increasing with age and decreasing with use of heparin indicated by calibrated automated thrombogram conducted in Chinese. *Biomed Environ Sci.* 2014; 27(5):378–384. DOI: 10.3967/bes2014.063.
- Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, et al. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost.* 2006; 95(5):772–775.
- Kausche LE, Adler W, Zimmermann R, et al. Thrombin Generation in Fresh and Frozen-Thawed Platelet Poor Plasma — Is there a Difference? *Clin Lab.* 2020; 66(6). DOI: 10.7754/Clin.Lab.2019.190834.
- Mori F, Genuardo C, Nannizzi S, et al. Intra— and inter-assay variations of two thrombin generation methods. *Int J Lab Hematol.* 2021; 43(4):O218—O220. DOI: 10.1111/ijlh.13524.
- Chandler WL, Roshal M. Optimization of plasma fluorogenic thrombin-generation assays. *Am J Clin Pathol.* 2009; 132(2):169–179. DOI: 10.1309/AJCP6AY4HTRAAJFQ.

21. Kintigh J, Monagle P, Ignjatovic V. A review of commercially available thrombin generation assays. *Res Pract Thromb Haemost*. 2017; 2(1):42–48. DOI: 10.1002/rth2.12048.

22. Dargaud Y, Wolberg AS, Luddington R, et al. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study. *Thromb Res*. 2012; 130(6):929–934. DOI: 10.1016/j.thromres.2012.07.017.

Информация об авторах:

Золотова Екатерина Алексеевна, аспирант кафедры лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Мельнишникова Ольга Сергеевна, к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской группы кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Симакова Мария Александровна, к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории кардиомиопатий, руководитель научно-исследовательской группы кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Жиленкова Юлия Исмаиловна, к.м.н., доцент кафедры лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Сироткина Ольга Васильевна, д.б.н., профессор кафедры лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; старший научный сотрудник отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий ФГБУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова»;

Вавилова Татьяна Владимировна, д.б.н., профессор, заведующий кафедрой лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Ekaterina A. Zolotova, MD, PhD student of Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Olga S. Melnichnikova, MD, PhD, Senior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Maria A. Simakova, MD, PhD, Senior Researcher, Noncoronary Heart Disease Department, Head of Research Group of Cardio-oncology, Research Centre of Personalized Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Yulia I. Zhilenkova, MD, PhD, Associate Professor of Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Olga V. Sirotkina, PhD, DSc, Professor of Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre; senior researcher, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»; senior researcher, Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University;

Tatiana V. Vavilova, MD, PhD, DSc, Professor, Head of Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre.