

혈소판기능 측정기 Multiplate 지표의 한국인 참고치에 대한 기초 자료

Basic Data for Reference Intervals in Koreans for Parameters Produced by Multiplate Platelet Function Analyzer

백세연¹ · 홍지만² · 임영애³

Sae Yun Baik, M.D.¹, Ji Man Hong, M.D.², Young Ae Lim, M.D.³

녹십자의료재단¹, 아주대학교 의과대학 신경과학교실² · 진단검사의학교실³

Green Cross Laboratories¹, Yongin; Departments of Neurology² and Laboratory Medicine³, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Background: The Multiplate analyzer (Dynabyte GmbH) has been recently introduced as a platelet function test for patients taking antiplatelet drugs. The study aimed at providing basic data for determining the reference interval of parameters produced by Multiplate in Koreans and to study the factors that influence those parameters.

Methods: Blood was collected from 35 healthy volunteers (female 18, male 17) into tubes containing hirudin or 3.2% sodium citrate. Whole blood platelet aggregations triggered by adenosine-5'-diphosphate (ADP), ADP-high sensitive (ADP+PGE1 only in hirudin samples), arachidonic acid (AA), collagen or thrombin receptor activator peptide (TRAP) were investigated using Multiplate according to the manufacturer's instructions. Data from healthy volunteers for the area under the curve (AUC) were determined from the central 95th percentile of the results.

Results: The values of AUC in hirudin samples for all agonists were significantly higher than those in sodium citrate samples. The AUC values in hirudin (sodium citrate) samples were as follows: ADP 38-107 (18-119) U; ADP+PGE1 16-91 U; AA 64-156 (32-117) U; collagen 53-112 (26-108) U; and TRAP 81-163 (49-149) U. The parameters from Multiplate were significantly correlated with leukocyte counts, but not with hematocrit levels.

Conclusions: Although our data were derived from only 35 subjects, the results are expected to be helpful in determining the reference interval at a single institute and may serve as basic data for future cumulative data of reference intervals from multiple institutes in Korea.

Key Words: Reference intervals, platelet function, Multiplate analyzer

서 론

항혈소판제를 복용하거나 복용할 예정인 환자들에서 약물에 대한 반응여부를 확인하기 위해서는 혈소판기능검사가 필요하다. 이

Corresponding author: Young Ae Lim

Department of Laboratory Medicine, Ajou University School of Medicine,

164 World cup-ro, Yeongtong-gu, Suwon 443-721, Korea

Tel: +82-31-219-5786, Fax: +82-31-219-5778

E-mail: limyoung@ajou.ac.kr

Received: September 10, 2012

Revision received: December 11, 2012

Accepted: December 14, 2012

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2013, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

러한 목적으로 현재 사용되는 혈소판기능검사로서는 1960년대에 개발된 고전적인 광투과식 응집측정기(light transmission ag-gregometry)가 있으나 혈소판풍부혈장의 제조로 많은 검체량이 필요하고 검사시간이 길고 복잡하다는 단점 때문에 실제 항혈소판 약물의 추적기능검사로 사용하기에는 어려웠다. 이러한 단점을 보완하여 간편하게 검사할 수 있는 장비들이 현재 국내에 소개되고 있는데, VerifyNow (Accumetrics, San Diego, CA, USA)와 Multiplate (Dynabyte GmbH, Munich, Germany) 장비이다[1, 2]. 이 중 Multiplate는 새롭게 국내에 소개된 장비로서 광투과식 응집측정기의 변형 형태인 전기장애법(electric impedance method)을 이용하며 혈소판 풍부혈장대신 300 μ L의 소량의 전혈을 이용하여 10분내에 간편하게 혈소판 기능을 평가할 수 있는 장비이다. 더욱이 검사당 한 개의 test cell을 이용하지만 각 검사당 2개의 감지기에서 결과값이 측정되어 이들의 평균값을 제공하므로 재현성이 검증되는 장점이 있다[3].

일반적으로 혈소판기능의 평가에 사용되는 검체는 혈액응고검사에 이용되는 sodium citrate를 사용하고 있으나, 이는 칼슘이온을 소진시키므로 혈소판 응집능검사에 적합하지 않다는 보고가 있다[4]. 반면에 hirudin은 보관 검체에서 더 안정하며 생리화학적 칼슘 수치를 방해하지 않는 트롬빈 억제제로 Multiplate장비에서는 sodium citrate 대신 권장하고 있는 항응고제이다[3]. Hirudin 검체를 이용한 Multiplate 검사의 참고치에 대한 일부 외국 보고들은 있다[5-7]. Multiplate를 사용하여 연구한 국내 보고는 한 기관에서만 sodium citrate로 측정하여 시행하였던 보고이며[1, 2], 한국인을 대상으로 한 Multiplate 참고치 설정에 대한 초록 보고가 있었으나 이 역시 hirudin이 아닌 sodium citrate에 대한 보고였으며 adenosine-5'-diphosphate (ADP)와 arachidonic acid (AA)에 대한 참고치만이 있다[8].

Multiplate 장비는 분석을 위하여 제조사에서 3가지의 지표표를 제시하는데, area under the curve (AUC), 분석 중 임피던스의 증가 (increase of impedance during analysis, aggregation) 그리고 응집의 최대 기울기(maximal slope of aggregation, velocity)이다. 이중 진단 시 권장되는 지표는 AUC로서 1 U는 10 AU×min에 해당되는데, 앞서 언급한 보고들은 모두 AUC에 대해서만 참고치를 산정하여 보고하였다. 현재 국내에 Multiplate 장비가 보급되어 사용되고 있으나, 참고치 산정을 위하여 정상인의 자료를 분석한 보고는 없는 실정이다. 이는 시약이 비교적 고가이고 단일기관에서 다수의 정상인 피험자를 모집하기 쉽지 않기 때문으로 생각한다. 따라서 이 연구에서는 한국인의 hirudin과 sodium citrate로 채혈한 검체에서 응집촉진제로 ADP와 AA 이외에 ADP보다 민감한 지표인 ADP에 prostaglandin E1 (ADP+PGE1), thrombin receptor activating peptide (TRAP)와 collagen을 사용하였다. 또한 Multiplate 장비에서 제공되는 지표인 AUC 이외에도 aggregation과 velocity 지표에 대하여 정상인의 자료를 분석하고, hirudin과 sodium citrate 검체의 연관성과 Multiplate 지표들에 미치는 요인들을 조사하여 Multiplate 검사 결과를 판독하거나, 참고자료로 이용하는 데 도움을 주고, 추후 국내 참고치 설정을 위하여 국내 다기관 자료 축적을 위한 기본 자료로서 제공하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 채혈

연구계획서는 아주대학교병원 연구윤리심의위원회(IRB)에서 승인을 받았다. 대상자는 혈액색을 제외한 건강검진상 현혈자 선별검사상 현혈자로 합당하였던 20세부터 50세까지 35명의 건강인이었다. 연구서에 동의한 대상자 중 일주일 이내에 약물복용력이 없는 경우에 채혈하였다.

21G 주사기를 이용하여 정맥에서 3개의 시험관에 채혈하였는데, 첫 번째 채취 시 유래될 수도 있는 조직인자(tissue factor)가 혈소판기능에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 첫 번째 시험관은 K2-EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 채혈한 후에 Multiplate 측정을 위하여 3.2% sodium citrate (Becton Dickinson), 그리고 hirudin (Multiplate Service GmbH, Munich, Germany) 25 µg/mL 시험관 순서로 각각 3 mL씩 채혈하였다[6]. 채혈 후에 검체를 잘 혼합한 후 검사 전까지 실온에 보관하였는데, 검사는 채혈 후 0.5-2시간 이내 모두 시행하였다. 이중 K2-EDTA 혈액은 혈액형과 일반혈액검사를 측정하는데 사용하였고, 일반혈액 검사는 LH750 (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.

2. Multiplate를 이용한 혈소판응집능검사

혈소판응집능검사는 시약과 제품설명서에 따라 시행하였다. 즉, Multiplate 장비에 전극이 부착된 test cell들을 넣은 뒤 여기에 hirudin 혹은 sodium citrate 전혈과 미리 37°C로 가온한 희석액인 생리식염수를 300 µL씩 모두 넣은 후 각각에 혈소판응집촉진제를 20 µL씩 넣고 반응시킨 후 장비에서 산출되는 결과값을 확인하였다. 혈소판응집촉진제는 모두 Dynabyte GmbH사(Munich, Germany) 제품을 이용하였는데, 최종 농도가 6.5 µM ADP (ADPtest), 6.5 µM ADP와 9.4 nM PGE1 (ADPtest HS), 0.5 mM AA (ASPItest), 3.2 µg/mL collagen (COLtest), 32 µM thrombin receptor activator peptide (TRAPtest)가 되도록 하였다. Multiplate 지표는 항응고제 종류에 따른 각 혈소판응집촉진제의 AUC (U=10 AU*min), aggregation (AU), 그리고 velocity (AU/min)에 대하여 분석하였다.

3. 통계처리

모든 자료는 평균±표준오차로 나타내었으며, 통계 프로그램은 SPSS 12.0.1 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA)와 Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, USA)를 사용하였다. 정상인의 자료분석에는 중앙 95 백분위수 (2.5-97.5 백분위수)로 정하였다[5, 6]. 모든 자료는 Kolmogorov-Smirnov 시험을 실시하여, 모두 정규분포를 보임을 확인하였다. 남녀 및 혈액형 비교에는 Student's *t*-test, hirudin과 sodium citrate 항응고제 비교에는 paired *t*-test를 시행하였다. 상관성 분석에는 Pearson 상관계수를 구하였다.

$P < 0.05$ 인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 대상자 특성

35명의 대상자들은 여자 18명, 남자 17명으로 평균 연령(범위)은

31.9±1.2세(22-48세)였다. 이들의 혈액형은 모두 Rh 양성으로 ABO 혈액형은 A형 11명, B형 17명, O형 4명 그리고 AB형 3명이었다. 평균 혈소판 수 $239 \pm 6 \times 10^9/L$ ($161-372 \times 10^9/L$), 혈색소 13.8±0.3 g/dL (11.3-16.8 g/dL), 백혈구 수 $6.3 \pm 0.2 \times 10^6/L$ ($4-10.8 \times 10^6/L$)였다. 혈색소와 혈소판 수는 남녀에 따라 차이를 보였다.

2. 항응고제에 따른 Multiplate 지표의 비교

ADP 첨가시의 AUC와 aggregation을 제외하고는, hirudin 검체의 AUC, aggregation 및 velocity 들은 다른 모든 혈소판 응집촉진제 첨가 시 sodium citrate 검체의 결과보다 유의하게 높은 값을 나타내었다(Table 1). 또한 TRAP을 첨가한 경우의 AUC 값을 제외하고는, 다른 혈소판응집촉진제 첨가 시 AUC, aggregation 및 velocity 자료들은 hirudin 검체와 sodium citrate 검체가 유의한 상관관계를 나타내었다(Table 1).

여성과 남성의 AUC, aggregation, 그리고 velocity 값은 대부분 유의한 차이가 없었으나, hirudin 검체의 ADP velocity 값이 여성

15.5±3.5 U로 남성 12.5±2.9 U에 비하여 유의하게 높았으며($P=0.01$), sodium citrate 검체의 AA의 velocity 값이 여성 18.8±5.6 U로 남성 15.6±2.8 U에 비하여 유의하게 높았다($P=0.039$).

3. Multiplate 지표에 대한 정상인의 자료 분석

Hirudin 검체의 AUC 분석 자료는 ADP 38-107 U, ADP+PGE1 16-91 U, AA 64-156 U, collagen 53-112 U 그리고 TRAP 81-163 U였다. Sodium citrate 검체의 AUC 분석 자료는 ADP 18-119 U, AA 32-117 U, collagen 26-108 U, 그리고 TRAP 49-149 U였다. 대부분의 결과가 hirudin 검체에 비하여 sodium citrate 검체의 자료 범위가 넓은 양상을 보였다(Table 2).

4. 기타 요인과 Multiplate 지표와의 상관성

Multiplate의 분석지표인 AUC와 aggregation, AUC와 velocity, 그리고 aggregation과 velocity 지표는 서로가 항응고제나 혈소판 응집촉진제에 상관없이 모두 $P<0.001$ 의 유의한 상관성을 보여 지

Table 1. Comparison and Pearson's correlations (R value) for parameters from the Multiplate analyzer according to the anticoagulants and platelet-aggregating agents

| Parameter | Anti-coagulants | Platelet aggregating agents (final concentration) | | | |
|-------------------|-----------------|---|--------------------|----------------------|--------------------|
| | | ADP (6.5 μM) | AA (0.5 mM) | Collagen (3.2 μg/mL) | TRAP (32 μM) |
| AUC (U) | Hirudin | 65.6 ± 2.7 | 100.8 ± 3.1 | 82.0 ± 2.5 | 124.5 ± 3.1 |
| | Na-citrate | 63.6 ± 3.6 | 69.9 ± 3.2 | 61.5 ± 3.0 | 109.5 ± 3.4 |
| P value* | | 0.377 | <0.001 | <0.001 | 0.001 |
| R | | 0.779 [†] | 0.815 [†] | 0.6696 [†] | 0.195 |
| Aggregation (AU) | Hirudin | 120.4 ± 4.4 | 178.5 ± 5.2 | 175.5 ± 4.5 | 212.1 ± 5.3 |
| | Na-citrate | 121.0 ± 6.4 | 114.7 ± 5.7 | 150.9 ± 5.0 | 173.8 ± 4.9 |
| P value* | | 0.903 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| R | | 0.749 [†] | 0.589 [†] | 0.590 [†] | 0.583 [†] |
| Velocity (AU/min) | Hirudin | 14.0 ± 0.6 | 22.9 ± 0.7 | 20.2 ± 0.6 | 26.6 ± 0.7 |
| | Na-citrate | 12.9 ± 0.7 | 17.3 ± 0.8 | 18.1 ± 0.8 | 28.4 ± 0.9 |
| P value* | | 0.024 | <0.001 | 0.011 | 0.045 |
| R | | 0.708 [†] | 0.803 [†] | 0.353 [†] | 0.412 [†] |

*P values for data of hirudin versus Na-citrate by Student's *t*-test; [†] $P<0.001$; [‡] $P<0.05$.

Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; AA, arachidonic acid; TRAP, thrombin receptor activator peptide; AUC, area under the curve.

Table 2. Reference range (central 95th percentile) for parameters from the Multiplate analyzer according to the anticoagulants and aggregating agents

| Parameter | Anticoagulants | Aggregating agents (final concentration) | | | | |
|-------------------|----------------|--|-------------------|-------------|----------------------|--------------|
| | | ADP (6.5 μM) | ADP+PGE1 (6.5 μM) | AA (0.5 mM) | Collagen (3.2 μg/mL) | TRAP (32 μM) |
| AUC (U) | Hirudin | 38-107 | 16-91 | 64-156 | 53-112 | 81-163 |
| | Na-citrate | 18-119 | ND | 32-117 | 26-108 | 49-149 |
| Aggregation (AU) | Hirudin | 74.6-184.9 | 34.5-155.6 | 125.3-282.8 | 118.9-243.8 | 132.4-275.3 |
| | Na-citrate | 34.1-210.4 | ND | 13.9-197.3 | 97.9-230.3 | 120-236.3 |
| Velocity (AU/min) | Hirudin | 8.3-23.5 | 4.5-19.8 | 15.4-31 | 14.2-27.2 | 19.5-35.2 |
| | Na-citrate | 4.9-22.5 | ND | 8-28.5 | 13-40.2 | 16.4-42.5 |

Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; PGE1, prostaglandin E1; AA, arachidonic acid; TRAP, thrombin receptor activator peptide; AUC, area under the curve; ND, not done.

Table 3. Pearson's correlations between parameters from the Multiplate analyzer according to the anticoagulants and platelet-aggregating agents

| Parameter | Anti-coagulants | Platelet aggregating agents | | | | |
|----------------------|-----------------|-----------------------------|----------|-------|----------|-------|
| | | ADP | ADP+PGE1 | AA | Collagen | TRAP |
| AUC-aggregation | | 0.969 | 0.948 | 0.969 | 0.914 | 0.811 |
| AUC-velocity | Hirudin | 0.934 | 0.986 | 0.935 | 0.902 | 0.921 |
| Aggregation-velocity | | 0.839 | 0.971 | 0.733 | 0.734 | 0.672 |
| AUC-aggregation | | 0.976 | NA | 0.797 | 0.915 | 0.933 |
| AUC-velocity | Na-citrate | 0.987 | NA | 0.964 | 0.746 | 0.834 |
| Aggregation-velocity | | 0.962 | NA | 0.799 | 0.802 | 0.678 |

All correlation coefficients were significant ($P < 0.001$).
For abbreviations and final concentration of aggregating agents, see Table 2.

Table 4. Pearson's correlations between hematologic parameters, age and AUC (U) according to the anticoagulants and aggregating agents

| Factor | Anti-coagulants | Aggregating agents | | | | |
|----------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | ADP | ADP+PGE1 | AA | Collagen | TRAP |
| Platelet | Hirudin | 0.608* | 0.506 [†] | 0.363 [†] | 0.457 [†] | 0.222 |
| | Na-citrate | 0.361 [†] | ND | 0.409 [†] | 0.311 | 0.094 |
| Hb | Hirudin | -0.206 | -0.056 | 0.037 | 0.077 | 0.155 |
| | Na-citrate | -0.065 | ND | -0.183 | 0.116 | 0.289 |
| Hct | Hirudin | -0.201 | -0.049 | 0.035 | 0.082 | 0.144 |
| | Na-citrate | -0.072 | ND | -0.174 | 0.109 | 0.28 |
| WBC | Hirudin | 0.522 [†] | 0.422 [†] | 0.667* | 0.586* | 0.54 [†] |
| | Na-citrate | 0.418 [†] | ND | 0.653* | 0.564* | 0.436 [†] |
| Age | Hirudin | 0.056 | 0.038 | 0.254 | 0.103 | 0.203 |
| | Na-citrate | 0.13 | ND | 0.092 | 0.355 [†] | -0.185 |

* $P < 0.001$; [†] $P < 0.01$; [‡] $P < 0.05$.
For abbreviation and final concentration of aggregating agents, see Table 2.

표끼리 매우 연관이 있음을 알 수 있었다(Table 3).

AUC 지표와 연관성이 있는 요인들을 살펴본 결과 hirudin 검체를 사용할 경우, 혈소판수치는 TRAP를 제외한 혈소판응집촉진제와 양의 상관관계를, 그리고 백혈구수치는 모든 혈소판응집촉진제에서 AUC와 양의 상관관계를 보였다. Sodium citrate 검체를 사용할 경우에는 혈소판 수는 ADP와 AA, 백혈구 수는 모든 혈소판응집촉진제, 그리고 연령은 collagen AUC와 양의 상관관계를 보였다($P=0.036$). 혈색소와 헤마토크리치는 모든 혈소판 응집촉진제에서 두 가지 항응고제와 AUC 사이에는 연관성이 없었다(Table 4). 자료는 제시하지 않았으나 O형과 O형이 아닌 군에서의 모든 지표들은 차이가 없었으며, velocity는 항응고제 상관없이 ADP와 AA 첨가 시 혈소판 수와 양의 상관관계를 보이며, velocity와 aggregation 지표는 AUC처럼 백혈구수와는 모든 항응고제와 혈소판응집촉진제에서 양의 상관관계를 보였다.

고 찰

이 연구에서 대부분의 혈소판응집촉진제 첨가 시 AUC 뿐만 아니라 aggregation 및 velocity 자료들도 두 가지 항응고제 검체를

사이에 유의한 상관관계가 있음을 확인하였다. 그러나 sodium citrate 검체를 사용할 경우에는 hirudin 검체에 비하여, ADP 첨가 시 AUC와 aggregation을 제외하고는, 모두 유의하게 낮은 값을 나타내었다. 이 연구는 채혈 30분에서 2시간 이내에 시행되었는데, 혈소판응집능 검사 시 혈소판의 반응의 주요 변화는 채혈 30분에서 2시간 이내에 발생하며, citrate 검체는 시간이 경과할수록 응집능이 손상되므로 혈소판기능검사에 citrate 검체는 권장되지 않는다고 하였다[9]. 또한 이 연구에서 ADP 첨가 시 혈소판응집능이 감소되지 않았던 이유는 citrate 검체는 이온화 칼슘의 환원을 유도하여 ADP에 의한 혈소판반응을 강화시킨다는 사실과 관련이 있는 것으로 생각된다[10]. 반면 트롬빈 억제제는 트롬빈 형성이나 트롬빈-유도 혈소판 활성을 억제하지 않으므로[11], hirudin 검체는 혈소판 응집 시 좀 더 안정적인 환경을 제공하며 citrate 검체에 비하여 일간 변이도 적었다고 하였다[5]. 따라서 Multiplate 장비 이용 시 채혈 후 즉시 검사가 시행되지 않는다면 가능한 hirudin 검체를 사용하는 것이 안정적인 결과를 줄 것으로 생각되었다.

이 연구에서 일부 응집촉진제를 이용할 때 velocity를 제외한 다른 Multiplate 지표들이 여성과 남성의 자료에 차이가 없었으므로 외국의 자료처럼[5, 6] 합쳐서 자료를 분석하였다. Ruback 등[5]은

Table 5. Comparison of reference intervals of AUC (U) according to data from references

| Anti-coagulants (final conc.) | Platelet aggregating agents | | | | | Reference (N) |
|----------------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------|---------------------------|-------------------|---------------|
| | ADP (6.5 μ M) | ADP+PGE1 (6.5 μ M) | AA (0.5 mM) | Collagen (3.2 μ g/mL) | TRAP (32 μ M) | |
| Hirudin | 38-107 | 16-91 | 64-156 | 53-112 | 81-163 | Ours (35) |
| | 48.3-117.3 | ND | 68.5-132.3 | 56-107 | ND | 5 (116-119) * |
| | 53-122 | ND | 74-136 | 46-116 | 94-156 | 7 (57-206) * |
| Na-citrate | 18-119 | ND | 32-117 | 26-108 | 49-149 | Ours |
| | 38-119 | ND | 20-116 | 40-121 | ND | 6 (120) |
| | 21-81 | ND | 31-79 | ND | ND | 8 (125) |

For abbreviations, see Table 2.

*The number of individuals for the reference intervals of AUC differs according to agonist.

여성이 더 높은 AUC 값을 보이는 것은 그 차이가 미미하므로 남녀를 합쳐 참고치를 산정하였다고 하였다. 이 연구의 결과와 같이 혈소판응집능은 성별에 차이가 없다는 보고들과[6, 12] 여성이 남성보다 더 높은 혈소판응집능을 보인다는 보고들이 있다[5, 13-15]. 후자의 이유로는 citrate 검체 사용 시 낮은 헤마토크리트를 보이는 노인이나 여성은 남성에 비하여 혈장내 citrate 농도가 낮아서 혈소판응집능이 더 높은 것이라고 설명하고 있다[13]. 그러나 이는 hirudin 검체를 사용한 경우에는 설명이 되지 않으며 Multiplate 장비를 이용한 이 연구와 Ruback 등[5] 보고에서는 헤마토크리트와 관련이 없었으므로 헤마토크리트와 성별에 따른 차이를 설명하기에는 부족한 것으로 생각된다. 이 외에도 호르몬에 의한 영향으로도 설명하기도 하나[14, 16] 명확한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 따라서 혈소판응집능의 성별에 따른 영향 여부 및 그 원인 그리고 Multiplate 지표의 성별에 따른 영향 여부에 대한 추후 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

이 연구의 정상인의 분석 결과에서 동일한 혈소판응집촉진제의 경우 hirudin 검체가 sodium citrate 검체에 비하여 더 높은 경향과 더 좁은 범위를 보여주었는데(Table 5), 국내외 보고도 이와 유사하였다[5-8]. 이러한 현상은 앞서 지적한 바와 마찬가지로 hirudin 검체가 citrate 검체에 비하여 안정적인 환경을 제공하기 때문으로 생각된다. 인종에 따라 Multiplate 지표들이 어떠한 영향에 대한 보고는 없으므로 이 연구는 한국인에서 결과를 해석에 도움을 줄 것으로 생각되었다.

이 연구에서 백혈구 수는 항응고제에 상관없이 AUC와 양의 상관관계를 보여 주었다. 이러한 양의 상관관계는 Ruback 등[5] 연구와는 일치하는 소견이었으나 Seyfert 등[6]은 AUC와 백혈구 수 간에 유의한 상관관계는 없었다고 보고하였다. 백혈구로부터 유래하는 cathepsin, elastase 등이 혈소판을 활성화시킬 수 있다[17]. 그러나 백혈구는 혈소판 응집 시 탈인산화 과정을 통하여 ATP를 ADP로 전환시켜 응집을 촉진하거나 혹은 ADP를 AMP로 전환시켜 ADP 유도 응집을 억제할 수 있으므로 백혈구 수가 증가된 경우에는 이러한 균형에 영향을 미칠 수 있다는 보고도 있다[18]. 따라서

백혈구 수와 혈소판응집능과의 관련성을 단정적으로 정의하기는 어려운 것으로 여겨졌다. 또한 hirudin 검체를 이용한 본 연구와 Ruback 등[5]은 혈소판수와 ADP, AA와 collagen의 AUC와 양의 상관관계를 보여 주었으며, Seyfert 등[6]은 AA를 제외한 두 가지 혈소판응집촉진제에서 양의 상관관계를 보여 주어 AUC와 혈소판수와 양의 상관관계에 대해서는 다른 연구들과도 일치하는 소견이었다. 이 연구와 같이 AUC와 혈소판 수 혹은 백혈구 수와의 양의 상관관계는 정상인뿐만 아니라 아스피린 복용중인 관상동맥질환 환자들에서도 collagen 10 μ g/mL, AA 1 mM를 사용할 경우 나타났는데, 특히, 혈소판 수와 혈소판응집능과의 양의 관계는 VerifyNow보다 Multiplate에서 더 현저하다고 하였다[19]. 이러한 현상은 전기장애법을 이용한 Multiplate와 혼탁도 광측정법(turbidimetric optical detection)을 이용한 VerifyNow 각 장비의 원리의 차이에 의한 가능성이 있으므로, Multiple 지표들의 해석 시는 이 점에 유의할 필요가 있을 것으로 여겨졌다.

Hirudin 검체는 연령과 연관성이 없었는데, 이러한 소견은 17세부터 66세까지의 건강인을 대상으로 할 경우 Multiplate 지표들이 연령에 따른 연관성이 없었다는 보고와 일치하였으므로[5], 성인에서 연령에 따른 지표들의 자료 분석은 큰 의미가 없는 것으로 생각되었다. O형은 von Willebrand factor의 항원과 ristocetin cofactor가 O형 이외의 혈액형에 비하여 낮으며, Thrombostat 4000과 PFA-100 장비의 closure time이 차이는 크지 않으나 유의하게 지연되었다는 보고가 있다[20]. 비록 이 연구에서 O형이 4명밖에 되지 않았으나 O형과 A형은 혈소판 응집에 차이가 없었다는 Aylett와 Wilkinson의 연구의 결과와 같이[21] O형과 O형 이외의 혈액형 사이의 Multiple 지표들은 유의한 차이가 없었다.

이 연구의 제한점으로는 정상인 자료분석에 참여한 대상군이 총 35명으로 대상군이 100명을 넘는 다른 보고들에[5, 6, 8] 비하여 적다는 점이다. 본 연구의 분석 결과 범위가 다른 연구의 결과의 범위에 비하여 넓게 설정되었는데, 이것이 다른 보고에 비하여 대상군이 적기 때문인지 혹은 다른 이유 때문인지는 좀 더 보강되어야 할 부분으로 여겨졌다. 또한 이 연구의 자료를 바탕으로 추후

국내 다기관이 자료가 축적되어 더 많은 한국인 정상인을 대상으로 한 참고치를 설정하는 데 기본 자료로 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 두 번째 제한점으로는 이 연구에서 분석한 것은 약물을 복용하지 않은 정상인을 대상으로 한 결과이므로 이 범위가 항혈소판약물을 사용하는 환자에게 약물반응 효과를 판정하는 지표로 사용될 수 있는지 여부에 대해서는 추가 연구가 필요할 것이다. 외국 보고에서도 참고치와 항혈소판치로제 사용시의 목표치, 그리고 혈소판수혈의 적응증을 달리 산정한 보고가 있기 때문이다. 즉 AA와 ADP의 참고치는 각각 74-136 U, 53-122 U로 산정하였으나 항혈소판치로제 사용시의 목표치는 각각 <30 U, <50 U, 그리고 혈소판수혈의 적응증은 각각 <20 U, <30 U으로 산정하였다[7].

세 번째 제한점으로는 AUC 이외에도 정상인에서 자료를 분석한 aggregation이나 velocity에 대한 임상적 의의에 관한 연구가 없었기에 이를 더 분석할 수는 없었다. 이들에 대한 임상적 활용에 대해서도 추후 더 연구되어야 할 부분으로 생각하였다.

결론적으로 본 연구에서는 국내에서는 처음으로 3.2% sodium citrate와 hirudin 검체에서 ADP, ADP+PGE1, AA, collagen과 TRAP 첨가 시 Multiplate에서 산출되는 지표들의 참고치 산정을 위한 기본자료를 제공하여 항응고제 종류에 따른 다양한 혈소판 응집촉진제의 AUC 결과 해석에 도움을 줄 수 있을 뿐 만이 아니라, aggregation이나 velocity를 이용한 연구에도 참고 자료로 도움을 줄 것으로 생각한다.

요 약

배경: Multiplate (Dynabyte GmbH, Munich, Germany) 장비는 항혈소판 복용 약물 환자의 혈소판기능검사로 최근 국내에 소개되었다. 이 연구는 Multiplate 관련 지표들에 대한 한국인에서의 참고치 설정을 위한 기본 자료를 제공하고, 지표들에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

방법: 35명의 건강한 지원자로부터(여성 18명, 남성 17명) hirudin과 3.2% sodium citrate 시험관에 채혈하였다. 채혈한 전혈에 adenosine-5'-diphosphate (ADP), ADP-high sensitiv (ADP+PGE1, hirudin 검체만 시행), arachidonic acid (AA), collagen 및 thrombin receptor activator peptide (TRAP)를 넣고 제조사의 지시에 따라 Multiplate 장비로 혈소판응집검사를 시행하였다. 건강한 지원자로부터 얻어진 area under the curve (AUC) 지표에 대한 자료는 중앙 95 percentile로 산정하였다.

결과: 모든 응집촉진제에서 AUC는 hirudin 검체에서 sodium citrate 검체의 결과값보다 모두 유의하게 높았다. Hirudin (sodium citrate) 검체의 AUC 결과는 ADP 38-107 (18-119) U, ADP+PGE1 16-91U, (AA) 64-156 (32-117) U, collagen 53-112 (26-108) U, TRAP

81-163 (49-149) U였다. Multiplate의 지표들은 헤마토크리트와는 연관이 없었으나 백혈구수와는 양의 상관관계를 보였다.

결론: 비록 대상군이 35명밖에 되지 않지만 이 자료들은 단일 기관의 참고치를 결정하는데 도움을 주며 향후 국내의 다기관으로부터 유래될 참고치의 누적자료에 대한 기본 자료를 제공하는 데 도움을 줄 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Woo KS, Kim BR, Kim JE, Goh RY, Yu LH, Kim MH, et al. Determination of the prevalence of aspirin and clopidogrel resistances in patients with coronary artery disease by using various platelet-function tests. *Korean J Lab Med* 2010;30:460-8.
2. Yoo NT, Bae HJ, Kim JE, Goh RY, Han JY, Kim MH, et al. Aspirin resistance may not be associated with clinical outcome after acute ischemic stroke: comparison with three different platelet function assays. *Korean J Stroke* 2012;14:35-42.
3. Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2006;96:781-8.
4. Packham MA, Bryant NL, Guccione MA, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Effect of the concentration of Ca²⁺ in the suspending medium on the responses of human and rabbit platelets to aggregating agents. *Thromb Haemost* 1989;62:968-76.
5. Rubak P, Villadsen K, Hvas AM. Reference intervals for platelet aggregation assessed by multiple electrode platelet aggregometry. *Thromb Res* 2012;130:420-3.
6. Seyfert UT, Haubelt H, Vogt A, Hellstern P. Variables influencing Multiplate™ whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets* 2007; 18:199-206.
7. Görlinger K, Jambor C, Hanke AA, Dirkmann D, Adamzik M, Hartmann M, et al. Perioperative coagulation management and control of platelet transfusion by point-of-care platelet function analysis. *Transfus Med Hemother* 2007;34:396-411.
8. Park SJ, Chi HS, Min SK, Choi MO, Jang S, Park CJ. Predicting response to antiplatelet drugs with the Multiplate analyzer. *Korean J Lab Med* 2008;28(S2):S476.
9. Kalb ML, Potura L, Scharbert G, Kozek-Langenecker SA. The effect of ex vivo anticoagulants on whole blood platelet aggregation. *Platelets* 2009;20:7-11.
10. Heptinstall S and Taylor PM. The effects of citrate and extracellular cal-

- cium ions on the platelet release reaction induced by adenosine diphosphate and collagen. *Thromb Haemost* 1979;42:778-93.
11. Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehilli J, Schömig A, et al. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost* 2008;99:121-6.
 12. Beyan C, Kaptan K, Ifran A, Savasci S, Oztürk Y, Okmen B. Effect of sex difference on platelet aggregation using an optical method in healthy subjects. *Clin Lab Haematol* 2006;28:14-6.
 13. Kasjanová D, Adamecková D, Gratzlová J, Hegyi L. Sex-related and age-related differences in platelet function in vitro: influence of hematocrit. *Mech Ageing Dev* 1993;71:103-9.
 14. Melamed N, Yogev Y, Bouganim T, Altman E, Calatzis A, Glezerman M. The effect of menstrual cycle on platelet aggregation in reproductive-age women. *Platelets* 2010;21:343-7.
 15. Otahbachi M, Simoni J, Simoni G, Moeller JF, Cevik C, Meyerrose GE, et al. Gender differences in platelet aggregation in healthy individuals. *J Thromb Thrombolysis* 2010;30:184-91.
 16. Knol HM, Kemperman RF, Kluin-Nelemans HC, Mulder AB, Meijer K. Haemostatic variables during normal menstrual cycle: A systematic review. *Thromb Haemost* 2012;107:22-9.
 17. Renesto P and Chignard M. Enhancement of cathepsin G-induced platelet activation by leukocyte elastase: consequence for the neutrophil-mediated platelet activation. *Blood* 1993;82:139-44.
 18. Glenn JR, White AE, Johnson A, Fox SC, Behan MW, Dolan G, et al. Leukocyte count and leukocyte ecto-nucleotidase are major determinants of the effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on platelet aggregation in human blood. *Platelets* 2005;16:159-70.
 19. Würtz M, Hvas AM, Kristensen SD, Grove EL. Platelet aggregation is dependent on platelet count in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 2012;129:56-61.
 20. Moeller A, Weippert-Kretschmer M, Prinz H, Kretschmer V. Influence of ABO blood groups on primary hemostasis. *Transfusion* 2001;41:56-60.
 21. Aylett RT and Wilkinson JM. Is there a correlation between blood type and platelet aggregations in the peripheral blood? *Explore (NY)* 2008; 4:196.