



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 102759614 B

(45)授权公告日 2017.09.26

(21)申请号 201210068133.3

(22)申请日 2012.03.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102759614 A

(43)申请公布日 2012.10.31

(30)优先权数据

11158195.5 2011.03.15 EP

(73)专利权人 西门子医疗诊断产品有限责任公司
地址 德国马尔堡

(72)发明人 J.恩德曼 A.雷希纳 N.灿德

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 周铁 林森

(51)Int.Cl.

G01N 33/49(2006.01)

G01N 1/40(2006.01)

(56)对比文件

US 2009/0186341 A1, 2009.07.23,

US 5869347 A, 1999.02.09,

CN 1736497 A, 2006.02.22,

US 2009/0186341 A1, 2009.07.23,

CN 1945310 A, 2007.04.11,

CN 1964753 A, 2007.05.16,

CN 101248012 A, 2008.08.20,

审查员 于园园

权利要求书3页 说明书11页 附图7页

(54)发明名称

用于在离心分析仪中测定血小板功能的装置和方法

(57)摘要

本发明涉及血小板功能诊断学领域,还涉及用于在离心分析仪中测定血小板功能的装置和方法。本发明基于下述目的:提供用于测定血小板功能的装置和方法,其允许使用离心分析仪可靠地、简单地且快速地测定血小板功能。本发明的目的通过一种用于测定血小板功能的测量池实现,所述测量池包括下述组件:a. 第一室,所述第一室用于接纳含有血小板的液体样品,b. 第二室,所述第二室在离心力作用于所述测量池的条件下捕集来自第一室的液体样品,和c. 多孔分隔件,所述分隔件使所述第一室和所述第二室彼此分开,且其中所述分隔件含有至少一种影响血小板活性的可溶物。

1. 一种用于测定血小板功能的测量池 (2、3、4、5), 所述测量池包括:
 - a. 第一室 (21、31、41、51), 所述第一室用于接纳含有血小板的液体样品,
 - b. 第二室 (22、32、42、52), 所述第二室在离心力作用于所述测量池的条件下捕集来自第一室的液体样品, 和
 - c. 多孔分隔件 (23、33、43、53), 所述分隔件使所述第一室和所述第二室彼此分开, 其特征在于,
所述分隔件 (23、33、43、53) 含有至少一种影响血小板活性的可溶物,
其中所述分隔件 (23、33、43、53) 具有 2-20 μm 的孔尺度,
其中从所述多孔分隔件开始的所述第二室 (22、32、42、52) 沿着其纵向轴线具有近端一半和远端一半, 具有在内部的装置 (24、34、44、54), 所述装置用于将第二室的空间细分成第一部分 (221、321、421、521) 和第二部分 (222、322、422、522),
 - 其中所述第一部分用于捕集和运输穿过分隔件的样品液体, 且
 - 其中所述第二部分用于测量捕集在第二室中的样品液体的液体量, 且
 - 其中所述第一部分和所述第二部分在所述第二室的远端一半中互连, 使得捕集和运输的样品液体可以从所述第一部分进入所述第二部分。
2. 如在权利要求1中要求保护的测量池, 其中所述至少一种影响血小板活性的可溶物是血小板活化剂。
3. 如在权利要求2中要求保护的测量池, 其中所述血小板活化剂来自下述组: ADP、2-MeSADP、胶原、肾上腺素、利托菌素、凝血酶、TRAP、花生四烯酸、U46619、PMA和血清素。
4. 如在权利要求1中要求保护的测量池, 其中所述至少一种影响血小板活性的可溶物是血小板抑制剂。
5. 如在权利要求4中要求保护的测量池, 其中所述血小板抑制剂来自下述组: 前列腺素 E1、前列腺素 I2、福司柯林、伊洛前列素和西卡前列素。
6. 如在前述权利要求之一中要求保护的测量池, 其中所述分隔件另外含有氯化钙离子。
7. 如在权利要求1中要求保护的测量池, 其中所述分隔件 (23、33、43、53) 具有 5 μm 的孔尺度。
8. 如述权利要求1中要求保护的测量池, 其中所述第二室 (22、32、42、52) 的至少一个部分区段由透光材料组成。
9. 如权利要求1中要求保护的测量池, 其中在所述第二室 (22、32、42、52) 上安置有许多用于电学地测量填充水平的电极对 (25、35、45)。
10. 如在权利要求1中要求保护的测量池 (2), 其中用于将第二室的空间 (22) 细分成第一部分 (221) 和第二部分 (222) 的装置 (24) 具有这样的平面: 所述平面相对于所述多孔分隔件成一定角度, 并从近端延伸至所述第二室的远端一半。
11. 如在权利要求1中要求保护的测量池 (3), 其中用于将第二室的空间 (32) 细分成第一部分 (321) 和第二部分 (322) 的装置 (34) 具有:
 - 第一区段 (341), 所述第一区段具有相对于所述多孔分隔件成一定角度的平面, 和
 - 第二部分区段 (342), 所述第二部分区段接连所述第一部分区段, 与限定第二室的空间的壁 (36) 平行地延伸, 并与所述壁形成管状结构, 所述管状结构延伸至所述第二室的远

端一半。

12. 如在权利要求1中要求保护的测量池(4), 其中用于将第二室的空间(42)细分成第一部分(421)和第二部分(422)的装置(44)具有漏斗样形状, 所述漏斗样装置的管状区域延伸至所述第二室的远端一半。

13. 如在权利要求1和10-12之一中要求保护的测量池(2、3、4), 其中用于测量捕集在第二室中的样品液体的液体量的所述第二室的第二部分(222、322、422)具有用于电学地测量填充水平的装置。

14. 如在权利要求13中要求保护的测量池(2、3、4), 其中所述装置是许多电极对(25、35、45)。

15. 一种用于测定血小板功能的测量池(5), 所述测量池包括:

a. 第一室(51), 所述第一室用于接纳含有血小板的液体样品,
b. 第二室(52), 所述第二室在离心力作用于所述测量池的条件下捕集来自第一室的液体样品, 和

c. 多孔分隔件(53), 所述分隔件使所述第一室和所述第二室彼此分开,
其特征在于,

所述分隔件(53)含有至少一种影响血小板活性的可溶物,

其中所述分隔件(53)具有2-20 μm 的孔尺度,

其中从所述多孔分隔件开始的所述第二室(52)沿着其纵向轴线具有近端一半和远端一半, 具有在内部的装置(54), 所述装置用于将第二室的空间细分成第一部分(521)、第二部分(522)和第三部分(523),

- 其中所述第一部分(521)用于捕集和运输穿过分隔件(53)的样品液体, 且其中所述样品液体沿着所述第二室(52)的纵向轴线从近端一半被运输至远端, 且

- 其中所述第二部分(522)用于测量捕集在所述第二室(52)中的样品液体(59)的流速, 且

- 其中所述第三部分(523)用作来自所述第二部分(522)的样品液体的溢流, 且

- 其中所述第一部分(521)和所述第二部分(522)在所述第二室的远端一半中互连, 使得捕集和运输的样品液体可从所述第一部分进入所述第二部分, 且

- 其中所述第二部分(522)具有毛细管的形式, 所述毛细管在所述第二室的近端一半的方向从远端一半升起, 且具有在它的末端处的开口(57), 所述开口建立与第三部分(523)的连接。

16. 一种用于测定血小板功能的方法, 所述方法包括下述步骤:

- i. 将含有血小板的液体样品装入如在权利要求1-15之一中要求保护的测量池的第一室中,

- ii. 将离心力施加于含有液体样品的测量池上,

- iii. 测量在第二室中捕集的液体的量, 或测量所述测量池的第二室中的样品液体的流速,

其中所述捕集的液体的量和所述流速与血小板功能负相关。

17. 如在权利要求16中要求保护的方法, 其中通过光度测定装置或电装置测量在测量池的第二室中捕集的液体的量。

18. 如在权利要求16中要求保护的方法,其中通过激光多普勒测速法测量在测量池的第二室中的样品液体的流速。

19. 如在权利要求16-18之一中要求保护的方法,其中在给定的时间间隔内连续地测量所述在测量池的第二室中捕集的液体的量或所述流速。

20. 如在权利要求16-18之一中要求保护的方法,其中在给定的时间测量所述在测量池的第二室中捕集的液体的量或所述流速一次。

21. 如在权利要求16-18之一中要求保护的方法,其中在离心力作用于测量池时,测量所述在测量池的第二室中捕集的液体的量或所述流速。

22. 如在权利要求16-18之一中要求保护的方法,其中所述施加于测量池的离心力是在50-2000×g范围内。

用于在离心分析仪中测定血小板功能的装置和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及凝固诊断学领域,更精确地,涉及血小板功能诊断学领域,还涉及用于在离心分析仪中测定血小板功能的装置和方法。

背景技术

[0002] 术语止血包括这样的生理过程:其首先确保血液在血管系统中的流动性,其次确保通过形成血块来避免血管外失血。在调节止血中涉及许多蛋白因子以及诸如血小板(凝血细胞)等细胞组分。在血管损伤的情况下,血小板首先积累在内皮下胶原上。该粘附由诸如von Willebrand因子(VWF)等粘附蛋白介导。在粘附过程中,血小板被活化,并从它们的颗粒释放出介质,其结果是,诱导其它血小板的聚集和活化的增加。这实现初步的血管壁阻塞(初期止血),其仅被血浆凝固系统的进一步反应稳定化(二期止血)。这些过程的失调可以导致血栓形成倾向或出血倾向,并根据严重性程度,可以具有危及生命的后果。

[0003] 在凝固诊断学中开发了不同的体外实验方法,这些可以用于测定患者的血液是否可以适当地凝固,或是否存在凝固缺陷。在凝固缺陷的情况下,经常有必要得到关于存在的缺陷的原因的更精确的信息,以便能够选择最佳的治疗措施。以靶向方式进行检查的凝固系统的一个重要的子功能是初期止血,这基本上依赖于血小板的功能。

[0004] 测定凝血细胞或血小板的功能是止血诊断学的一个常规目的,它在众多临床情形下是重要的,例如在心血管疾病的早期检测中,用于诊断遗传性或获得性血小板功能缺陷,用于在外科手术之前排除出血并发症,或用于监测抗血栓治疗。抑制血小板聚集的药物主要被用于预防和治疗动脉栓塞性事件,诸如心肌梗塞或中风。具有血小板聚集抑制作用的最普遍的药物是乙酰基水杨酸(ASA, 阿司匹林®)和噻吩并吡啶类药物氯吡格雷和噻氯匹定。

[0005] 现有技术已经公开了用于检查血小板功能的不同方法。测定出血时间是检测初期止血的总体内试验。如下测定出血时间:在患者上切开小切口或穿刺损伤,并测量在出血停止之前的时间。这是一个粗略地提供信息的试验,其难以标准化,主要用于紧急情况,以便得到初期止血的概况。血小板聚集抑制剂的摄入导致出血时间的增加。测定出血时间的缺点是,在正常出血时间的情况下,不可能排除血小板功能缺陷。

[0006] 不同的体外方法允许明显更灵敏地检测血小板功能缺陷。在这些方法中,通常通过加入活化剂和/或通过施加剪切力,在全血样品或富含血小板的血浆(PRP)样品中诱导血小板的聚集,并测量聚集反应。最常用于诱导血小板聚集的活化剂如下:ADP(腺苷5'-二磷酸)、胶原、肾上腺素(epinephrine、adrenalin)、利托菌素(ristocetin)和它们的不同组合,以及凝血酶、凝血酶受体活化蛋白(TRAP)或血清素。为了在体外施加剪切力(所述剪切力是血小板在体内聚集的重要触发因素),使用不同的方法,例如搅拌血小板样品,或穿过具有小直径的插管或孔引导或压迫血小板样品。

[0007] 在常规光透过集合度测定(LTA,其也称作Born血小板聚集)的情况下,在有聚集诱导物存在下,在集合度计中光度测定地测量富含血小板的血浆中血小板的聚集效率。作为

聚集体形成的结果,PRP样品的光透过增加,所以测量光透过使得可能测定例如聚集体形成的速率。光透过集合度测定也使得可能检测用作药物的血小板聚集抑制剂的治疗效果。光透过集合度测定的一个缺点是,仅富含血小板的血浆可以用作样品材料。富含血小板的血浆不仅缺少血液的重要组分例如红血细胞和白血细胞,而且需要耗费时间的且易出错的样品制备。

[0008] VerifyNow® 系统(Accumetrics)是光透过集合度测定的一种发展,其允许检查全血样品中的血小板功能。在该系统中,通过加入纤维蛋白原包被的微粒,增加血小板的聚集反应。

[0009] 在血小板功能分析仪(PFA-100®, PFA-200 Siemens Healthcare Diagnostics)中,实现了完全不同的测定血小板功能的试验原理。这是通用的、自动化的和标准化的体外全血试验,其中在流动条件下并因此在强剪切力存在下,测量初期止血。为了模拟在相对小的动脉血管中普遍的流动条件和剪切力,在专门的测量池中产生大约-40毫巴(mbar)的负压,并使位于样品蓄池中的柠檬酸盐化的全血流过具有大约200 μ m直径的毛细管。所述毛细管在测量室中开口,所述测量室被分隔件(例如膜)封闭,所述分隔件含有毛细管样中心开口(孔),血液因为负压而穿过所述中心开口。通常向膜中(至少在所述孔周围的区域)添加一种或多种诱导血小板聚集的活化剂,使得流过它的血液与所述孔区域中的聚集诱导物接触。作为诱导的血小板粘附和聚集的结果,在孔区域中形成血小板塞(血块),它闭合膜开口,并停止血流。在该系统中,测量封闭膜开口所需的时间。该所谓的闭合时间与血小板的功能效率相关联。在例如WO 97/34698中,描述了在基于闭合时间来测定血小板功能的方法中使用的测量池。作为实例,使用配有膜的测量池,所述膜被胶原(Co1)和另外的ADP或肾上腺素(Epi)包被。在例如WO 96/00899 A1中,描述了不同的分隔件以及它们的生产和应用。

[0010] 也用于测定血小板功能的另一个试验原理是基于血液或富含血小板的血浆被迫穿过滤器。

[0011] Uchiyama, S. 等人(Thrombosis Research 31: 99-116, 1983)描述了所谓的滤器出血时间(FBT)试验。在该方法中,引导处于恒压(大约150 mmHg)的全血穿过聚酯纤维滤器(Dacron®)。血小板聚集体堵塞滤器孔,并减小流速。出血时间FBT是流动开始至流速已经下降至低于1滴/30秒所经历的时间。

[0012] GB 2175691 A描述了根据Uchiyama等人的FBT试验的一种发展。在这里,借助于正压,使全血样品穿过由纤维网丝组成的滤器。滤器具有不同尺度的孔,并允许具有最高达10 μ m直径的颗粒穿过。其效应是,在仅20-100 mmHg的更低压力,可以压迫样品穿过滤器。相对大的血小板聚集体堵塞孔,并逐渐地阻断样品材料的穿过。测定流速或对比滤过的洗脱液中的血小板数目与未滤过的样品中的血小板数目提供关于血小板的聚集效率以及因而血小板功能的洞察。

[0013] 另一种测定血小板功能的方法(其基于血液或富含血小板的血浆被迫穿过滤器的原理)是所谓的保留试验Homburg (RTH) (Krischek, B. 等人, Seminars in Thrombosis and Hemostasis 31(4): 449-457, 2005; Krischek, B. 等人, Seminars in Thrombosis and Hemostasis 31(4): 458-463, 2005)。在该方法中,借助于离心力(110 $\times$ g, 10分钟),使全血或富含血小板的血浆穿过Porex® 滤器单元,所述滤器单元具有2.3 mm的高度和16-22 μ m的孔尺度。测定在样品穿过滤器之前和之后的血小板数目之间的差异,并

计算保留指数(RI%)。滤器中减小的血小板保留指示血小板功能的丧失。滤器中增加的血小板保留指示增加的血小板活性。

[0014] 最后提及的两种方法的一个缺点是,除了实际上进行试验以外,必须测定每个样品中的血小板数目2次。为此目的,首先,需要专门的分析仪器,其次,必须处理每个样品多次。

[0015] 用于自动化凝固诊断学的不同的可商业得到的仪器(凝固分析仪)包括离心单元。后者通常由比色杯转子组成,在所述比色杯转子上安置有分光光度计单元,使得在比色杯转子旋转过程中可以光度测定地测量样品。因此,特别希望提供可以在可得到的具有离心单元的仪器上进行的血小板诊断学方法。

发明内容

[0016] 因此,本发明基于下述目的:提供用于测定血小板功能的装置和方法,其允许使用离心分析仪可靠地、简单地且快速地测定血小板功能。

[0017] 通过独立权利要求的技术特征,实现了该目的。从属权利要求说明了本发明的其它实施方案。

[0018] 本发明涉及一种用于测定血小板功能的测量池,所述测量池包括下述组件:

[0019] a. 第一室,所述第一室用于接纳含有血小板的液体样品,

[0020] b. 第二室,所述第二室在离心力作用于所述测量池的条件下捕集来自第一室的液体样品,和

[0021] c. 多孔分隔件,所述分隔件使所述第一室和所述第二室彼此分开,

[0022] 且其中所述分隔件含有至少一种影响血小板活性的可溶物。

附图说明

[0023] 借助于下面讨论的例证附图,更详细地解释了本发明。在这里应当指出,所述附图仅仅具有描述性质,无意以任何方式限制本发明。

[0024] 图1

[0025] 图1显示了根据本发明的测量池(1)的一个实施方案。测量池(1)包括:用于接纳含有血小板的液体样品的第一室(11),和第二室(12),所述第二室在离心力作用于所述测量池的条件下捕集来自第一室的液体样品。所述测量池另外包括多孔分隔件(13),所述分隔件横过中空体的整个直径使所述第一室和所述第二室彼此分开。分隔件(13)含有至少一种影响血小板活性的可溶物。

[0026] 图2

[0027] 图2显示了根据本发明的测量池(2)的另一个实施方案。测量池(2)包括:用于接纳含有血小板的液体样品的第一室(21),和第二室(22),所述第二室在离心力作用于所述测量池的条件下捕集来自第一室的液体样品。所述测量池另外包括多孔分隔件(23),所述分隔件横过中空体的整个直径使所述第一室和所述第二室彼此分开。分隔件(23)含有至少一种影响血小板活性的可溶物。

[0028] 此外,在第二室(22)中,这里显示的测量池(2)包括斜坡样组件形式的装置(24),所述装置用于将第二室的空间细分成第一部分(221)和第二部分(222)。

[0029] 第一部分 (221) 用于捕集和运输穿过分隔件的样品液体。第二部分 (222) 用于测量捕集在第二室 (22) 中的样品液体 (29) 的液体量。所述第一部分和所述第二部分在所述第二室的远端一半 (即在虚线以下) 中互连, 使得捕集和运输的样品液体仅可以在测量池尖部附近从所述第一部分进入所述第二部分。其优点在于, 在离心过程中穿过分隔件 (23) 的样品液体不以不受控的方式润湿整个第二室 (24), 而是使样品液体被以靶向方式捕集、收集和运输到所述第二室的远端区。因而运输的样品液体 (29) 收集在第二室 (22) 中, 更具体地, 在第二室 (22) 的第二部分 (222) 中, 从底部 (远端) 至在测量池尖部中的顶部 (近端)。

[0030] 此外, 这里显示的测量池 (2) 包括用于检测填充水平的不同长度的电极 (25)。随着第二室 (22) (更具体地, 在第二室 (22) 的第二部分 (222)) 中的液体水平增加, 越来越多的电极接触样品液体。

[0031] 图3

[0032] 图3显示了根据本发明的测量池 (3) 的另一个实施方案。测量池 (3) 包括: 用于接纳含有血小板的液体样品的第一室 (31), 和第二室 (32), 所述第二室在离心力作用于所述测量池的条件下捕集来自第一室的液体样品。所述测量池另外包括多孔分隔件 (33), 所述分隔件横过中空体的整个直径使所述第一室和所述第二室彼此分开。分隔件 (33) 含有至少一种影响血小板活性的可溶物。

[0033] 此外, 在第二室 (32) 中, 这里显示的测量池 (3) 包括装置 (34), 所述装置用于将第二室的空间细分成第一部分 (321) 和第二部分 (322)。

[0034] 将第二室的空间 (32) 细分成第一部分和第二部分的装置 (34) 具有第一区段 (341), 所述第一区段具有相对于所述多孔分隔件成一定角度的平面。装置 (34) 此外具有第二部分区段 (342), 所述第二部分区段接连第一部分区段 (341), 与限定第二室的空间 (32) 的壁 (36) 基本上平行地延伸, 并与所述壁形成管状结构, 所述管状结构延伸至第二室 (32) 的远端一半。该实施方案的优点在于, 所述第二室的第一部分 (321) (捕集区) 被减小至第二室的空间 (32) 的最小值, 使得所述第二部分 (322) (测量区) 可以得到尽可能大的第二室空间 (32)。作为实例, 其优点在于, 最大可能量的可利用面积被用于可能的测量装置, 所述测量装置安置在测量池上。

[0035] 此外, 这里显示的测量池 (3) 包括用于检测填充水平的不同长度的电极 (35)。随着第二室 (32) (更具体地, 在第二室 (22) 的第二部分 (322)) 中的液体水平增加, 越来越多的电极接触样品液体 (39)。

[0036] 图4

[0037] 图4显示了根据本发明的测量池 (4) 的另一个实施方案。测量池 (4) 包括: 用于接纳含有血小板的液体样品的第一室 (41), 和第二室 (42), 所述第二室在离心力作用于所述测量池的条件下捕集来自第一室的液体样品。所述测量池另外包括多孔分隔件 (43), 所述分隔件横过中空体的整个直径使所述第一室和所述第二室彼此分开。分隔件 (43) 含有至少一种影响血小板活性的可溶物。

[0038] 此外, 在第二室 (42) 中, 这里显示的测量池 (4) 包括装置 (44), 所述装置用于将第二室的空间细分成第一部分 (421) 和第二部分 (422)。

[0039] 在该情况下, 将第二室的空间 (42) 细分成第一部分和第二部分的装置 (44) 具有漏斗样形状, 漏斗样装置的管状区域延伸至第二室 (42) 的远端一半。

[0040] 在图4A中显示的测量池(4)包括用于检测填充水平的不同长度的电极(45)。

[0041] 在图4B中显示的测量池(4)中,测量池的壁和至少漏斗形装置(42)的管状区域由透光材料组成。测量池的该实施方案特别适用于测量在测量池的第二室中的样品液体(49)的流速。再借助于沿着测量池的纵向轴线安置的光源和光检测器(未图解),光度测定地测量漏斗形装置(44)的管状区域中的流速。或者,通过激光多普勒测速法(LDA)的装置,也可以测量漏斗形装置(44)的管状区域中的流速。

[0042] 图5

[0043] 图5显示了根据本发明的测量池(5)的另一个实施方案。测量池(5)包括:用于接纳含有血小板的液体样品的第一室(51),和第二室(52),所述第二室在离心力作用于所述测量池的条件下捕集来自第一室的液体样品。所述测量池另外包括多孔分隔件(53),所述分隔件横过中空体的整个直径使所述第一室和所述第二室彼此分开。分隔件(53)含有至少一种影响血小板活性的可溶物。

[0044] 此外,在第二室(52)中,这里显示的测量池(5)具有装置(54),所述装置用于将第二室的空间细分成第一部分(521)、第二部分(522)和第三部分(523)。第一部分(521)(捕集区)用于捕集和运输样品液体,所述样品液体穿过分隔件,沿着第二室(52)的纵向轴线,从近端一半进入远端。第一部分(521)连接至第二室(52)的远端一半中的第二部分(522)上,使得被捕集和运输的样品液体可以从第一部分(521)进入第二部分(522)。第二部分(522)(测量区)用于测量捕集在第二室(52)中的样品液体的流速。在这里,第二部分(522)具有毛细管的形式,所述毛细管在所述第二室的近端一半的方向从远端一半升起,且具有在它的末端处的开口(57),所述开口建立与第三部分(523)的连接。第三部分(523)(溢流区)用作来自第二部分(522)的样品液体(59)的溢流。测量池的该实施方案特别适用于基于测量样品液体的流速来测定血小板功能。

[0045] 图6

[0046] 图6显示了根据本发明的测量池转子(7)的平面视图,所述测量池转子具有许多以弧形形式安置的测量池(6),其中每个测量池(6)包括:用于接纳含有血小板的液体样品的第一室(61),和第二室(62),所述第二室在离心力作用于所述测量池的条件下捕集来自第一室的液体样品。所述测量池另外包括多孔分隔件(63),所述分隔件横过中空体的整个直径使所述第一室和所述第二室彼此分开。分隔件(63)含有至少一种影响血小板活性的可溶物。

[0047] 测量池(6)沿着它们的纵向轴线具有弯曲形状。含有分隔件(63)的测量池(6)的区域具有比测量池的剩余区域更小的直径。在测量池转子(7)的上侧,存在吸液孔(68),穿过所述吸液孔,可以将样品材料导入测量池(6)的第一室(61)中。箭头指示测量池转子(7)的旋转方向。

[0048] 引用符号的列表

[0049] 测量池 1,2, 3, 4, 5, 6

[0050] 测量池转子 7

[0051] 用于接纳样品的第一室 11,21,31,41,51, 61

[0052] 用于捕集来自第一室的样品的第二室 12, 22, 32, 42, 52, 62

[0053] 分隔件 13,23,33, 43, 53, 63

- [0054] 用于细分第二室空间的装置 24, 34, 44, 54
- [0055] 第二室的第一部分(捕集区) 221, 321, 421, 521
- [0056] 第二室的第二部分(测量区) 222, 322, 422, 522
- [0057] 电极 25, 35, 45
- [0058] 样品液体 29, 39, 49, 59
- [0059] 用于细分第二室空间的装置的第一区段 341
- [0060] 用于细分第二室空间的装置的第二区段 342
- [0061] 壁 36
- [0062] 第二室的第三部分(溢流区) 523
- [0063] 开口 57
- [0064] 吸液孔 68。

具体实施方案

[0065] 术语“凝血细胞”和“血小板”同义地使用。

[0066] 术语“含有血小板的液体样品”应当理解为表示含有人或动物血小板的液体样品, 更具体地, 全血、富含血小板的血浆 (PRP) 或其它血小板制品。全血样品优选地是新采集的、静脉的、抗凝化的人或动物血液。优选地, 通过加入抗凝血药, 使全血抗凝化。下述药剂适合作抗凝血药: 结合钙的柠檬酸盐缓冲溶液例如 3.2 或 3.8% 柠檬酸钠缓冲溶液、EDTA、肝素, 和天然的或合成的直接凝血酶抑制剂例如水蛭素、PPACK (D-Phe-Pro-Arg-氯甲基酮, HCl) 阿加曲班和美拉加群, 或天然的或合成的直接因子 Xa 抑制剂例如 antistasin、壁虱抗凝肽、yagin、draculin、GGACK (H-Glu-Glu-Arg-氯甲基酮)、二肽基因子 Xa 抑制剂和单苯甲脒因子 Xa 抑制剂。

[0067] 术语“多孔分隔件”应当理解为表示这样的分隔物: 其使所述第一室和第二室彼此完全分开, 且由允许单个血细胞穿过、但是阻止细胞团块 (尤其是聚集的血小板的血小板聚集体) 穿过的材料组成。为此, 所述材料优选地具有 2-20 μ m、特别优选 5 μ m 的孔尺度。此外, 所述分隔件未受损, 即它不具有任何类型的穿孔、切口或孔。

[0068] 所述多孔分隔件含有至少一种影响血小板活性的物质, 当含有血小板的液体样品接触所述分隔件时, 所述物质可溶于所述液体样品中。

[0069] 所述分隔件优选地以膜的形式体现。优选的材料是吸收液体的, 所以影响血小板活性的物质可以应用于溶液中。特别优选的材料是纤维素酯、陶瓷制品、尼龙、聚丙烯、聚醚砜和聚偏氟乙烯 (PVDF)。优选地干燥被希望的物质润湿或浸湿的所述多孔分隔件。作为液体样品与分隔件接触的结果, 所述物质从所述分隔件溶解, 并与含有血小板的样品混合。

[0070] 术语“影响血小板活性的物质”包括能够诱导或抑制血小板聚集的物质。

[0071] 在一个实施方案中, 所述多孔分隔件含有至少一种血小板活化剂, 其优选地来自下述组: ADP (腺苷 5'-二磷酸) 2-MeSADP (2-甲硫基腺苷 5'-二磷酸)、胶原、肾上腺素、利托菌素、凝血酶、TRAP (凝血酶受体活化蛋白)、花生四烯酸、U46619 ((Z)-7-[(1S, 4R, 5R, 6S)-5-[(E, 3S)-3-羟基辛-1-烯基]-3-氧杂双环[2.2.1]庚烷-6-基]庚-5-烯酸)、PMA (佛波醇 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯) 和血清素。

[0072] 在另一个实施方案中, 所述多孔分隔件含有至少一种血小板抑制剂, 其优选地来

自下述组：前列腺素E1 (PGE 1)、前列腺素I2、福司柯林 (forskolin)、伊洛前列素 (iloprost) 和西卡前列素 (cicaprost)。

[0073] 在另一个实施方案中，在所述分隔件中可以有来自血小板活化剂组和血小板抑制剂组的一种或多种物质。作为实例，ADP和PGE 1的组合特别适用于测定样品中的血小板活性，所述样品来自正在用来自P2Y (12) 拮抗剂组的抗血栓治疗剂(例如氯吡格雷或噻氯匹定)治疗的患者。本领域技术人员知晓哪种物质或物质组合可以用于测定血小板活性。

[0074] 根据本发明的测量池优选地是整体的，优选圆柱形或圆锥形的中空体，其中可以以定制方式插入多孔分隔件，使得所述分隔件使所述第一室和第二室彼此完全分开，即横过中空体的整个直径。整体的中空体优选地是具有大约100 μ m至1 cm的内径的管。第一室用于接纳含有血小板的液体样品，并为此具有开口。第二室用于捕集来自第一室的液体样品，所述样品在离心力作用于所述测量池的条件下穿过分隔件。

[0075] 或者，根据本发明的测量池可以是双组件反应器，其由第一中空体和第二中空体组成，所述第一中空体在一侧开口，并形成第二室，所述第二中空体在两侧开口，并形成第一室。使双中空体组件互连，使得第二组件的开口安置在第一组件的一个开口上。所述多孔分隔件要么精确地应用在这2个组件之间，要么应用在第一组件的一个开口中或应用在第二组件的朝向第一组件的开口中。

[0076] 整体的反应器或多组件反应器的组件优选地由透光材料组成，优选地由塑料或玻璃组成。

[0077] 在第二室(从所述多孔分隔件看，其具有沿着其纵向轴线的近端一半和远端一半)的内部，根据本发明的测量池的一个优选实施方案具有这样的装置：所述装置用于将第二室的空间细分成第一部分和第二部分。所述第一部分用于捕集和运输穿过分隔件的样品液体。样品液体从所述第二室的近端一半运输至远端。所述第二部分用于测量捕集在第二室中的样品液体的液体量。所述第一部分和所述第二部分在所述第二室的远端一半中互连，使得捕集和运输的样品液体可以从所述第一部分进入所述第二部分。将第二室的空间细分成第一部分(捕集区)和第二部分(测量区)的优点在于，在离心过程中穿过分隔件的样品液体不以不受控的方式润湿整个第二室，所述不受控的方式可能导致第二测量室中填充水平或其它参数的测量失误。将第二室的空间细分成第一部分(捕集区)和第二部分(测量区)确保样品液体以靶向方式被捕集、收集和运输到所述第二室的远端区，这确保在所述第二部分(测量区)中的样品液体从底部(远端)收集到在测量池尖部中的顶部(近端)。

[0078] 用于将第二室的空间细分成第一部分和第二部分的装置可以具有不同的设计。

[0079] 在一个简单的实施方案中，用于将第二室的空间细分成第一部分和第二部分的装置可以具有这样的平面：所述平面相对于所述多孔分隔件成一定角度，或仅仅由具有成角的平面的连续斜面组成，所述成角的平面从近端延伸至所述第二室的远端一半。

[0080] 在另一个实施方案中，用于将第二室的空间细分成第一部分和第二部分的装置具有第一区段和第二部分区段，所述第一区段具有相对于所述多孔分隔件成一定角度的平面，所述第二部分区段接连(follow)所述第一部分区段，与限定第二室的空间的壁基本上平行地延伸，并与所述壁形成管状结构，所述管状结构延伸至所述第二室的远端一半。该实施方案的优点在于，所述第二室的第一部分(捕集区)被减小至第二室的空間的最小值，使得所述第二部分(测量区)可以得到尽可能大的第二室空间。作为实例，其优点在于，最大可

能量的可利用面积被用于可能的测量装置,所述测量装置安置在测量池上。

[0081] 在另一个实施方案中,用于将第二室的空间细分成第一部分和第二部分的装置具有漏斗样形状,漏斗样装置的管状区域延伸至所述第二室的远端一半。

[0082] 具有用于将第二室的空间细分成第一部分和第二部分的装置的测量池的一个实施方案可以设计成,使得所述第二室的第二部分(测量区)具有用于电学地测量填充水平的装置,优选多个电极对。

[0083] 根据本发明的测量池的另一个实施方案具有将第二室的空间细分成第一部分、第二部分和第三部分的装置。所述第一部分(捕集区)用于捕集和运输样品液体,所述样品液体穿过分隔件,沿着所述第二室的纵向轴线,从近端一半进入远端。所述第一部分连接至所述第二室的远端一半中的第二部分上,使得被捕集和运输的样品液体可以从所述第一部分进入所述第二部分。所述第二部分(测量区)用于测量捕集在所述第二室中的样品液体的流速。所述第二部分(测量区)具有毛细管的形式,所述毛细管在所述第二室的近端一半的方向从远端一半升起,且具有在它的末端处的开口,所述开口建立与第三部分的连接。所述第三部分(溢流区)用作来自所述第二部分的样品液体的溢流。测量池的该实施方案特别适用于基于测量样品液体的流速来测定血小板功能。

[0084] 本发明的另一个主题涉及用于离心分析仪的装置,所述装置具有至少2个根据本发明的测量池。根据该实施方案,这样的装置可以具有最多100个测量池。这样的装置的优点包括,能够同时进行许多血小板功能测定。在该过程中,可能同时地测定一个样品的许多等分试样或不同样品的等分试样。在它们的结构设计方面,或在用影响血小板活性的物质包被分隔件方面,所述多个测量池可以是类似的或不同的。

[0085] 用于离心分析仪的装置的一个实施方案(其具有至少2个根据本发明的测量池)是圆盘,所述测量池以弧线和放射形式安置在所述圆盘上。在下文中,这样的装置也称作测量池转子。

[0086] 在测量池转子的一个特别的实施方案中,所述测量池沿着它们的纵向轴线不具有直线形状,而是具有弯曲的形状。其优点在于,在测量池转子旋转过程中,恒定的流动条件在测量池中占优势。至少含有分隔件的测量池区域优选地具有比测量池的剩余区域更小的直径。该区域优选地具有大约50至500 μm 的直径。

[0087] 根据本发明的测量池转子可以由例如透光塑料组成,且/或由上部件和下部件装配而成。在装配好的测量池转子中上部件和下部件的彼此相对的侧面可以具有凹陷部和/或凸起部,它们随后形成希望的测量池形状。所述上部件含有每个测量池的吸液孔,穿过所述吸液孔,可以将样品材料导入测量池的第一室中。在装配上部件和下部件之前,可以将所述多孔分隔件单独地插入作为单个单元的每个测量池中,或者可以将它以连续条的形式插入,所述连续条由合适的多孔材料制成,其同中心地安置在上部件和下部件之间,因而穿过转子的所有测量池。用一种或多种影响血小板活性的物质包被多孔材料可以发生在插入单独的分隔件或连续条之前,或者可以在原位发生,即当所述分隔件或所述条已经连接至所述上部件或下部件上时。

[0088] 至少部分地由透光材料组成的测量池转子使得测量在第二室中捕集的液体的量成为可能,或使得通过光度测定方法来测量样品液体穿过分隔件的流速成为可能。为此,优选地将一个或多个光源、优选发光二极管(LED)安置在测量池转子的上面,并优选地将分别

连接的光检测器安置在测量池转子的下面,或反之亦然,使得可以与旋转平面垂直地穿过测量池的测量区发出光束。

[0089] 本发明的另一个主题是,用于测定血小板功能的方法,其中使用根据本发明的测量池或包含至少2个根据本发明的测量池的装置。所述方法至少包括下述步骤:

[0090] i. 将含有血小板的液体样品装入根据本发明的测量池的第一室中,

[0091] ii. 将离心力施加于含有液体样品的测量池上,

[0092] iii. 测量在第二室中捕集的液体的量,或测量所述样品液体穿过分隔件的流速。

[0093] 作为作用于其上面的离心力的结果从第一室穿过分隔件并被捕集在所述第二室中的液体量(或液体体积)与血小板功能负相关。

[0094] 穿过分隔件并被捕集在所述第二室中的样品液体的流速也与血小板功能负相关。

[0095] 随着血小板聚集减少(作为降低的血小板功能的结果)和减少分隔件中孔的堵塞,在给定的时间间隔中可以穿过分隔件的样品液体的量增加,因此流速或流量增加,在第二室中捕集的液体的量也增加。

[0096] 随着血小板聚集增加(作为增强的血小板功能的结果)和增加分隔件中孔的堵塞,在给定的时间间隔中可以穿过分隔件的样品液体的量减少,因此流速或流量减少,在第二室中捕集的液体的量也减少。

[0097] 根据本发明施加于测量池上的离心力优选地在 $50-2000 \times g$ 范围内。可以借助于常规离心单元,施加离心力。

[0098] 可以以不同的方式,测量穿过分隔件并被捕集在第二室中的液体的量。

[0099] 在第一个实施方案中,光度测定地测定在第二室中捕集的液体的量。为此,在根据本发明的测量池中所述第二室的至少一个部分区段由透光材料组成。此外,许多光源(优选发光二极管(LED))和分别连接的光检测器沿着所述第二室的纵向轴线且垂直于根据本发明的测量池或根据本发明的测量池转子的旋转平面安置。在测量过程中,所述光源发射光,由分别分配给光源的检测器测量光的强度 I 。如果样品液体位于光源和检测器之间,则光强度减小。吸光度 $E = -\log(I_t/I_0)$ (I_t = 在时间 t 的光强度, I_0 = 在时间 0 的光强度)与在光源和检测器之间的吸光材料的量成比例。光源相对于所述第二室的纵向轴线的相对定位提供关于流过分隔件的样品体积的说明。光源/检测器对的数目指示了不同体积的辨别。在最简单的情况下($n=3$),仅可能做出关于正常还是病态的数字说明,当 $n=6$ 时,存在5种可能的体积辨别。确定在给定时点处的吸光度是大于指示阈值(光路中的样品液体)还是小于该阈值(光路中的空气)。在检测器离容器底部的距离和容器中液体的量之间存在简单的关系。如果检测器是在离具有半径 r 的圆柱形容器的底部距离 h 处,大吸光度意味着容器中液体的最小量由 $r^2\pi h$ 给出。测量随时间变化的吸光度使得以时间依赖性的方式测定液体的量成为可能: $V = V(t)$ 。通过相对于时间数学地微分化液体的总量($d/dt V(t)$),测定时间依赖性的流速。

[0100] 在第二个实施方案中,电学地测定在第二室中捕集的液体的量。为此,在第二试验室上安置许多用于检测填充水平的电极对,它们具有不同的长度。随着第二室中的液体体积增加,越来越多的电极接触样品液体。在电极离容器底部的距离和容器中液体的量之间存在简单的关系。电极的数目指示了不同体积的辨别。在最简单的情况下($n=3$),仅可能做出关于正常还是病态的数字说明,当 $n=6$ 时,存在5种可能的体积辨别。在最简单的情况下,

通过电导率进行测量(欧姆测量法)。如果在电极之间存在空气(所述电极之间存在工作电势),则没有电流流过,因为空气是电绝缘体。但是,随着该室装入样品液体,电极之间的各个回路能够因此闭合,因为血液或血浆是电学上有传导性的(作为溶解的盐的结果)。

[0101] 在第三个实施方案中,借助于激光多普勒测速法(LDA),测定流速。为此,根据本发明的测量池的第二室的至少一个部分区段由透光材料组成。一个激光束被分成2束,这2束被定位,使得它们穿过所述第二室的区域。在所述束穿过的测量点处,建立干涉图样。检测器测量由流动的样品液体生成的2个散射波。测量信号是2个散射波的叠加,结果,存在由多普勒效应造成的搏动,所述搏动的频率(多普勒频率)与流动的样品液体的速度成比例。

[0102] 可以在给定的时间间隔内连续地测量在第二室中捕集的液体的量。为此,测量穿过分隔件的时间依赖性的流动。

[0103] 或者,可以在给定的时间测量在第二室中捕集的液体的量一次。作为实例,可以通过测定终点来进行测量。为此,测定在特定时间时已经穿过分隔件的液体的总量。

[0104] 优选地,通过对比来自样品的测量结果和含有已知血小板活性的一种或多种对照品的测量结果,测定未知样品中的血小板功能。对照品/校准品优选地由来自健康人的血液/血浆捐献物的集合组成。优选地,从由来自该集合的样品测定出的测量结果确定中值,并将来自未知样品的测量结果与其建立关联。

[0105] 因为穿过分隔件的样品液体的量与血小板功能成反比,在所述第二室中捕集的液体量V的倒数($1/V$)特别适合作为血小板功能的量度。如果未知样品的倒数 $1/V$ 低于预先建立的中值阈值,则样品具有降低的血小板功能和出血风险。如果未知样品的倒数 $1/V$ 高于预先建立的中值阈值,则样品具有增强的血小板功能和血栓形成风险。

[0106] 下面的示例性的实施方案用于例证根据本发明的方法,不应解释为限制性的。

实施例

[0107] 实施例1: 根据本发明测定全血样品中的血小板活性

[0108] 如下生产根据本发明的测量池:将圆锥形地形成的离心管(由透明塑料制成的50 ml Falcon管,Becton Dickson)从大致中间向上切掉。将具有PVDF膜的一次性使用的滤器附件(Millipore Millex®-SV, 5 μ m孔尺度)连接至截断的Falcon管的开口上。根据本发明,使用含有胶原和肾上腺素(各自0.5 mg/ml)的血小板活化剂混合物,预处理PVDF膜。为此,将0.8 ml混合物放在Millipore Millex®-SV一次性使用的滤器附件的上面,随后风干。作为对照,将0.8 ml水放在Millipore Millex®-SV一次性使用的滤器附件的上面,随后风干。现在,将由塑料制成的一次性使用的注射器(Omnifix®, 5 ml, B. Braun Melsungen AG)(没有柱塞和注射针)连接至Millipore Millex®-SV一次性使用的滤器附件上,后者连接至截断的Falcon管上。

[0109] 现在,将1.5 ml正常的柠檬酸盐血液样品导入测量池的第一室(一次性使用的注射器)中,在离心机(Rotixa R50, Andreas Hettich GmbH & Co. KG)中在22°C在50 $\times$ g离心测量池75秒。通过体积法测定在第二室(截断的Falcon管)中捕集的液体的量。

[0110] 从表1可以看出,用血小板活化剂胶原和肾上腺素浸渍的分隔件的应用导致减少的样品液体流,这是由于在血液样品中诱导的血小板聚集。

[0111] 表1

[0112]	
分隔件的浸渍	流量
胶原/肾上腺素	0.6 ml
水	1.5 ml

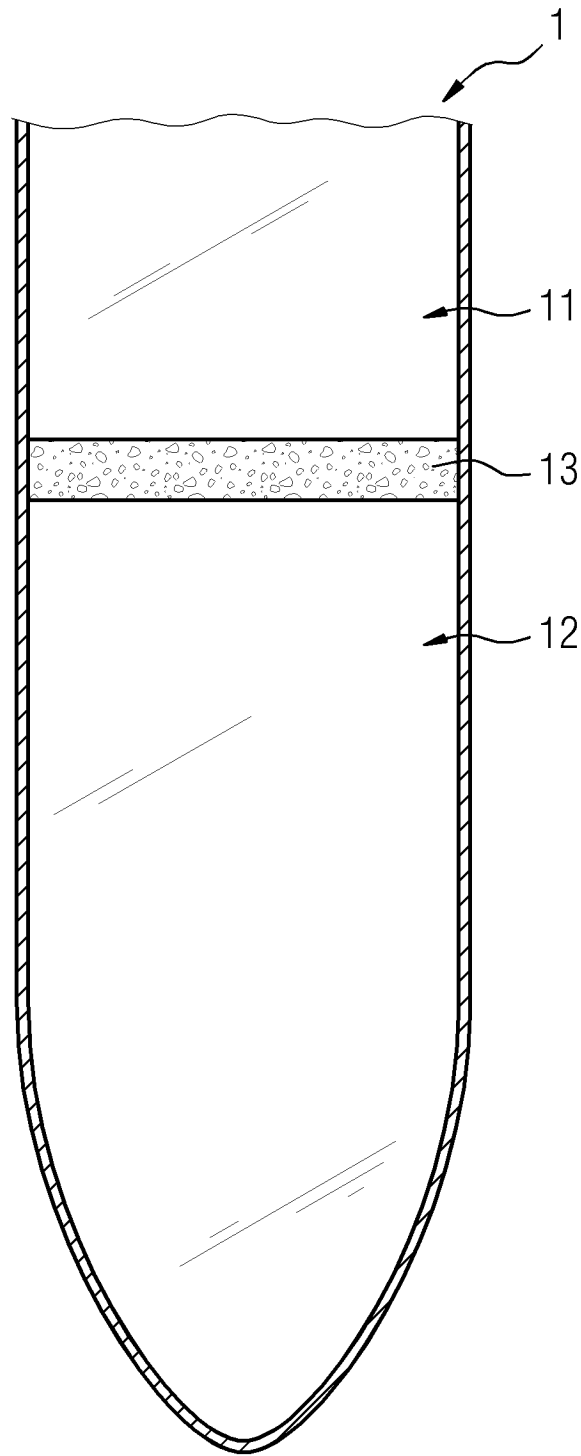


图 1

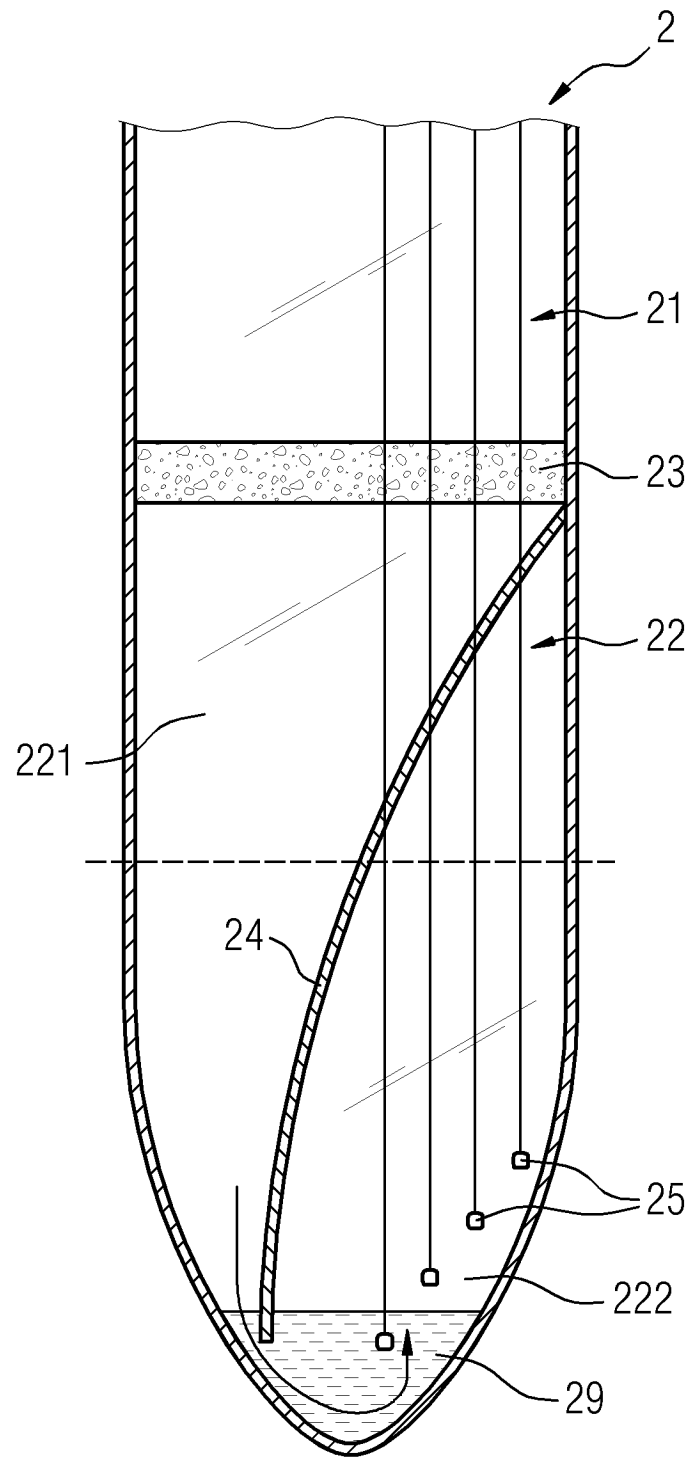


图 2

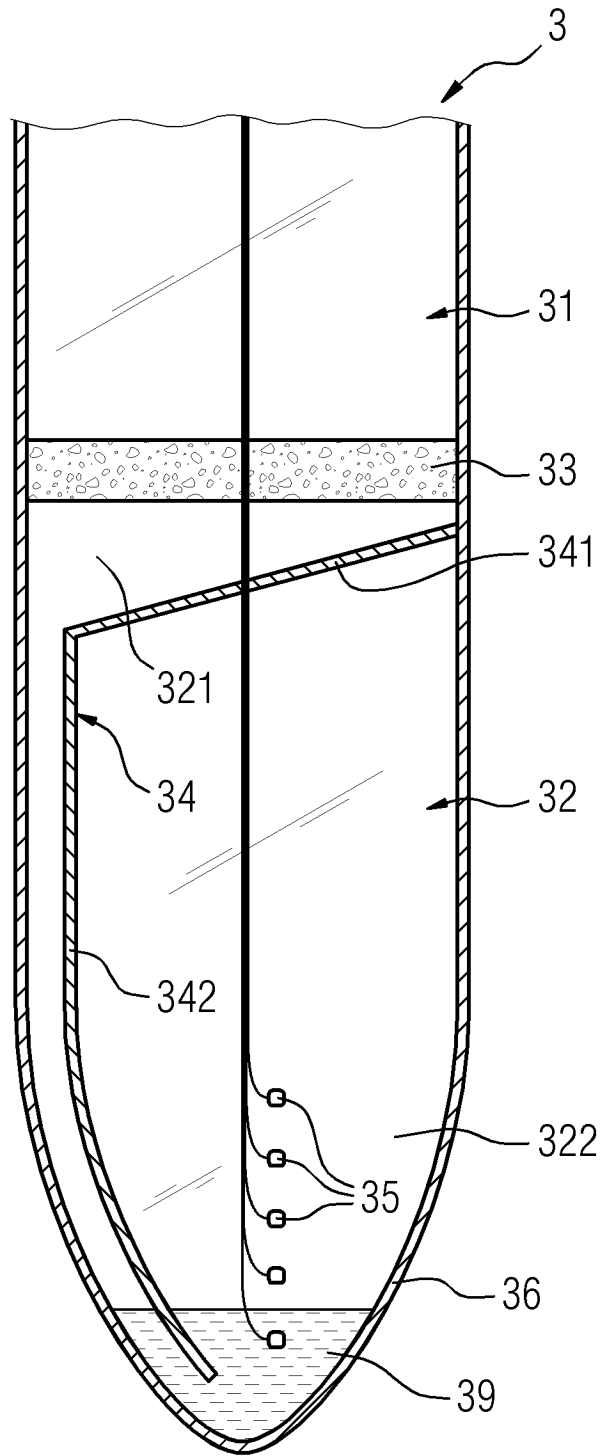


图 3

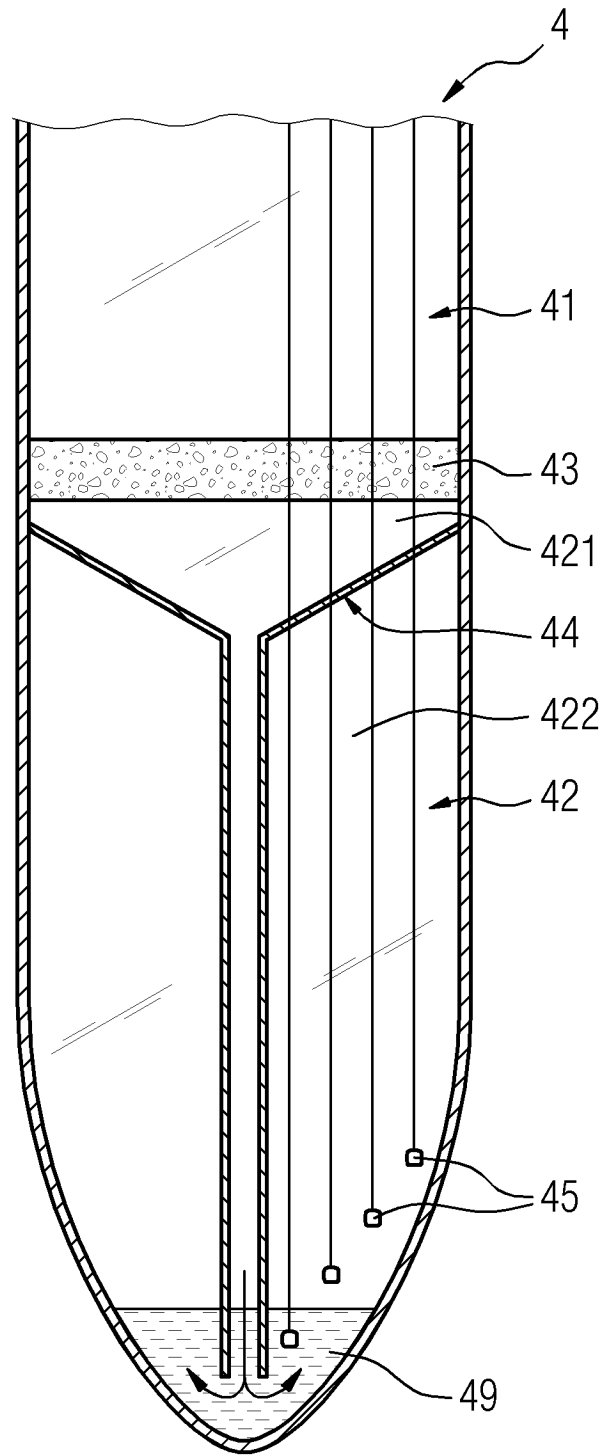


图 4A

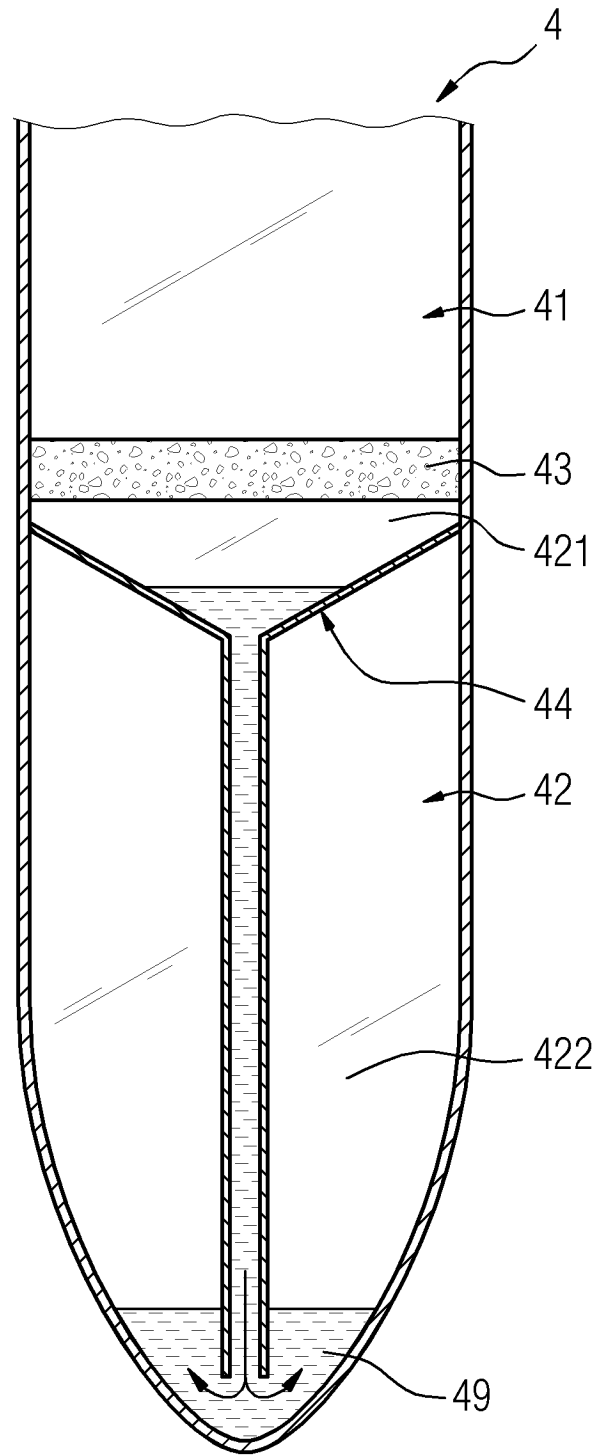


图 4B

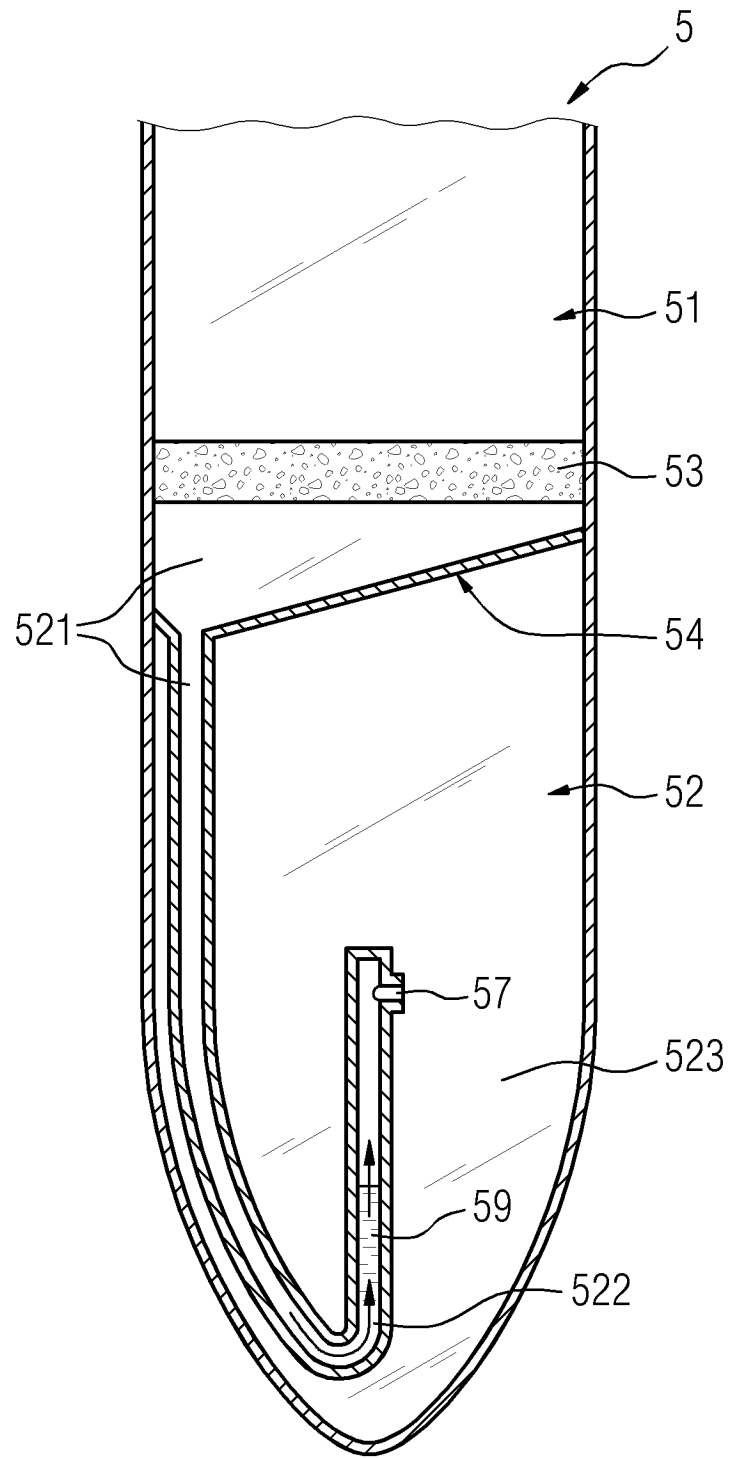


图 5

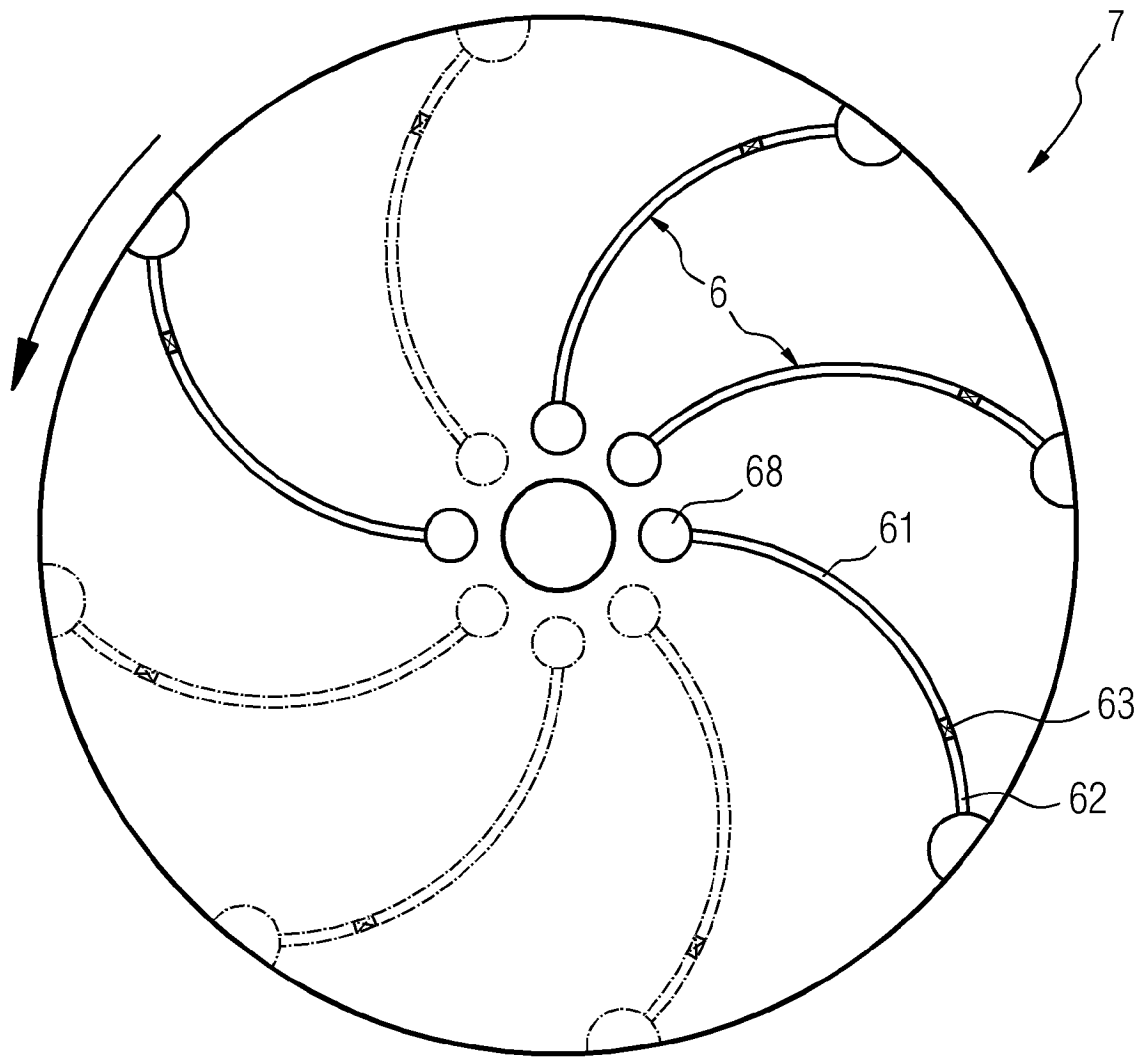


图 6