



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 146 366** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **G 01 N 33/48**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96119224/14, 25.09.1996

(24) Дата начала действия патента: 25.09.1996

(46) Дата публикации: 10.03.2000

(56) Ссылки: Spact T. and al/A technique for estimation of platelet collagen adgesion, Proc. Soc. Exp. Biol. Meh.132, 1038-1041, 1969/SU 1337349 A1, 15.09.87. SU 1427216 A1, 30.09.88.

(98) Адрес для переписки:
194156, Санкт-Петербург, пр.Пархоменко, 15,
НИИ кардиологии МЗМП РФ, патентный отдел

(71) Заявитель:
Научно-исследовательский институт
кардиологии

(72) Изобретатель: Михайлова И.А.,
Иванов В.И., Казеннова Н.И.

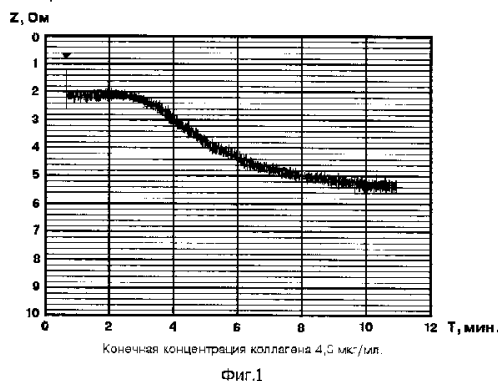
(73) Патентообладатель:
Научно-исследовательский институт
кардиологии

(54) СПОСОБ ИЗМЕРЕНИЯ АДГЕЗИИ ТРОМБОЦИТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине. Сущность изобретения: параметры процесса определяют по изменению модуля комплексного сопротивления пробы крови, стабилизированной ЭДТА в концентрации 7,0 мМ, под действием основного природного индуктора процесса - коллагена. Исследования проводятся с помощью импедансного агрегометра. При подключении к прибору самописца осуществляется графическая документация процесса. Измерение ведут не ранее чем через 15 мин и не позднее чем через 2 ч после забора крови. Способ обеспечивает быстроту и точность

измерения. 2 ил.



RU 2 146 366 C1

RU 2 146 366 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 146 366** ⁽¹³⁾ **C1**
 (51) Int. Cl.⁷ **G 01 N 33/48**

RUSSIAN AGENCY
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96119224/14, 25.09.1996
 (24) Effective date for property rights: 25.09.1996
 (46) Date of publication: 10.03.2000
 (98) Mail address:
 194156, Sankt-Peterburg, pr.Parkhomenko, 15,
 NII kardiologii MZMP RF, patentnyj otdel

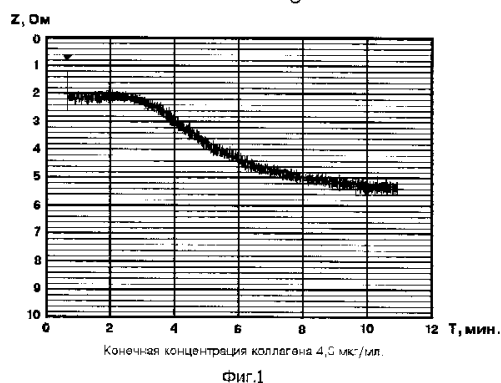
(71) Applicant:
 Nauchno-issledovatel'skij institut kardiologii
 (72) Inventor: **Mikhajlova I.A.,
 Ivanov V.I., Kazennova N.I.**
 (73) Proprietor:
 Nauchno-issledovatel'skij institut kardiologii

(54) **METHOD FOR CHANGING BLOOD PLATELETS ADHESION PROPERTIES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine. SUBSTANCE: method involves determining process parameters from complex resistance value changes in blood sample stabilized with ethylenediaminetetraacetate at 7.0 mMole concentration under the impact of collagen as the basic natural process inductor. Studies are carried out by applying impedance-type aggregometer unit. When connecting self-recorder unit to the device, graphical documentation of the process is produced. Measurements are done not earlier than in 15 min and not later than in 2 h after taking blood sample. EFFECT: accelerated and accurate

measurement method. 2 dwg



RU 2 146 366 C1

RU 2 146 366 C1

Изобретение относится к актуальной проблеме современной клинической и профилактической медицины - диагностике и контролю за эффективностью лечения заболеваний, связанных с нарушением системы гемостаза.

Адгезия тромбоцитов к элементам сосудистой стенки является начальным этапом в процессах гемостаза, артериального тромбоза и атеросклероза, что определяет существенное информативное значение этого показателя при лабораторной диагностике и оценке эффективности лекарственной терапии широкого ряда гематологических и сердечно - сосудистых заболеваний.

Существующие методы оценки адгезии тромбоцитов либо слишком сложны и используются поэтому лишь в исследовательских целях, либо недостаточно физиологичны (адгезия к стеклу, стекловолокну), неспецифичны (определяют, наряду с адгезией, также и агрегацию пластинок) и плохо воспроизводимы, что делает их малоприменимыми для рутинной лабораторной практики.

Наиболее близким аналогом (прототипом) данного изобретения является способ оценки адгезии тромбоцитов по изменению оптической плотности обогащенной тромбоцитами плазмы крови под действием коллагена в агрегометре, работающем по принципу Борна, в присутствии ЭДТА для подавления секреции и агрегации пластинок.

Преимуществом этого способа является возможность изучения адгезии тромбоцитов не к чужеродной поверхности, а к основному адгезивному компоненту сосудистой стенки-коллагену, что позволяет более адекватно моделировать процессы, протекающие в условиях реального кровотока и играющие ведущую роль в гемостазе, тромбозе и атерогенезе. Запись кривых адгезии с помощью самописца, подключенного к агрегометру, дает возможность исследовать динамику процесса, легко и быстро оценивать количественно продолжительность лаг-фазы, скорость и амплитуду адгезии на любом ее этапе. Это обстоятельство является существенным преимуществом данного способа по сравнению с рекомендуемыми в настоящее время для лабораторной практики и основанными на подсчете разницы количества тромбоцитов в крови непосредственно до и после ее контакта с адгезивной поверхностью (стекловолокну, стеклянные шарики и т.д.) с помощью фазово-контрастной микроскопии - метода, плохо воспроизводимого, требующего затраты достаточно большого количества труда и времени.

Основными недостатками этого способа оценки адгезии тромбоцитов, общими для всех методов исследования функциональной активности тромбоцитов в плазме крови, являются длительность пробоподготовки, воздействие на тромбоциты ускорений при центрифугировании крови, потеря при этом наиболее активной фракции пластинок, а также эритроцитов и лейкоцитов, существенно модулирующих активность пластинок.

Задачами изобретения являются повышение точности, воспроизводимости и оперативности способа измерения адгезии

тромбоцитов. Предлагаемый метод основан на регистрации изменений модуля комплексного сопротивления пробы цельной крови, стабилизированной ЭДТА, под действием коллагена.

5 Образцы крови получают из антекубитальной вены доноров, не принимавших в течение 10-12 дней препаратов, влияющих на функциональную активность тромбоцитов. В процессе исследования кровь сохраняют в закрытых 10 пластиковых пробирках, при комнатной температуре, с соблюдением общепринятых мер предосторожности при работе с этими клетками.

Для исследования способности 15 тромбоцитов к адгезии на микрофибриллах коллагена аликвоты крови стабилизируют с помощью раствора ЭДТА в концентрации 7,0 мМ/л крови. Анализ функциональной активности тромбоцитов осуществляют не ранее, чем через 15 минут, и не позднее, чем 20 через 2 часа после получения крови, с помощью импедансного агрегометра АИ-300, при 37°С и перемешивании содержимого кюветы со скоростью 1000 об/мин. Соотношение объемов крови и индуктора процесса при этом составляет 11:1.

25 Для индуцирования адгезии тромбоцитов используют растворы коллагена из диагностических наборов фирмы Sigma (Sigma diagnostics, platelet aggregation reagent), приготовленные в соответствии с 30 рекомендациями фирмы. Поскольку процесс адгезии тромбоцитов в кювете агрегометра сопровождается прогрессивным ростом электрического сопротивления крови, изменение сопротивления во времени регистрируется в виде характерной кривой 35 либо на экране прибора, либо с помощью подключенного к прибору самописца (фиг. 1). Для характеристики процессов оценивают их амплитуду в омах. Длительная инкубация крови в кювете агрегометра не 40 сопровождается изменением ее электрического сопротивления, если вместо коллагена к ней добавляют физиологический раствор NaCl.

Чувствительность тромбоцитов к 45 фибриллярному коллагену широко варьируется: пороговая концентрация препарата, необходимая для инициирования процесса адгезии у разных доноров, колеблется от 4 до 20 мкг/мл (конечная концентрация).

50 Оценка адгезии тромбоцитов под действием коллагена во времени обнаруживает в большинстве случаев продолжительную лаг-фазу (до 3 минут). Вслед за начальной лаг - фазой следует быстрое нарастание электрического сопротивления крови, достигающее через 55 10-12 минут максимальных значений, с выходом на плато (фиг. 1).

60 Для подтверждения исходного положения о том, что использование для предотвращения свертывания крови такого хелатора кальция, как ЭДТА, исключает индуцирование коллагеном процесса агрегации пластинок, было произведено микроскопическое исследование окрашенных по Geimsa мазков крови, инкубированной с коллагеном, из кюветы агрегометра после окончания записи изменений электрического сопротивления крови. При использовании для

стабилизации крови ЭДТА в концентрации 7,0 мМ/л мы не наблюдали в препаратах агрегатов тромбоцитов. Вместе с тем, сохраняется максимальная амплитуда кривой адгезии пластинок, снижающаяся при использовании более высоких концентраций ЭДТА. В связи с этим, в дальнейших исследованиях мы использовали для стабилизации крови ЭДТА в концентрации 7,0 мМ/л.

При подсчете числа тромбоцитов в образце крови до и после ее инкубации с коллагеном с помощью счетчика клеток крови отмечается убыль пластинок, составляющая при пороговой концентрации коллагена около 25% (n=4) и связанная, видимо, с их концентрированием на микрофибриллах коллагена.

При инкубировании в кювете агрегометра стабилизированной ЭДТА крови доноров с важнейшим индуктором агрегации пластинок АДФ в высокой концентрации ($25 \cdot 10^{-6}$ М/л) электрическое сопротивление исследуемой крови не меняется, а при микроскопическом исследовании крови, инкубированной с АДФ, скопления пластинок в препарате отсутствуют, т.е. индуцировать процесс агрегации тромбоцитов в этих условиях не удается.

Все вышеизложенное косвенно свидетельствует о том, что процесс, индуцируемый в стабилизированной ЭДТА крови коллагеном, не связан с формированием агрегатов пластинок и может быть объяснен только их прилипанием к микрофибриллам коллагена.

Амплитуда адгезии тромбоцитов в каждом исследуемом образце крови прямо зависит от концентрации индуктора (коллагена), увеличиваясь при этом, однако, до определенного предела (фиг. 2).

Для оценки воспроизводимости и

надежности теста мы осуществили повторное измерение величины адгезии тромбоцитов в крови одного и того же донора в течение нескольких недель. При этом нам не удалось обнаружить значительное изменение показателя у каждого индивидуума. 3 донора, исследованные таким способом, имели средний коэффициент вариации $9.5 \pm 3.0\%$. Воспроизводимость адгезии тромбоцитов при повторном определении дважды в течение 2 часов после сбора крови была хорошей. Коэффициент вариации колебался от 5.4 до 8.2%.

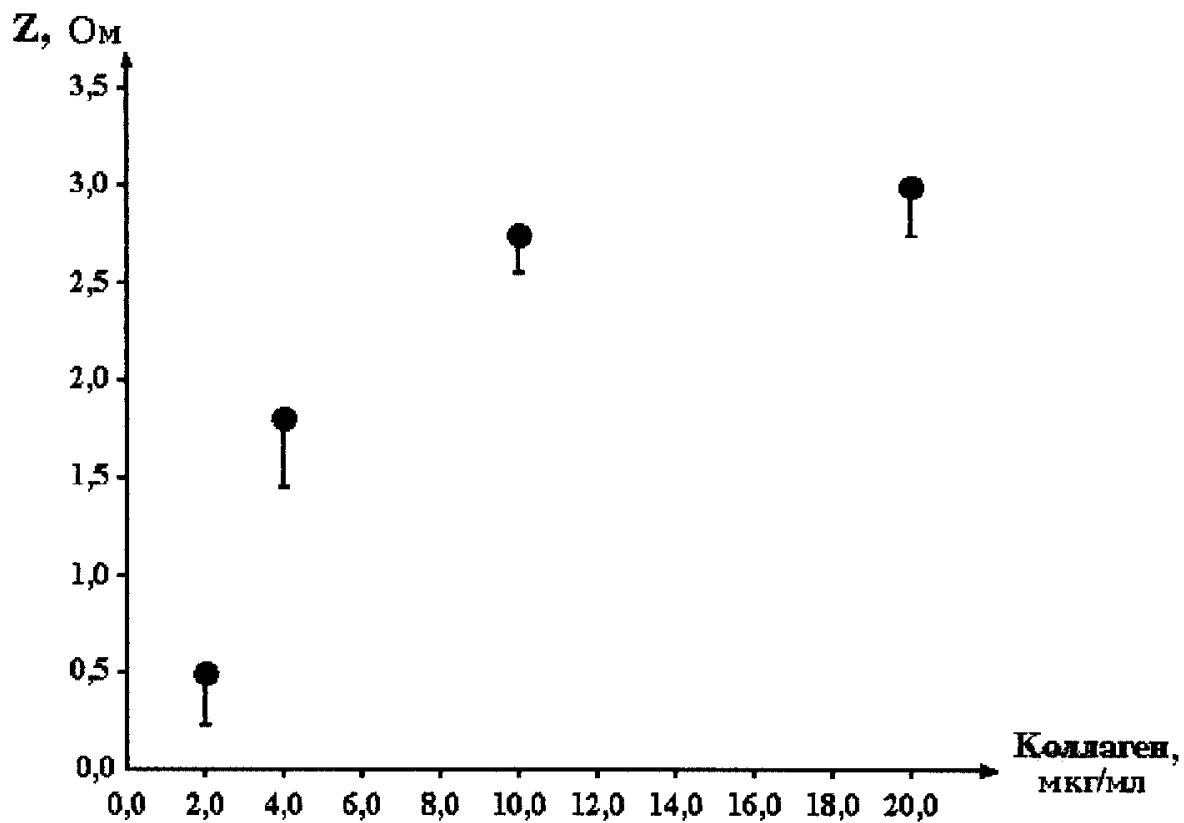
При исследовании временных рамок после сбора крови для измерения адгезии тромбоцитов близкие значения были получены у 5 доноров в интервале между 15 мин. и 2 часами. При этом высоко значимое снижение адгезии наблюдалось после 2.5-3.0 часов. Поэтому все исследования должны быть выполнены в пределах 2 часов после сбора крови.

Таким образом, в настоящей работе предложен простой, быстрый и хорошо воспроизводимый способ количественной оценки и графической документации адгезии тромбоцитов в образцах цельной крови, основанный на регистрации изменений модуля комплексного сопротивления пробы крови под действием коллагена с помощью импедансного агрегометра.

Формула изобретения:

Способ измерения адгезии тромбоцитов путем индукции процесса коллагеном, отличающийся тем, что параметры адгезии определяют в цельной крови, стабилизированной ЭДТА в концентрации 7,0 мМ, по амплитуде изменения модуля комплексного сопротивления образца крови, не ранее 15 мин и не позднее чем через 2 ч после забора крови.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60



Фиг. 2

RU 2146366 C1

RU 2146366 C1