



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/48 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2019101085, 16.01.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.01.2019

Дата регистрации:
12.09.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.01.2019

(45) Опубликовано: 12.09.2019 Бюл. № 26

Адрес для переписки:
634021, г. Томск, а/я 1769, Н.Г. Зубаревой

(72) Автор(ы):

Тютрин Иван Илларионович (RU),
Жуков Егор Леонидович (RU),
Слизевич Дмитрий Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"Меднорд-Техника" (ООО "Меднорд-Т")
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2348041 C1, 27.02.2009. US
7785891 B2, 31.08.2010. УДУТ В.В. и др.,
Технология низкочастотной
пьезотромбоэластографии в мониторинге
противотромботической терапии,
Экспериментальная и клиническая
фармакология, 2017, N 11, С.10-17-реферат.
MANNINI L. et al., Erythrocyte deformability
and white blood cell count are associated with
aspirin (см. прод.)

(54) Способ определения аспиринорезистентности

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и может
быть использовано для экспресс-оценки
аспиринорезистентности. Для этого на пробу
цельной крови в объеме 25 мкл, помещенную в
измерительную камеру до приема аспирина и
через 4 часа после его приема, воздействуют
ультразвуковыми колебаниями с частотой 150-
160 кГц. После чего регистрируют
эхокоагулограмму и через интервалы времени:
0,3 минуты, 2 минуты, 3 минуты, 5 минут

определяют величину амплитудных показателей,
угол наклона кривой, интегральный показатель,
площадь сектора. Затем анализируют результаты
и при изменении результатов исследования после
приема аспирина на более чем на 50% определяют
отсутствие у больного аспиринорезистентности.
Изобретение позволяет определить
аспиринорезистентность у больного с
использованием микрообъемов капиллярной
крови. 8 ил., 2 пр.

(56) (продолжение):

resistance in high-risk vascular patients, Clin Hemorheol Microcirc., 2006; 35(1-2):175-81 - реферат.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/48 (2019.05)

(21)(22) Application: **2019101085, 16.01.2019**

(24) Effective date for property rights:
16.01.2019

Registration date:
12.09.2019

Priority:

(22) Date of filing: **16.01.2019**

(45) Date of publication: **12.09.2019** Bull. № 26

Mail address:

634021, g. Tomsk, a/ya 1769, N.G. Zubarevoj

(72) Inventor(s):

**Tyutrin Ivan Illarionovich (RU),
Zhukov Egor Leonidovich (RU),
Slizevich Dmitrij Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Mednord-Tekhnika" (OOO "Mednord-T") (RU)**

(54) **METHOD FOR DETERMINING ASPIRIN RESISTANCE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine and can be used for rapid assessment of aspirin resistance. That is ensured by ultrasonic oscillations with frequency of 150–160 kHz for a whole blood sample in volume of 25 mcl, placed in a measuring chamber before taking aspirin and 4 hours after taking it. Thereafter, echocoagulogram is recorded and in time intervals: 0.3 minutes, 2 minutes, 3 minutes, 5 minutes determine

amplitude values, curve inclination angle, integral index, sector area. That is followed by analyzing the results, and if observing the results of the study after taking aspirin by more than 50 %, the absence of aspirin resistance in the patient is stated.

EFFECT: invention enables determining aspirin resistance in a patient using microvolumes of capillary blood.

1 cl, 8 dwg, 2 ex

Изобретение относится к области медицины, конкретно к способам определения аспиринорезистентности.

Применение антиагрегантной терапии (АГ) играет важную роль в профилактике тромботических осложнений. Основными представителями АГ терапии, являются блокаторы циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1) - аспирин, кардиомагнил и др.; и блокаторы P_2Y_{12} рецепторов тромбоцитов - клопидогрель, тиклопедин, празугрель и др. Оценка эффективности проводимой терапии является важным звеном в профилактике тромботических осложнений.

В настоящее время, самым распространенным в клинической практике способом оценки аспиринорезистентности является оценка агрегационной активности тромбоцитов до и после назначения антиагреганта (через 2-3 и 5 дней) - золотым стандартом в лабораторной практике является определение агрегационной активности тромбоцитов - турбодиметрическим методом Борна, основанном на исследовании изменений оптической плотности плазмы. Контроль проводится с использованием агрегометра, по динамике снижения функции тромбоцитов богатой тромбоцитами плазмы больного на фоне приема препарата (метод по Борну) [1]. Распространенность явления - аспиринорезистентности, по многочисленным данным достигает от 2% до 46% [5], такая вариабельность связана в первую очередь, с отсутствием общепринятой методики оценки указанного состояния, широкой вариабельностью и малой воспроизводимостью результатов известных тестов. Агрегацию тромбоцитов исследуют в образце обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), стабилизированной каким-либо антикоагулянтом. В зависимости от задач исследования возможно применение различных антикоагулянтов (цитрат Na, кислый цитрат-декстрозный раствор, гепарин гирудин и т.д.). Кроме того, в исследовательской практике иногда выделяют тромбоциты в среде заданного состава. Для исследования агрегации тромбоцитов. Готовят обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) и бедную тромбоцитами плазмы (БТП). Наиболее часто в качестве антикоагулянта используют 130 мМ раствор цитрата натрия. (Это 3,2% раствор безводного цитрата натрия).

Подготовленная к исследованию ОТП разливается по 0,3 мл в кюветы для агрегометра и хранится при комнатной температуре до начала исследования.

В кювету с подготовленной к исследованию ОТП помещают магнитную мешалку (скорость перемешивания 800 об/мин) и устанавливают кювету в ячейку лазерного анализатора агрегации тромбоцитов, для предварительной инкубации на 3 минуты, при температуре 37°C, далее запускают процесс исследования. После открытия окна записи через 10 секунд, по звуковому сигналу пипеткой добавляют в кювету (не вынимая ее из рабочей ячейки) необходимую дозу индуктора (АДФ, ФАТ, коллаген, арахидоновая кислота). При исследовании агрегации традиционным методом по Борну результаты исследований принято представлять в процентах, причем за 0% агрегации принимается начальное состояние обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), а за 100% принимают состояние бедной тромбоцитами плазмы (БТП). [3,6].

Для оценки эффективности проводимой терапии, проводят вышеописанное исследование повторно через 2-3 и 5 дней. По степени изменения интенсивности агрегации на 50% и более от исходного уровня считают терапию эффективной, а состояние, при котором происходит изменение агрегации тромбоцитов на 20% менее исходного уровня определяют, как аспиринорезистентность.

Основными недостатками данного метода являются:

- длительность проведения исследования
- сложность пробоподготовки

- невозможность проведения у постели больного - вариабельность результатов
 - недостаточная информативность и достоверность результатов в связи с использованием подготовленной к исследованию пробы крови.

Наиболее близким к предлагаемому выбранным в качестве прототипа, является
 5 способ определения аспиринорезистентности с помощью низкочастотной
 пьезотромбоэластографии (НПТЭГ) [2] с использованием аппаратно-программного
 комплекса АРП-01М «Меднорд» (Р.С. 2010/09767) [7], согласно которому для проведения
 исследования у испытуемого из кубитальной вены производят забор венозной крови
 в количестве 0,5 мл, которую незамедлительно переносят в кювету, находящуюся в
 10 термостатируемой ячейке прибора, куда помещают иглу-резонатор, закрепленную на
 пьезоэлектрическом элементе, регистрируют вязкостно-хронометрические
 характеристики крови и по результатам изменения показателей t_1 (период реакции,
 представляющий время от начала исследования до достижения максимального снижения
 амплитуды - A_1 , в мин) и ИКК (интенсивность контактной фазы коагуляции), делается
 15 заключение об эффективности проводимой терапии - увеличение времени t_1 в 2 и более
 раз, снижение ИКК в 2 и более раз, свидетельствует об эффективности проводимой
 антиагрегантной терапии и отсутствии аспиринорезистентности у пациента [4].

Недостатками метода НПТЭГ являются: - необходимость высокой квалификации
 персонала;

20 - невозможность оценки с использованием капиллярной крови - необходимость
 забора
 венозной крови;
 - высокая стоимость комплекса.

Таким образом, известные методики позволяют определить аспиринорезистентность,
 25 но являются сложными, малодоступными для пациента, требуют наличия
 квалифицированного персонала.

Новая техническая задача - разработка достоверного и доступного способа
 определения аспиринорезистентности у постели больного (Point-of-care-test - РОСТ) с
 использованием капиллярной крови.

30 Новый технический результат - повышение точности, информативности, доступности
 и удобства способа при использовании микрообъемов крови для применения в режиме
 РОСТ.

Для достижения нового технического результата в способе определения
 аспиринорезистентности, включающего забор и помещение пробы крови в
 35 измерительную камеру с последующим воздействием на нее физическим фактором и
 регистрацию характеристик крови, на пробу цельной крови в объеме 25 мкл помещенную
 в измерительную камеру до приема аспирина и через 4 часа после его приема,
 воздействуют ультразвуковыми колебаниями с частотой 150-160 кГц, после чего,
 регистрируют эхокоагулограмму и через интервалы времени $T_1=0,3$ минуты, $T_2=2$
 40 минуты, $T_3=3$ минуты, $T_4(4)=5$ минут определяют величину амплитудных показателей
 A_1 , A_2 , A_3 , $A_4(4)$ соответственно, угол наклона La кривой между точками на
 эхокоагулограмме A_1 и A_2 и интегральный показатель: площадь сектора S ,
 ограниченного с одной стороны отрезком кривой между точками A_1 и $A_4(4)$ с другой
 45 осью абсциссы, анализируют графические результаты и при изменении показателей
 исследования после приема аспирина более чем на 50% определяют отсутствие у
 больного аспиринорезистентности (либо при изменении показателей исследования после
 приема аспирина менее чем на 50% определяют у больного аспиринорезистентность).

Способ осуществляют следующим образом: Способ реализуют с помощью

оригинального устройства экспресс-оценки состояния системы гемостаза (Фиг. 1, Фиг. 2).

На Фиг 1. Картридж устройства для экспресс-оценки состояния системы гемостаза

1. Пьезокерамический ультразвуковой датчик (в разрезе);
2. Измерительная камера;
3. Корпус картриджа;
4. Внешний электрод;
- 4.1 Генератор ультразвуковых колебаний; 4.2. Приемник ультразвуковых колебаний;
5. Внутренний электрод;
6. Контактная группа для коммутации;
7. Центральный контакт;
8. Боковой контакт.

На Фигура 2. Устройство для экспресс-оценки состояния системы гемостаза (общий вид)

1. Пьезокерамический ультразвуковой датчик (в разрезе)
9. Дисплей для отображения результатов;
10. USB-выход для зарядки/соединения с ПК;
11. Разъем для помещения картриджа;
12. Блок регистрации для экспресс-оценки состояния системы гемостаза;
13. Клавиатура.

При проведении исследований применяют стандартную процедуру взятия крови. Безымянный палец пациента перед забором крови должен быть немного промассирован. Обрабатывают верхнюю фалангу пальца ваткой или марлей, смоченной антисептиком, затем палец протирают сухим стерильным материалом; выполняют прокол, и несколько первых кровяных капелек протирают сухим стерильным. Следующую каплю крови помещают (за счет капиллярного эффекта), в измерительную камеру 2 датчика 1 устройства экспресс-оценки состояния системы гемостаза. После забора крови, датчик с измерительной камерой помещают в картридж устройства и запускают исследование. После окончания исследования одноразовый датчик отключают от устройства и утилизируют (как отход класса Б).

Данную процедуру производят дважды: перед приемом аспирина и через 4 часа после его приема.

Измерительная камера 2 и электроды 4.1. и 4.2 размещены на основании корпуса картриджа 3, причем, измерительная камера 2 расположена внутри пьезоэлектрического датчика 1 выполненного в виде полого цилиндра, снаружи которого расположен внешний электрод 4, разделенный симметричными прорезями на две равные части, одна часть которого 4.1 является генератором, а вторая 4.2 - приемником ультразвуковых колебаний, на внутренней поверхности цилиндра расположен внутренний электрод 5, центральный 7 и боковые 8 контакты встроены в основание картриджа 3 и закреплены на его основании.

Регистрируют эхокоагулограмму и через интервалы времени $T_1=0,3$ минуты, $T_2=2$ минуты, $T_3=3$ минуты, $T_4(4)=5$ минут определяют величину амплитудных показателей A_1 , A_2 , A_3 , $A_4(4)$ соответственно, угол наклона $\angle \alpha$ кривой между точками на эхокоагулограмме A_1 и A_2 и интегральный показатель: площадь сектора S ,

ограниченного с одной стороны отрезком кривой между точками A_1 и $A_4(4)$ с другой осью абсциссы, анализируют графические результаты и при изменении показателей исследования после приема аспирина более, чем на 50% определяют отсутствие у больного аспиринорезистентности (и при изменении показателей исследования после

приема аспирина менее чем на 50% определяют аспиринорезистентность).

Результаты измерений регистрируют в виде эхокоагулограммы дважды: до приема и через четыре часа после приема аспирина повторное исследование.

После проведения 2-х исследований (до и после приема препарата) анализируют графические результаты и при изменении результатов показателей исследования после приема аспирина более чем на 50% определяют отсутствие у больного аспиринорезистентности, а при изменении показателей исследования после приема аспирина менее чем на 50% определяют аспиринорезистентность).

Клинические примеры

Пример 1. Условно здоровый доброволец Д. 28 лет.

На первом этапе от испытуемого было получено добровольное письменное согласие на участие в научном исследовании.

Для определения исходного состояния агрегации тромбоцитов, был произведен забор крови из локтевой вены, в стандартный вакутейнер (BD Vacutainer) для определения исследования агрегации по Борну. Далее при помощи трехкомпонентного шприца, производят забор крови из локтевой вены для проведения низкочастотной пьезотромбоэластографии, и забор крови из пальца для проведения эхокоагулограммы.

Результаты исследования агрегации тромбоцитов ("Biola", Москва) с АДФ (5 мкМ): светопропускание составило 42% (Фигура 3);

Проведено исследование посредством низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ) [2] с использованием аппаратно-программного комплекса АРП-01М «Меднорд» (Р.С.2010/09767)[7]

Результаты НПТЭГ - $t1=1,4$; ИКК=22,7 (Фигура 4);

Далее испытуемому был назначен аспирин (75 мг*1 раз/сутки)

Было проведено повторное исследование НПТЭГ через 4 часа после приема аспирина- $t1=2,7$; ИКК=11, 12 (Фигура 4);

Через 3 суток после начала приема аспирина проведена повторная агрегатометрия тромбоцитов с АДФ: светопропускание составило 26% (Фигура 3);

Данные НПТЭГ (увеличение $t1$ в 2 и более раза, уменьшение ИКК в 2 и более раза) и данные агрегатометрии (по Борну) - уменьшение светопропускания более чем на 50%, свидетельствуют об эффективности антиагрегантной терапии - отсутствие аспиринорезистентности.

Дополнительно проведено исследование согласно предлагаемому способу с использованием устройства экспресс-оценки состояния гемостаза с регистрацией эхокоагулограммы после воздействия ультразвуковых колебаний на пробу крови 150-160 КГц.

Результаты эхокоагулографии:

Фоновые значения - $A2=75$; $A3=105$; $A4=120$; $\angle \alpha=45^\circ$; $S=431$ (Фигура 5).

Через 4 часа после приема аспирина $A2=10$; $A3=20$; $A4=30$; $\angle \alpha=12^\circ$; $S=91$ (Фигура 5).

Вывод: По полученным результатам, можно сделать заключение об эффективности действия аспирина, т.е. об отсутствии у пациента аспиринорезистентности, что подтверждается уменьшением угла наклона, снижением амплитудных показателей, уменьшением значения интегрального показателя площади S в 2 и более раза.

Пример 2. Больной М. 30 лет.

Поступил в стационар с диагнозом посттромбофлеботический синдром (ПТФС), тромбоз подколенного сегмента.

Для определения исходного состояния агрегации тромбоцитов, был произведен забор

крови из локтевой вены, в стандартный вакутейнер (BD Vacutainer) для определения исследования агрегации по Борну. Далее при помощи трехкомпонентного шприца, производят забор крови из локтевой вены для проведения низкочастотной пьезотромбоэластографии, и забор крови из пальца для проведения эхокоагулограммы.

5 Результаты исследования агрегации тромбоцитов ("Biola", Москва) с АДФ (5 мкМ): светопропускание составило 43% (Фигура 6); Результаты НПТЭГ - $t1=1,1$; ИКК=15,45 (Фигура 7).

Далее, согласно назначению лечащего врача, пациенту был назначен аспирин, в дозировке 150 мг/1раз в сутки.

10 Через 4 часа после приема аспирина было проведено повторное исследование с помощью НПТЭГ - $t1=1,2$; ИКК=15 (Фигура 7);

Через 3 суток после начала приема аспирина проведена повторная агрегатометрия тромбоцитов с АДФ: светопропускание составило 38% (Фигура 6);

15 Данные НПТЭГ (увеличение $t1$ менее чем в два раза, уменьшение ИКК менее чем в два раза) и данные агрегатометрии (по Борну) - уменьшение светопропускания менее чем на 50%, свидетельствуют об неэффективности антиагрегантной терапии - аспиринорезистентности.

Дополнительно проведено исследование согласно предлагаемому способу с использованием устройства экспресс-оценки состояния гемостаза с регистрацией эхокоагулограммы после воздействия ультразвуковых колебаний на пробу крови 150-160 КГц.

Результаты эхокоагулографии:

Фоновые значения - $A2=115$; $A3=145$; $A4=160$; $\angle \alpha=40^\circ$; $S=320$ (Фигура 8). Через 4 часа после приема аспирина $A2=100$; $A3=130$; $A4=150$; $\angle \alpha=38^\circ$; $S=260$ (Фигура 8).

25 Вывод: На основании данных проведенных исследований можно сделать заключение о неэффективности действия аспирина, т.е о наличии у пациента аспиринорезистентности, что соответствует результатам исследования, полученным с помощью предлагаемого способа и подтверждено - отсутствием статистически значимых изменений угла наклона, амплитудных показателей, и интегрального показателя площади.

30 Фигура 1. Картридж устройства для экспресс-оценки состояния системы гемостаза

1. Пьезокерамический ультразвуковой датчик (в разрезе);

2. Измерительная камера;

3. Корпус картриджа;

4. Внешний электрод;

35 4.1 Генератор ультразвуковых колебаний; 4.2. Приемник ультразвуковых колебаний;

5. Внутренний электрод;

6. Контактная группа для коммутации;

7. Центральный контакт;

8. Боковой контакт.

40 Фигура 2. Устройство для экспресс-оценки состояния системы гемостаза (общий вид) 1. Пьезокерамический ультразвуковой датчик

9. Дисплей для отображения результатов;

10. USB-выход для зарядки/соединения с ПК;

11. Разъем для помещения картриджа;

45 12. Блок регистрации для экспресс-оценки состояния системы гемостаза;

13. Клавиатура.

Фигура 3. Агрегатограмма условно здорового добровольца, по Борну (до и через 5 дней после приема аспирина). А - фоновое исследование (до приема), Б - исследование

после приема аспирина.

Фигура 4. Масштабированная низкочастотная пьезотромбоэластограмма, условно здорового добровольца, до и после назначения аспирина. А - фоновое исследование (до приема), Б - исследование после приема аспирина.

5 Фигура 5. Эхокоагулограммы условно здорового добровольца, до и после назначения аспирина. А - фоновое исследование (до приема), Б - исследование после приема аспирина.

10 Фигура 6. Агрегатограмма больного М., по Борну (до и через 5 дней после приема аспирина). А - фоновое исследование (до приема), Б - исследование после приема аспирина.

Фигура 7. Масштабированная низкочастотная пьезотромбоэластограмма, больного М., до и после назначения аспирина. А - фоновое исследование (до приема), Б - исследование после приема аспирина.

15 Фигура 8. Эхокоагулограммы больного М., до и после назначения аспирина. А - фоновое исследование (до приема), Б - исследование после приема аспирина.

Источники информации

1. Долгов В.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза/ В.В. Долгов, П.В. Свиригин.- М.-Тверь: Триада, 2005. -227 с.

20 2. Удут В. В., Тютрин И.И. и соавт. Технология низкочастотной пьезотромбоэластографии в мониторинге противотромботической терапии/ В.В. Удут, И.И. Тютрин и соавт.// Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2017. - №11. - С.

3. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. Лабораторное дело, 1989, 25 N10, с. 15-18

4. Соловьев М.А., Удут В.В., Тютрин И.И., Карчагина О.С. Особенности фармакодинамики антиагрегантов в коррекции тромботических осложнений при политравме/ Соловьев М.А., Удут В.В., Тютрин И.И. и соавт.// Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations, 2015. - No 1. С. 96-102.

30 5. Macchi L., Sorel N., Christiaens L. Aspirin resistance: definitions, mechanism, prevalence, and clinical significance. Curr Pharm Des. 2006; 12(2): 251-258.

6. Born G.V.R. Quantitative investigation into the aggregation of blood platelets. J. Physiol. (Lond), 1962, p.67P-68P.

7. Удут В.В., Кинзерский А.А. Способ оценки агрегационной активности тромбоцитов 35 //Патент RU 2666945.

(57) Формула изобретения

Способ экспресс-оценки аспиринорезистентности путем двукратного определения вязкостных характеристик крови, включающего забор и помещение пробы крови в 40 измерительную камеру с последующим воздействием на нее физическим фактором и регистрацию характеристик крови, отличающийся тем, что на пробу цельной крови в объеме 25 мкл, помещенную в измерительную камеру до приема аспирина и через 4 часа после его приема, воздействуют ультразвуковыми колебаниями с частотой 150-160 кГц, после чего регистрируют эхокоагулограмму и через интервалы времени T1= 45 0,3 мин, T2=2 мин, T3=3 мин, T4(4)=5 мин определяют величину амплитудных показателей A1, A2, A3, A4 (4) соответственно, угол наклона кривой между точками A1 и A2 - $\angle \alpha$ и интегральный показатель, площадь сектора S, ограниченную с одной стороны отрезком кривой между точками A1 и A4 (4) с другой осью абсциссы,

анализируют графические результаты и при изменении результатов исследования после приема аспирина на более чем на 50% определяют отсутствие у больного аспиринорезистентности.

5

10

15

20

25

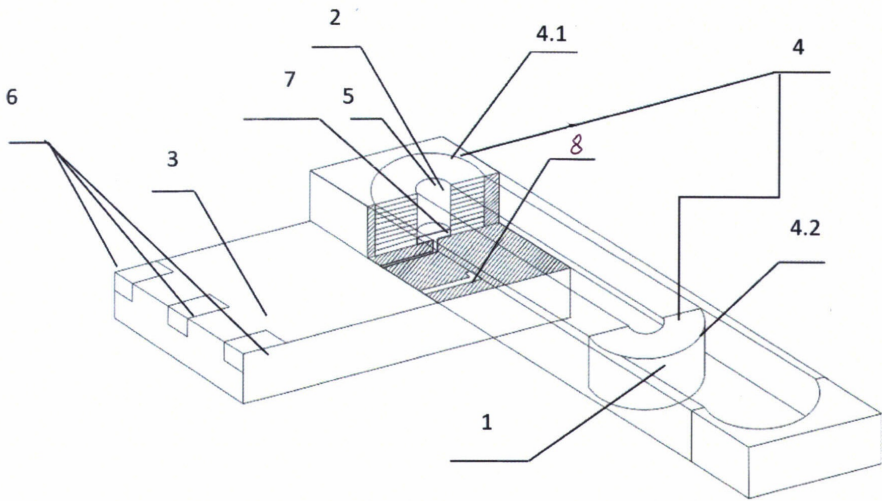
30

35

40

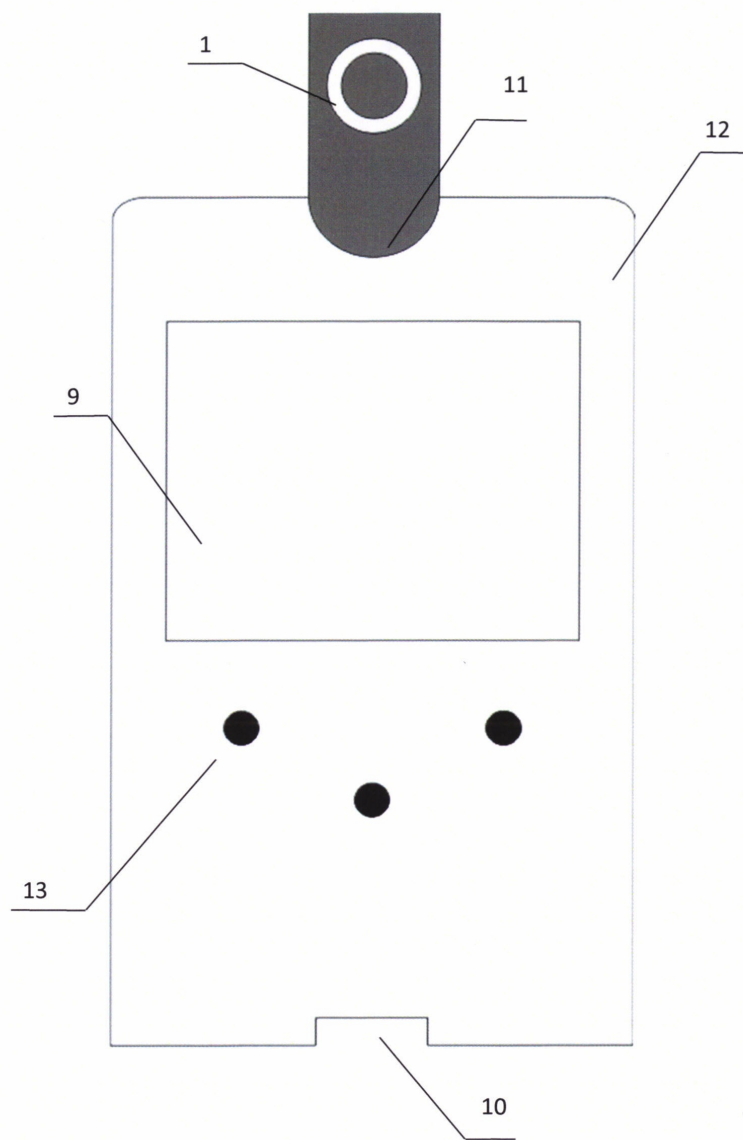
45

1

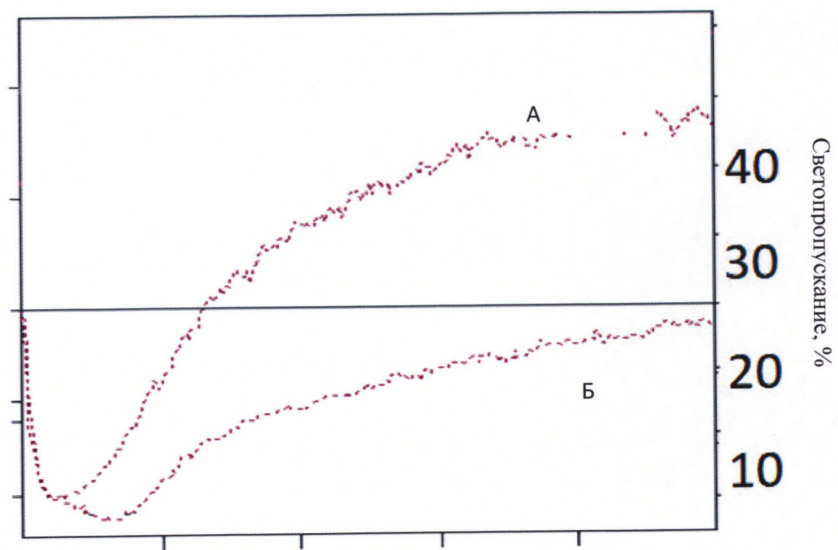


Фигура 1

2

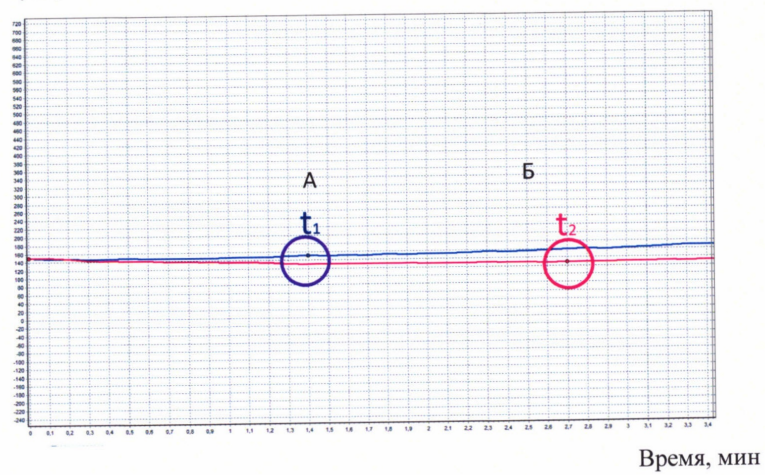


Фигура 2



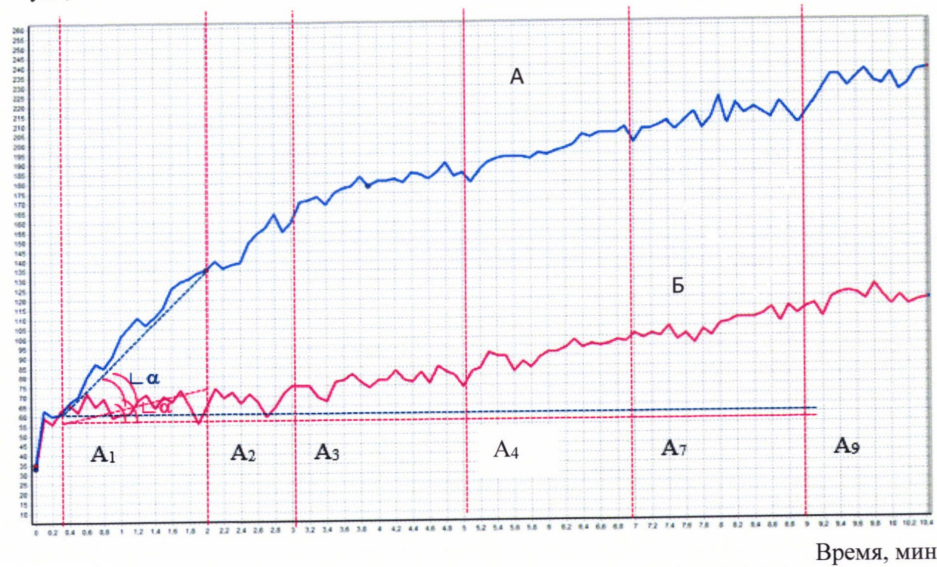
Фигура 3

Амплитуда, о.е.



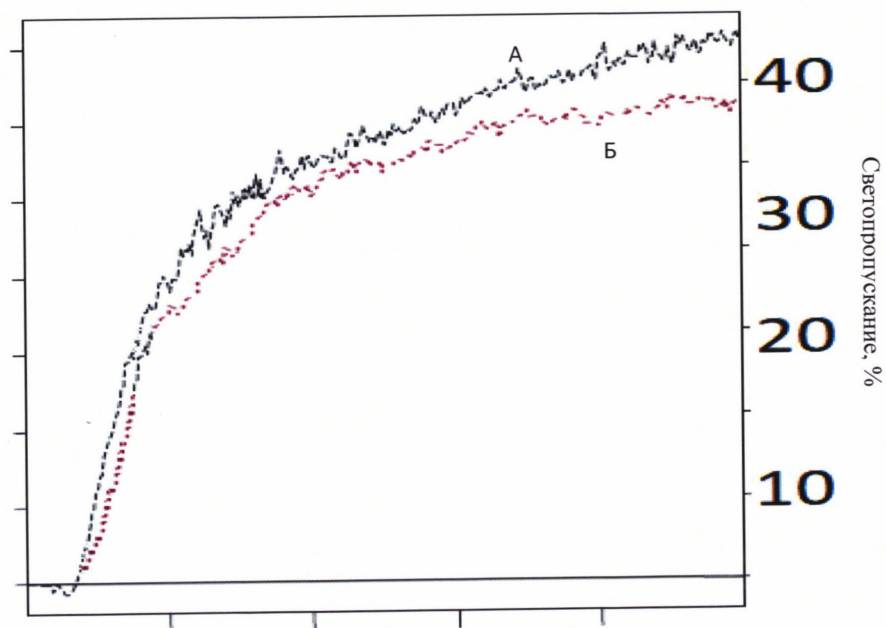
Фигура 4

Амплитуда, о.е.



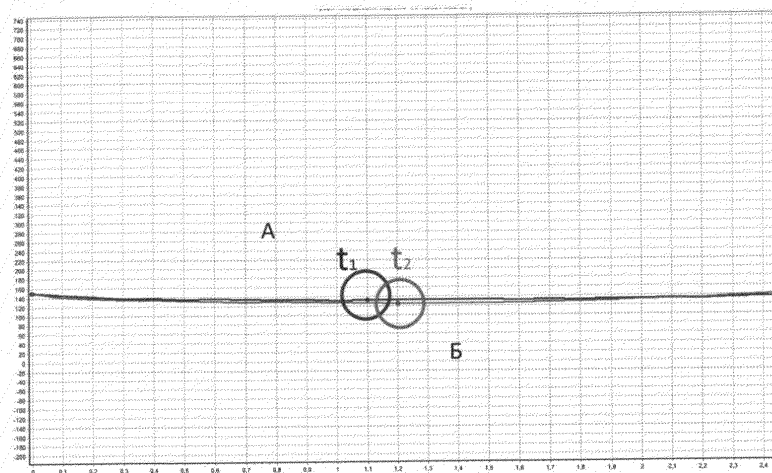
Фигура 5

Время, мин



Фигура 6

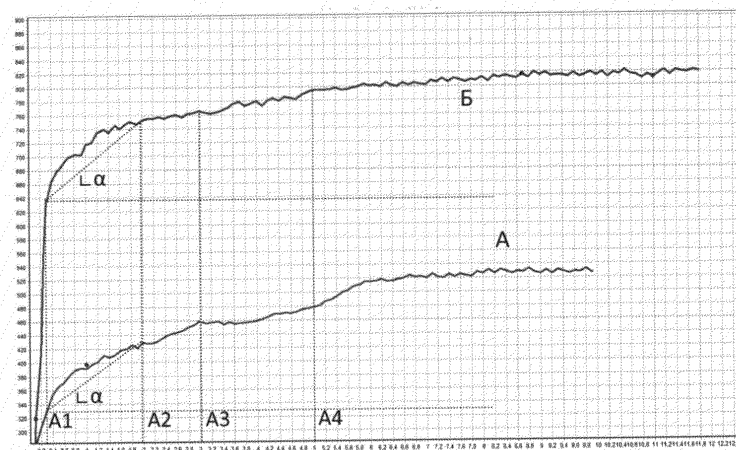
Амплитуда, о.е.



Время, мин

Фигура 7

Амплитуда, о.е.



Время, мин

Фигура 8