



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **77372**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/86** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 09532**

(22) Дата подання заявки: **06.08.2012**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **11.02.2013**

(46) Публікація відомостей **11.02.2013, Бюл.№ 3**  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Павлов Сергій Борисович (UA),  
Бабенко Наталія Михайлівна (UA),  
Кумечко Марина Валентинівна (UA),  
Черних Людмила Володимирівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ  
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ,  
вул. Корчагінців, 58, м. Харків, 61176 (UA)**

## (54) СПОСІБ ОЦІНКИ АГРЕГАЦІЙНОЇ АКТИВНОСТІ ТРОМБОЦИТІВ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки агрегаційної активності тромбоцитів включає забір крові та її стабілізацію, Потім отримують багату тромбоцитами плазму. Після цього здійснюють індукцію агрегації тромбоцитів аденозиндифосфатом. Безперервно вимірюють коефіцієнт світлопропускання досліджуваного розчину та отримують криві агрегації. За цими кривими будують поліноміальну лінію тренда із ступенем 2.

**UA 77372 U**



Корисна модель належить до медицини, а саме до лабораторної діагностики і призначена для діагностики патологій тромбоцитів, дослідження механізмів агрегації, підбору адекватної антиагрегантної терапії та оцінки її ефективності.

В даний час існує декілька способів оцінки агрегаційних властивостей тромбоцитів, одним з яких є спосіб, що виконується на аналізаторі агрегації тромбоцитів (агрегометрі). В основі принципу роботи приладу полягає метод Born (метод світлорозсіювання). Зменшення загальної розсіюючої поверхні клітин в результаті їх склеювання одна з одною в процесі агрегації тромбоцитів призводить до зміни в часі коефіцієнта пропускання досліджуваного розчину. Зміни коефіцієнта пропускання розчину, що графічно реєструються в процесі агрегації, характеризують фізіологічну активність тромбоцитів, при цьому розраховуються параметри агрегації (швидкість, ступінь і т.д.) і виводяться результати вимірювань на зовнішню ЕОМ (Анализатор агрегации тромбоцитов АР 2110. Инструкция по определению агрегационной активности тромбоцитов.- Минск, 1995). АДФ являє собою один з головних індукторів агрегації, тому для оцінки агрегаційної здатності тромбоцитів послідовно використовують розчини АДФ в декількох концентраціях реагенту - в низькій, середній та високій дозі.

До недоліків методу відносять суб'єктивність оцінки форми отриманої кривої агрегації (оборотна, необоротна, двохвильова; наявність або відсутність дезагрегації; пригнічення другої хвилі агрегаційної кривої). Використання зареєстрованих значень ступеня агрегації (%), часу досягнення максимальної агрегації (хв., с.) та швидкості агрегації за перші 30 секунд процесу агрегації клітин (%/хв.) характеризує процес агрегації недостатньо повно, тому що кількісно не описує характер кривої, що має вирішальне значення для оцінки агрегаційної активності тромбоцитів.

Здійснюються спроби кількісної оцінки отриманих агрегатограм. Відомий спосіб оцінки агрегаційних властивостей тромбоцитів, де як індуктор використовується АДФ у кінцевій концентрації 1 мкМ (Горшунова Н.К., Соболева Н.И., Желтобрюх А.В. Коррекция когнитивных расстройств и нарушений первичного звена гемостаза у пожилых пациентов // Consilium medicum.-2008. - Том 10, № 7. - С. 64-67.). Крива агрегації оцінюється за допомогою індексу вираженості дезагрегаційного процесу (ІВДП) за формулою:  $ІВДП = \text{деагрегація тромбоцитів на 4-й хвилині від її початку} / \text{максимальна агрегація тромбоцитів} \times 100 \%$ . Описаний метод недостатньо об'єктивний, тому що запропонований індекс не відображає зв'язок з ІВДП розрахованим для групи здорових осіб, а також у методі не обґрунтовано вибір хвилини у формулі ІВДП.

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб оцінки агрегаційних властивостей тромбоцитів (патент №2213976 RU Сидоркин В.Г. и соавт.), в якому розраховують інтегральний показник агрегації тромбоцитів (ІПАТ, ум. од.) за формулою:

$$ІПАТ = K1 + K2 + K3 + K4 + Z,$$

де K1 - відношення ступеня агрегації тромбоцитів у обстежуваного в умовах індукції агрегації АДФ до середнього арифметичного аналогічного показника здорових людей;

K2 - відношення швидкості агрегації тромбоцитів у обстежуваного в умовах індукції агрегації АДФ до середнього арифметичного аналогічного показника здорових людей;

K3 - відношення ступеня агрегації тромбоцитів у обстежуваного в умовах індукції агрегації колагеном до середнього арифметичного аналогічного показника здорових людей;

K4 - відношення швидкості агрегації тромбоцитів у обстежуваного в умовах індукції агрегації колагеном до середнього арифметичного аналогічного показника здорових людей, а якісні ознаки агрегатограм виражають у вигляді кількісного параметра Z, де

Z - "+2" - реєстрація другої хвилі агрегації тромбоцитів при індукції процесу АДФ або відсутність феномена дезагрегації;

Z - "0" - відсутність хвилі агрегації при індукції процесу колагеном;

Z - "-2" - відсутність на агрегатограмі патологічних якісних ознак, і при значенні ІПАТ в межах 1,6-5,5 од. агрегаційну активність тромбоцитів оцінюють як нормальну, понад 5,5 од. - як підвищену, а нижче 1,6 од. - як знижену.

Для індукції агрегації тромбоцитів використовують тільки низьку дозу АДФ, яку підбирають дослідним шляхом на зразках крові здорових людей.

Недоліком даного способу є оцінка агрегаційних властивостей тромбоцитів тільки для низької концентрації АДФ, середні та високі концентрації не розглядаються. При використанні іншого індуктора (адреналіну, серотоніну, арахідонової кислоти тощо), або одного з індукторів, що використовувався у патенті, не описана можливість застосування даного інтегрального показника.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу оцінки агрегаційної активності тромбоцитів, в якому на підставі результатів вимірювання коефіцієнтів

світлопропускання та математичного виразу кривої агрегації, що представлена графічно, діагностують патологічні порушення функціональних властивостей тромбоцитів.

Поставлена задача вирішується в способі оцінки агрегаційної активності тромбоцитів, що включає забір крові, її стабілізацію, отримання багатої тромбоцитами плазми, індукцію агрегації тромбоцитів аденозиндифосфатом (АДФ) у концентраціях 0,625 мкмоль/л, 2,5 мкмоль/л та 5 мкмоль/л, безперервне вимірювання коефіцієнта світлопропускання досліджуваного розчину за допомогою агрегометра та отримання кривих агрегації, згідно з корисною моделлю, за цими кривими, виключаючи першу хвилину процесу агрегації, будують поліноміальну лінію тренда із ступенем 2, яку виражають рівнянням  $y = ax^2 + bx + c$ , розраховують коефіцієнти  $k_1$  і  $k_2$ ,

де  $k_1$  - відношення коефіцієнта  $a$  рівняння досліджуваної кривої до відповідного коефіцієнту усередненої кривої, що характерна для здорових людей,

$k_2$  - відношення коефіцієнта  $b$  рівняння досліджуваної кривої до відповідного коефіцієнту усередненої кривої, що характерна для осіб контрольної групи, і при появі від'ємних знаків при коефіцієнтах  $k_1$  і  $k_2$  діагностують патологічні процеси порушення балансу між механізмами агрегації і дезагрегації при низьких концентраціях індуктора, та визначають зміни, що відображають процеси первинної та вторинної агрегації при середніх і високих концентраціях АДФ.

Визначення знаків при коефіцієнтах  $k_1$  і  $k_2$  дає можливість оцінювати агрегаційну активність тромбоцитів.

Суть корисної моделі пояснюють кресленнями 1, 2, 3, де зображені криві агрегації пацієнтів і усереднені криві, що характерні для осіб контрольної групи, при індукції АДФ в різних концентраціях.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином. У пацієнтів самопливом беруть кров з ліктьової вени, змішують її з цитратом натрію 3,8 % у співвідношенні 9:1. Аналіз зразків плазми необхідно провести протягом 3 годин після забору крові. Багату тромбоцитами плазму отримують шляхом центрифугування зразків крові протягом 12-15 хв. при 1000 об/хв. Частину плазми залишають для аналізу, іншу частину піддають подальшому центрифугуванню протягом 20 хвилин при 4000 об/хв. Отримують безтромбоцитну плазму, яку використовують для калібрування шкали оптичної щільності приладу і для стандартизації клітин, кількість яких повинна складати  $200-250 \cdot 10^9/\text{л}$ . Шляхом послідовного додавання АДФ різної концентрації проводять запис кривих за допомогою агрегометра. АДФ використовують фірми "Технологія-Стандарт" (Барнаул). Спочатку визначають агрегаційну здатність тромбоцитів практично здорових людей (контрольна група). Отримують 3 види агрегаційних кривих. Під дією малої дози АДФ (0,625 мкмоль/л) відбувається первинна (оборотна) агрегація, так звана агрегація з подальшою дезагрегацією. При індукції агрегації АДФ середньої концентрації (2,5 мкмоль/л) зазвичай отримують двофазну агрегаційну криву. Великі дози АДФ викликають однофазну необоротну агрегацію. Для кожної концентрації індуктора будують усереднену криву, виключаючи першу хвилину процесу агрегації. Знаходять поліноміальну лінію тренда із ступенем 2, яку виражають у вигляді  $y = ax^2 + bx + c$ . Отримують три рівняння, що відповідають трьом концентраціям індуктора.

Для концентрації індуктора 0,625 мкмоль/л рівняння усередненої кривої, що характерна для осіб контрольної групи, має вигляд  $y = 0,9957x^2 - 8,8274x + 33,75$ ; для концентрації 2,5 мкмоль/л -  $y = -1,054x^2 + 14,027x + 16,14$ ; для концентрації 5 мкмоль/л -  $y = -1,9411x^2 + 21,512x + 12,316$ . Потім досліджують агрегаційну активність тромбоцитів пацієнта аналогічно особам контрольної групи. Отримують три рівняння кривих агрегації обстежуваного, що відповідають трьом концентраціям індуктора. Розраховують коефіцієнти  $k_1$  і  $k_2$  шляхом ділення коефіцієнтів  $a$  і  $b$  рівнянь досліджуваної кривої на відповідні коефіцієнти усередненої кривої, що характерна для здорових людей. При появі від'ємних знаків при коефіцієнтах  $k_1$  і  $k_2$  судять про патологічні процеси порушення балансу між механізмами агрегації і дезагрегації при низьких концентраціях індуктора, та зміни, що відображають процеси первинної та вторинної агрегації при середніх і високих концентраціях АДФ.

Перехід від дезагрегації, що спостерігається на агрегатограмі у осіб контрольної групи, до необоротної агрегації, графічно представлена на кривій агрегації обстежуваних пацієнтів при низьких концентраціях обраного індуктора, оцінюють за допомогою запропонованого способу шляхом отримання коефіцієнтів  $k_1$  і  $k_2$ , і при появі від'ємних знаків діагностують гіперагрегацію.

При середніх і високих концентраціях АДФ відсутність або пригнічення другої хвилі агрегації або спостереження оборотної кривої у обстежуваних замість двохвильової кривої або незворотної кривої у осіб контрольної групи дозволяє виявляти порушення механізмів агрегації тромбоцитів і діагностувати патології їх функціональної активності.

## Приклад 1

Пацієнт В-ий І.Л., 77 років. Досліджували агрегацію тромбоцитів в умовах індукції процесу АДФ в концентрації 0,625 мкмоль/л. Отриману криву агрегації виразили запропонованим способом у вигляді рівняння  $y = -0,0245x + 2,4474x + 11,485$ . Значення коефіцієнтів рівняння кривої агрегації пацієнта ділили на відповідні значення коефіцієнтів усередненої кривої, що характерна для практично здорових осіб. Отримали значення  $k_1 = -0,02461$  і  $k_2 = -0,27725$ . Поява від'ємних знаків при коефіцієнтах  $k_1$  і  $k_2$  відображає відсутність дезагрегації на кривій обстежуваного пацієнта при даній концентрації індуктора, що, в свою чергу, дозволяє діагностувати гіперагрегацію тромбоцитів. Крива агрегації пацієнта і усереднена крива, що характерна для осіб контрольної групи, при індукції АДФ в концентрації 0,625 мкмоль/л показані на рис. 1.

## Приклад 2

Пацієнт Ш-н, 22 роки. Було проведено дослідження агрегації тромбоцитів в умовах індукції процесу АДФ в концентрації 2,5 мкмоль/л. Отримана крива агрегації була виражена у вигляді рівняння  $y = 0,3514x^2 - 6,4686x + 81,188$ . Значення коефіцієнтів рівняння кривої агрегації пацієнта ділили на відповідні значення коефіцієнтів усередненої кривої. Отримали значення  $k_1 = -0,3334$  і  $k_2 = -0,46115$ . Знаки "-" при коефіцієнтах  $k_1$  і  $k_2$  відображають пригнічення другої хвилі агрегації на кривій пацієнта при даній концентрації індуктора, що дозволяє діагностувати дисфункцію тромбоцитів. Крива агрегації пацієнта і усереднена крива, що характерна для осіб контрольної групи, при індукції АДФ в концентрації 2,5 мкмоль/л показані на рис. 2.

## Приклад 3

Пацієнт Б-ов, 80 років. Було проведено дослідження агрегації тромбоцитів в умовах індукції процесу АДФ в концентрації 5 мкмоль/л. Отримана крива агрегації була виражена у вигляді рівняння  $y = 0,7177x^2 - 16,469x + 114,15$ . Значення коефіцієнтів рівняння кривої агрегації пацієнта ділили на відповідні значення коефіцієнтів усередненої кривої. Отримали значення  $k_1 = -0,36974$  і  $k_2 = -0,76557$ . Від'ємні знаки при коефіцієнтах  $k_1$  і  $k_2$  відображають появу оборотної кривої агрегації у пацієнта замість незворотної у практично здорових осіб при даній концентрації індуктора, що дозволяє судити про патологічну агрегаційну активність тромбоцитів і може бути використане для підбору адекватної антиагрегантної терапії та оцінки її ефективності. Крива агрегації пацієнта і усереднена крива, що характерна для осіб контрольної групи, при індукції АДФ в концентрації 5 мкмоль/л показані на рис. 3.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє оцінювати агрегаційну активність тромбоцитів.

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки агрегаційної активності тромбоцитів, що включає забір крові, її стабілізацію, отримання багатої тромбоцитами плазми, індукцію агрегації тромбоцитів аденозиндифосфатом (АДФ) у концентраціях 0,625 мкмоль/л, 2,5 мкмоль/л та 5 мкмоль/л, безперервне вимірювання коефіцієнта світлопропускання досліджуваного розчину за допомогою агрегометра та отримання кривих агрегації, який **відрізняється** тим, що за цими кривими, виключаючи першу хвилину процесу агрегації, будують поліноміальну лінію тренда із ступенем 2, яку виражають рівнянням  $y = ax^2 + bx + c$ , розраховують коефіцієнти  $k_1$  і  $k_2$ , де  $k_1$  - відношення коефіцієнта  $a$  рівняння досліджуваної кривої до відповідного коефіцієнту усередненої кривої, що характерна для здорових людей,  $k_2$  - відношення коефіцієнта  $b$  рівняння досліджуваної кривої до відповідного коефіцієнту усередненої кривої, що характерна для осіб контрольної групи, і при появі від'ємних знаків при коефіцієнтах  $k_1$  і  $k_2$  діагностують патологічні процеси порушення балансу між механізмами агрегації і дезагрегації при низьких концентраціях індуктора, та визначають зміни, що відображають процеси первинної та вторинної агрегації при середніх і високих концентраціях АДФ.

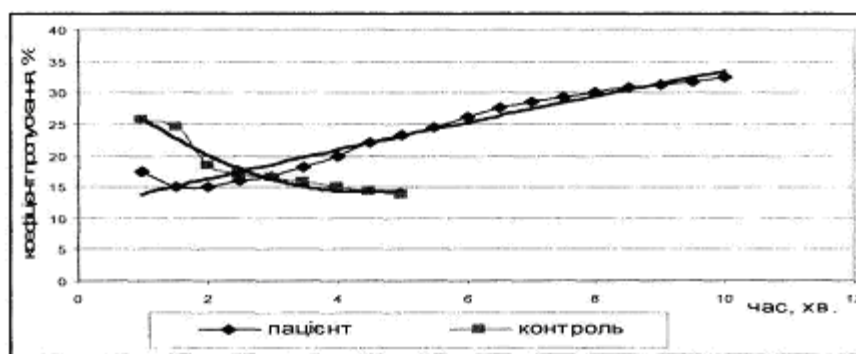


Fig.1

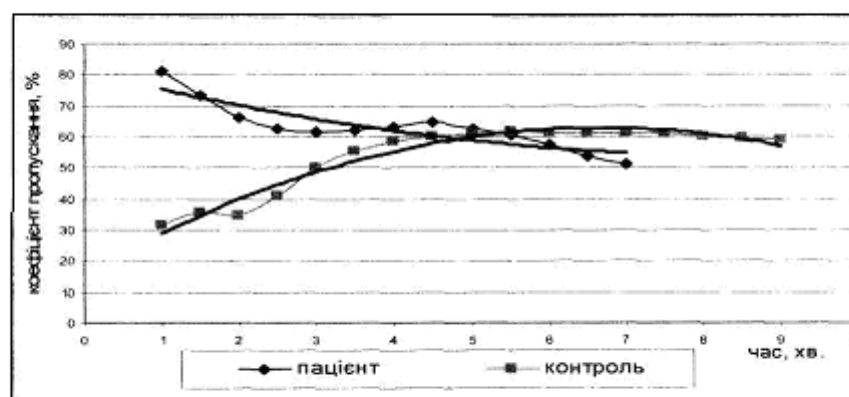


Fig.2

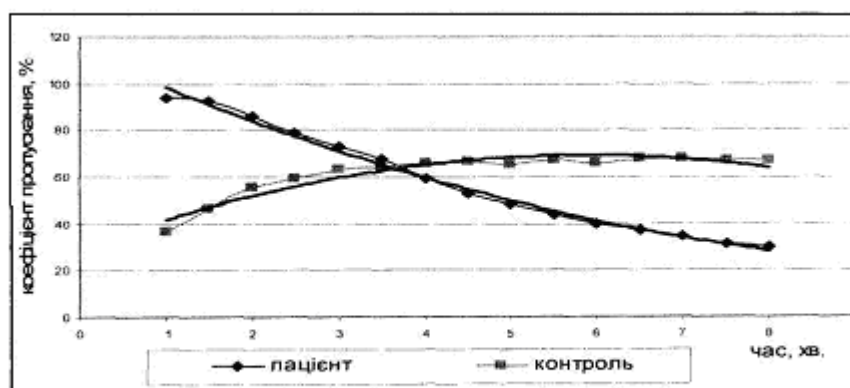


Fig.3

---

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601