

НПФ БИОЛА

**ЛАЗЕРНЫЙ АНАЛИЗАТОР АГРЕГАЦИИ  
ТРОМБОЦИТОВ  
АЛАТ-2 «БИОЛА»**



**Инструкция по эксплуатации**

Научно-производственная фирма БИОЛА  
Россия, 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А;  
тел/факс(495)414-6748, 414-6747  
Модель \_\_\_\_\_  
Серийный номер – ААС \_\_\_\_\_

## ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

1. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие прибора требованиям технических условий при соблюдении потребителем правил эксплуатации, установленных в настоящем руководстве по эксплуатации.
2. Гарантийный срок эксплуатации прибора 2 года. Гарантийный срок на покупные изделия: компьютер, монитор, принтер и другие – устанавливается их производителем.
3. В случае отказа прибора или его неисправности в период действия гарантийных обязательств, а также обнаружения некомплектности при его первичной приемке, владелец прибора должен направить изготовителю:
  - a. - заявку на ремонт (замену);
  - b. - ведомость дефектов;
4. Ремонт прибора производится изготовителем за счет владельца в случае:
  - c. - эксплуатации прибора с нарушением требований настоящего руководства;
  - d. - отказа в послегарантийный период.

## СВИДЕТЕЛЬСТВО О ПРИЕМКЕ

Лазерный анализатор агрегации тромбоцитов АЛАТ2-«Биола», заводской номер ААС \_\_\_\_\_ соответствует техническим условиям ТУ 9443-001-59852626-2007 и признан пригодным к эксплуатации.

Дата выпуска \_\_\_\_\_ 2012 г.

М.П.

ведущий инженер  
(должность и подпись представителя фирмы-изготовителя)

Воршев А.В. \_\_\_\_\_  
(инициалы, фамилия)

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
1. ВВЕДЕНИЕ .....	3
1.1. НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
1.2. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	3
2. РАБОТА С ПРИБОРОМ .....	4
2.1. УСТАНОВКА ПРИБОРА .....	4
2.2. ЭЛЕМЕНТЫ ПРИБОРА .....	4
2.3. ПРОЦЕДУРЫ .....	6
2.3.1. ВВЕДЕНИЕ .....	6
2.3.2. УСТАНОВКА СКОРОСТИ ПЕРЕМЕШИВАНИЯ .....	6
2.3.3. УСТАНОВКА ТЕМПЕРАТУРЫ .....	6
2.3.4. ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ .....	6
2.3.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ, ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА И ФАКТОРА ФОРМЫ .....	7
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Приготовление обогащенной (ОТП) и бедной (БТП) тромбоцитами плазмы. ....	8
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Приготовление индукторов агрегации. ....	9
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Обработка результатов. ....	10
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Измерение агрегации тромбоцитов при тромбоцитопении. ....	12

# 1. ВВЕДЕНИЕ

## 1.1. НАЗНАЧЕНИЕ

Анализаторы агрегации НПФ БИОЛА - это микропроцессорные приборы, предназначенные для исследования агрегации кровяных пластинок (тромбоцитов) и других клеток в суспензии, оценки фактора формы тромбоцитов, определения концентрации тромбоцитов, а также определения активности фактора Виллебранда. Агрегация регистрируется как традиционным методом, предложенным Борном и О'Брайеном [1,2], так и методом, основанным на оценке среднего размера агрегатов в реальном времени, предложенным в 1989г.[7,8,9].

Традиционный метод (по Борну) позволяет исследовать не только агрегацию, но и изменение формы тромбоцитов [3]. С другой стороны, изменение формы может маскировать начальный этап агрегации [4]. Кроме того, образование малых агрегатов (менее 50-100 тромбоцитов) может не регистрироваться традиционным методом, предложенным Борном [5,6]. Метод основанный на оценке относительного среднего размера агрегатов [7,8,9] отличается высокой чувствительностью, что делает его пригодным для исследования спонтанной агрегации, агрегации под действием низких концентраций индукторов [7,8], а также агрегации субклеточных частиц и макромолекул [10]. Развитие этого методического подхода позволило также измерять концентрацию частиц в перемешиваемой суспензии [11]. В приборе реализован метод определения активности фактора Виллебранда, основанный на его способности в присутствии антибиотика ристоцетина вызывать агглютинацию фиксированных и лиофильно высушенных тромбоцитов [13,14]. Кроме того, модифицированным методом Латимера [17,18] может быть оценен фактор формы (степени дискоидности) тромбоцитов.

Данное описание касается приборов с внутренним программным обеспечением версии 4 и выше. Прибор выпускается в вариантах с двумя или четырьмя независимыми каналами. Агрегация определяется одновременно обоими методами в каждом канале. Температура и скорость перемешивания поддерживаются встроенным микропроцессором независимо в каждом канале. Концентрация клеток и фактор Виллебранда (для приборов, оснащенных этими опциями) могут быть определены только в канале 1. Анализатор агрегации работает только в комплекте с внешним компьютером, к которому подключается через стандартный интерфейс USB. Прилагаемое программное обеспечение выполняется на компьютере с операционной системой WindowsXP и выше.

## 1.2. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Объем пробы 0.3 мл.

Два или четыре независимых канала измерения и 2 ячейки для предварительной инкубации на канал.

Источник света - полупроводниковый лазер, длина волны 0.785 мкм.

Термостатирование - от 25 до 42°C (с шагом 1°C) или "выключено" независимо в каждом канале.

Скорость перемешивания - от 100 до 1200 об/мин (с шагом 100 об/мин) или "выключено"

устанавливается независимо в каждом канале.

Автоматическая установка "0%" и "100%" для метода по Борну.

Авторанжирование кривой среднего размера агрегатов.

Счетчик тромбоцитов:

рабочий диапазон концентраций	50...600 тыс./мкл
систематическая погрешность	<20%
воспроизводимость	<20%

Подключение компьютера - последовательный интерфейс USB.

Напряжение питания - от 220 до 240 В, 50 или 60 Гц.

## 2. РАБОТА С ПРИБОРОМ

**ВНИМАНИЮ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ:** До начала работы персоналу настоятельно рекомендуется пройти **ОБУЧЕНИЕ** работе на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 «Биола» на базе Российского кардиологического научно-производственного комплекса в Москве. По вопросам обучения обращаться в НПФ «Биола» по телефонам: (495) 414-67-47, (495) 414-67-48. Стоимость обучения входит в стоимость прибора.

### 2.1. УСТАНОВКА ПРИБОРА

**ВНИМАНИЕ:** Несоблюдение требований настоящего раздела создает опасность для аппаратуры и для оператора.

Распаковав агрегометр, убедитесь в соответствии содержимого коробки упаковочному листу и в отсутствии видимых повреждений. Об обнаруженных расхождениях или повреждениях немедленно сообщите представителю НПФ Биола. **Не включайте поврежденный прибор в сеть!**

Убедитесь в том, что напряжение сети равно  $220\text{В} \pm 10\%$ . При необходимости примените стабилизатор. **Не рекомендуется использовать источник бесперебойного питания, предназначенный для компьютера.** Щит электропитания (или удлинитель), к которому будет подключаться прибор, должен быть рассчитан на подключение трехконтактных вилок и иметь провод защитного заземления. **Не допускается применение нулевого провода сети в качестве заземления.**

Перед подключением агрегометра соединительным (интерфейсным) кабелем к компьютеру (включая системный блок, монитор, принтер) **все оборудование должно быть включено в один щит электропитания (или удлинитель)** – это обеспечивает заземление всех устройств в одной точке. **Не включая выключателей питания прибора и компьютера** подключите интерфейсный кабель к компьютеру и прибору. Агрегометр готов к работе.

Перед отключением любой из трехпроводных вилок питания необходимо отсоединить интерфейсный кабель. Нарушение указанной последовательности может привести к повреждению интерфейса как со стороны агрегометра, так и компьютера и является грубым нарушением правил эксплуатации агрегометра.

Прибор должен быть установлен на твердую и ровную поверхность. Не допускается устанавливать прибор на мягкую поверхность, так как на дне прибора имеются вентиляционные отверстия, которые в случае установки на мягкую поверхность будут закрыты. Это приведет к невозможности нормальной работы термостатов прибора и вызовет перегрев. Кроме того, при работе прибора выделяется тепло, поэтому даже при выключенном термостате температура кюветного отделения может быть на  $5\text{-}7^\circ\text{C}$  выше комнатной. По этой же причине для надежной работы термостата температура в помещении должна быть не менее чем на  $7^\circ\text{C}$  ниже заданной для термостатирования.

### 2.2. ЭЛЕМЕНТЫ ПРИБОРА

Внешний вид прибора спереди показан на рисунке 6 (на странице 5). Цифрами обозначены:

1. Клавиша «Старт» (по одной на канал). Запускает/останавливает процесс регистрации агрегатограммы. Процедуры оценки концентрации, оценки формы и определения фактора Виллебранда запускаются только из программы
2. Индикаторы «Регистрация», по одному на канал. Светится во время проведения регистрации.
3. Индикаторы «Перемешивание», по одному на канал. Когда перемешивание включено, то этот индикатор светится зеленым светом.
4. Индикатор «Термостат», по одному на канал. При выключенном термостате не горит. Оранжевое свечение этого индикатора означает, что термостат включен, но заданная температура не достигнута. Зеленое свечение этого индикатора означает, что достигнута заданная температура.
5. Рабочие ячейки (одна на канал). Тестируемый образец должен быть установлен в рабочую ячейку.
6. Ячейки для предварительной инкубации (прогрева), по 2 на канал.
7. Индикатор включения прибора. При включенном приборе светится желтым светом.



Рисунок 6. Вид прибора спереди.

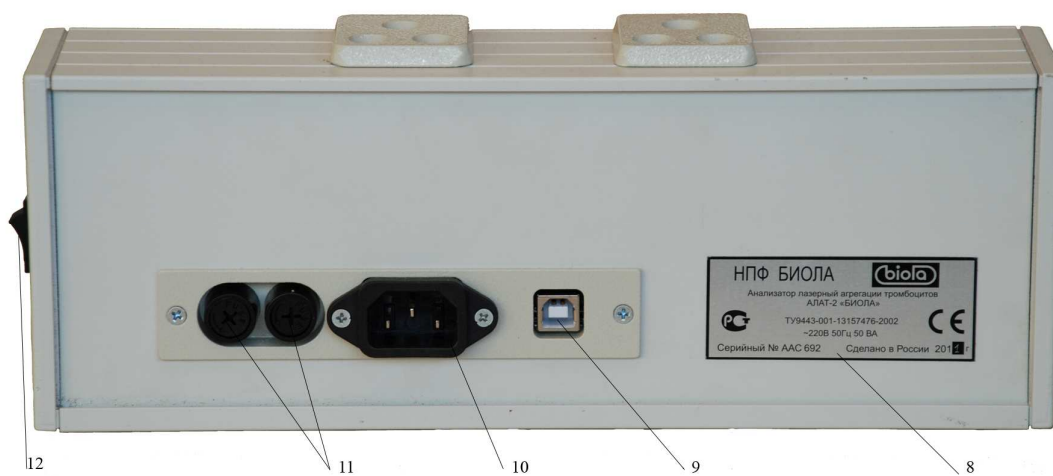


Рисунок 7. Вид прибора сзади.

На виде прибора сзади (Рисунок 7) цифрами обозначены:

8. Табличка с выходными данными прибора – серийным номером и датой изготовления.
9. Разъем USB для подключения к компьютеру.
10. Сетевой разъем питания.
11. Предохранители.
12. Сетевой выключатель прибора.

## **2.3. ПРОЦЕДУРЫ**

### **2.3.1. ВВЕДЕНИЕ**

Текущая версия анализатора агрегации тромбоцитов работает только в комплекте с персональным компьютером. На компьютере должна быть установлена операционная система Windows XP или Windows 7 в 32-битном варианте (наиболее распространенный ныне вариант; работа программы с 64-битными версиями не тестировалась). Поэтому после установки самого прибора необходимо установить программу с прилагаемого в комплекте поставки CD диска. Процедура установки программы проста и описана в руководстве пользователя программы (см. п.2 Руководства пользователя программы Agg версии 4.0).

Все управление прибором и задание всех необходимых параметров (скорости перемешивания, температуры термостатов, длительности записи агрегатограмм) осуществляется из программы.

### **2.3.2. УСТАНОВКА СКОРОСТИ ПЕРЕМЕШИВАНИЯ**

Скорость перемешивания у прибора при поставке во всех каналах установлена 800об/мин, перемешивание включено. В этом состоянии прибор будет находиться после включения в сеть и до запуска на компьютере программы Agg. После запуска программа берет управление прибором на себя и, как правило, выключает перемешивание до начала проведения исследования. Это сделано преднамеренно, поскольку перемешивание является одним из стимуляторов агрегации тромбоцитов. Перемешивание будет включено автоматически после старта процедуры регистрации и вновь выключено по окончании регистрации.

Процедура изменения заданной скорости перемешивания описана в Руководстве по программе в п.6.1. После изменения скорости перемешивания новое значение запоминается программой и автоматически устанавливается при следующем сеансе работы с прибором.

### **2.3.3. УСТАНОВКА ТЕМПЕРАТУРЫ**

Температура термостатирования у прибора при поставке во всех каналах задана 37°C. Нагрев термостатов до этой температуры начинается сразу после включения прибора в сеть.

Процедура изменения заданной температуры описана в Руководстве по программе в п.6.1. После изменения температуры термостатирования новое значение запоминается программой и автоматически устанавливается при следующем сеансе работы с прибором.

Однако необходимо понимать, что запомненное программой значение температуры будет установлено в приборе только после запуска программы, в то время как до запуска программы термостат будет прогревать прибор до заданных по умолчанию 37°C. Это следует учитывать, особенно при желании работать при температурах ниже 37°C, ибо охлаждение прибора занимает заметно больше времени, чем нагрев.

Дополнительно необходимо учитывать следующие особенности работы термостатов прибора:

1. При работе прибора выделяется тепло, поэтому даже при выключенном нагревателе температура кюветного отделения может быть на 5-7°C выше комнатной. По этой же причине для надежной работы термостата температура в помещении должна быть не менее чем на 7°C ниже установленной.
2. Поскольку чувствительный элемент датчика температуры находится не непосредственно в кювете с плазмой, то рекомендуется начинать исследования спустя 5-10мин после загорания индикатора «Термостат» зеленым светом.
3. Несмотря на то, что температура термостатирования задается в каждом кюветном отделении индивидуально, из-за близости расположения кюветных отделений нормальная работа термостатов с существенно разными (более 5°C) заданными температурами не гарантируется.

### **2.3.4. ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ**

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% принимается состояние бедной тромбоцитами

плазмы (БТП). При этом с достаточной для практики точностью можно считать, что свойства БТП и дистиллированной воды эквивалентны. При исследовании агрегации методом по среднему радиусу за единичный радиус принимается средний радиус тромбоцитов до начала агрегации. Для представления результатов исследований в таком виде (относительном) необходима калибровка прибора. В описываемом приборе калибровка осуществляется автоматически при каждом исследовании агрегации. Однако в связи с возможным старением источника света (лазера) в приборе необходимо время от времени проводить калибровку прибора по дистиллированной воде. При поставке каждый прибор проходит такую калибровку при изготовлении и поэтому для начала работы никакой дополнительной калибровки не требуется. Однако раз в полгода программа будет требовать провести процедуру калибровки по воде. Проведение этой калибровки описано в Руководстве пользователя программы п.6.2.

Приготовьте ОТП. Стандартная процедура описана в приложении А. Для измерения агрегации тромбоцитов:

1. Включите прибор и запустите на компьютере программу.
2. При необходимости установите требуемые параметры записи – длительность, температуру, скорость перемешивания и др.(см в Руководстве пользователя программы п.6.1.) При поставке заданная температура 37°C, скорость перемешивания равна 800 об/мин. После загорания индикаторов «Термостат» зеленым светом рекомендуется подождать еще 10 минут до начала исследования.
3. Налейте в кювету 0.3 мл обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), опустите в кювету магнитную мешалку и установите кювету в ячейку для предварительной инкубации. Рекомендуется прогревать образец не менее 3 минут. Желательно, чтобы время предварительного прогрева было одинаковым для всех образцов.
4. Установите кювету в рабочую ячейку. Запустить процесс исследования можно нажав кнопку «Старт» данного канала на самом приборе или же вызвать через меню программы команду **Канал X -> Старт**. При этом появится диалоговое окно с просьбой вставить пробирку с плазмой и мешалку. Убедитесь в наличии пробирки с мешалкой в рабочей ячейке, после чего повторно нажмите кнопку «Старт» на приборе или «ОК» в диалоге. На экране будут последовательно появляться вспомогательные диалоговые окна, информирующие о стадии процесса.
5. После открытия окна записи по звуковому сигналу пипеткой добавьте в кювету (не вынимая её из рабочей ячейки!!!) необходимую дозу индуктора. По умолчанию звуковой сигнал подается через 10 секунд после начала записи, однако это время для каждого канала можно поменять в меню параметров (см в Руководстве пользователя программы п.6.1.).
6. Запись можно остановить как из программы, так и нажатием на кнопку «Старт» данного канала на самом приборе.

Описание с иллюстрациями см в Руководстве пользователя программы п.6.3.

### **2.3.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ, ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА И ФАКТОРА ФОРМЫ**

Процедуры определения концентрации тромбоцитов, фактора Виллебранда и фактора формы описаны в Руководстве пользователя программы в п.6.4, 6.5 и 6.6 соответственно.

*По вопросам обучения  
работе на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов АЛАТ2-«Биола» обращаться  
в НПФ «Биола» по телефонам (495) 414-67-47, (495)414-67-48*



## **ПРИЛОЖЕНИЕ А. Приготовление обогащенной (ОТП) и бедной (БТП) тромбоцитами плазмы.**

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. Ниже описана стандартная процедура приготовления обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) и бедной тромбоцитами плазмы (БТП) для исследования агрегации тромбоцитов.

Наиболее часто в качестве антикоагулянта используется 130 мМ раствор цитрата натрия. Это 3.2% раствор безводного цитрата натрия или 3.8% раствор 5.5-водного цитрата натрия в дистиллированной воде. Перед взятием крови в пробирки объемом 10 мл наливается 1 мл антикоагулянта. Закрытая пробкой пробирка может несколько дней храниться при +4°C. При взятии крови (обычно из локтевой вены) после пункции **первые несколько капель крови сливаются**. В пробирке с антикоагулянтом уровень крови доводится до отметки 10 мл, и содержимое пробирки **немедленно** перемешивается. Стабилизированная кровь должна храниться до центрифугирования **при комнатной температуре** не более 30 минут.

Для приготовления ОТП цельная кровь центрифугируется при 200g в течении 7 мин. Из каждой пробирки осторожно отбирается по 2.5 мл супернатанта (верхнего слоя). БТП получают повторным центрифугированием остатков крови при 2000g в течении 15 мин. Супернатант обычно содержит не более 500 клеток/мкл, и используется для калибровки прибора или разведения аутологичной ОТП.

Количество оборотов центрифуги и время центрифугирования крови определяются параметрами центрифуги, размером пробирки и степенью ее заполнения кровью. Для центрифуг с диаметром ротора приблизительно 30 см ускорение 200g соответствует примерно 1200-1500 об/мин. Более точная информация должна содержаться в описании центрифуги. В любом случае, не обязательно придерживаться точного значения ускорения. В небольших пределах это несоответствие можно корректировать изменяя время центрифугирования (например в диапазоне от 6 до 10 минут). Результат осаждения эритроцитов можно считать удовлетворительным при получении однородного верхнего слоя. В нормальных условиях (скажем отсутствие тромбоцитопении) супернатант должен содержать от 300 до 600 тыс. клеток/мкл.

Для исследования агрегации тромбоцитов рекомендуется чтобы концентрация тромбоцитов в ОТП находилась в пределах 200-600 тыс./мкл. Для определения концентрации тромбоцитов может использоваться автоматический счетчик клеток, гемоцитометр, или анализатор агрегации/счетчик тромбоцитов НПФ БИОЛА (модель LA230). В случае высокой концентрации тромбоцитов в ОТП, ее необходимо разбавить аутологичным образцом БТП. При низкой концентрации тромбоцитов смотри Приложение Г.

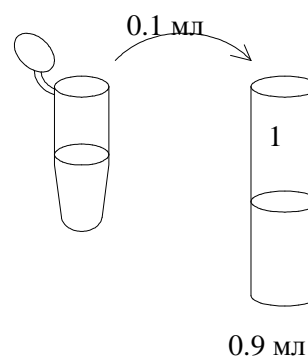
Подготовленная к исследованию ОТП разливается по 0.3 мл в кюветы для агрегометра, и хранится при комнатной температуре до начала исследования.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Приготовление индукторов агрегации.

Для исследования агрегации тромбоцитов применяются различные индукторы агрегации: аденозиндифосфат (АДФ), фактор активации тромбоцитов (ФАТ), коллаген, тромбин, арахидоновая кислота, стабильные аналоги циклических эндопериксидов и т.д.. Процедура приготовления и хранения индукторов должна обеспечивать сохранение их активности. Ниже описаны стандартные процедуры приготовления двух наиболее часто используемых индукторов - АДФ и ФАТ.

### Аденозиндифосфат (АДФ).

При использовании в качестве индуктора агрегации АДФ, готовится раствор АДФ в концентрации 105 мкМ. Для АДФ фирмы "Sigma" с  $M=477$  берется навеска 5.00 мг на 100 мл физиологического раствора. Отливаются аликвоты по 0.2-0.4 мл и замораживаются. В день использования в пробирку 1 наливается 0.9 мл физиологического раствора. Размораживается одна аликвота, и 0.1 мл ее содержимого добавляется в пробирку 1.



В образцы обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) объемом 0.3 мл добавляется по 15 мкл раствора АДФ из пробирки 1 и маточного разведения, для получения конечной концентрации 0.5 мкМ и 5 мкМ соответственно.

### Фактор активации тромбоцитов (ФАТ).

Необходимо приготовить раствор ФАТ в этаноле с концентрацией 100 мкМ. Такой раствор может храниться несколько лет при  $-35^{\circ}\text{C}$ . Процедура приготовления раствора ФАТ в этаноле различна для ФАТ разных производителей.

Для приготовления рабочего разведения 10 мкл спиртового раствора ФАТ смешивается с 1 мл 0.25% раствора альбумина в забуференном физрастворе ( $\text{pH}=7.4$ ). Приготовленное таким образом рабочее разведение также может храниться при  $-35^{\circ}\text{C}$ , но не более недели. При добавлении 3 мкл рабочего разведения в образцы ОТП объемом 0.3 мл конечная концентрация ФАТ составляет 10 нМ, а при добавлении 9 мкл - 30 нМ ( $10^{-8}$  М и  $3 \cdot 10^{-8}$  М).

При приготовлении других индукторов агрегации необходимо пользоваться рекомендациями фирмы производителя.

## ПРИЛОЖЕНИЕ В. Обработка результатов.

Ниже приведены типичные кривые изменения среднего размера агрегатов (сплошная линия) и по Борну (пунктирная линия) после добавления 5 мкМ АДФ:



По левой вертикальной оси отложен размер агрегатов в относительных единицах, по правой оси – по Борну в процентах. Одно деление горизонтальной оси соответствует 1 минуте.

### Определение параметров агрегации по Борну.

После калибровки прибор автоматически вычисляет проценты светопропускания, причем за 0% принимается начальное состояние ОТП, а за 100% состояние БТП (ил дистиллированной воды).

*Степень агрегации* определяется как максимальное приращение после добавления индуктора, и измеряется в процентах.

*Скорость агрегации* определяется как максимальный наклон кривой, и измеряется в процентах в минуту.

### Определение параметров агрегации по кривой среднего размера агрегатов.

После калибровки прибора размер одиночных тромбоцитов принимается за 1.

*Степень агрегации* определяется как максимальное значение среднего размера агрегатов после добавления индуктора, и измеряется в относительных единицах.

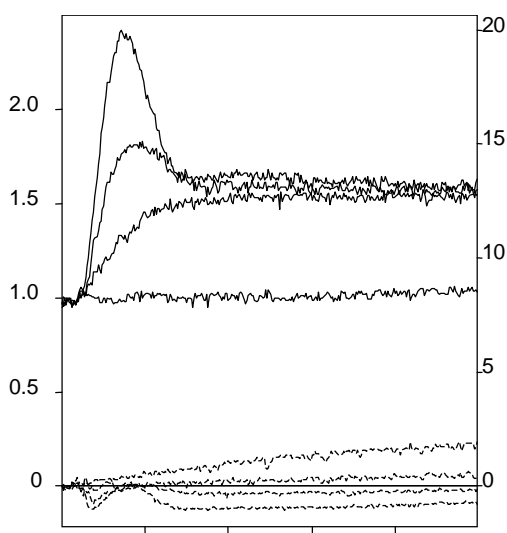
*Скорость агрегации* определяется как максимальный наклон кривой среднего размера, и измеряется в относительных единицах в минуту.

*Показатель агрегации* - значение среднего размера агрегатов в заранее заданное время после добавления индуктора, и измеряется в относительных единицах.

При исследовании спонтанной агрегации или агрегации под действием низких концентраций индукторов кривые агрегации по Борну часто не могут быть разумно интерпретированы. В приведенных ниже примерах *степень* и *скорость агрегации* могут быть определены **только по кривым среднего размера агрегатов**.

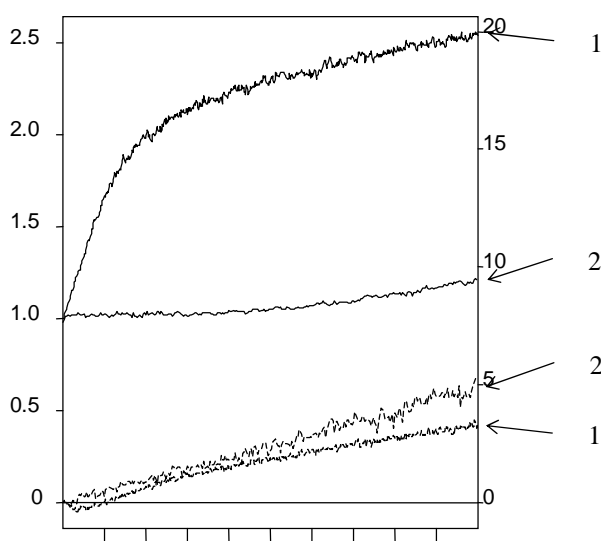
(1) Кривые изменения среднего размера агрегатов без добавления индуктора и в процессе агрегации индуцированной 0.16, 0.33 и 0.5 мкМ АДФ. После добавления 0.33 и 0.5 мкМ АДФ наблюдается двухфазная кривая изменения размеров агрегатов. В этом случае рекомендуется определять *скорость агрегации* и два *показателя агрегации* :

- а) максимальное значение (*степень агрегации*)
- б) *показатель агрегации* через 2-4 минуты после добавления индуктора агрегации



Кривые агрегации по Борну (нижние пунктирные линии) не могут быть как-либо разумно интерпретированы.

(2) Спонтанная агрегация тромбоцитов у пациента с ишемической болезнью сердца (1) и здорового человека (2). Средний размер агрегатов монотонно возрастает после начала перемешивания. Рекомендуется определять *показатель агрегации* через 2 минуты после начала перемешивания. В норме этот показатель не превышает 1.35 отн.ед.. В данном случае у пациента этот показатель составляет 1.99, что значительно превышает верхний уровень нормы. Как видно из приведенных графиков кинетика агрегации по Борну (пунктирные линии) в обоих случаях практически одинакова.



## **ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Измерение агрегации тромбоцитов при тромбоцитопении.**

Определяют концентрацию тромбоцитов в образце неразбавленной стабилизированной ОТП пациента с тромбоцитопенией. ОТП здорового донора разбавляют аутологической БТП до получения ОТП с такой же концентрацией тромбоцитов, как и у пациента с тромбоцитопенией.

Исследуют агрегацию тромбоцитов в неразбавленной ОТП пациента с тромбоцитопенией и разбавленной ОТП здорового донора при одинаковых типах и концентрациях индукторов.

Величину агрегации тромбоцитов у пациентов с тромбоцитопенией можно сравнивать с соответствующей агрегацией тромбоцитов здорового донора (норма) и выражать в процентах от "нормы". Желательно для уточнения величины "нормы" исследовать агрегацию тромбоцитов в разбавленных ОТП нескольких здоровых доноров.

Лазерные анализаторы агрегации тромбоцитов НПФ БИОЛА позволяют работать с ОТП при концентрации тромбоцитов 20.000 кл/мкл и даже ниже.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Born G.V.R. Quantitative investigation into the aggregation of blood platelets. *J. Physiol. (Lond)*, 1962, p.67P-68P.
2. O'Brien J.R. Platelet aggregation. Part II. Some results of a new study. *J. Clin. Pathol.*, 1962, 15, p.452-455.
3. Latimer P., Born G.V.R., Michal F. Application of light-scattering theory to optical effects associated with morphology of blood platelets. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, 180, p. 151-159.
4. Kitek A. and Breddin K. Optical density variations and microscopic observations in the evaluation of platelet shape change and microaggregate formation. *Thromb. Res.*, 1980, 44, p.154-158.
5. Thompson N.T., Scrutton M.C. and Wallis R.B. Particle volume changes associated with light transmittance changes in the platelet aggregometer: dependence upon aggregating agent and effectiveness of stimulus. *Thromb. Res.*, 1986, 41, p.615-626.
6. Latimer P. and Wamble F. Light scattering by aggregates of large colloidal particles. *Applied Optics*, 1982, 21, p.2447-2455.
7. Gabbasov Z.A., Popov E.G., Gavrilov I.Yu. and Posin E.Ya. Platelet aggregation: the use of optical density fluctuations to study microaggregate formation in platelet suspension. *Thromb. Res.*, 1989, 54(3), p.215-223.
8. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. *Лабораторное дело*, 1989, N10, с.15-18.
9. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. Новый методический подход к исследованию агрегации тромбоцитов in vitro., *БЭБМ*, 1989, N10, с.437-439.
10. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G. and Orechov A.N. Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid accumulation caused by modified low density lipoproteins, *BBRC*, 1989, 163(1), p.489-494.
11. Gabbasov Z.A., Gavrilov I.Yu. and Popov E.G. The use of optical density fluctuations for determination of platelet concentration in stirred suspension. *Platelets*, 1992, 3, p.281-282.
12. Nilsson I.M., Holmberg L. von Willebrand's disease today. *Clinics in Hematology* 1979, v.8, N1.
13. Olson J.D. et al. Evaluation of ristocetin-Willebrand factor assay and ristocetin-induced aggregation. *Amer.J.Clin.Path.* 1975, v.63, p.210.
14. Miller C.H. et al. Genetics of classic von Willebrand's disease. Phenotypic variations within families. *Blood* 1979, v.54, p.117.
15. Brinkhous K.M. et al. Assay of von Willebrand factor in von Willebrand disease and hemophilia. Use of Macroscopic platelet aggregation test. *Thromb. Res.* 1975, v.6, p.627.
16. Zimmerman T.S. et al. The factor VIII abnormality I Severe von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 301:1307, 1979.
17. Latimer P., Born G.V.R., Michal F. Application of light scattering theory to the optical effects associated with the morphology of blood platelets. *Archs Biochem. Biophys.* 1977, 180: 151-159.
18. Latimer P. Transmittance: an index to shape changes of blood platelets. *Applied Optics* 1975, 14 (10): 2324-2326.