

УДК 534.29

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УЛЬТРАЗВУКА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ ПРОЦЕССА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

А.А. УШАКОВА, В.М. БОНДАРИК

Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники
П. Бровка, 6, Минск, 220013, Беларусь

Поступила в редакцию 29 сентября 2016

Приведены результаты интегральной оценки динамики процесса свертывания крови с помощью ультразвука. При активации внешнего и внутреннего путей свертывания регистрировалось изменение сдвига фазы между зондирующим ультразвуковым сигналом и сигналом, прошедшим через кювету с исследуемой плазмой крови как функции времени.

Ключевые слова: гемостаз, сдвиг фазы, фибриновый сгусток, интегральный метод.

Введение

Система гемостаза – одна из самых жизненно важных физиологических систем организма человека. Процесс свертывания крови – это главное звено системы гемостаза, которое отвечает за предотвращение кровопотери при нарушении целостности сосудистой системы [1].

Корректная диагностика нарушений свертывания крови является общеизвестной медицинской проблемой. Современные анализаторы для исследования параметров гемостаза позволяют выполнять широчайший спектр стандартных (локальных) тестов, основанных на разных принципах обнаружения фибринового сгустка. К стандартным тестам относятся гематокрит, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время, протромбиновое время (ПТВ), определение концентрации фибриногена и другие. К достоинствам этих тестов можно отнести простоту выполнения. Однако при обычном измерении показателей АЧТВ или ПТВ с помощью диагностического оборудования регистрируется только время свертывания, которое позволяет оценивать отдельные цепочки реакций каскада свертывания и не дают полного представления о динамике процесса образования фибринового сгустка. Поэтому в последнее время в дополнение к стандартным тестам внедряются новые глобальные тесты для интегральной оценки работы свертывающей системы крови, которые позволяют оценивать систему гемостаза как единый функционирующий комплекс.

К глобальным методам относятся следующие.

1. Тест генерации тромбина – тест, основанный на реакции отщепления тромбином метки от флюорогенного субстрата, который вносится в кювету с исследуемой плазмой при активации каскада свертывания. Тромбин расщепляет субстрат, в результате чего высвобождается молекула флюорофора, излучение которой автоматически регистрируется флюориметром через равные промежутки времени. Интенсивность свечения пропорциональна концентрации образовавшегося тромбина [2].

2. Тромбоэластография – тест, основанный на определении эластических свойств фибринового сгустка по средствам измерения вращательного движения стержня, помещенного в кювету с исследуемой плазмой крови. Угол вращения стержня напрямую зависит от прочности сформированного сгустка. Вращательное движение стержня преобразуется из механического в электрический сигнал, который фиксируется на компьютере в виде тромбоэластограммы.

3. Тромбодинамика – самый новый метод интегральной оценки свертывающей системы крови, основанный на фотографической регистрации роста фибринового сгустка. Рост сгустка запускается от нанесенного на поверхность тонкого слоя тканевого фактора. Растущий сгусток освещается красным светом и регистрируется цифровой камерой по светорассеянию методом темного поля. Пространственная динамика роста фибринового сгустка непрерывно регистрируется с помощью видеосистемы и анализируется на компьютере, формирующем изображение по картине светорассеяния [3].

Применение интегральных методов для оценки параметров системы свертывания крови является перспективным направлением, так как такие тесты позволяют оценить работу системы в целом и сделать результирующее заключение о ее работе в организме. В связи с этим было предложено модифицировать ультразвуковой фазовый метод, основанный на определении параметров гемостаза по изменению сдвига фазы зондирующего ультразвукового сигнала [4] в метод для интегральной оценки динамики процесса свертывания крови.

Методика эксперимента

Было предложено измерять сдвиг фазы ультразвукового зондирующего сигнала как функцию времени на протяжении всего процесса свертывания плазмы крови от момента внесения реагента, активирующего каскад свертывания, до момента коагуляции. Исследования проводились на лабораторном макете (рис. 1).



Рис. 1. Лабораторный макет: 1 – генератор сигнала; 2,4 – пьезокерамические преобразователи; 3 – кювета; 5 – осциллограф; 6 – термостатируемая ячейка; 7 – персональный компьютер

Ранее было установлено [5], что оптимальная частота зондирующих ультразвуковых колебаний зависит от диаметра кюветы. Расчетным значением частоты зондирующего сигнала для проведения исследований в предложенных условиях является частота 600 кГц. Для генерации синусоидального сигнала частотой 600 кГц использовался универсальный цифровой двухканальный генератор AG1022 производства Owon Technology (Канада), который за счет технологии прямого цифрового синтеза позволяет получать точный стабильный выходной синусоидальный сигнал с низкими искажениями в диапазоне частот от 1 мкГц до 25 МГц.

В качестве ультразвуковых датчиков использовались пьезокерамические преобразователи прямоугольной формы с площадью контактной поверхности 6 мм² производства Научно-внедренческого РУП «Элкерм» (Беларусь). Датчики, расположенные на одной оси с противоположных сторон кюветы, применялись для преобразования электрического сигнала генератора в ультразвуковой сигнал и ультразвукового сигнала обратно в электрический после прохождения через кювету с исследуемой плазмой крови.

Измерение фазы ультразвукового сигнала как функции времени осуществлялось с помощью двухканального портативного цифрового осциллографа ScopeMeter серии 190 для захвата высокочастотных сигналов. В режиме последовательной записи ScopeRecord осуществлялась одновременная запись изменения фазы зондирующего сигнала и сигнала, прошедшего через кювету с исследуемой пробой плазмы крови, во времени на протяжении всего процесса образования фибринового сгустка.

Осциллограф был подсоединен к персональному компьютеру и через оптически изолированный кабель RS-232 данные передавались на компьютер для последующего анализа с помощью специализированного программного обеспечения FlukeView (рис. 2).

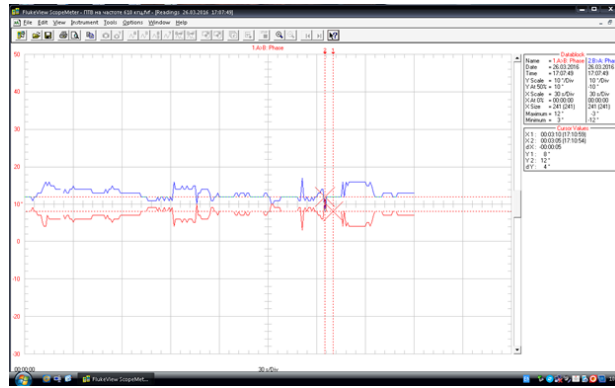


Рис. 2. Вид диалогового окна программы FlukeView

Активация свертывания осуществлялась по стандартным методикам измерения АЧТВ и ПТВ. Тест АЧТВ моделировал *in vitro* внутренний путь свертывания, а тест ПТВ – внешний путь свертывания.

Методика получения фазового профиля при активации каскада свертывания по внутреннему пути (АЧТВ). Для активации каскада свертывания по внутреннему пути применялся набор реагентов ПГ-7/1 производства НПО «Ренам», состоящий из семи флаконов по 4 мл лиофильно высушенного АЧТВ-реагента и трех флаконов по 10 мл раствора кальция хлорида 0,025 М.

Первым этапом при проведении исследований была подготовка реагентов согласно инструкции по применению. Во флакон с АЧТВ-реагентом вносили 4 мл дистиллированной воды и растворяли при покачивании. Реагент был готов к проведению исследований через 30 мин после растворения. Флакон с раствором кальция хлорида 0,025 М подогревали до температуры 37 °С.

Кювета с прикрепленными к ней датчиками помещалась в термостатируемую ячейку. С генератора подавался синусоидальный сигнал частотой 600 кГц. На первом канале осциллографа был настроен режим отображения фазы зондирующего сигнала, а на втором – сигнала, прошедшего через кювету с исследуемым образцом плазмы крови.

В кювету вносили 100 мкл исследуемой плазмы и 100 мкл готового АЧТВ-реагента. Кювета инкубировалась при температуре 37 °С в течение 3-х мин после чего запускался режим записи на осциллографе и активировался каскад свертывания путем добавления 100 мкл раствора кальция хлорида 0,025 М. Режим записи останавливался после того, как в кювете можно было визуально наблюдать образовавшийся фибриновый сгусток. Полученные зависимости изменения фазы от времени передавались на персональный компьютер для последующего анализа.

Методика получения фазового профиля при активации каскада свертывания по внешнему пути (ПТВ). Для активации каскада свертывания по внешнему пути применялся набор реагентов ПГ-5/1 производства НПО «Ренам», состоящий из десяти флаконов по 8 мл лиофильно высушенного ренампластина – тромбопластин-кальциевого реагента, полученного из мозга кроликов. Первым этапом при проведении исследований была подготовка реагентов согласно инструкции по применению. Во флакон с лиофильно высушенным ренампластином вносили 8 мл дистиллированной воды и растворяли путем покачивания. Реагент прогревался при температуре 37 °С в течение 30 мин.

Кювета с прикрепленными к ней датчиками помещалась в термостатируемую ячейку. С генератора подавался синусоидальный сигнал частотой 600 кГц. На первом канале осциллографа был настроен режим отображения фазы зондирующего сигнала, а на втором – сигнала, прошедшего через кювету с исследуемым образцом плазмы крови. В кювету вносили 100 мкл исследуемой плазмы. Кювета инкубировалась при температуре 37 °С в течение 2-х мин, после чего запускался режим записи на осциллографе и активировался каскад свертывания путем добавлением 200 мкл раствора ренампластина. Режим записи останавливался после того, как в кювете можно было визуально наблюдать образовавшийся фибриновый сгусток. Полученные характеристики зависимости изменения фазы от времени передавались на персональный компьютер для последующего анализа.

Результаты и их обсуждение

В результате проведения исследований на образцах плазмы крови человека различных групп и резус-факторов была получена серия зависимостей изменения фазы зондирующего сигнала и сигнала, прошедшего через исследуемую среду от времени. С помощью специального программного обеспечения на каждом графике определялась разность фаз $\Delta\varphi$ между зондирующим сигналом и сигналом, прошедшим через кювету с исследуемым образцом. По полученным результатам были построены графики зависимостей сдвига фазы $\Delta\varphi$ от времени (рис. 3, 4).

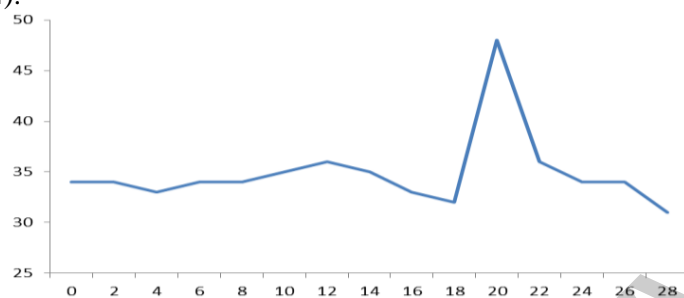


Рис. 3. Зависимость сдвига фазы $\Delta\varphi$ от времени при активации внешнего пути свертывания

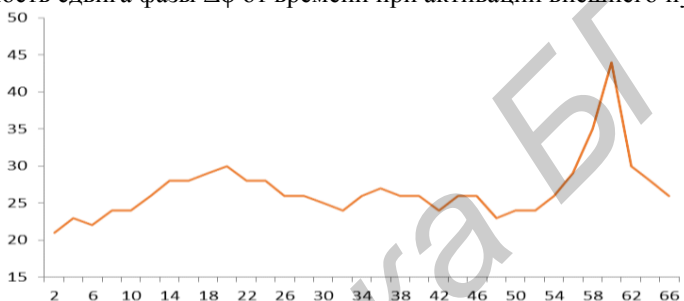


Рис. 4. Зависимость сдвига фазы $\Delta\varphi$ от времени при активации внутреннего пути свертывания

На графиках зависимостей сдвига фазы $\Delta\varphi$ от времени видно, что изменение сдвига фазы между зондирующим ультразвуковым сигналом и сигналом, прошедшим через кювету с исследуемым образцом плазмы крови происходит на протяжении всего процесса свертывания. В момент образования фибринового сгустка на графике наблюдается пик. При активации внешнего пути свертывания ренампластином образование фибринового сгустка происходит через 20 ± 1 с, при активации внутреннего пути свертывания – через 60 ± 2 с, что коррелирует с результатами предыдущих исследований.

Важной модификацией стандартных тестов является так называемый анализ формы сигнала (waveform analysis). При обычном измерении АЧТВ приборы регистрируют только время свертывания плазмы. В новом же подходе коагулометр непрерывно измеряет и записывает величину светопропускания как функцию времени, а сама форма кривой является важным диагностическим показателем. Обнаружено, что изменение светопропускания в тесте АЧТВ при синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания имеет характерный двухфазный вид (рис. 5): в норме светопропускание начинает падать только после некоторой задержки, а при патологии падение начинается немедленно после рекальцификации, а затем ускоряется [6].

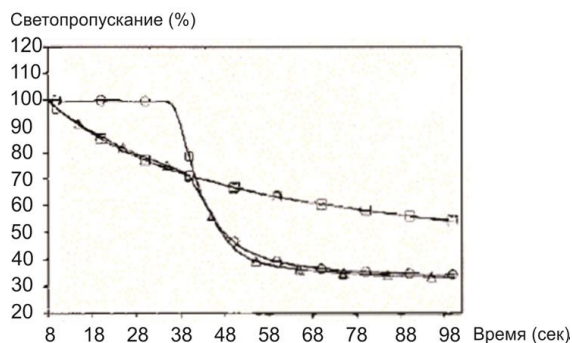


Рис. 5. Форма сигнала светопропускания

Предполагается, что по аналогии с методом анализа формы сигнала светопропускания кривая изменения сдвига фазы от времени может также иметь диагностическую значимость и отличаться формой при различных патологиях системы гемостаза.

Заключение

Предложенный ранее способ определения параметров гемостаза, основанный на зондировании кюветы с плазмой крови ультразвуком и определении момента коагуляции по изменению сдвига фазы между зондирующим сигналом и сигналом прошедшим через кювету с плазмой, был модифицирован в интегральный метод оценки. Отличием интегрального метода исследования динамики процесса свертывания является то, что изменение сдвига фазы ультразвукового сигнала измеряется не только в момент образования фибринового сгустка, а как функция времени на протяжении всего процесса свертывания. Интегральный метод является важной модификацией стандартных тестов АЧТВ и ПТВ, так как форма кривой изменения сдвига фазы $\Delta\varphi$ может являться диагностическим показателем патологий в системе гемостаза.

По результатам исследований установлено, что изменение сдвига фазы наблюдается на протяжении всего процесса свертывания, а в момент образования фибринового сгустка на графике зависимости фазы от времени наблюдается пик. Анализируя полученные графики можно сделать вывод, что:

– при активации внешнего пути свертывания образование фибринового сгустка происходит через 20 ± 1 с;

– при активации внутреннего пути свертывания – через 60 ± 2 с.

Планируется дальнейшее проведение аналогичных исследований динамики процесса свертывания с помощью ультразвука на образцах патологической плазмы крови с целью определения характерных форм кривой при различных заболеваниях системы гемостаза и подтверждения ее диагностической значимости.

ULTRASOUND IN FOLLOW-UP INVESTIGATION OF BLOOD CLOTTING FORMATION

A.A. USHAKOVA, V.M. BONDARIK

Abstract

The results of the ultrasound follow-up investigation of clotting process are presented. Phase shift between probing signal and signal passed through the sample was measured as function of time when the internal and external ways of blood coagulation were activated.

Keywords: hemostasis, phase shift, fibrin clot, integral method.

Список литературы

1. Воробьев А.И., Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. и др. // Современные наукоемкие технологии. 2010. № 4. С. 32–37.
2. Наместников Ю.А. // Гематология и трансфузиология. 2010. № 2. С. 32–39.
3. Соболева Е.Н. // Молочнохозяйственный вестник. 2011. №1. С. 91–94.
4. Ушакова А.А., Камлач П.В., Бондарик В.М. // Докл. БГУИР. 2016. № 2 (96). С. 70–74.
5. Камлач, П.В., Бондарик В.М., Дегтярев Ю.Г. // Изобретатель. 2012. №10. С. 36–39.
6. Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2008. № 2. Т.1. С. 174–181.