

УДК 615.47

УЛЬТРАЗВУКОВЫЕ МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ МОМЕНТА ОБРАЗОВАНИЯ ФИБРИНОВОГО СГУСТКА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

А.А. УШАКОВА, П.В. КАМЛАЧ, В.М. БОНДАРИК

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

Поступила в редакцию 3 декабря 2015

Предложены ультразвуковые методы регистрации момента образования фибринового сгустка при проведении коагулологических тестов плазмы крови человека. В ходе проведения исследований для запуска каскада свертывания применялись методики проведения тестов для определения времени свертывания плазмы крови активированного частичного тромбопластинового времени и протромбинового времени. Приведены результаты исследования регистрации момента образования фибринового сгустка по изменению амплитуды и сдвига фаз ультразвукового сигнала.

Ключевые слова: система гемостаза, образование сгустка, ультразвук, амплитуда, сдвиг фазы.

Введение

Быстрое возрастание роли лабораторной диагностики – характерная черта современного этапа развития клинической медицины. С каждым днем все большая роль в диагностике и лечении широкого спектра заболеваний отводится анализу крови, как наиболее широко используемому биологическому материалу. В норме сохранение крови в жидком состоянии, предупреждение и остановку кровотечений, а так же целостность кровеносных сосудов обеспечивает система гемостаза. Система гемостаза тесно связана с функционированием организма в целом и меняет свое функциональное состояние в зависимости от состояния всего организма. Нарушения в работе системы гемостаза такие, как кровотечения и тромбозы могут быть смертельно опасными. Такие состояния легче предотвратить, чем лечить. Все это обуславливает необходимость лабораторной оценки состояния системы гемостаза [1].

Первой попыткой в изучении системы гемостаза было визуальное наблюдение физиологического процесса свертывания крови при нарушениях целостности сосудистой стенки. Позже использование прозрачных стеклянных пробирок позволило наблюдать коагуляционные процессы *in vitro*. При наблюдении за процессом свертывания крови в стеклянной пробирке с помощью секундомера определяли время свертывания – параметр, характеризующий состояние системы гемостаза. Следующим шагом в развитии лабораторных методов исследования гемостаза был переход от визуального наблюдения к простейшим приборам, которые использовали либо метод регистрации момента образования сгустка крови по изменению ее вязкости в процессе коагуляции, либо оптический метод регистрации, основанный на изменении оптической плотности по мере образования фибринового сгустка. В полуавтоматических приборах добавилась функция автоматического запуска после внесения реагента, активирующего каскад свертывания. Такие приборы возможно применять для скрининговых исследований. Современные полностью автоматизированные системы применяются для клинических исследований в больших диагностических лабораториях, они дают возможность проводить определение любых коагулометрических, хромогенных и иммунологических тестов и позволяют полностью исследовать коагулологический статус пациентов.

В настоящее время наиболее распространенным подходом оценки состояния системы гемостаза в скрининговых исследованиях являются коагуляционные тесты для определения времени свертывания крови. Все коагуляционные тесты основаны на определении промежутка времени от добавления стартового реактива, запускающего каскад свертывания крови, до наступления момента коагуляции (выпадения фибрина) и различаются методом регистрации момента образования фибринового сгустка крови. В последние годы появляются все новые методы исследования системы гемостаза: низкочастотная кондуктометрия, лазерный метод, электрохимические методы. Однако по-прежнему основными методами регистрации момента образования сгустка в современных коагулометрах остаются оптический, механический либо оптико-механический. Не смотря на ряд достоинств существующих методов, они обладают и рядом недостатков. С помощью оптического метода можно исследовать только оптически прозрачные среды, что не позволяет проводить исследования на цельной крови. Основным недостатком механического метода является низкая чувствительность.

Одним из перспективных направлений в скрининге гемостаза является применение ультразвука (УЗ). Ультразвуковой метод исследования гемостаза обладает таким важным преимуществом, как возможность исследования цельной крови и в тоже самое время в нем отсутствует самый главный недостаток механических методов – низкая чувствительность.

Методика эксперимента

Первым ультразвуковым методом регистрации момента образования сгустка был предложен метод, основанный на изменении амплитуды ультразвукового сигнала при образовании фибринового сгустка [2]. Однако величина амплитуды ультразвукового сигнала сильно зависит от качества акустического контакта, которое довольно сложно обеспечить. В связи с этим был предложен еще один ультразвуковой метод, основанный на определении момента коагуляции по изменению сдвига фаз между зондирующим ультразвуковым сигналом и сигналом, прошедшим через кювету с исследуемым образцом плазмы крови [3]. Изменение сдвига фазы происходит из-за того, что при образовании фибринового сгустка путь прохождения ультразвуковой волны удлиняется. До свертывания плазмы крови непрерывные упругие колебания проходят через кювету с плазмой кратчайшим путем в виде продольной волны, а при образовании сгустка путь ультразвукового луча, огибающего образующийся фибриновый сгусток больше, чем прямой путь через несвернутую плазму крови. Запоздывание прихода сквозного сигнала на приемный преобразователь и является причиной изменения сдвига фаз между излученным и принятым сигналами.

В ходе исследования для запуска каскада свертывания применялись методики двух самых распространенных коагуляционных тестов: определение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и протромбинового времени (ПТВ). В тесте для определения АЧТВ время свертывания плазмы крови определяется после активации контактных факторов без добавления тканевого тромбопластина, поэтому тест отражает общую эффективность внутреннего пути свертывания. Протромбиновое время свидетельствует об общей эффективности внешнего пути свертывания, так как время коагуляции плазмы крови определяется в присутствии оптимальной концентрации тромбопластина [4]. Исследования проводились по двум методикам разработанным для определения АЧТВ и ПТВ по изменению величины амплитуды и по изменению сдвига фаз, основанным на стандартных клинических методиках.

Проведение исследований АЧТВ и ПТВ происходит в несколько этапов:

- 1) подготовка реактивов;
- 2) перемешивание реактивов с плазмой;
- 3) регистрация образования фибринового сгустка.

При проведении исследований АЧТВ и ПТВ с помощью различных методик первых два этапа проводят согласно стандартизированным методикам кефалин-каолинового времени плазм по Саен и Квику [5]. Для измерения АЧТВ используется набор для определения АЧТВ K-350 (PZ Cormay S.A. (Польша)) и Calcium Chloride 0,025 M (HemosIL), а для измерений ПТВ – набор для определения протромбинового времени K-251 (PZ Cormay S.A. (Польша)).

Для проведения исследований параметров гемостаза по изменению величины амплитуды ультразвукового сигнала, прошедшего через кювету с исследуемым образцом, был разработан

лабораторный макет (рис. 1), который состоит из генератора Г4-102 (1), двух пьезокерамических преобразователей прямоугольной формы (2,4), размещенных на одной оси на стенках полистирольной круглой кюветы (3), двухканального цифрового осциллографа С8-46/1 (5) и термостатируемого кюветного отделения (6).

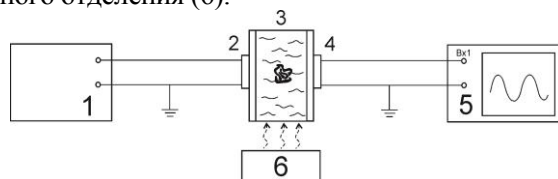


Рис. 1. Схема лабораторного макета для регистрации момента образования фибринового сгустка в плазме крови по изменению величины амплитуды УЗ

Электрический сигнал с генератора поступает на входной пьезопреобразователь, где преобразуется в ультразвук. Ультразвуковой сигнал проходит через кювету с исследуемым образцом плазмы крови и преобразуется обратно в электрический сигнал выходным пьезопреобразователем. Значение амплитуды выходного сигнала фиксируется на экране осциллографа. При образовании фибринового сгустка в плазме крови изменяется акустическое сопротивление исследуемой среды и уменьшается амплитуда выходного сигнала. Уменьшение величины амплитуды выходного сигнала свидетельствует об образовании фибринового сгустка.

Для определения сдвига фаз ультразвукового сигнала, прошедшего через кювету с исследуемым образцом плазмы крови по отношению к зондирующему сигналу при исследованиях параметров гемостаза в лабораторном макете использовался двухканальный осциллограф (рис. 2). На вход первого канала осциллографа подавался зондирующий сигнал, на вход второго канала сигнал прошедший через кювету. На экране осциллографа измерялся временной сдвиг между двумя сигналами и производился расчет сдвига фаз.

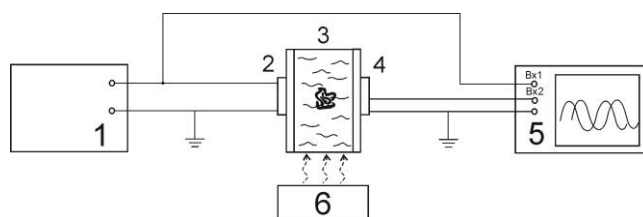


Рис. 2. Схема лабораторного макета для регистрации момента образования фибринового сгустка в плазме крови по изменению сдвига фаз УЗ

Результаты и их обсуждение

Был проведен ряд исследований по измерению величины амплитуды выходного сигнала и сдвига фазы, с плазмой крови различных групп и резус факторов, в диапазоне от 100 кГц до 1800 кГц. В результате проведения измерений были получены усредненные характеристики изменения напряжения выходного сигнала на разных частотах и усредненные характеристики изменения сдвига фазы до наступления момента коагуляции и после него при проведении теста для определения АЧТВ (рис. 3, 5) и ПТВ (рис. 4, 6).

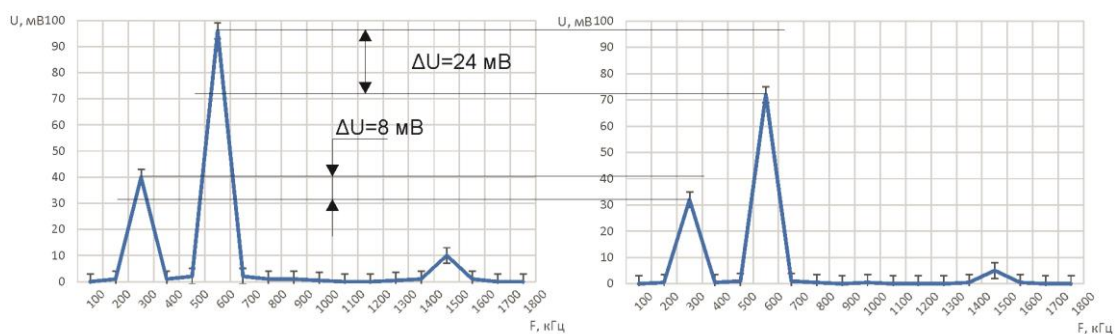


Рис. 3. Графики зависимости величины амплитуды от частоты до момента образования фибринового сгустка в плазме крови и после него при проведении теста АЧТВ

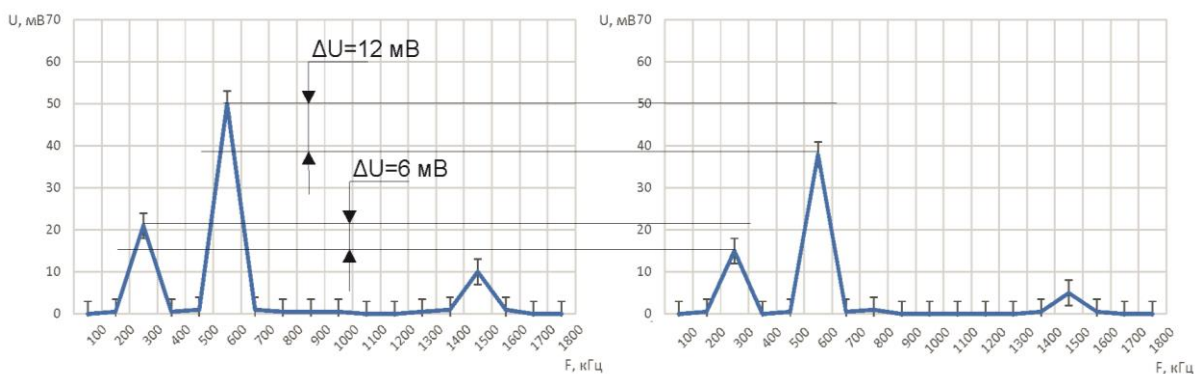


Рис. 4. Графики зависимости величины амплитуды от частоты до момента образования фибринового сгустка в плазме крови и после него при проведении теста ПТВ

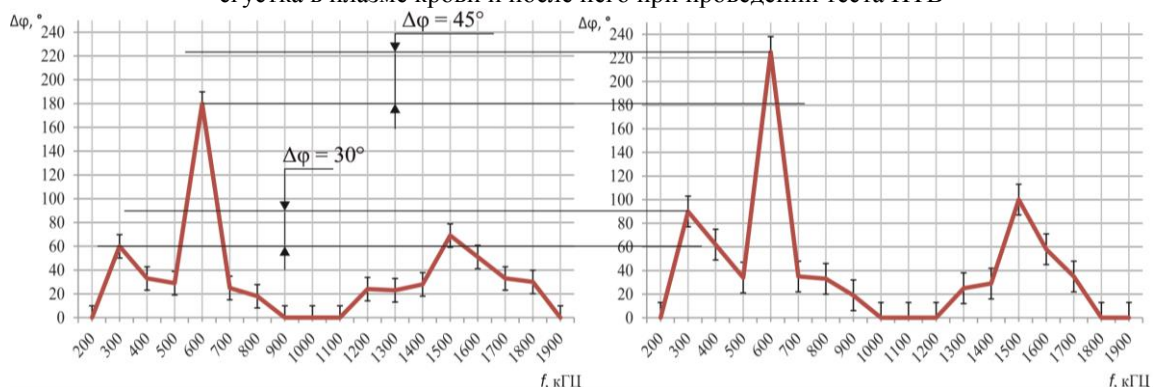


Рис. 5. Графики зависимости величины амплитуды от частоты до момента образования фибринового сгустка в плазме крови и после него при проведении теста АЧТВ

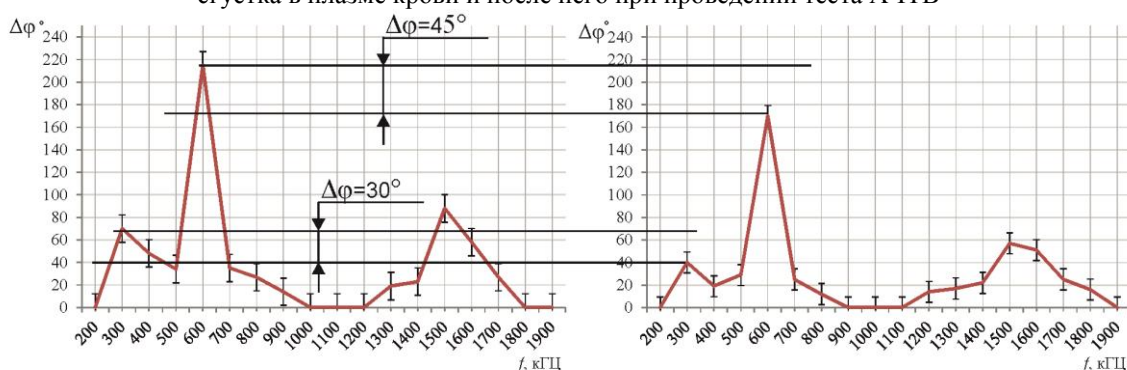


Рис. 6. Графики зависимости величины амплитуды от частоты до момента образования фибринового сгустка в плазме крови и после него при проведении теста ПТВ

На передаточных характеристиках максимальный пик наблюдается на частоте 600 кГц. Данный пик обусловлен тем, что резонансная частота пьезокерамических преобразователей прикрепленных к стенкам кюветы составляет 600 кГц и длина прохождения ультразвука в плазме кратна длине волны. Для проведения дальнейших исследований рекомендуется использовать соответственно частоту 600 кГц.

Из рис. 3 видно, что при проведении теста для определения АЧТВ до наступления момента коагуляции на частоте 600 кГц величина амплитуды выходного сигнала составляла 96 мВ, а после образования фибринового сгустка в плазме крови составила 72 мВ. Из рис. 4 видно, что при проведении теста для определения ПТВ величина амплитуды выходного сигнала до момента образования фибринового сгустка в плазме крови составляла 51 мВ, а после образования сгустка – 39 мВ. Таким образом, можно сделать вывод, что при образовании фибринового сгустка в исследуемой плазме крови происходит уменьшение величины амплитуды выходного сигнала на $20 \pm 5\%$.

Из характеристики, представленной на рис. 5, видно, что при проведении теста для определения АЧТВ на частоте 600 кГц величина сдвига фазы между зондирующим и выходным сигналом составляет 45°. При проведении теста для определения ПТВ сдвиг фазы на частоте 600 кГц так же составляет 45°. То есть при образовании фибринового сгустка в плазме крови сдвиг фазы изменяется на постоянную величину.

Заключение

Разработан способ для определения АЧТВ и ПТВ с помощью ультразвуковых колебаний, основанный на стандартных методиках кефалин-каолинового времени плазм по Саен и методу Квика. Суть способа заключается в прохождении ультразвука через плазму крови и фиксации сдвига фаз при образовании сгустка крови. Разработанные методики являются бесконтактными, но лишены основного недостатка существующих бесконтактных методик – работы только с оптически прозрачными материалами. Предлагаемые методики позволяют проводить исследования параметров гемостаза для цельной крови без погружения в пробу датчика и влияния на исследуемые параметры.

Установлена взаимосвязь между параметрами гемостаза и параметрами ультразвука. По результатам исследований установлено, что:

- при измерении АЧТВ и ПТВ на частоте 600 кГц величина сдвига фазы между зондирующим и выходным сигналом составляет 45°;

- при регистрации момента образования сгустка по изменению сдвига фазы, величина на которую изменяется сдвиг фазы остается постоянной, так же влияние интерференционных помех на величину сдвига фазы практически отсутствует, что повышает стабильность результатов измерения.

Предложенный способ, позволяющий проводить исследования параметров гемостаза (активированное частичное тромбопластиновое время и протромбиновое время) с помощью зондирования ультразвуковыми колебаниями, может использоваться при разработке новых приборов лабораторной диагностики системы гемостаза.

ULTRASONIC DETECTION METHOD OF BLOOD PLASMA FIBRIN CLOT FORMATION MOMENT

A.A. USHAKOVA, P.V. KAMLACH, V.M. BONDARIK

Abstract

The ultrasonic method for detecting of the fibrin clot formation during the coagulation tests is propose. To start clotting cascade in research APTT and PTV tests were used. The results of investigation for detecting fibrin clot formation by changing the amplitude and phase shift of the ultrasonic signal are presented.

Keywords: hemostatic system, clot formation, ultrasound, amplitude, phase displacement.

Список литературы

1. Долгов В.В., Свириг П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. Тверь, 2005.
2. Камлач П.В., Бондарик В.М., Дегтярев Ю.Г. // Изобретатель. 2012. № 10. С. 36–39.
3. Ушакова А.А., Камлач П.В., Бондарик В.М. // Матер. VIII Междунар. науч.-техн. конф. «Медэлектроника 2014. Средства медицинской электроники и новые медицинские технологии». Минск, 10–11 декабря 2014. С. 235–237.
4. Петрищева Н.Н., Папаян Л.П. Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний. СПб, 1999.
5. Зубовская Е.Т., Светлицкая С.Г. Система гемостаза. Теоретические основы и методы исследования. Минск, 2010.