

Определение времени коагуляции цельной крови методом корреляции лазерных спекл-изображений

Аннотация

Представлены результаты применения метода корреляции цифровых спекл-изображений для оценки времени коагуляции цельной цитратной крови. Разброс полученных значений времени коагуляции в экспериментах составил не более 25 % для условно здоровой выборки лабораторных животных. Показана возможность выявления патологий гемостаза посредством используемого метода на основе исследований нормальной и патологической плазмы крови. Обсуждается возможность создания нового универсального оптического коагулометра, анализирующего цитратную и нативную кровь, а также плазму крови. Работа по определению времени свертывания цитратной крови является промежуточной для перехода к анализу нативной крови.

Введение

Механизм свертывания крови играет ключевую роль в защите организма от случайных повреждений [1]. Заболевания системы гемостаза несут в себе значительный риск для нормальной жизни человека. Быстрое и точное определение механизмов свертывания крови остается актуальной задачей. Наиболее эффективным методом оценки состояния гемостаза является измерение времени коагуляции крови.

Оценка функционирования механизма коагуляции является рутинным процессом в клинической практике. Факторы коагуляции, регулирующие механизм свертывания, присутствуют в плазме крови [2], [3]. В традиционных лабораторных методах исследования используется плазма, извлеченная путем центрифугирования цельной цитратной крови, в которой заблокированы факторы свертывания, с последующей активацией фибринообразования стандартными реагентами [3]. Поэтому широко применяемые коагулометры не позволяют быстро оценить время свертывания и требуют большого количества крови для получения плазмы. Кроме того, элементы коагулометра находятся в контакте с образцом и могут влиять на образование фибринового сгустка. Поэтому востребованы методы и средства измерения времени свертывания при работе с цельной кровью, в том числе не контактирующие с образцом.

Одним из современных приборов для анализа времени свертывания цельной крови является тромбозастрограф [4], [5]. В работе [5] приведены результаты анализа цельной крови тромбозастрографом АРП-01М «Меднорд». Тромбозастрограф позволяет получить информацию о фазах свертывания крови с интегративной оценкой состояния звеньев гемостаза и суммарной фибринолитической активности. Объем анализа для этого прибора составляет 500 мкл, датчик контактирует с объектом исследования.

Метод корреляции лазерных спекл-изображений является оптическим методом, посредством которого возможно исследование динамики процессов, таких как смещение [6], [7], структурные изменения и скорость [8], механическое натяжение [9], путем анализа лазерных спеклов. В биомедицине спекл-методы нашли применение для измерения пульса [10], скорости микрососудистого кровотока [11], активности роста бактерий [12] и пр. Достоинством методов является отсутствие контакта с исследуемым образцом.

В работе [6] нами показана возможность применения метода корреляции цифровых спекл-изображений для анализа плазмы крови. В настоящей работе используется аналогичный подход для определения времени коагуляции цитратной крови лабораторных животных с использованием лабораторной установки, предложенной в работе [6]. Исследование возможности применения метода корреляции цифровых спекл-изображений для определения времени свертывания цитратной крови является промежуточным этапом для перехода к анализу нативной крови с использованием предложенного метода.

Материалы и методы

Основной задачей измерения времени коагуляции крови является определение отклонения значения от нормального. В работе [6] методом корреляции цифровых спекл-изображений определялось время фибринообразования в образцах нормальной плазмы крови. Для проверки применимости метода для исследования отклонений от нормального, в данной работе были проведены эксперименты с нормальной и патологической плазмой и реагентом «Техпластин» производства фирмы «Технология-стандарт» [13]. В медицинских учреждениях реагент «Техпластин» используется для определения протромбинового времени в лабораторных условиях.

Схема лабораторной установки, используемой в работе, представлена на рис. 1а. Параметры оптической схемы соответствовали работе [6]. Источником когерентного излучения служил He-Ne-лазер с мощностью излучения 5 мВт и длиной волны 632 нм.

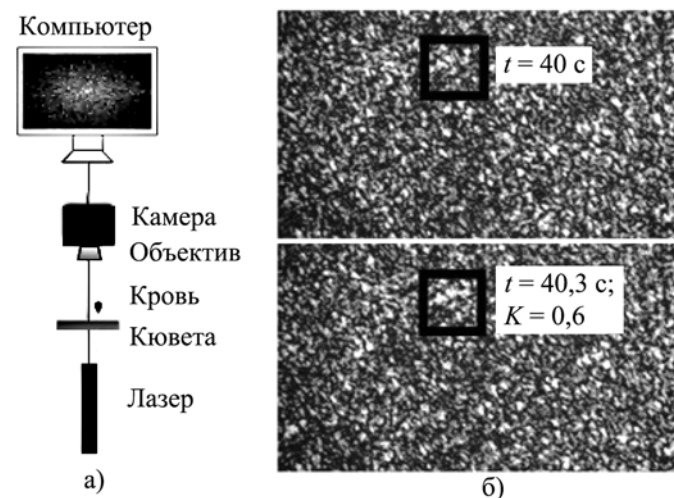


Рис. 1. Экспериментальная установка (а) и спекл-изображения образца крови (б), полученные в различные моменты времени в процессе коагуляции. Размер окна для исследования 200 × 200 пикселей

При исследовании плазмы крови источник освещал частично прозрачную пластиковую кювету, в которую помещали плазму объемом 50 мкл. Объем пробы был выбран минимальным согласно результатам работы [6]. Для активирования процесса фибринообразования в кювету добавляли 100 мкл реагента «Техпластин» в соответствии с рекомендациями производителя [13]. С целью равномерного освещения образца в работе [7] отмечалась необходимость применения диффузора, который располагали перед объектом на пути лазерного излучения. В данной работе использовалась кювета, изготовленная методом 3D-печати; таким образом, дно кюветы служило

диффузором. Цифровая камера регистрировала спекл-изображения в течение всего процесса свертывания. Характерный вид спекл-изображений показан на *рис. 1б*.

Согласно [10], спекл-изображения формируются в плоскости на некотором расстоянии от объекта исследования. Для проецирования изображений спеклов в этой плоскости на матрицу камеры используется объектив. В ходе исследования фокусное расстояние объектива настраивалось таким образом, чтобы получалось увеличенное спекл-изображение высокой четкости. Камера записывала спекл-изображения с частотой 30 кадр/с. Записанные изображения передавались в персональный компьютер, где осуществлялся расчет коэффициента корреляции с использованием программного обеспечения MATLAB. Расчет производился аналогично приведенному в работах [6], [7].

Исследование процесса свертывания нативной крови отличается от исследования плазмы крови. При контакте крови с воздухом в первый момент времени начинается процесс фибринообразования. Фибриновые сети становятся нерастворимыми и образуют плотный сгусток. В течение всего процесса свертывания замедляется скорость движения взвешенных частиц и форменных элементов крови. Это означает, что скорость изменения спекл-изображений будет замедляться с увеличением вязкости исследуемого образца. Чем больше размер фибринового сгустка, тем больше вязкость крови и меньше скорость изменения спекл-изображений. Время образования фибринового сгустка – это протромбиновое время, важнейший контролируемый параметр крови при проведении диагностики и лечения системы гемостаза.

При добавлении нативной крови в пробирку с цитратом натрия в крови блокируются ионы кальция и процесс коагуляции прекращается. Таким образом, цитрат натрия используется для блокировки свертывающей системы крови с целью дальнейшего ее анализа в лабораторных условиях. Для исследования свертывающей системы крови в полученную из цитратной крови плазму добавляют активатор свертывания и проводят необходимые исследования. В проведенных нами исследованиях использовалась цельная цитратная кровь и активатор свертываемости «Техпластин», который активирует процесс коагуляции. Рекомендованное соотношение объема аналита к объему реагента «Техпластин» нормировано и составляет 1:2. Таким образом, исследовалась возможность при-

менения метода корреляции цифровых спекл-изображений для анализа цельной крови.

Для проведения экспериментов с цельной кровью использовалась венозная кровь 10 тест-систем – белых крыс линии Wistar весом 180...250 г. Все тест-системы являлись условно здоровыми, без видимых нарушений жизнедеятельности и патологий внутренних органов. Животные содержались в виварии с соблюдением всех установленных норм. Исследование проводилось в соответствии с применимыми регуляторными требованиями РФ. Эвтаназия животных производилась методом цервикальной дислокации, что не противоречит Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

После извлечения нативная кровь помещалась в пробирки с цитратом натрия, блокирующим коагуляцию. Образцы каждой тест-системы исследовались 5 раз. Исследование цельной крови проводилось аналогично исследованию плазмы. Для анализа использовались 50 мкл крови и 100 мкл реагента «Техпластин».

Результаты исследования плазмы крови

На *рис. 2* представлены результаты анализа нормальной и патологической плазмы крови человека. Патологическая плазма обеднена тромбоцитами, что приводит к увеличению протромбинового времени. Коэффициент корреляции отражает соотношение двух последовательных спекл-изображений. Чем он ближе к единице, тем меньше различий между изображениями. В экспериментах с плазмой время завершения процесса фибринообразования определялось как момент, когда коэффициент корреляции достигал значения 0,95.

Согласно полученным данным, время образования фибринового сгустка нормальной плазмы составляет 17 с, а активный рост фибринового сгустка происходит с 13,5-й до 17-й с. Анализ патологической плазмы показал, что активный рост фибринового сгустка начинается с 24-й с, а протромбиновое время равно 27,5 с. Согласно данным, представленным в инструкции к реагентам [13], для нормальной плазмы протромбиновое время составляет 13...18 с. Для патологической плазмы протромбиновое время не нормируется, но оно превышает протромбиновое время нормальной плазмы, так как она обеднена тромбоцитами. Таким образом, метод корреляции цифровых спекл-изображений позволяет с высокой достовернос-

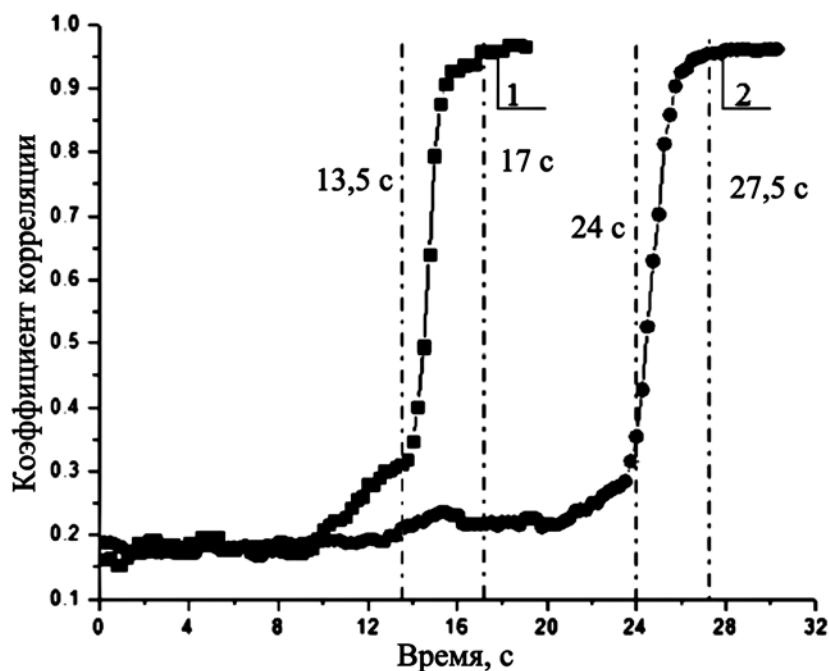


Рис. 2. Кривые зависимости коэффициента корреляции от времени образования фибринового сгустка для нормальной и патологической плазмы: 1 – нормальная плазма; 2 – патологическая плазма

тью отличать процессы свертывания нормальной и патологической плазмы, а значит, нормальное и патологическое состояния нативной или цитратной крови.

Результаты исследования цитратной крови

Зависимость коэффициента корреляции от времени для процесса коагуляции двух образцов цитратной крови показана на рис. 3. Время коагуляции определяется как период времени от 0 до t_1 (от 0 до t_2) и составляет 56 с для первого образца и 54 с для второго образца. Для случая плазмы на рис. 2 после достижения максимума коэффициент корреляции остается практически постоянным. Для случая с цельной кровью кривая коэффициента корреляции после достижения максимума может спадать или колебаться. Это связано с тем, что на поверхности образца после окончания процесса фибринообразования остается слой жидкости, который наблюдается визуально. В данном случае движение спеклов замедляется по окончании процесса фибринообразования, но не останавливается полностью из-за движения жидкости на поверхности. В момент времени, когда зависимость коэффициента корреляции достигает максимума, мы считаем, что процесс образования фибринового сгустка завершился, а зарегистрированное время достижения максимума является временем коагуляции. При исследовании времени коагуляции цитратной крови рассчитанный коэффициент корреляции достигает максимума при значении 0,7...0,8 (рис. 3).

В табл. 1 приведены значения среднего, максимального и минимального времени коагуляции для исследуемых образцов каждой из десяти тест-систем. Значения времени свертывания образцов, зависимости для которых показаны на рис. 3, обозначены знаком (*). Как следует из представленных данных, время свертывания у всех десяти животных различается, но

находится в диапазоне ($60,5 \pm 5$) с. Таким образом, нормальным временем коагуляции цитратной крови при использовании «Техпластина» в качестве активатора можно считать среднее значение по всем тест-системам, которое составляет 60,5 с.

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что все они верны с точностью более 90 % внутри группы, соответствующей одному животному, за исключением 1-го, 2-го, и 8-го животных. В этих случаях отклонение от среднего значения выборки достигает 17, 10 и 13 % соответственно. Следует отметить, что в нескольких опытах не было соблюдено рекомендованное объемное соотношение крови и цитрата натрия в пробирках: объем крови был меньше рекомендованного. Вследствие этого в данных экспериментах время свертывания больше, чем в экспериментах, выполненных в соответствии с рекомендациями.

С одной стороны, полученные результаты могут отражать действительное состояние тест-системы, с другой стороны, полученные отклонения могут являться ошибкой оператора или случайной ошибкой. При эвтаназии животного мог произойти скачок адреналина, что привело к сгущению крови. Появление ошибки изменений могло являться следствием неточного соотношения объема крови к объему цитрата натрия. Пробирки с цитратом натрия содержат фиксированное количество консерванта и рассчитаны на определенный объем крови, в частности, используемые в работе пробирки содержат 0,22 мл цитрата натрия и рассчитаны на объем крови 2 мл. Таким образом, если объем крови, взятой у животного, меньше 2 мл, то время свертывания, измеренное после активации, будет больше. Внешние вибрации во время исследования также создают помехи при формировании спекл-изображений.

Для верификации используемого метода были проведены контрольные эксперименты по исследованию свертываемос-

Таблица 1

Результаты исследования протромбинового времени

Протромбиновое время, с	Порядковый номер исследуемой тест-системы									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Среднее	52	57	75	63	54	60,5	61	59	63,5	60,5
Максимальное	56*	60	77	66	55	62	63	63	65	63
Минимальное	47	54*	72	60	53	59	59	55	62	58

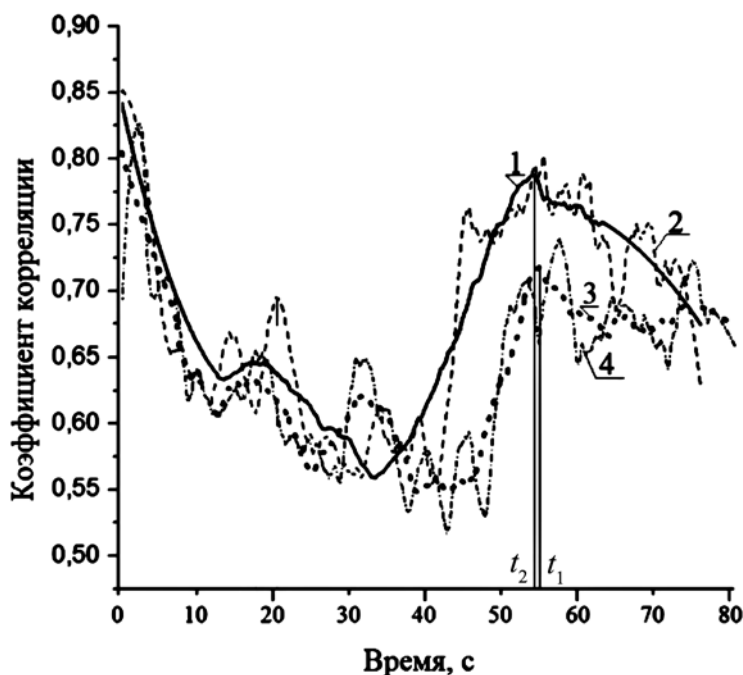


Рис. 3. Зависимость коэффициента корреляции от времени: 1 – аппроксимирующая кривая; 2 – расчетная кривая (тест-система 1); t_1 – момент окончания коагуляции для первого образца; 3 – аппроксимирующая кривая; 4 – расчетная кривая (тест-система 2); t_2 – момент окончания коагуляции для второго образца

ти цитратной крови методом тромбозластографии с использованием пьезотромбозластографа АРП-01М «Меднорд» [4]. Результаты двух контрольных экспериментов приведены в табл. 2. Отличие экспериментов 1 и 2 заключалось в различном соотношении крови/цитрат натрия. У одной тест-системы были взяты два образца нативной крови; объем первого образца соответствовал рекомендованному соотношению кровь/цитрат натрия. Второй образец имел примерно на 1/3 меньший объем крови при том же объеме цитрата натрия.

Таблица 2

Результаты контрольных экспериментов

Протромбиновое время, с	АРП-01М «Меднорд»	Метод корреляции спекл-изображений
Эксперимент 1	60	65
Эксперимент 2	84	90

Полученные результаты показали, что расхождение значений протромбинового времени, определенного методом корреляции спекл-изображений и тромбозластографии, составило 8 % для эксперимента 1 и 7 % для эксперимента 2.

Заключение

Полученные результаты показывают возможность применения метода корреляции цифровых спекл-изображений для анализа времени коагуляции цельной крови. Разброс полученных значений времени коагуляции в экспериментах составил не более 20 % для условно здоровой выборки лабораторных животных. Принимая во внимание, что разброс результатов измерений мог быть вызван как естественными причинами, так и случайной ошибкой, реальная погрешность измерений времени коагуляции цельной крови данным методом составляет менее 20 %. Контрольные эксперименты с использованием метода тромбозластографии показали высокую степень соответствия и позволяют сделать вывод о применимости метода корреляции цифровых спекл-изображений для оценки времени свертывания цельной цитратной крови.

На основе метода корреляции цифровых спекл-изображений возможно создание нового универсального оптического коагулометра, анализирующего цельную цитратную и нативную кровь, а также плазму крови. Предлагаемое решение позволит проводить анализ свертывания крови в реальном времени, в том числе вести прикроватный мониторинг.

Авторы выражают благодарность профессору СибГМУ Тютрину И.И. и сотрудникам компании «Меднорд» за интерес к работе и полезные дискуссии.

Список литературы:

1. Kumar P., Clark M.L. Clinical Medicine / 6th Edition. – Saunders Ltd., 2005.
2. Levy J.H., Dutton R.P., Hemphill J.C., Shander A., Cooper D., Pajdas M.J., Kessler C.M., Holcomb J.B., Lawson J.H. Multidisciplinary approach to the challenge of hemostasis // Anesthesia & Analgesia. 2010. № 2. PP. 354-364.
3. Карпищенко А.И., Андреев В.А., Антонов В.Г. и др. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы. Руководство для врачей / Под ред. А.И. Карпищенко. 3-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 696 с.
4. Меднорд-Техника. Производство и продажа медицинской техники [электронный ресурс] / <http://mednord-t.ru/> (дата обращения: 15.09.2019).
5. Соловьев М.А., Тютрин И.И., Удут В.В., Клименкова В.Ф. Опыт диагностики и мониторинга критических нарушений гемостаза // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2013. № 4. С. 55-60.

6. Ли Л., Сытник Ю.Д., Губарев Ф.А., Пеккер Я.С. Оценка свертываемости крови по корреляционным характеристикам лазерных спекл-изображений // Медицинская техника. 2018. № 3. С. 23-25.
7. Li L., Bloschkina A.I., Gubarev F.A. Liquid transparency changing dynamics estimation by means of digital speckle correlation // 2017 Progress in Electromagnetics Research Symposium – Spring (PIERS). St. Petersburg, 22-25 May 2017. PP. 3172-3175.
8. Zhang P., Peterson S.D., Porfiri M. Combined particle image velocimetry/digital image correlation for load estimation // Experimental Thermal and Fluid Science. 2018. Vol. 100. PP. 207-221.
9. Hild F., Bouterf A., Forquin P., Roux F.S. On the use of digital image correlation for the analysis of the dynamic behavior of materials. – The Micro-World Observed by Ultra High-Speed Cameras. 2017. PP. 185-206.
10. Zalevsky Z., Beiderman Y., Margalit I., Gingold S., Teicher M., Mico V., Garcia J. Simultaneous remote extraction of multiple speech sources and heart beats from secondary speckles pattern // Optics Express. 2009. № 24. PP. 21566-21580.
11. Khaksari K., Kirkpatrick S.J. Laser speckle contrast imaging is sensitive to advective flux // Journal of Biomedical Optics. 2016. Vol. 21 (7). PP. 076001.1-8.
12. Ramirez-Miquet E.E. Digital imaging information technology for biospeckle activity assessment relative to bacteria and parasites // Lasers in Medical Science. 2017. Vol. 32 (6). PP. 1375-1386.
13. Технология стандарт. Техпластин-тест (100 опр.) [электронный ресурс] / http://www.tehnologia-standart.ru/catalog/tekhplastin_test/tekhplastin_test_100_opr_.html (дата обращения: 15.09.2019).

*Юлия Дмитриевна Люшневская,
магистрант,
Федор Александрович Губарев,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
Исследовательская школа химических
и биомедицинских технологий,
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»,
г. Томск,
Линь Ли,
канд. техн. наук, доцент,
факультет электротехники и управления,
Ляонинский технический университет,
Китай,
Алексей Валерьевич Носарев,
д-р мед. наук, профессор,
Виктория Сергеевна Гусакова,
аспирант,
кафедра биофизики
и функциональной диагностики,
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
г. Томск,
e-mail: juliasytnik55@yandex.ru*