

ОПТИЧНИЙ МЕТОД ДОСЛІДЖЕННЯ ДИНАМІКИ ЗГОРТАННЯ КРОВІ

Запропоновано об'єктивний метод визначення часу формування тромбу у плазмі крові, що базується на дослідженнях зміни її оптичної густини у процесі рекальцифікації і при дії тромбіну.

The objective method of determining the time of forming the thrombus in blood plasma, which is based on the investigation of change of blood's optical density in the process of recalcification under the influence of thrombase is suggested in the paper.

Ферментативна система згортання крові забезпечує зупинку кровотечі шляхом формування фібринних тромбів, підтримку цілісності кровоносних судин і рідкого стану крові [1,2]. Основи вчення про згортання крові розроблені А.А.Шмідтом. Він сформулював теорію двофазного згортання крові, згідно з якою у першій фазі у результаті ферментативних реакцій виникає тромбін, а у другій під впливом тромбіну фібриноген плазми крові перетворюється у фібрин. У 1904 р. Моравітц, у 1952 р. Салібі та Оврен у 1954р. відкрили утворення тромбопластів у плазмі й обґрунтували роль іонів кальцію у перетворенні протромбіну у тромбін. Це дозволило сформулювати трифазну теорію згортання крові, згідно з якою процес протікає послідовно: у першій фазі відбувається формування активної протромбінази, у другій – утворення тромбіну, у третій – поява фібрину у вигляді щільного згустку (тромбу), який є нерозчинним у воді білком. У тромбі міститься також багато еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів.

За схемою Макфарлена згортання крові протікає за типом каскаду, тобто відбувається послідовне перетворення неактивного фактора (профермента) в активний фермент, який активує наступний фактор. Отже, згідно з сучасними уявленнями, згортання крові – складний, багатовступневий механізм, що діє за принципом зворотного зв'язку. При цьому в процесі такого перетворення збільшується швидкість кожного наступного етапу і кількість активізованої речовини.

У загальному випадку в процесі згортання крові беруть участь компоненти плазми, тромбоцитів і тканин, які називаються факторами

згортання крові. Методи дослідження системи згортання крові використовуються для з'ясування причин кровотечі, тромбозів і тромбогеморагій. Вони базуються на визначенні часу згортання, під яким розуміють проміжок часу, протягом якого кров, розміщена у пробірці при температурі 37°C, утворює згусток. Найбільш розповсюдженими методами, які мають орієнтувальне значення, є час рекальцифікації плазми та Оврена тромботест. У першому випадку розрізняють час рекальцифікації при відсутності у плазмі тромбоцитів і інших формених елементів і час рекальцифікації тромбоцитарної плазми. При цьому до досліджуваної плазми додають дозовану кількість розчину CaCl_2 (на 1 мл плазми 0,2 мл 0,025 М розчину); фіксують час утворення згустка (норма 70-110 с). Збільшення часу свідчить про схильність до кровотечі, скорочення – до гіперкоагуляції. Більш точним методом є метод визначення тромбінового часу. У цьому випадку до 1 мл тромбоцитарної плазми доливають 0,1 мл розчину тромбіну (10 од. NiH) і фіксують час утворення згустка (норма 9-15 с).

У практиці клінічних досліджень час утворення тромбу визначається, як правило, візуально, що не виключає похибок за рахунок суб'єктивного фактора (індивідуальних особливостей оператора). Тому важливою є розробка об'єктивних методів визначення цього часу, що й стало завданням даної роботи. Запропонований метод базується на дослідженні зміни оптичних властивостей плазми при доливанні до неї розчинів CaCl_2 , або тромбіну людини.

Оптична густина плазми для фіксованої довжини хвилі λ при одноразовому розсіянні:

Таблиця 1. Значення оптичної густини D для різних типів плазми.

λ , нм	600	610	620	630	640	650	660
без тромбоцитів	0,20	0,17	0,15	0,112	0,103	0,09	0,075
з тромбоцитами	0,72	0,68	0,60	0,52	0,48	0,44	0,42

Таблиця 2. Значення швидкостей реакцій рекальцифікації V_p , с⁻¹.

Донор	Плазма без тромбоцитів	Тромбоциторна плазма
№1	$6,92 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$
№2	$6,7 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$
№3	$10,3 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$
№4	$8,2 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$

$$D = D_{\Pi} + D_{\text{роз}}, \quad (1)$$

де D_{Π} – оптична густина, зумовлена поглинанням, а $D_{\text{роз}}$ – складова, зумовлена наявністю розсіяння на оптичних неоднорідностях плазми. Методика роздільного визначення цих складових описана у [3]. Там же показано, що як плазма, так і форменні елементи у ній в області $\lambda > 600$ нм мають незначне поглинання, тому значення D у цій області зумовлене в основному складовою $D_{\text{роз}}$. При відсутності розсіяння (наприклад, у плазмі без форменних елементів) оптична густина невелика, $D \leq 0,1$. Це значить, що при розробці оптичного методу дослідження динаміки згортання крові, коли при зародженні згустка у плазмі починають з'являтися додаткові розсіюючі центри за рахунок утворення фібрину, вигідно використовувати саме область спектра з $\lambda > 600$ нм.

Вимірювання проводилися у паралельному пучку монохроматичного випромінювання на спектрофотометрі СФ-46, в якого фотометрична головка замінена на фотопомножувач з реєстрацією сигналу цифровим вольтметром. Досліджувана плазма поміщалася у кювету об'ємом 4 мл і товщиною $l = 1$ см, "нульовим" розчином служила дистильована вода у такій же кюветі. Вимірювались коефіцієнти пропускання τ , а оптична густина розраховувалася за формулою $D = -\lg \tau$. У таблиці 1 приведені деякі результати подібних досліджень для випадку плазми без тромбоцитів і для тромбоцитарної плазми. Видно, що для плазми з тромбоцитами в області $\lambda > 600$ нм оптична густина – суттєвою, внаслідок розсіяння на тромбоцитах, водночас для плазми без форменних елементів D – незначною, особливо для $\lambda = 600$ нм. Для дослідження динаміки згортання крові використовувалися три типи реакцій:

- реакція рекальцифікації плазми без тромбоцитів;
- реакція рекальцифікації плазми з тромбоцитами;
- тромбінова реакція на плазмі з тромбоцитами.

Відповідні зразки плазми готувалися з крові здорових пацієнтів (донорів) на Чернівецькій станції переливання крові. Динаміка згортання крові досліджувалася при фіксованій довжині хвилі $\lambda = 660$ нм. Спочатку визначалося значення D стосовно "нульового" розчину, потім до зразка плазми доливали відповідний реагент у залежності від типу реакції (це відповідає часу $t = 0$) і через певні проміжки часу $t = 3-10$ с фіксувалася зміна оптичної густини плазми доти, доки значення D вже практично не змінюється. Величина часового інтервалу контролю значень D визначається швидкістю цих змін: чим більша швидкість, тим менший проміжок t . Кожна із зазначених типів реакцій проводилася на 4-5 зразках плазми крові донорів. Характерні криві зміни оптичної густини для деяких зразків наведені на рис.1 (для реакції рекальцифікації плазми без тромбоцитів), рис.2 (для реакції рекальцифікації плазми з тромбоцитами) і рис.3 (для тромбінової реакції). Видно, що у процесі рекальцифікації плазми можна чітко зафіксувати час початку утворення згустка t_0 , який відповідає часу початку зростання оптичної густини внаслідок виникнення додаткових центрів розсіяння: для плазми без тромбоцитів t_0 знаходиться у межах від 90 до 120 с, а для плазми з тромбоцитами – 60-120 с. Крім того, можна визначити і повний час утворення і фіксації згустка $t_K = 110-195$ с.

Графіки рис.1 і рис.2 дають можливість визначити середню швидкість протікання відповідної реакції рекальцифікації

$$V_p = \frac{\Delta D}{\Delta t}, \quad (2)$$

де $\Delta D = D_K - D_0$, а $\Delta t = t_K - t_0$. Тут D_0 – оптична густина, що відповідає часу t_0 , а D_K – відповідно для часу t_K закінчення формування тромбу.

У табл.2 наведені значення V_p у декількох донорів для кожної із реакцій рекальцифікації. Видно, що для тромбоцитарної плазми швидкість утворення згустка у більшості випадків суттєво вища, ніж для плазми без тромбоцитів.

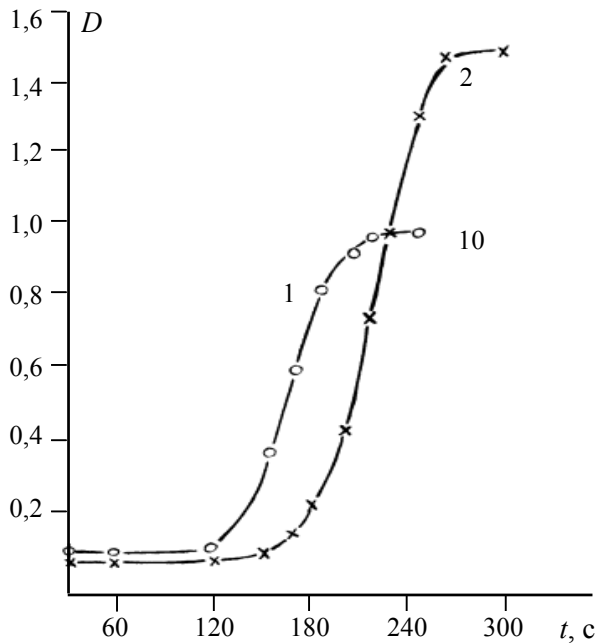


Рис.1. Залежність оптичної густини від часу протікання реакції рекальцифікації плазми без тромбоцитів: донор №1 (1), донор №3 (2).

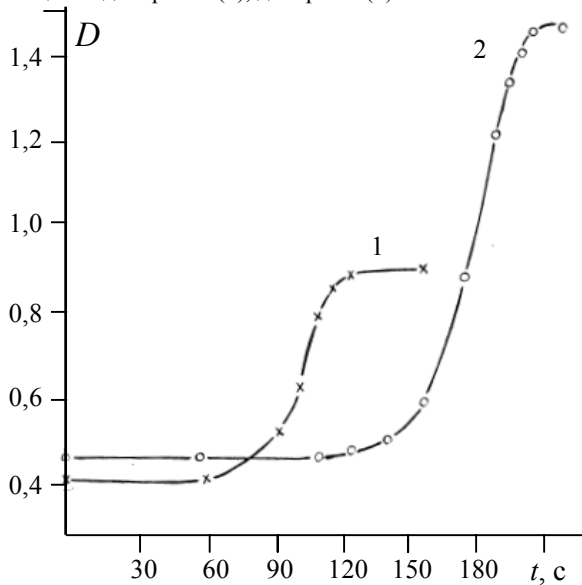


Рис.2. Залежність оптичної густини від часу протікання реакції рекальцифікації тромбоцитарної плазми: донор №2 (1), донор №4 (2).

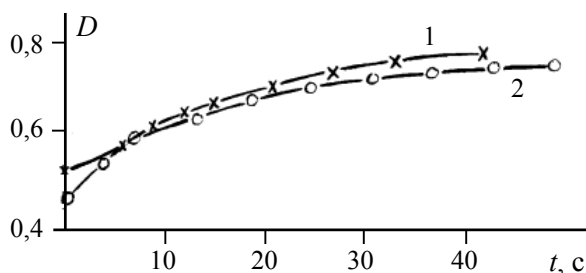


Рис.3. Залежність оптичної густини від часу протікання тромбінової реакції: донор №4 (1), донор №1 (2).

На рис.3 видно, що тромбіновий час значно менший від часу рекальцифікації: вже через 10-15 с практично закінчується утворення згустка. У цьому випадку внаслідок особливостей установки (можливість виміряти перше значення оптичної густини не раніше, ніж через 4-5 с. після додавання у плазму тромбіну) не вдається зареєструвати час початку формування тромбу й відповідно кількісно оцінити швидкість тромбінової реакції. Це вдається зробити, якщо автоматизувати систему реєстрації зміни оптичної густини у процесі дослідження динаміки згортання крові, що й буде проведено у майбутньому.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Маркосян А.А. Физиология свертывания крови. - М.: Медицина, 1966.
2. Кудряшов Б.А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. - М.: Медицина, 1975.
3. Гумінецький С.Г., Решетнік І.В., Григорішин П.М., Гнатюк І.Е. Спектрофотометричні властивості білків і формених елементів крові // Науковий вісник ЧДУ. Вип. 22: Інженерно-технічні науки. - Чернівці: ЧДУ, 1998. - С.61-69.