

*М.В.Шаплавський\**, *М.С.Гавриляк\*\**,  
*П.М.Григорішин\**, *І.М.Рубленік\**,  
*О.Г.Шайко-Шайковський\*\**, *С.Г.Гумінецький\*\**, *П.П.Максимяк\*\**

## ОПТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗГОРТАННЯ КРОВІ

\*Буковинська державна медична академія,  
 \*\*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича

**Резюме.** У роботі висвітлюються дослідження динаміки коефіцієнта світлопропускання плазми крові в процесі рекальцифікації та тромбінової реакції згортання крові в прямому та розсіяному когерентному випромінюванні. Установлені часові характеристики пускових реакцій тромбоутворення у здорових донорів.

**Ключові слова:** когерентне випромінювання, плазма крові, рекальцифікація, тромбінова реакція.

**Вступ.** У наших попередніх роботах [1,2] розглянуті процеси тромбоутворення в плазмі крові (реакція рекальцифікації та тромбінова реакція), що базувалися на спостереженні динаміки зміни коефіцієнта світлопропускання плазми крові в прямому потоці когерентного випромінювання з довжиною хвилі  $\lambda = 633$  нм. Відомо, що світлопоглинання крові і плазми в такому потоці за відсутності коагуляції немає, тому зміна зазначеного коефіцієнта мала бути викликана виникненням світлорозсіювання внаслідок тромбоутворення [3]. Не виключено, що при додаванні до плазми тромбіну чи розчину  $\text{CaCl}_2$  коефіцієнт світлопропускання системи може змінюватися внаслідок кінетичного руху згаданих компонентів у момент змішування реагентів.

**Мета дослідження.** Диференціювати вплив механічного перемішування зазначених реагентів системи на зміни динаміки кривих світлопропускання, що спостерігались у попередніх дослідженнях [1,2], а також впливу тромбоутворення на динаміку оптичних змін світлорозсіювання випромінювання під кутом  $2-3^\circ$  від геометричної осі променя. Останнє використовується для визначення швидкості руху компонентів гетерогенної системи [4].

**Матеріал і методи.** Досліджувалася кров чотирьох донорів, з якої була приготовлена тромбодитарна і чиста плазма, що була поділена на 42 біологічні проби (шість статистичних груп із семи варіант). Методи досліджень висвітлені нами раніше [1,2]. Новим є те, що одночасно проводилося дослідження параметрів спекл-поля, тому схема установки оптичного аналізу дещо ускладнилась. Вона наведена на рис.1.

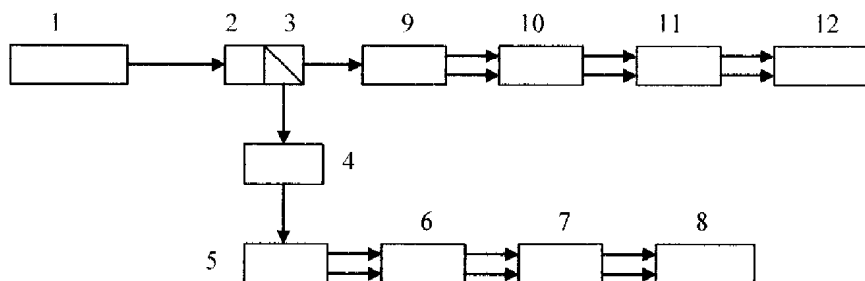


Рис.1 Функціональна схема установки

Примітка. 1 – квантовий генератор з довжиною хвилі  $\lambda = 633$  нм;  
 2 – кювета з досліджуваною плазмою крові; 3 – світлороздільна призма; 4 – об'єктив;  
 5 – фотодіод; 9 – фотопомножувач; 6, 10 – перетворювач струм-напруга;  
 7, 11 – аналогово-цифровий перетворювач (АЦП); 8, 12 – персональні комп'ютери  
 (реєстрація оптичної інформації).

Ланцюг 4 – 8 призначений для вимірювання інтенсивності сигналу в прямому світловому потоці, а ланцюг 9 – 12 - у розсіяній частині світлового потоку (спекл-полі)

У кювету 2, що містить плазму, додаються дозовані кількості тромбіну чи розчину  $\text{CaCl}_2$  (залежно від типу реакції тромбоутворення), одночасно запускаються системи вимірювання сигналів світлопропускання. Його зміни за часом візуалізуються на екранах комп'ютерів, зазнають математичного аналізу і роздруковуються у вигляді графіків. Вперше створена комп'ютерна програма відеосигналу спекл-поля, аналіз якої складає окреме питання, що буде висвітлене пізніше.

© М.В.Шаплавський, М.С.Гавриляк, П.М.Григорішин,  
 І.М.Рубленік, О.Г.Шайко-Шайковський, С.Г.Гумінецький, П.П.Максимяк, 2004

**Результати дослідження та їх обговорення.** При дослідженні в прямому світловому потоці для виявлення впливу кінетики перемішування реагентів на динаміку коефіцієнта світлопропускання плазми крові в кювету з плазмою додавали дозовану кількість (0,2 мл) дистильованої води. У цьому разі одержували діаграму зміни інтенсивності лазерного світлового потоку, що наведена на рис.2. Вірогідна дія механічного перемішування проявляється в перші 5-6с після додавання дистильованої води, потім система стабілізується і світлопропускання залишається постійним. Отже, навіть за дії перемішування коефіцієнт світлопропускання плазми крові в процесі тромбоутворення може бути зареєстрований у "чистому" вигляді після 6с від початку додавання в плазму крові реагенту (тромбіну чи розчину  $\text{CaCl}_2$ ).

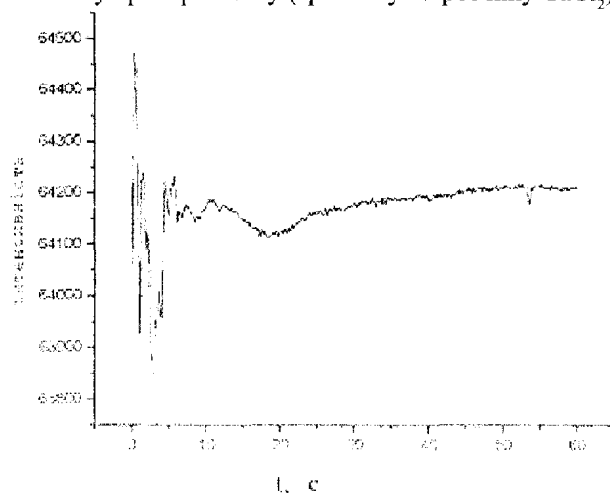


Рис. 2. Динаміка коефіцієнта світлопропускання плазми крові при змішуванні з дистилатом

Оскільки, у відповідності до даних нашої попередньої роботи [1], при реакції рекальцифікації тромб починає зароджуватися не раніше терміну 30 с дії реагенту, то виходить, що кінетика перемішування реагентів суттєво не впливає на оптичні характеристики процесу тромбоутворення у вказаних умовах дослідження.

Слід зауважити, що при відтворенні тромбінової реакції зародження тромбу розпочинається водночас із додаванням тромбіну в тромбоцитарну плазму. Тому тут вірогідно виявлятиметься вплив кінетики змішування реагентів. Зазначене ілюструється на рис. 3 і 4.

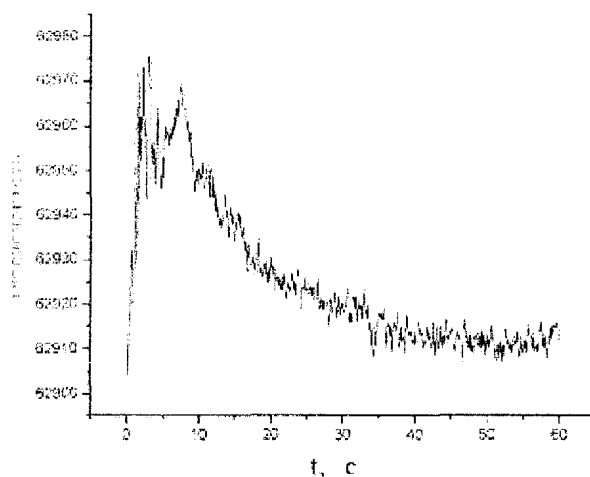


Рис. 3. Динаміка коефіцієнта світлопропускання плазми крові за тромбінової реакції

Зокрема на рис. 3 наведена типова діаграма зміни інтенсивності пропускання лазерного променя тромбоцитарною плазмою крові донора третьої групи в процесі тромбінової реакції. Видно, що в перші 5-6с кінетика руху максимальна, а далі процес тромбоутворення візуалізується в „чистому” вигляді, завершуючись на 30-35с дії

реагенту, коли інтенсивність пропускання стабілізується. На рис. 4 процес тромбоутворення у плазмі донора другої групи крові в ході реакції рекальцифікації починається через 55-60с після початку дії реагенту і закінчується на терміні  $\approx 200$ с.

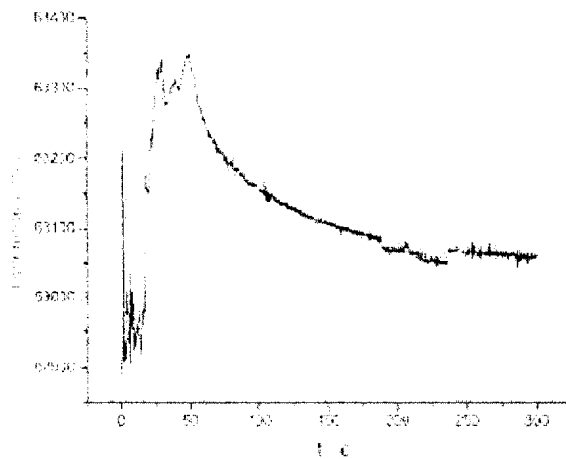


Рис. 4. Динаміка коефіцієнта світлопропускання плазми крові за реакції рекальцифікації

Перш ніж навести результати досліджень згортання крові в розсіяному когерентному випромінюванні, ми мусимо коротко охарактеризувати його фізичні властивості, які стали вихідними для схеми експерименту, що не має аналогів. Розсіяння когерентного оптичного випромінювання складними динамічними системами призводить до просторово-часової модуляції інтенсивності поля, внаслідок інтерференційного складання парціальних хвиль із випадковими амплітудами та фазами. Часові кореляції поля розсіяного випромінювання визначаються швидкістю руху елементів системи та геометрією експерименту і є предметом дослідження доплерівської спектроскопії [4,5]. Методи такого оптичного детектування, що детально обговорюються в ряді оглядів [6], стали основою нового напрямку – спектроскопії оптичного змішування, що успішно застосовується у фізичних та хімічних дослідженнях, біології та медицині.

Для опису таких систем можна застосувати теорію стохастичних та хаотичних коливань [7]. Постає важливе питання про характер просторово-часової хаотизації поля розсіяного випромінювання, про кількісні діагностичні зв'язки між стохастичними характеристиками середовища та поля, а також про доцільність стохастичного підходу при визначенні структурних та динамічних характеристик середовищ із броунівським рухом.

У роботі ми наводимо дослідження розсіяння когерентного випромінювання за вищезазначених умов експерименту. На прикладі максимального показника Ляпунова досліджена залежність часової хаотизації поля розсіяного випромінювання в процесі тромбінової реакції та реакції рекальцифікації.

Показники Ляпунова відіграють важливу роль при вивченні динамічних систем. Вони характеризують середню швидкість експоненціальної розбіжності близьких фазових траєкторій. Якщо  $d_0$  – початкова відстань між двома вихідними точками фазових траєкторій, то через час  $t$  відстань між траєкторіями, що виходять із цих точок, буде такою:

$$d(t) = d_0 e^{\lambda t} \quad (1)$$

Величину  $\lambda$  називають показником Ляпунова [7]. Кожна динамічна система характеризується спектром показників Ляпунова  $\lambda_i$  ( $i=1,2,\dots,n$ ), де  $n$  – кількість диференціальних рівнянь, необхідних для опису системи. Для експериментальних даних, отриманих при спостереженні за динамічними системами, наявність додатного показника Ляпунова може бути ознакою існування хаосу в системі. Загалом, для хаотичної системи характерна розбіжність фазових траєкторій в одних напрямках та їх збіжність в інших. Тобто, у хаотичній системі обов'язково є як додатні, так і від'ємні показники Ляпунова. При цьому сума усіх показників від'ємна, тобто, ступінь збігання траєкторій перевищує ступінь розбіжності. Якщо ця умова не виконується, динамічна система нестійка, а поведінка – легкоідентифікована. Таким чином, у більшості випадків досить обчислити тільки максимальний показник Ляпунова. Додатне значення максимального показника Ляпунова вказує на можливість існування хаосу в системі, а величина цього показника характеризує ступінь хаотичності.

Більшість алгоритмів для розрахунку максимального показника Ляпунова мають деякі недоліки, зокрема, вони потребують значної кількості експериментальних даних, складної програми реалізації алгоритму і значного об'єму роботи [7]. Користуючись теоретичними викладками, висвітленими раніше [8], ми склали алгоритм та програму розрахунку максимального показника Ляпунова, позбавлену вказаних недоліків.

Першим кроком алгоритму є реконструкція фазової траєкторії. Фазова траєкторія зображається у вигляді матриці  $X$ , кожний стовпчик якої являє собою вектор у фазовому просторі:

$$X = [\bar{X}_1 \quad \bar{X}_2 \quad \dots \quad \bar{X}_M]^T$$

де  $\bar{X}_i$  - стан системи в момент часу  $i$ . Для серії  $N$  вимірів  $\{x_1, x_2, \dots, x_N\}$  кожне  $\bar{X}_i$  визначається як:

$$\bar{X}_i = [x_i \quad x_{i-J} \quad \dots \quad x_{i+(m-1)J}]$$

де  $J$  - часова затримка (затримка реконструкції),  $m$  - розмірність вкладання.

Розмірність вкладання звичайно оцінюється за теоремою Такенса, відповідно до якої  $m > 2n$ , де  $n$  - порядок системи. Однак описаний метод часто дає правильний результат при низьких значеннях  $m$ . Затримка реконструкції обирається рівною часу, за яким автокореляційна функція зменшується на  $1 - 1/e$  від свого початкового значення.

Після реконструкції фазової траєкторії алгоритмом передбачено пошук найближчого "сусіда" для кожної точки траєкторії. Під найближчим "сусідом" розуміємо точку  $\bar{X}_j$  з мінімальною віддаллю  $d_j(0)$  від неї до опорної точки  $\bar{X}_i$ :

$$d_j(0) = \min_{\bar{X}_j} \|\bar{X}_j - \bar{X}_i\|$$

Пара "сусідніх" точок розбігається з часом експоненційно:

$$d_j(i) \approx C_j e^{\lambda_1(i-m)}$$

де  $\lambda_1$  - максимальний показник Ляпунова. Його можна знайти як нахил лінії, визначеної за формулою:

$$y(i) = \frac{1}{\Delta t} \langle \ln d_j(i) \rangle \quad (2)$$

Тут  $\langle \dots \rangle$  означає середнє значення по всіх  $j$ .

На основі цього алгоритму складена програма мовою Pascal. Для тестування програми застосовувались модельні та експериментальні хаотичні сигнали. Як модельний сигнал використовувалось відображення Хенона:

$$x_{i+1} = 1 - ax_i^2 + y_i; \quad y_{i+1} = bx_i; \quad a = 1.4; \quad b = 0.3.$$

Результати розрахунку  $y(i)$  для відображення Хенона наведені на рис. 5. Нахил графіка розраховувався методом найменших квадратів. Отримано значення  $\lambda_1 = 0.403$ , що майже збігається з теоретичним значенням  $\lambda_1 = 0.418$ .

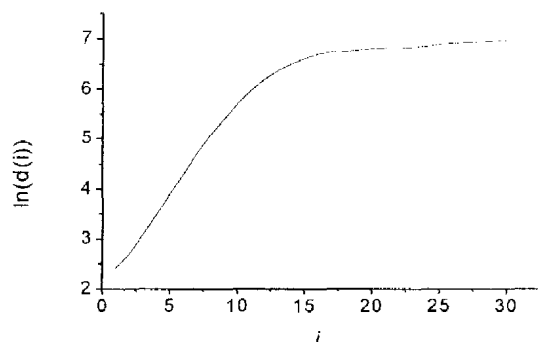


Рис. 5. Результати розрахунку  $y(i)$  для відображення Хенона

Експериментальні виміри флуктуацій інтенсивності випромінювання розсіяного на зразках плазми крові наведено на рис. 6а та 7а. Визначення динамічного показника Ляпунова цих процесів наведено на рис. 6б та рис. 7б. В обох випадках спостерігається зменшення  $\lambda_1$  до постійного значення. Проте конкретні значення залежностей для тромбоцитарної плазми та плазми без тромбоцитів суттєво відрізняються за формування тромбу.

У результаті проведення експерименту встановлено, що максимальний показник Ляпунова часових флуктуацій інтенсивності поля, розсіяного тромбоцитарною плазмою та плазмою без тромбоцитів за тромбінової реакції крові додатній, тобто, система характеризується часовим терміном нестабільності, що прагне до рівноваги.

Поведінка максимального показника Ляпунова часових флуктуацій інтенсивності випромінювання є об'єктивним критерієм перебігу часу тромбінової реакції.

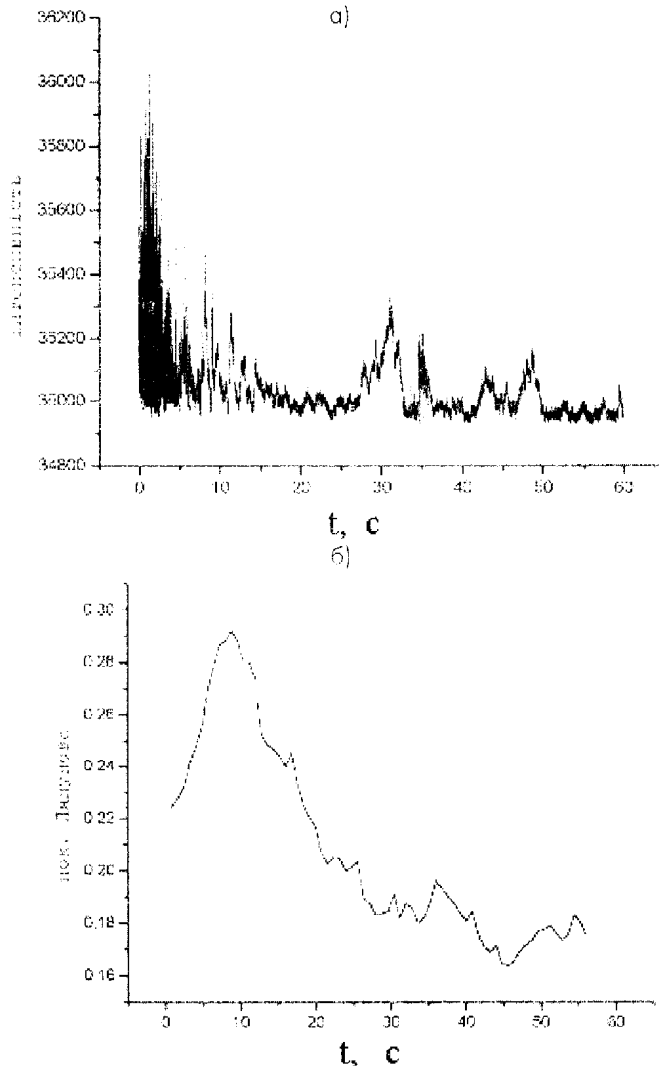


Рис.6. Тромбоцитарна плазма крові  
(а – розподіл інтенсивності флуктуацій;  
б – залежність максимального показника Ляпунова від часу)

На нашу думку, кінетика компартментів реагуючої системи зумовлена афінними реакціями біоспецифічних реагентів, які провокують їх рух за вектором хімічної взаємодії в напрямку проміжних продуктів реакцій, що за термодинамічними характеристиками (кінетикою реакцій) значно переважають енергію механічного перемішування в системі. Додавання води у вищезначені системи плазми неминуче пов'язано з гідратацією її гідрофільних складових, а отже, вочевидь здатне до зміни енергопросторових оптично активних характеристик динамічної гетерогенності системи.

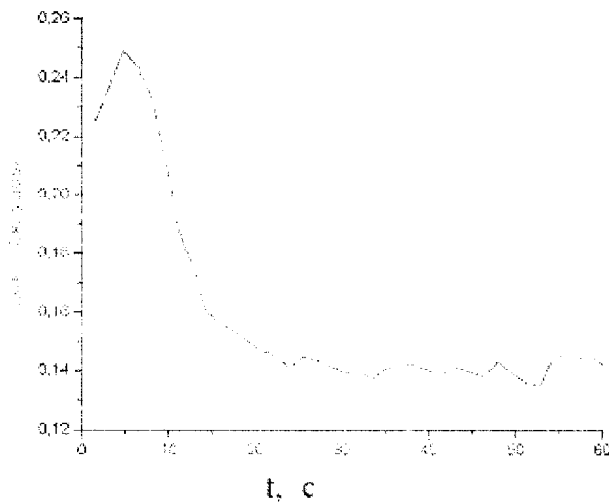
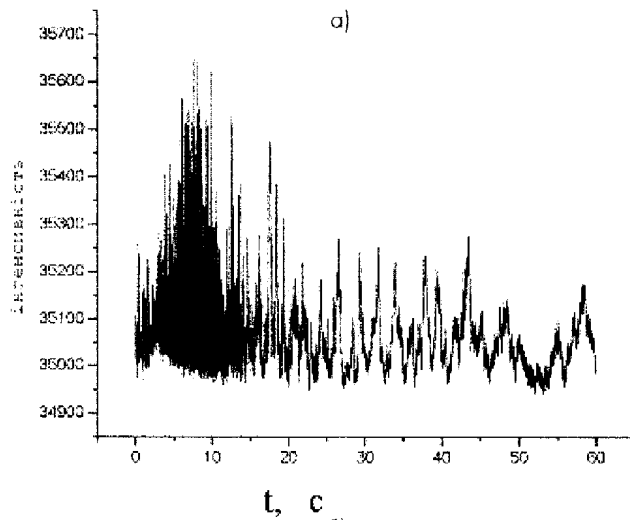


Рис.7. Плазма крові

(а – розподіл інтенсивності флуктуацій;

б – залежність максимального показника Ляпунова від часу)

Незважаючи на початковий рівень наведених тут досліджень, є всі підстави висловити припущення, що каскад реакцій згортання крові може бути проідентифікованим сучасними оптичними методами аналізу хоча б на тій основі, що кожен з проміжних продуктів реакції має притаманні йому оптично активні характеристики. Біохімічна схема експериментів та технічні рішення аналітичних установок – справа часу.

#### Висновки.

1. При дослідженні динаміки згортання крові в прямому потоці лазерного випромінювання основним параметром, що характеризує даний процес, є динаміка його інтенсивності після проходження кювети з досліджуваною плазмою.

2. Динамічні криві коефіцієнта світлопропускання крові можуть бути використані в експерименті і клініці для вивчення тромбоутворення.

3. Каскадна динаміка показника Ляпунова є відображенням градацій хаотичності системи, градацій, що відображають динаміку проміжних продуктів реакції згортання крові в напрямку термостабілізації системи, що характеризується функцією тромбоутворення.

**Перспективи подальших досліджень.** Найближчою перспективою є систематизоване вивчення оптичних характеристик динаміки тромбоутворення в донорів всіх груп крові (популяційних флуктуацій тромбоутворення в нормі).

**Література.** 1. Гумінецький С.Г., Котик Г.М., Кухарчук О.П. Оптичний метод дослідження динаміки згортання крові // Науковий вісник ЧНУ. - 2000 - Вип. 86. - С. 45-47. 2. Пішак В.П., Гумінецький С.Г., Григорішин П.М., Ломанець В.С. Спосіб визначення часу тромбоутворення у плазмі крові // Патент України. UA58370, Бюл. №7, 2003. 3. Пішак О.В., Гумінецький С.Г., Пішак В.П., Григорішин П.М. Дослідження поглинаючих і розсіюючих властивостей плазми крові і сечі // Бук. мед. вісник. - 1998. - Т. 2, N1. - С. 113-121. 4. Vikram C. S. Particle Field Holography. - Cambridge: Cambridge University Press, 1992. - 460 p. 5. Syvitski P.M. Principles, methods and application of particle size analysis. - Cambridge: Cambridge University Press, 1991. - 366 p. 6. Спектроскопія оптичного сміщення і кореляція фотонів / Под ред. Г.Камминса і Э.Пайка: Пер. с англ. - М.: Мир, 1978. - 584 с. 7. Неймарк Ю.И., Ланда П.С. Стохастические и хаотические колебания. - М.: Наука, 1987. 8. Rosenstein M.T., Collins J.J., Luca Carlo J. De. A practical method for calculating largest Lyapunov exponents from small data sets // MA 02215. - Boston University, 1992. - 65 p.

## OPTICAL METHODS OF STUDYING BLOOD CLOTTING

*M.V.Shaplavs'kyi, M.S.Havryliak, P.M.Hrygoryshyn, I.M.Rublenyk,  
O.G.Shaiko-Shaikovsky, S.G.Huminets'kyi, P.P.Maksymiak*

**Abstract.** The paper ascertains a study of the dynamics of the coefficient of blood plasma light transmission in the process of recalcification and the thrombin reaction of blood clotting in direct and scattered coherent radiation. The time responses of starting reactions for thrombogenesis in healthy subjects have been evaluated.

**Key words:** coherent radiation, blood plasma, recalcification, thrombin reaction.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)  
U.Fedkovich National University (Chernivtsi)

Buk. Med. Herald. - 2004. - Vol.8. №4.- P.168-174

Надійшло до редакції 28.07.2004 року