

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ



ЕДИЧНА



ЕАБІЛІТАЦІЯ



УРОРТОЛОГІЯ



ІЗІОТЕРАПІЯ

*Medical  
Rehabilitation  
Balneology  
Physiotherapy*

*Медицинская  
Реабилитация  
Курортология  
Физиотерапия*

- НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЖУРНАЛ
- ЗАСНОВАНО У 1994 р.
- ВИХОДИТЬ 4 РАЗИ НА РІК
- ЖОВТЕНЬ—ГРУДЕНЬ

*Журнал зареєстрований*

*в Госкомиздате України 30.11. 1994 г.*

*Свидетельство: серия КВ № 1092.*

4 (8) '96

*Одесса*



УДК 612.1:615.849.19:616-073.584

Ю. И. БАЖОРА, Е. Я. КАРПОВСКИЙ, В. Н. ЗАПОРОЖАН,  
В. И. КРЕСЮН, Л. А. НОСКИН, В. С. СОКОЛОВСКИЙ,  
Д. Ю. АНДРОНОВ, О. Ф. ПРОКУДА

**Лазерная корреляционная спектроскопия в изучении гомеостаза:  
ее возможности и перспективы применения в медицине.  
(Сообщение 1)**

*Одесский государственный медицинский университет, г. Одесса*

*В роботі викладені принципи, на яких базується новий метод дослідження біологічних рідин — лазерна кореляційна спектроскопія (ЛКС). Пояснено математичний апарат, який дозволяє отримати об'єктивну інформацію спектроскопії. Наведені переваги ЛКС перед іншими традиційними методами дослідження гомеостазу плазми (сироватки) крові.*

Санаторно-курортное лечение — важный этап на пути реабилитации больных, страдающих различными заболеваниями. Как и на этапах клинического и поликлинического лечения здесь требуются современные методы диагностики, прогноза течения заболевания, а также оценки эффективности проводимого лечения. Одним из таких методов может стать лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС), которая позволяет получить интегральный показатель, характеризующий состояние плазмы (сыворотки) крови.

ЛКС дает оценку изменениям спектральных характеристик монохроматического когерентного излучения, в результате светорассеяния, при прохождении через дисперсную систему. При взаимодействии лазерного луча с коллоидными частицами, находящимися в броуновском движении, происходит расширение спектра света. Форма линий спектра, в данном случае, характеризует дисперсный состав системы [1].

ЛКС является современным, отличающимся высокой разрешающей способностью, экспрессностью и полной автоматизацией, методом исследования дисперсных систем различной природы, которые содержат светорассеивающие частицы величиной от 1 до 10000 нм. В монодисперсных системах ЛКС позволяет, с высокой точностью, определить константы диффузии частиц, на основе

которых, в свою очередь, рассчитываются их гидродинамические радиусы. Точность и надежность измерения размеров частиц, при этом, сопоставима с данными электронной микроскопии [26].

С точки зрения рациональности технических решений, наилучшим в настоящее время признается оптический квантовый генератор (лазер). В отличие от других известных природных и искусственных источников света, лазерное излучение является не самопроизвольным, а индуцированным. Это обеспечивает лазеру идеальные характеристики с точки зрения корреляционной спектроскопии:

— когерентность (регулярность в пространстве и во времени);

— монохроматичность (излучение происходит, практически, на одной частоте и на одной длине волны).

Благодаря перечисленным свойствам, луч лазера управляем; в нем можно сконцентрировать необходимую энергию для генерации опорного сигнала. Тогда общий принцип оптических генераторов может быть конкретизирован в виде схемы (рис. 1) гетеродинного измерения в корреляционной спектроскопии [5, 9]. Луч лазера (Л) разделяется с помощью светоделительной пластины (П) на два, один из которых (1) используется для формирования рассеянного, под некоторым углом, пучка света, а второй (2) — явля-



ется опорным. Спектр частот (или длин волн) рассеянного пучка света отличается от падающего. При смещении опорного и рассеянного пучков света на фотодетекторе ( $\Phi$ ) возникает интерференционная картина. Так как частотные сдвиги в спектре рассеянного света обусловлены стохастическим движением частиц в растворе, интерференционная картина также стохастически меняется во времени, что, в свою очередь, вызывает подобные колебания фототока относительно некоторого среднего значения. Статистика изменений величины фототока однозначно связана с корреляционной функцией электромагнитного поля рассеянного света.

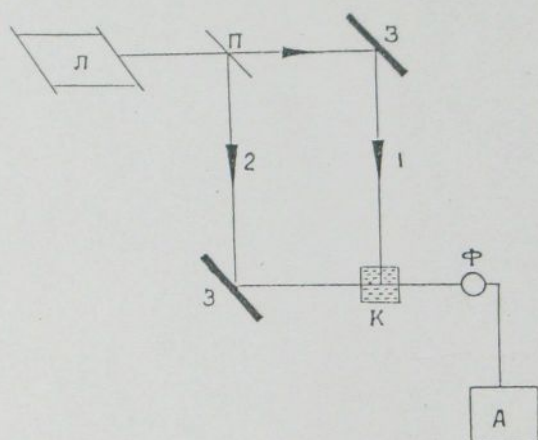


Рис. 1. Схема гетеродинамного детектирования лазерного луча. Л — гелий-неоновый лазер; П — светоделительная пластинка; З — зеркало; К — кювета; А — анализатор; Ф — фотозумножитель.

Таким образом, по описанной схеме (рис. 1) непосредственно измеряются флуктуации фототока на выходе фотозумножителя ( $\Phi$ ), как результат биений гармоник электромагнитных полей при их суперпозиции и сосредоточении в низкочастотной области спектра, что удобно анализировать современными методами. Поскольку в  $\Phi$  попадает также опорное излучение, такой вариант схемы измерения, по аналогии с радиотехническими супергетеродинами, получил название гетеродинамной.

Метод ЛКС с успехом применяют в биологических исследованиях, однако, в ограниченных пределах — для субмолекулярного изучения го-

могенных биологических сред, когда анализу подвергаются отдельные, предварительно выделенные фракции. В растворах и взвешях исследовали содержание желатина [10, 12], глобулинов [14], казеина [11], ДНК [13], липопротеидов [4].

Для решения фундаментальных и прикладных вопросов медицины большой интерес представляет изучение нативных биологических жидкостей (плазмы, сыворотки крови и др.) без какой-либо предварительной их обработки. До недавнего времени такие исследования не проводились в связи с отсутствием адекватных методов математической обработки спектров квазиупругого рассеяния света в многокомпонентных полидисперсных системах.

Поскольку исследователя интересуют характеристики каждого из случайных процессов в отдельности, возникает задача разложения спектральной кривой на аддитивные вклады различной природы. Основная трудность, при этом, — полидисперсность рассеивателей. Подобная задача относится к классу обратных задач спектрального анализа с плохо обусловленной матрицей.

Известны три различных подхода к решению обратной задачи [1, 2, 9].

Первый подход, называемый, обычно, методом прямой подгонки [1, 5], заключается в задании предполагаемого математического вида функции распределения частиц по размерам, и оптимизационном поиске параметров этого распределения. Недостаток этого подхода — потеря, в ряде случаев, информации об истинном виде функции распределения.

Второй подход, наиболее часто применяемый, называется методом кумулянтов [1] и заключается в последовательном разложении функции по ее центральным моментам. Такой подход позволяет полностью использовать всю экспериментальную информацию, но, при этом, параметры распределения, вычисляемые по центральным моментам, достаточно сложно интерпретировать.

Третий подход к обработке корреляционных функций основан на методе регуляризации [3], применение которого позволяет получить функ-



цию распределения светорассеивающих частиц по их размерам в форме гистограммы (рис. 2). Этот подход сегодня представляется наиболее предпочтительным с точки зрения как полноты использования экспериментальных данных, так и возможности достаточно простой интерпретации результатов обработки.

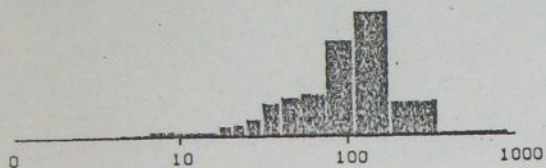


Рис. 2. Усредненная гистограмма плазмы крови клинически здоровых людей. По вертикали: вклад частиц различного диаметра в светорассеяние. По горизонтали: размеры частиц в нм, вычисляемые в рамках моделей жестких сфер.

С целью выявления общности и различий полученных гистограмм распределений, по заранее заданным признакам проводится их групповое сравнение с помощью программы "Многомерный классификатор" [3], в которой использованы методы распознавания образов путем кластерного анализа данных в многомерном пространстве.

Каждая из гистограмм распределения частиц по размерам состоит из  $N$  (например,  $N=32$ ) столбцов, ширина которых логарифмически увеличивается при переходе от наиболее мелких к более крупным.

"Многомерный классификатор" представляет каждую гистограмму в виде точки  $N$ -мерного пространства, координаты которой определяются относительными весами столбцов гистограммы. Далее происходит редукция размерности пространства координат до пяти, причем, в качестве новых координат используются 5 первых центральных моментов распределения. В этих координатах выполняется сравнение групп спектров, предварительно отобранных врачом на основании тех или иных признаков, выделенных при логическом анализе. Например, при исследовании гомеостаза человека такими признаками могут служить физиологические или клинические характеристики (пол, возраст, группа крови, наличие того или иного заболе-

вания, проведение того или иного лечения и т. д.).

Результаты сравнения групп лазерных корреляционных спектров представляются "Многомерным классификатором" в виде классификационной карты (рис. 3), на которой каждому спектру соответствует точка, полученная при проецировании из пятимерного пространства на плоскость, где выбранное распределение на группы максимально достоверно по статистическим критериям. Масштабы по осям даны в относительных единицах. Классификационный алгоритм обработки результатов измерений направлен на статистически достоверное сравнение спектров, входящих в группы, объединенные общим признаком между собой, и представление результатов в наглядном и удобном виде. Критерием различия между двумя группами на классификационной карте следует считать их удаленность друг от друга, а также величину области перекрытия.

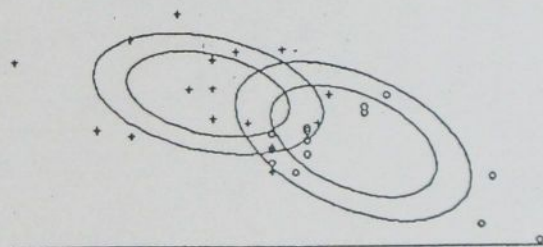


Рис. 3. Классификационная карта сравнения гистограмм плазмы доноров I и II групп крови АВО. o — доноры группы I крови; + — доноры группы II крови.

Существование области перекрытия неизбежно ввиду неоднородности групп и трудностей, связанных с критерием отбора. Модельные эксперименты показали, что для групп, формируемых произвольным образом, применение классификатора дает, практически, сплошное перекрытие и разделения не наблюдается. Следует также отметить, что статистическая достоверность результатов классификационной обработки материала возрастает с увеличением числа спектров в группах.

Сложность обсуждаемого подхода связана с тем, что объемно регистрируемая информация проецируется на заданные координаты плоскости.



В этом случае относительная информативность достигается только при сравнительном, попарном анализе референтных групп. Причем, для совокупности точек, априорно относимых к одной группе, должна определяться область доверительных интервалов.

С учетом пуассоновского распределения флуктуаций отдельных точек, области доверительных интервалов соответствуют эллипсам (плоскостное сечение объемного пуассоновского распределения), при этом внутренний эллипс включает точки спектров, которые принадлежат к данной совокупности с 90%-ой достоверностью, а наружный — с 70%-ой.

При данном подходе, на заданные координаты плоскости проецируются многомерные координаты спектра. Отсюда следует, что, при проекции точек из многомерного пространства на плоскость, в зону определенной совокупности могут попадать и некоторые точки, не принадлежащие ей. Другими словами, статистически значимые различия, при таком визуальном плоскостном анализе, принадлежат только тем наблюдениям, которые выходят за границы доверительных интервалов. С другой стороны, точки, которые находятся в плоскости описываемого эллипса, могут не принадлежать к данной совокупности.

В свете вышеуказанного, понятно, что классификационные карты дают только приближенную визуальную оценку степени сходства или различия групп. Точные результаты многомерного статистического анализа отражаются в виде классификационных таблиц, характеризующих вероятности распределения точек в многомерном пространстве по группам.

Рассмотрим принцип организации подобных таблиц (рис. 4). Например, нас интересует сходство доноров 1 и 2 групп крови. Для анализа данных по группе, надо найти соответствующий столбец в классификационной таблице. Вероятности нахождения точек этой группы в соответствующих областях многомерного пространства отражаются числами на пересечении столбца и соответствующих строк. Так, в нашем случае 82% доноров со 2 группой крови попадают в зону, отвечающую

месту нахождения в этой области пространства доноров данной группы крови (это отражает однородность самой группы), 7% — попадают в область нахождения доноров с 1 группой крови. При этом, зона "else" характеризует точки, не попадающие ни в одну из рассмотренных групп. В качестве статистического критерия зоны "else", обычно, выбирают величину, равную 10% от общей дисперсии всей рассматриваемой совокупности точек в многомерном пространстве.

|      |     |      |      |
|------|-----|------|------|
|      |     | дон2 | дон1 |
| else | 10% | 11%  | 8%   |
| дон2 | 44% | 82%  | 44%  |
| дон1 | 46% | 7%   | 48%  |

Рис. 4. Классификационная таблица сравнения ЛК-спектров доноров с I и II группами крови. Условные обозначения: дон1 — доноры I группы крови ABO; дон2 — доноры II группы крови ABO; else — атипичные случаи.

Альтернативным способом составления классификационной таблицы является непосредственное указание на количество точек, попадающих в ту или иную группу. При этом, сумма чисел в столбце составляет общее количество точек, принадлежащих к данной группе.

Этот подход успешно применяется при решении практических задач ЛКС. Однако, существуют трудности, ограничивающие возможности корректного применения многомерного классификатора гистограмм. В первую очередь, следует выделить необходимость выполнения условия Старджесса при построении гистограмм:

$$\Delta r = \frac{\Gamma_{\max} - \Gamma_{\min}}{1 + 3,3 \lg N}$$

где N — число точек наблюдений;

$\Gamma_{\max}$  и  $\Gamma_{\min}$  — соответственно максимальный и минимальный размеры радиусов светорассеивающих частиц;

$\Delta r$  — шаг (дискретность) частиц по оси абсцисс.



Для увеличения статистической достоверности результатов классификации необходимо стремиться к увеличению числа спектров в группах. Отсюда возникает противоречие между условием Старджесса и требованиями к достоверности результатов классификации.

Разрешение этого противоречия может быть достигнуто за счет нового подхода к задаче классификации гистограмм, использующего идеи теории нечетких множеств [7], а именно, алгебры нечетких чисел (L-R) типа, определенных на интервале  $[0, \gamma_{\max}]$ . Нечеткое число (L-R) типа может быть задано с помощью функции принадлежности (ФП) следующим образом:

$$\mu_a(r) = \begin{cases} L((a-r)/\gamma_{\min}), & r < a; \gamma_{\min} > 0, \\ 1, & r = a; \\ R((r-a)/\gamma_{\max}), & r > a; \gamma_{\max} > \gamma_{\min}, \end{cases}$$

где  $L$  и  $R$  — невозрастающие функции на множестве неотрицательных действительных чисел;

$a$  — среднее значение (или мода) для анализируемой гистограммы;

$\gamma_{\max}$  и  $\gamma_{\min}$  — соответственно, максимальный и минимальный размеры радиусов светорассеивающих частиц.

Нечеткое число обычно записывается в виде тройки  $\langle a, \gamma_{\min}, \gamma_{\max} \rangle$

Рассмотрим пример построения ФП нечеткого числа по гистограмме (рис. 5).

На рис. 5 отмечены точки  $\gamma_{\min}$  и  $\gamma_{\max}$ , что позволяет задать число (L-R) типа с помощью ФП, изображенной сплошной линией на гистограмме. Данный пример иллюстрирует построение ФП для "хорошей" гистограммы. На практике часто встречаются "плохие" гистограммы, имеющие "разрывы", "хвосты", а также мультимодальную форму. Для построения ФП в этих случаях используется понятие  $\alpha$ -среза, т. е. нечеткое множество спектров разлагается на систему  $\alpha$ -уровней множеств [7].

В медико-биологических исследованиях для задания  $\alpha$ -среза обычно используют значение границ доверительных интервалов. В простейшем случае принимают  $\alpha = \sigma$ , где  $\sigma$  — среднее квадратическое отклонение измеряемого показателя.

Определим операцию сравнения

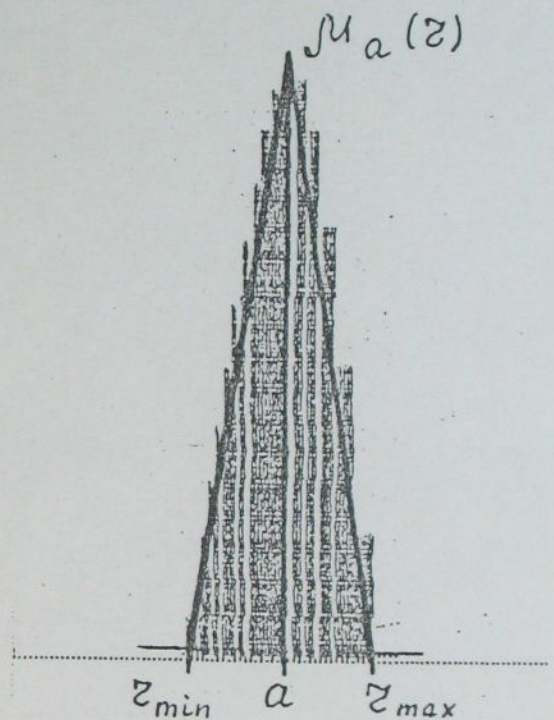


Рис. 5. Построение функции принадлежности треугольного вида по гистограмме. Обозначения в тексте.

двух треугольных образов гистограмм, заданных нечеткими числами (L-R) типа. В нижней части рис. 6 построены треугольные функции принадлежности  $\mu_a$  и  $\mu_b$ , соответственно, для первой и второй гистограмм. Принцип построения показан пунктирными линиями.

Для сравнения двух гистограмм введен индекс сходства, равный:

$$I = S/Q,$$

где  $S$  — площадь треугольника  $\Delta_{a_1 b_2 b_3}$ ;

$Q$  — сумма площадей треугольников  $\Delta_{b_1 b_2 b_3}$  и  $\Delta_{a_1 a_2 a_3}$  за вычетом площади  $S$ .

При  $I=1$  считается, что наблюдается нечеткое сходство двух сравниваемых гистограмм, при  $I=0$  — нечеткое сходство не наблюдается.

Предлагаемый индекс принципиально не имеет тех недостатков, которые были отмечены выше для многомерного классификатора. Это позволяет использовать индекс для попарного сравнения гистограмм при малых объемах исходных данных, и переходить к многомерной классификации по мере накопления ин-



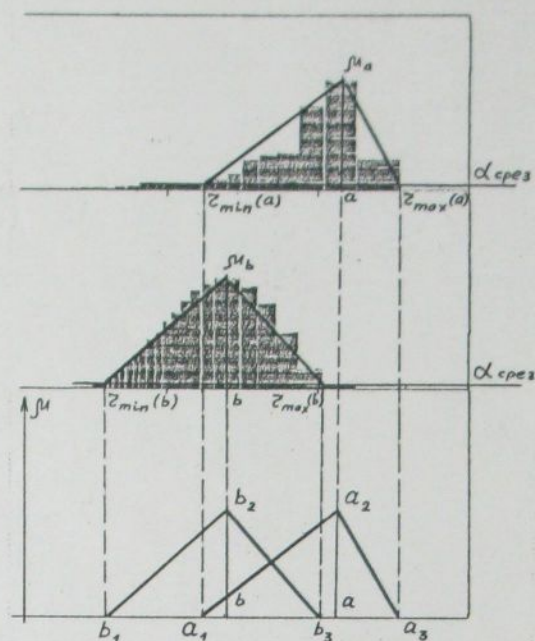


Рис. 6. Сравнение двух нечетких треугольных образов гистограмм. Обозначения в тексте.

формации (когда соблюдается условие Старджесса). Достоверность решений, принимаемых на основе индекса, оценивается величиной  $\alpha$ -среза, а для измерения состоятельности принятых решений можно использовать параметр  $\delta = \sqrt{I(1-I)}$ .

Это обстоятельство дало большие преимущества ЛКС в сравнении с фракционными методами исследования (хроматографией, ультрацентрифугированием и др.), позволяющее изучать нативные биологические образцы и измерять интегральные межмолекулярные взаимодействия, а также оценивать агрегационное равновесие между низко- и высокомо-

лекулярными комплексами и другими компонентами биологической жидкости, и зафиксировать мультипараметрические конформационные изменения в исследуемой системе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вентцель Е. С. Теория вероятностей. — М.: Наука, 1968. — 426 с.
2. Джонсон Жд. Статистические методы обработки данных. — М.: Мир, 1986. — 316 с.
3. Лазерная корреляционная спектроскопия крови: Методические рекомендации /ОГМУ; Сост.: Ю. И. Бажора, В. С. Соколовский, В. И. Кресюн и др. — Одесса, 1995. — 20 с.
4. Лозовский В. Т., Шмелев Г. Е., Носкин В. А. //Биофизика. — 1987. — Т. 32, № 2. — С. 285-291.
5. Лебедев А. Д., Левчук Ю. Н., Ломакин А. В., Носкин В. А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. — К.: Наукова думка, 1987. — 256 с.
6. Ломакин А. В., Носкин В. А., Розенберг О. А., Шмелев Г. Е. //Молекулярная биология. — 1983. — Т. 17, №2. — С. 249-257.
7. Нечеткие множества /Под ред. Д. А. Поспелова. — М.: Наука, 1986. — 214 с.
8. Приезжев А. В., Тучин В. В., Шубочкин Л. П. Лазерная диагностика в биологии и медицине. — М.: Наука, 1989. — 126 с.
9. Спектроскопия оптического смещения и корреляция фотонов /Под ред. Г. Камминса, Э. Пайка. — М.: Мир, 1978. — 583 с.
10. Amis S., Jannray P., Ferry J. //Macromolecules. — 1983. — Vol. 16, № 6. — P. 441-446.
11. Horn D., Dalgleish D. //Enr. Biophys. — 1985. — Vol. 11, № 4. — P. 249-258.
12. Hwand I., Cummins H. //J. Chem. Phys. — 1982. — Vol. 77, № 2. — P. 616-627.
13. Kam Z., Borochoy N. //Biopolymers. — 1981. — Vol. 20, №12. — P. 2671-2690.
14. Swenke K., Sohuts M. //J. Peptid. Protein Res. — 1982. — Vol. 16, № 1. — P. 12-18.

Поступила 15.05.96.

#### LASER CORRELATIONAL SPECTROSCOPY IN HOMEOSTASIS STUDIES: ITS POSSIBILITIES AND PROSPECTS OF USAGE IN MEDICINE (Report 1)

Yu. I. Bazhora, Ye. Ye. Karpovsky, V. N. Zaporozhan, V. I. Kresyun,  
L. A. Noskin, V. S. Sokolovsky, D. Yu. Andronov, O. F. Prokuda

#### S U M M A R Y

The paper explains the principles on which the new method of biological fluid studies is based, this method being termed the laser correlational spectroscopy (LCS). The mathematical rationale which allows the researcher to obtain objective

spectroscopical information is presented. The LCS advantages as to other traditional research methods for homeostasis are being listed as compared to other traditional research methods of blood plasma (serum) homeostasis.