

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
УКРАИНЫ  
ОДЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**ЛАЗЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ  
СПЕКТРОСКОПИЯ МОЧИ**

**(методические рекомендации)**

**Одесса - 2000 год**

УДК 616-003.261-073.584:615.849.19

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
УКРАИНЫ  
ОДЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**ЛАЗЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ  
СПЕКТРОСКОПИЯ МОЧИ**

**(методические рекомендации)**

**Рекомендованы к изданию  
Ученым Советом Одесского  
Государственного медицинского  
университета  
Протокол № 7 от 27 января 2000 г.**

**Одесса - 2000 год**

**Лазерная корреляционная спектроскопия мочи: Методические рекомендации / Ю.И. Божора, Ф.И. Костев, Л.А. Носкин, И.В. Рачок, Д.Ю. Андронов. - Одесса: Одесский государственный медицинский университет, 2000, - 28 с.**

Методические рекомендации рассчитаны на научных сотрудников, врачей и студентов.

**Авторы:**

**Бажора Ю.И.** - д.м.н., проф., заведующий кафедрой клинической иммунологии, генетики и медбиологии;

**Костев Ф.И.** - д.м.н., проф., заведующий кафедрой урологии и нефрологии;

**Носкин Л.А.** - д.б.н., проф., ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского института ядерной физики РАН (г.Гатчина);

**Рачок И.В.** - аспирант кафедры урологии и нефрологии;

**Андронов Д.Ю.** - мл.н.сотр., кафедра клинической биофизики.

**Рецензенты:**

**А.И. Гоженко**, Заслуженный деятель науки и техники Украины, доктор медицинских наук, профессор;

**К.А. Великанов**, доктор медицинских наук, профессор.

Методические рекомендации разработаны коллективом сотрудников Одесского государственного медицинского университета в соответствии с выполняемой госбюджетной НИР (0199V000762).

## Введение.

Многолетним опытом и многочисленными исследованиями показана значимость исследования мочи в диагностике и оценке эффективности лечения различных заболеваний в урологии и нефрологии. Несмотря на введение новейших методов исследования, анализ мочи остаётся основным и часто единственным методом, позволяющим выявить и установить характер почечного заболевания. При этом исследуются: окраска, реакция мочи, относительная её плотность, наличие протеинурии, микроскопия осадка различными методами и др.

Известно, что многие из изучаемых параметров изменяются при различных заболеваниях почек. Следует отметить, что существующие методы цитологических, биохимических, иммунологических, а также других исследований обладают определёнными недостатками. Одни из них дорогостоящи, другие - продолжительны во времени и требуют предварительной обработки биологического материала. Всё это ограничивает возможность их внедрения в широкую клиническую практику.

Существующий до сих пор достаточно широкий диагностический арсенал, к сожалению, не принёс желанных результатов. При этом привлекает внимание ежегодное увеличение инфекционно - воспалительных заболеваний почек, к которому приводит не только социально-экономические и экологические факторы, но и вовремя не распознанный патологический процесс. В таких условиях для улучшения ситуации необходимы дальнейшие поиски современных диагностических методов.

В связи с этим, перспективным представляется применение в урологической и нефрологической практике нового биофизического метода - лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС). Одним из потенциально важных принципов метода ЛКС в практике биомедицинских исследований является то, что он применим для изучения субфракционного состава любой биологической жидкости. Так, например, для пульмонологической практики интересными представляются данные о субфракционном составе легочного конденсата и мокроты; в офтальмологической клинике информативным может быть результат исследования слёзной жидкости; для нейрохирургов важны данные о субфракционном составе спинномозговой жидкости; для решения дифференциальных задач в акушерстве и гинекологии метод

может быть использован для изучения секрета слизистых оболочек половых путей; метод ЛКС успешно применяется для изучения гомеостаза плазмы и сыворотки крови и т.д. Поэтому, по всем этим направлениям, в соответствующих специализированных лечебных учреждениях сейчас проводится апробация метода и предварительные результаты клинических исследований весьма перспективны.

Метод ЛКС обладает целым рядом преимуществ, в частности, он не требует применения реактивов, так как исследуется нативная биологическая жидкость, он полностью автоматизирован. Сопряжение ЛК - спектрометра с компьютером обеспечивает возможность быстрой и объективной обработки полученной информации, а так же архивирование полученных данных.

Основным преимуществом метода ЛКС является возможность проводить исследования непосредственно на нативных биологических образцах, не прибегая к их фракционированию. Это открывает возможность быстрого измерения интегральных межмолекулярных взаимодействий, а также позволяет оценить агрегационное равновесие между низко- и высокомолекулярными комплексами и другими компонентами биологической жидкости и зафиксировать мультипараметрические конформационные изменения в исследуемой системе. Подробно основы метода ЛКС и принципы решения задач методом регуляризации изложены в книге Лебедева А.Д. с соавт. (1986 г.)

Все эти преимущества метода ЛКС делают его перспективным для изучения такого гетерогенного биологического материала, каким является моча. Использование метода ЛКС для исследования мочи в урологии и нефрологии позволит повысить информативность диагностики, эффективность лечения, снизить экономические и расходы.

#### *Общие положения.*

В основе метода ЛКС лежит изменение спектральных характеристик монохроматического когерентного излучения в результате светорассеяния при прохождении через дисперсную систему.

В результате прохождения луча через среду с коллоидными частицами, находящимися в броуновском движении, происходит уширение спектра рассеянного света,

причём форма линий спектра является характеристикой дисперсного состава системы.

В целом ЛКС можно рассматривать как современный метод исследования дисперсных систем различной природы, содержащих светорассеивающие частицы в диапазоне размеров от 1 до 10 000 нм.

Для монодисперсных систем ЛКС позволяет с высокой точностью определить константы диффузии частиц, из которых, в свою очередь, рассчитываются их гидродинамические радиусы. Точность и надёжность измерения размеров частиц при этом сопоставима с данными электронной микроскопии.

Для полидисперсных систем ситуация более сложна, однако применение современных математических методов спектрального анализа позволяет рассчитывать функцию распределения частиц по размерам спектра рассеянного света. Полученная таким образом корреляционная функция подвергается математической обработке методом регуляризации, который является наиболее адекватным при восстановлении сложных полимодальных распределений, обычно имеющих место для нативных биологических сред.

Главным достоинством метода регуляризации является отсутствие необходимости в априорной информации о виде распределения и удобный способ гистограммного представления данных.

Рассмотрим кратко устройство лазерного корреляционного спектрометра и физические основы процесса измерения.

В приборе, с которым мы работаем, реализован коррелометрический гетеродинный метод регистрации лазерных корреляционных спектров, который мы сейчас рассмотрим.

В качестве источника основной информации об исследуемой системе, как уже упоминалось, выступает корреляционная функция электромагнитного поля рассеянного света. Однако, она не является непосредственно измеряемой величиной.

В процессе измерений на ЛК - спектрометре обычно регистрируется корреляционная функция флуктуаций фототока, обусловленных интерференцией рассеянного и опорного пучков света. Принципиальная схема прибора изображена на рис.1

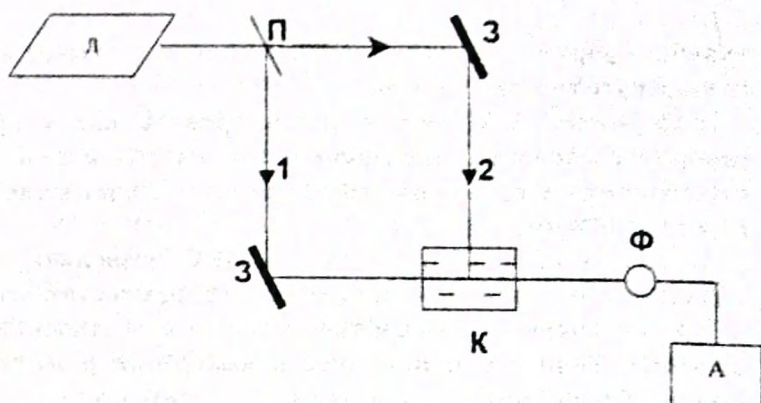


Рис.1. Схема гетеродинного детектирования света.

Л – He-Ne лазер;

К – кювета;

П – светоделительная пластина; А – анализатор;

З – зеркало;

Ф – фотозлектронный

множитель

Луч лазера разделяется с помощью светоделительной пластины на два луча: один из которых (1) используется для формирования рассеянного под некоторым углом пучка света, а второй (2) является опорным.

Поскольку при рассеянии света происходит изменение его спектра, т.е. в спектре появляются частоты (или длины волн), отсутствующие в падающем излучении, при смещении опорного и рассеянного пучков света на фотодетекторе возникает интерференционная картина. Так как частотные сдвиги в спектре рассеянного света обусловлены стохастическим движением частиц в растворе, интерференционная картина также стохастически меняется во времени. Это, в свою очередь, обуславливает непрерывные стохастические колебания фототока относительно некоторого среднего значения.

Таким образом, фототок является непрерывно меняющейся случайной величиной, статистика изменений которой однозначно связана с корреляционной функцией электромагнитного поля рассеянного света и содержит ту же информацию о динамике светорассеивающей системы.

Рассмотренный способ регистрации называется гетеродинным. Управление спектрометром осуществляется при помощи персонального компьютера типа PC/AT.

## *Оборудование, инструментарий и реактивы.*

### Стандартное оборудование:

1. Лазерный корреляционный спектрометр (ЛКС - метр) отечественного или иностранного производства, который отвечает следующим техническим характеристикам:

- мощность лазера 8 мВт;
- длина волны излучения лазера 0,633 мкм;
- диапазон размеров измеряемых частиц 5...10 000 нм;

В наших исследованиях использован ЛКС - метр (разработка Санкт - Петербургского института ядерной физики РАН, производство НПО «Прогресс» АН Украины, г. Одесса).

2. Персональный компьютер типа IBM PC - AT/287;
3. Центрифуга настольная ОПН - 8 или аналогичная с частотой оборотов не менее 3000 об./мин.;
4. Термостат суховоздушный ТС - 80;
5. Шкаф сушильный ГП -20 или аналогичный, который обеспечивает нагрев до 120°C;
6. Стерилизатор электрический;
7. Насос перистальтический или вакуумный;
8. Низкотемпературная морозильная камера с температурой не ниже - 12°C (можно использовать морозильную камеру обычного бытового холодильника \*\* или \*\*\*);
9. Дозаторы пипеточные П-1 или аналогичные отечественные или зарубежного производства объёмом 100 и 200 мкл;
10. Наконечники для дозаторов;
11. Пробирки «Эппендорф» объёмом 0,5 и 1,5 мл;
12. Катетеры стерильные одноразовые эластические для забора мочи;
13. Стерильная ёмкость для забора мочи (100 мл);
14. Пробирки лабораторные;
15. Химические сосуды -колбы для растворов, чашки Петри или эксикаторы для хранения стерильных инструментов, термоустойчивые стаканы для кипячения эппендорфов.

### Нестандартное оборудование:

1. Стеклограф для обозначения пробирок (можно использовать водостойкий маркер);
2. Резиновые перчатки;
3. Катетеры стерильные одноразовые эластические для забора мочи;
4. Штативы для эппендорфов (можно заменить использованными планшетами для иммунологических реакций).



### Реактивы:

1. Спирт этиловый 96%;
2. Раствор водный хлоргексидина 2%;
3. Синтетическое моющее средство;
4. Дистиллированная вода.

Необходим также рабочий журнал для учёта поступающего в лабораторию биологического материала.

Для сокращения затрат труда и времени для получения результатов ЛКС - исследований целесообразно готовить комплекты материалов, приведенные в таблицах 1, 2.

Таблица 1.

Комплект материалов многократного использования.

№ п/п	Наименование	единицы	количество
1.	Дозаторы пипеточные П-1 или аналогичные отечественные или зарубежного производства объёмом 100 и 200 мкл; Наконечники для дозаторов	шт.	1
2.	Катетеры стерильные одноразовые эластические для забора мочи	шт.	1
3.	Штативы для эппендорфов	шт.	1
4.	Стеклограф для обозначения пробирок	шт.	1
5.	Резиновые перчатки	пара	1
6.	Стерильная ёмкость для забора мочи (100 мл)	шт.	1
7.	Пробирки лабораторные	шт.	1

Таблица 2.

Комплект материалов и реактивов одноразового использования (для исследования мочи у 100 пациентов), которые подлежат длительному (не менее 1 года) хранению при комнатной температуре.

№ п/п	Наименование	единицы	количество
1.	Пробирки типа «эппендорф»	шт.	100

	ёмкостью 0,5 или 1,5 мл		
2.	Спирт этиловый	мл.	200

*Подготовка инструментов, материалов и посуды к работе.*

Для приготовления образцов используются новые или совсем чистые сухие эппендорфы. Стерилизация их необязательна.

Использованные ранее эппендорфы замачивают на сутки в тёплой воде с синтетическим моющим средством (порошок или паста). Затем необходимо промыть их внутри, для чего используют кисточку для рисования подходящих размеров, аккуратно снимая все присохшие частицы. После этого эппендорфы промывают снаружи и внутри проточной водой не менее 3-х раз. Вымытые пробирки помещают в термостат, заливают дистиллированной водой, кипятят не менее 20 мин., затем высушивают в сушильном шкафу при температуре от 90°C до 110°C. Эппендорфы хранят до использования в плотно закрытом сосуде.

Новые эппендорфы при условии сохранения в запечатанном пакете никакой предварительной обработки не требуют.

Перед работой необходимое количество эппендорфов помещают в штатив и обозначают их стеклоглафом (или водостойким маркером), нанося номер или шифр образца.

Подготовка и применение автоматических дозаторов.

Автоматические дозаторы используются для отбора надосадочной жидкости, полученной в результате центрифугирования мочи, а так же для отбора точных объёмов растворов. В процессе работы они не соприкасаются непосредственно с исследуемым материалом, поэтому не требуют стерилизации.

В дозаторах используются сменные наконечники, они могут храниться в спирте. Перед работой наконечник вынимается из спирта, подсушивается и надевается на дозатор. При работе с различными растворами, а также при смене жидкости необходимо менять наконечник. При отборе надосадочной жидкости из отцентрифугированной мочи *один наконечник не может использоваться для нескольких образцов мочи*, так как он соприкасается непосредственно с используемым материалом.

### Подготовка катетеров одноразовых стерильных эластических.

Следует использовать одноразовые эластические катетеры (запечатанные в стерильном пакете). Недопустимо многократное использование этих катетеров после стерилизации, так как они становятся непригодными, а также многоразовых резиновых, а также металлических катетеров во избежание травматизации мочеиспускательного канала и стенки мочевого пузыря (фальсификация результатов ЛКС - исследования).

### Приготовление растворов.

Раствор хлоргексидина водный 2%. Готовится непосредственно перед забором образца мочи.

### Забор образца мочи и его обработка.

Приступать к взятию образцов необходимо лишь после полной подготовки оборудования и материалов. Оптимальное время забора образцов мочи для исследования - утренние часы, натощак, после тщательного туалета наружных половых органов, а также обработки наружного отверстия мочеиспускательного канала 2% водным раствором хлоргексидина.

Взятие образца мочи осуществляется с помощью одноразового стерильного эластического катетера. На рабочем столе лаборанта, непосредственно перед забором материала, должны находиться:

- одноразовый стерильный эластический катетер в заводской упаковке;
- резиновые перчатки;
- пробирка лабораторная;
- штатив для лабораторных пробирок;
- автоматический дозатор П-1 ёмкостью 100 мкл и наконечник к нему;
- промаркированные (подписанные) эппендорфы, которые для удобства устанавливаются в штатив и закрываются во избежание их загрязнения;
- рабочий журнал.

С помощью стерильного одноразового эластического катетера, после обработки наружного отверстия мочеиспускательного канала, производят катетеризацию мочевого пузыря. В стерильную ёмкость для забора мочи

выпускают мочу. С помощью автоматического дозатора отбирают 500 мкл мочи в лабораторную пробирку. Оставшуюся мочу выливают или используют для других исследований.

Образцы в маркированных лабораторных пробирках (моча) необходимо поместить в холодильник при  $t^{\circ} +4^{\circ}\text{C}$  (не морозильную камеру!) на срок не более 2-х часов с момента забора. По окончании забора материала у всех обследуемых, охлаждённые маркированные лабораторные пробирки с образцами помещают в центрифугу (следя за уравновешенностью ротора!) и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин. После центрифугирования пробирки аккуратно (не встряхивая) извлекают из гнезд ротора и помещают в штатив. Из пробирки автоматическим дозатором отбирают 100 мкл надосадочной жидкости (желательно из верхних слоёв) и переносят в чистый маркированный эппендорф (с такой же маркировкой, как и на пробирке).

#### Хранение и транспортировка материала.

Полученные образцы биологического материала (мочи) необходимо сразу же заморозить. Не рекомендуется хранить образцы в не замороженном состоянии более 1-х суток от момента отбора проб. Оптимальным является замораживание и хранение проб при температуре  $-25^{\circ}\text{C}$  и ниже. В своей работе мы используем низкотемпературную морозильную камеру «Арктика» (АП «Импульс», г. Одесса), позволяющую быстро заморозить биологический материал до температуры  $-85^{\circ}\text{C}$ , что обеспечивает возможность длительного хранения образцов (год и более). Допускается и быстрое замораживание образцов до  $-10...-15^{\circ}\text{C}$  в морозильной камере обычного бытового холодильника, однако при такой температуре допускается хранение не более 3-х месяцев. **НЕ ДОПУСТИМО ДАЖЕ ОДНОКРАТНОЕ РАЗМОРАЖИВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДО ИССЛЕДОВАНИЯ!**

При транспортировке образцов неременным условием является сохранение их в замороженном состоянии. Для этого можно воспользоваться обыкновенным бытовым термосом, укладывая в него образцы в полиэтиленовых пакетах и пересыпая льдом и солью, после чего необходимо герметически закрыть крышку термоса. При транспортировке, занимающей по времени более 2-х суток, вместо обычного льда можно использовать «сухой лёд» (углекислоту).

В сопроводительном листе к образцам должны указываться следующие данные:

1. Порядковый номер образца;
2. Ф.И.О. пациента, у которого был взят данный биологический материал или его шифр;
3. Данные о враче и клинике, направившей материал для исследования, № истории болезни;
4. Предварительные сведения (диагноз, данные лабораторных исследований);
5. Дата и время забора материала, а также время помещения в морозильную камеру;
6. Примечания, в которых должны быть указаны случаи отклонения от рекомендуемой методики забора и подготовки материала, если таковые имели место.

#### *Проведение ЛКС-исследований.*

Для проведения исследования необходимо следующее оборудование и реактивы:

Основная аппаратура:

1. Лазерный корреляционный спектрометр (ЛКС) отечественного или зарубежного производства, отвечающий следующим техническим характеристикам:
  - мощность лазера - 8 мВт;
  - длина волны излучения лазера - 0,633 мкм;
  - диапазон размеров измеряемых частиц - 5...10 000 нм.

В наших исследованиях, на базе НИИ клинической биофизики ОГМУ, используется ЛКС, разработанный в отделе молекулярной и радиационной биофизики Санкт - Петербургского института ядерной физики РАН, изготовитель - НПО «Прогресс» АН Украины (г. Одесса).

2. Персональная ЭВМ типа IBM PC AT 286/287

Вспомогательная аппаратура и реактивы перечислены выше.

Непосредственно перед проведением ЛКС - исследования, хранящийся в замороженном виде биологический материал необходимо подготовить к исследованию. Для этого образцы в эппендорфах извлекают из морозильной камеры и помещают в штативе в суховоздушный термостат на 30-40 мин. при температуре 37°C. Рекомендуется одномоментно размораживать для исследований до 10-ти образцов, так как хранение образцов мочи в размороженном состоянии при комнатной температуре более 2-х часов нежелательно. Этого времени достаточно для проведения ЛКС - исследования образцов.

После размораживания образец необходимо отцентрифугировать при 3000 об/мин в течение 15 мин. для осаждения пылевых и других крупных частиц. После этой процедуры НЕДОПУСТИМО ВСТРЯХИВАНИЕ ПРОБИРОК С ОБРАЗЦАМИ!

### *Выполнение измерения.*

При подготовке прибора к измерению проводят следующие работы:

1. Приводят рукоятку ослабления опорного пучка в положение, соответствующее минимальному току фотоэлектронного умножителя;
2. Включают блок питания ФЭУ и предусилителя;
3. Включают в сеть источник питания лазера. Время прогрева спектрометра до начала проведения измерений составляет 30 мин.;
4. Включают ПЭВМ;
5. Образец для измерения отбирают из эппендорфа с помощью дозатора с поверхности. Открывают крышку кюветного отделения и крышку кюветы и заполняют кювету исследуемой жидкостью в объеме 0,4-0,5 мл, контролируя заполнение визуально через объектив. Нормальное заполнение кюветы соответствует беспрепятственному прохождению опорного луча через диафрагму (отсутствие менисков или пузырей в поле зрения). Затем обе крышки закрывают во избежание попадания в кювету пыли или паразитного света;
6. Загружают в память ПЭВМ программу коррелятора.

Дальнейший порядок работы с прибором и компьютерная обработка корреляционной функции описываются в техническом паспорте, прилагаемом к прибору.

Время накопления корреляционной функции зависит от связанных с целью исследования параметров, задаваемых программой, и в нашем случае составляло в среднем 5-7 минут на 1 образец.

Накопленная корреляционная функция записывается и сохраняется в ПЭВМ на диске в виде файла.

После измерения содержимое рабочей кюветы извлекается с помощью перистальтического насоса или вакуумного отсоса в сосуд для отработанного материала.

Рабочая кювета промывается дистиллированной водой не менее 3-х раз, для чего она полностью заполняется дозатором и

опорожняется с помощью насоса. Указанная процедура повторяется несколько раз. После этого прибор готов к измерению очередного образца.

Вся процедура измерения одного образца и первичной обработки данных занимает по времени 5-7 минут.

#### *Интерпретация результатов ЛКС - исследования.*

Результат исследования того или иного образца биологической жидкости с помощью ЛКС представляется в виде гистограммы, по оси ординат которой отложена светорассеивающая эффективность (в %), а по оси абсцисс - размер соответствующих ингредиентов (так называемый диаметр светорассеивающих частиц в нм). На рис. 2 приведен пример такой гистограммы.

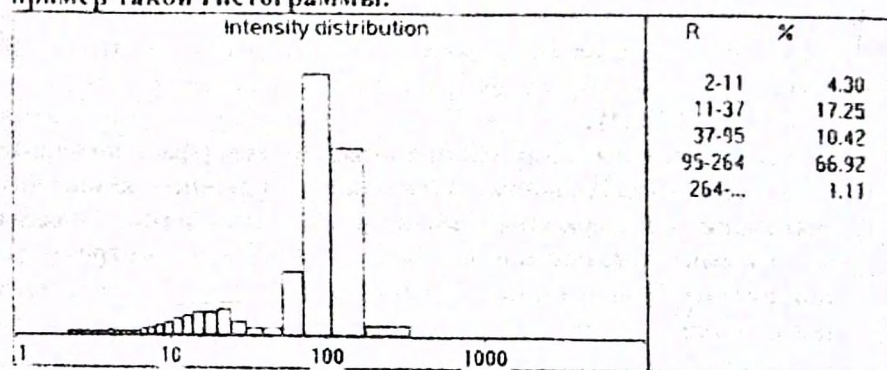


Рис. 2 Индивидуальная гистограмма, получаемая при ЛК-спектроскопии мочи.

При оценке гистограммы следует обращать внимание на два обстоятельства:

1. На гистограмме приводятся соотношения светорассеивающей эффективности различных по размеру ингредиентов, в силу чего детектируются только те биосубстраты, которые в конкретном измерении имеют вклад в интегральное светорассеяние образца, достаточное для их идентификации (не менее 1% от общей светорассеивающей эффективности). Отсюда следует, что если какой-то биоингредиент в данном образце представлен в концентрации, несущественной на фоне остальных рассеивающих частиц, то данным методом она не идентифицируется;
2. Метод позволяет одновременно учитывать вклад биоингредиентов, различающихся друг от друга по размерам в сотни и тысячи раз. Необходимо иметь в виду то, что, больший по размеру биосубстрат большей эффективностью

рассеивает падающий на него свет. Отсюда следует, что если растёт концентрация крупных частиц, то даже незначительный её подъём будет сопровождаться очень существенным повышением светорассеивающей эффективности данной фракции. Соответственно, если снижается концентрация больших по размеру биомолекул, то с большей эффективностью начинают контрастировать более низкомолекулярные фракции (А.Д., Лебелев с соавт., 1988; Ю.И. Бажора с соавт., 1996).

Принимая во внимание вышесказанное, следует учитывать то, что результирующая гистограмма не может быть проанализирована с позиций простых концентрационных взаимоотношений, наиболее общепринятых и широко представленных в клиничко - лабораторной практике методами седиментации, хроматографии и электрофореза. Вот почему необходимо более подробно остановиться на вопросах интерпретации результатов ЛКС биологических жидкостей.

Как видно на рис. 2, диапазон размеров участвующих в светорассеянии частиц чрезвычайно широк (от 1 нм до 10 000 нм). Вместе с тем, при исследовании контрастируется только определённый для данной биологической жидкости набор ингредиентов. Поэтому адекватная интерпретация ЛК-спектров может строиться на следующих априорных утверждениях:

1. Если сдвиги в ЛК - спектрах направлены в сторону повышения вклада низкомолекулярных ингредиентов, то это означает, что относительно установленной нормы происходит или дезагрегация определённых комплексов (например, из-за гидролиза высокомолекулярных субстратов), или дополнительное содержание в биологической жидкости новых ингредиентов, ранее в ней отсутствующих (или, если и присутствующих, то в более низких концентрациях);
2. Если сдвиг происходит в сторону более крупных ингредиентов, то это означает преобладание процессов агрегации (например, образование иммунных комплексов, либо специфическое влияние воспалительных и других заболеваний почек);
3. Сдвиги количественно можно оценить по изменению усреднённого значения соответствующей моды как по вкладу в светорассеяние, так и по диапазону размеров частиц, входящих в неё.

На этих априорных утверждениях и строится количественная обработка ЛКС - гистограмм, осуществляемая с



помощью специальных программных средств (программы классификации спектров в зависимости от нозологии - «Нозологический классификатор» и в зависимости от направления семиотических сдвигов - «Семиотический классификатор»).

#### *Основы нозологической классификации спектров.*

Программа «Нозологический классификатор», разработанная в Санкт - Петербургском институте ядерной физики РАН, позволяет проводить классификационный анализ полученных первичных данных методом распознавания образов в многомерном пространстве.

«Многомерный классификатор» представляет каждую гистограмму в виде точки в 32-х -мерном пространстве, координаты которой определяются относительными величинами столбцов гистограммы. Далее программа редуцирует размерность пространства координат до пяти, причём в качестве новых координат используются 5 различных, определяемых исследователем, признаков. Поскольку речь идёт об изучении гомеостаза человека, то такими признаками могут служить любые физиологические или клинические характеристики, например, пол, возраст, группа крови, наличие того или иного заболевания (его характер, стадия, степень тяжести), проведение того или иного лечения, лабораторные показатели и т.п. В этих координатах программа выполняет сравнение предварительно сформированных пользователем групп спектров на основании тех или иных признаков. Задание принадлежности спектра к соответствующей группе проводится на этапе формирования базы данных с помощью кодирования интересующих признаков. В программе имеется возможность одновременного задания пяти независимых признаков, т.е. имеется 5 соответствующих полей для кодировки.

Результаты сравнения групп ЛК-спектров представляются «Многомерным классификатором» в виде классификационной карты, на которой каждому спектру соответствует точка, получающаяся при проецировании из пятимерного пространства на плоскость, где выбранное распределение на группы максимально достоверно по статистическим критериям.

Масштабы по осям карты даны в относительных единицах. Классификационный алгоритм обработки результатов измерений направлен на статистически достоверное сравнение многочисленных спектров, входящих в группы, объединённые общим признаком между собой. Результаты

сравнения имеют наглядный вид. Критерием различия между двумя группами на классификационной карте следует считать их удалённость друг от друга, а также величину области перекрытия. Пример классификационной карты представлен на рис. 3.

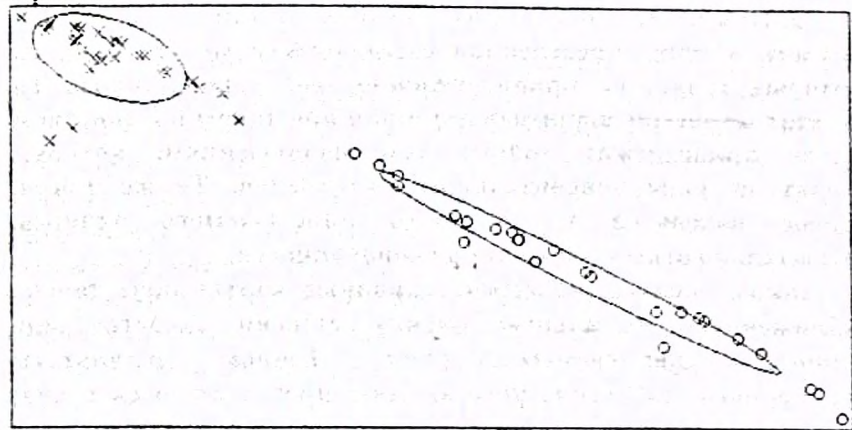


Рис. 3 Классификационная карта сравнения ЛК-спектров мочи. о – клинически здоровые люди; х – больные хроническим пиелонефритом.

Области перекрытия существуют в виду неоднородности сравниваемых групп, которая связана с внутригрупповой дисперсией результатов. Модельные эксперименты показали, что для групп, набранных произвольным образом, применение классификатора даёт практически сплошное перекрытие и разделения не наблюдается.

Статистическая достоверность результатов классификационной обработки материала возрастает с увеличением числа спектров в группах.

Сложность такого подхода связана с тем, что объёмно регистрируемая информация проецируется на заданные координаты плоскости. В этом случае относительная информативность достигается только при сравнительном анализе не более двух референтных групп. В этом случае для совокупности точек априори относимых к одной группе, определяется зона доверительных интервалов.

С учётом пуассоновского распределения флуктуаций отдельных точек, зоны доверительных интервалов соответствуют эллипсоидным окружностям (плоскостное сечение объёмного пуассоновского распределения). Эллипс включает точки спектров, которые принадлежат к данной

совокупности в доверительном интервале 90% ( $\pm 2\sigma$ ). Обсуждая возможность статистического анализа при помощи используемых классификационных программ, нельзя не принять во внимание следующий факт. На заданные координаты плоскости проецируются многомерные координаты спектра. При проекции точек из многомерного пространства на плоскость в зону определённой совокупности могут попадать некоторые точки, не принадлежащие этой совокупности. То есть, статистически значимые различия при таком плоскостном анализе принадлежат только тем наблюдениям, которые выходят за зоны доверительных интервалов. Те же точки, которые находятся в плоскости описываемого эллипса, необязательно относятся к данной совокупности.

Таким образом, классификационные карты дают только приближенную визуальную оценку степени сходства или различия сравниваемых групп. Точные результаты многомерного статистического анализа представляются в виде классификационных таблиц, формируемых программой «Многомерный классификатор». Классификационная таблица характеризует вероятности распределения точек в многомерном пространстве по группам. Например, нас интересует степень сходства ЛК- спектров клинически здоровых людей и людей, больных пиелонефритом.

Результаты, проиллюстрированные на рис. 3, представлены в табличных значениях на рис. 4. Построение таблиц основано на следующих принципах. Каждой сравниваемой группе присваивается определённая аббревиатура, которая кодирует всю информацию о данной группе в памяти ПЭВМ. В нашем примере группе клинически здоровых людей соответствует аббревиатура 1(0) норма (рис.4), а больным хроническим пиелонефритом соответственно 2 (x) патология.

	1(о)	2(x)
Фон	2	4
1(о) норма	24	0
2(x) патология	0	24

А

	1(о)	2(x)
Фон	7,7%	4,3%
1(о) норма	92,3%	0
2(x) патология	0	85,7%

Б

Рис. 4 Классификационная таблица сравнения ЛК-спектров мочи клинически здоровых людей и больных хроническим пиелонефритом.

А – абсолютные значения, Б – процентное соотношение;  
1,2 – сравниваемые группы.

При попарном анализе математических параметров классификации в численном или в процентном виде (как на рис. 4 А и Б) применяется шкала оценки аппаратной информации. Её значения заключаются в следующем: когда математический алгоритм должен назначить ту или иную зону, которой принадлежит спорный спектр, преимущества имеет та группа, процент встречаемости которой выше. Для сравниваемых групп эта априорная информация просто соответствует процентному соотношению спектров в каждой из анализируемых групп. При этом зона «фон» характеризует точки, не попадающие ни в одну из рассмотренных групп (рис. 4). Для зоны «фон» во всех наблюдениях априорное значение присваивается в 7,7% (от общей дисперсии всей рассматриваемой совокупности точек в многомерном пространстве), так как пока не существует оправданных оснований коррелировать число атипичных спектров выше 10%. Кстати, модельные эксперименты с варьированием этой величины от 5 до 20% не дали существенных поправок в оценку вероятности попадания спектров в эту зону. Априорная информация в группах, как было определено, просто соответствует соотношению групп по числу включённых для анализа спектров. Только в случае, когда статистический вес групп различается в 3-5 и более раз, априорная информация корректирует заметно групповую принадлежность конкретного спектра. В большинстве проведенных исследований группы сравнения были сбалансированы. По этой причине в графе априорной информации не требуется корректировки.

Вероятности нахождения точек какой - либо группы в соответствующих областях многомерного пространства отражается числами на пересечении данного столбца и соответствующих строк в таблице.

Исходя из этого, результаты ЛК-исследования на рис. 4, соответствующие графической записи на рис.3, означают следующее. Из всех спектров, принадлежащих клинически здоровым людям ( 1(0) норма), принятых за 100% (26 случаев) ни один не схож с группой больных хроническим пиелонефритом ( 2(x) патология - 28 случаев), а ещё 4,3% -

атипичны относительно обеих групп (в зоне «фон»). Из всех спектров группы больных хроническим пиелонефритом ( 2(x) патология) - также 0% подобных группе клинически здоровых людей ( 1(0) норма) и ещё 7,7% - атипичны. Сумма чисел в столбце классификационной таблицы должна быть равна 100%. Альтернативным способом составления классификационной таблицы является непосредственное указание количества точек, попадающих в ту или иную группу. При этом сумма чисел в вертикальном столбце составляет общее количество случаев, принадлежащих к данной группе.

При этом субфракционный состав мочи, идентифицируемый с помощью ЛКС, дифференцирует характер гомеостатических сдвигов при самых разнообразных клинических патологиях. Вместе с тем, с используемым методом многомерной классификации групповых ЛК - спектров не представлялось возможным интерпретировать природу самих сдвигов с позиций саногенеза: механизмов, определяющих уровень резистентности организма к воздействию экзогенных и эндогенных факторов ( к числу последних относится, в том числе, разнообразные заболевания и интоксикации). В настоящее время разработан другой классификационный подход, так называемый семиотический классификатор, который, в отличие от предыдущего позволяет оценивать индивидуальные особенности гомеостаза.

Вариант усредненной гистограммы, полученной при ЛКС исследовании мочи в группе больных с различной почечной патологией представлен на рис. 5. Четко прослеживается, что в моче в основном контрастируют частицы размером от 50 нм до 400 нм (около 50% от всей светорассеивающей активности). Кроме того, заметный вклад в светорассеивание вносят частицы от 400 нм и выше (до 30% – 40%) и незначительный вклад (до 10% - 20%) частицы ниже 50 нм.

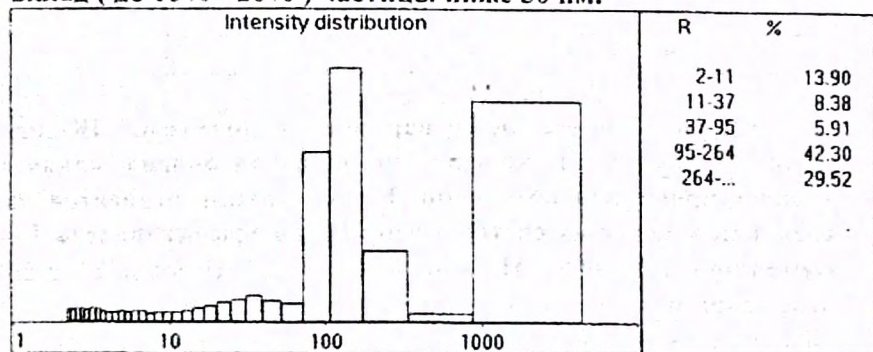


Рис. 5.

В соответствии с вышеизложенным при классификации ЛК-спектров мочи нами было решено использовать только три информативных зоны:

- Зона I - от 0 до 50 нм
- Зона II - от 51 до 400 нм
- Зона III - от 401 и выше.

Таким образом, сложная многопараметровая гистограмма на рис.5. может трансформироваться в более простой трехзонный вариант изображенный на рис. 6.

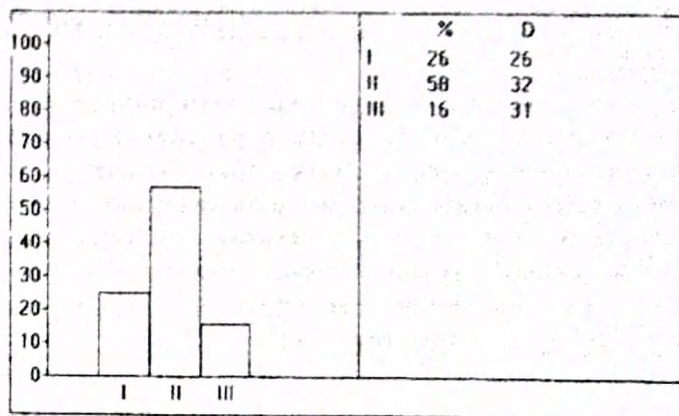


Рис. 6.

На рис. 7 представлен вариант гистограммы ЛК-спектра мочи из группы, в которой не была выявлена какая-либо верифицированная патология. К этой группе относятся все те спектры, у которых светорассеивающая эффективность I зоны составляет  $10 \pm 6\%$ , II зоны  $66 \pm 11\%$ , III зоны  $24 \pm 5\%$ . В дальнейшем программа "Классификатор" все регистрируемые спектры, дисперсия распределения интенсивности суммарных вкладов в которых будет находиться в пределах указанных диапазонов, будет относить к «0» группе.

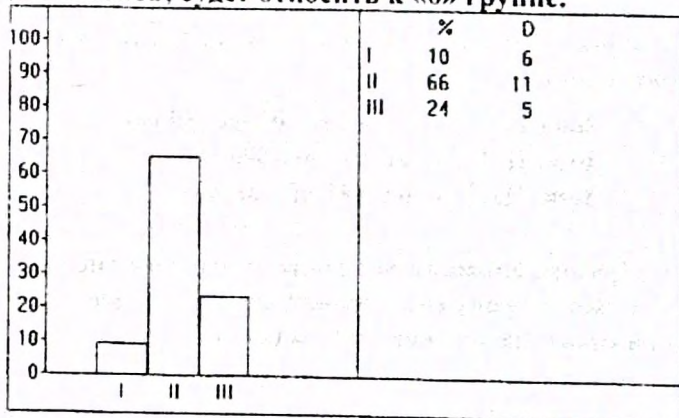


Рис. 7

Относительно данного вида распределения светорассеивающих частиц в моче, при разнообразных саногенетических сдвигах, могут наблюдаться разнонаправленные изменения субфракционного состава различной степени выраженности. Задача "Классификатора" - определить направление этих трансформаций и степень их выраженности. Согласно данным работ Носкина В.А. с

соавторами, группы направленности изменений создаются, исходя из позиций патологической физиологии.

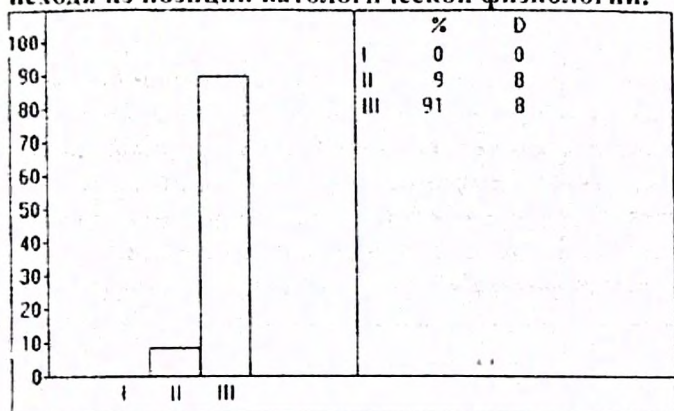


Рис. 8

Так на рис. 8 приведен пример кластера, характеризующего изменения в субфракционном составе мочи как выраженную трансформацию в сторону аллергических сдвигов. Как видно, при этом резко возрастает светорассеивающая эффективность третьей (высокомолекулярной) субфракции (до  $91 \pm 8\%$ ), при отсутствующем вкладе в светорассеяние частицами первой (низкомолекулярной) субфракции. Подобные трансформации ЛК-спектров мочи, будут трактоваться программой «Классификатор» как алергоподобные (группа «1»).

На рис. 9 изображен другой тип спектральной трансформации характеризующийся тем, что ЛК-спектр формируется в основном за счет светорассеивающей эффективности II фракции, вклад которой в светорассеяние составляет  $57 \pm 4\%$ . При этом заметно возрастает вклад низкомолекулярной субфракции ( $41 \pm 3\%$ ), а высокомолекулярной – наоборот резко снижен (до  $2 \pm 3\%$ ). Подобный вид трансформации обозначается, как интоксикационный (группа «2»).



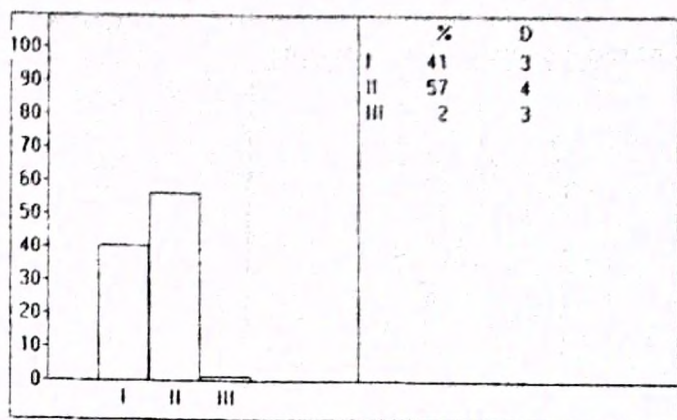


Рис. 9.

На рис. 10 представлен тип гистограммы, в котором подавляюще контрастирует самая низкомолекулярная – I субфракция спектра. Подобный тип гистограмм определяется, как дистрофический (группа «3»).

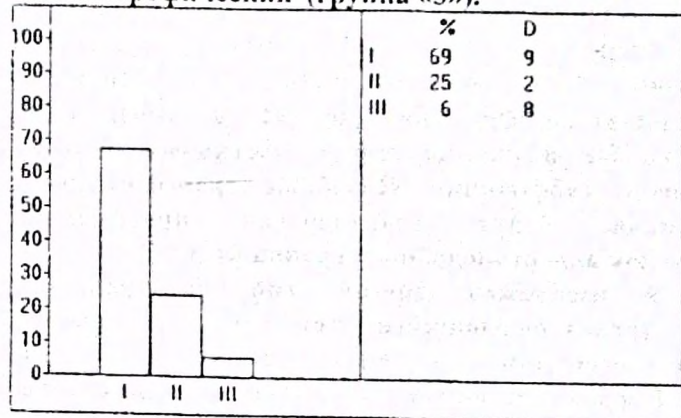


Рис. 10.

В ряде случаев, выявляется тип гистограмм основной отличительной чертой которых является одновременное нарастание светорассеивающей эффективности первой и третьей фракции при пониженном вкладе среднемолекулярной «II» фракции. Подобный тип трансформации определяется как смешанный («4» группа), поскольку одновременно происходят аллергические и дистрофические изменения.

Приведенные примеры иллюстрируют крайне выраженные сдвиги. В реальных измерениях программа «Классификатор» отражает также и промежуточные состояния субфракций спектров, что позволяет дифференцировать, по крайней мере, 13 вариантов спектров: один соответствующий

недифференцированной патологии (условная норма «0» группа) и по три (начальная, умеренная и выраженная) степени выраженности аллергоподобных («1» группа), интоксикационно-подобных («2» группа), дистрофически-подобных («3» группа) и смешанных («4» группа) сдвигов.

Нами была проанализирована группа ЛК-спектров мочи больных с различными заболеваниями почек. В таблице 3. произведены суммарные результаты по частоте встречаемости различных семиотических сдвигов в обследованной группе, интерпретируемых программой «Классификатор» по ЛК-спектрам мочи.

Таблица 3.

Семиотическая классификация ЛК-спектров мочи больных с различной патологией почек.

Характер семиотических сдвигов.	Группы сцепления.	Число наблюдений	%	Общ. %
0 Норма	0	2	6%	6%
1 Аллергические	*1.1.			6%
	1.2.			
	1.3.	2	6%	
2 Интоксикационные	2.1.	8	26%	55%
	2.2.	1	3%	
	2.3.	8	26%	
3 Дистрофические	3.1.	6	19%	32%
	3.2.	4	13%	
	3.3.			
4 Смешанные	4.1.			
	4.2.			
	4.3.			

\* 1 - Характер семиотических сдвигов

1. - Начальная степень выраженности  
 2. - Умеренная.  
 3. - Выраженная

Как видно, из этих результатов более половины (55%) видов интерпретируются, как различной степени выраженности интоксикационные сдвиги. На втором месте по встречаемости стоят трансформации спектра, интерпретируемые как дегенеративно-дистрофические сдвиги. Аллергические сдвиги в данной группе выявлены всего лишь у 6% обследованных. И смешанные трансформации спектров не встречаются вообще.

В дальнейшем, по мере накопления статистических групп сравнения, предполагается более детальная дифференциация характера субфракционных сдвигов определяемых в моче. Кроме того, особый интерес вызывает возможность изучения семиотических сдвигов, регистрируемых в моче в динамике патологического процесса и их скоррелированности с терапевтическими мероприятиями.

При этом сразу отметим два главных обстоятельства. Во-первых, с помощью ЛКС сдвиги в моче устанавливаются практически у всех больных (всего 6% наблюдений отнесены к норме). Подчеркнем, что на сегодняшний день с подобной частотой сдвиги в моче другими методами не устанавливаются. Полученный результат априорно можно было предсказать, так как регистрируемая концентрация биосубстратов при использовании ЛКС находится на уровне менее 2 мкг/мл белка, что, естественно, недоступно для методов прямой аналитической детекции протеинемии (предел их чувствительности на уровне 10-20 мкг/мл).

С другой стороны, характер семиотических сдвигов, обнаруженный по анализу мочи, заметно совпадает с основной направленностью сдвигов, выявленных при анализе сыворотки крови изучаемой патологии. Подобная сочетаемость выявляемых сдвигов сама по себе предполагает патогномоничность обсуждаемых параметров. Во всяком случае, обсужденные параметры представляются достаточно патогномоничными и скоррелированными с результатами анализа нарушений в системе гомеостаза.

Кроме того, процедура забора мочи для ЛКС-исследования проста, не трудоемка и не травматична для больного. Она может быть осуществлена самим больным без привлечения специально обученного высококвалифицированного персонала.

Таким образом, метод ЛКС позволяет при внедрении в научные исследования, а также, в последующем, в практику урологии и нефрологии, значительно расширить возможность дифференциальной диагностики различных заболеваний мочевыделительной системы. Кроме того, этот метод даёт возможность вести динамическое наблюдение за течением заболевания у конкретного больного, выявлять направленность патологических сдвигов процессов и особенности формирования саногенетических механизмов под влиянием являющегося исследования.

Список использованной литературы.

1. Аклеев А.В., Пашков И.А. и др. Дифференциальные возможности метода ЛКС при диагностике различных патологических процессов, встречаемых среди населения Уральского радиационного следа. Радиационная биология. Радиозкол., т.35, №6, 1995, с.829 - 835.
2. Арефьев И.М., Еськов А.Н., Юдин И.К. Лазерный корреляционный спектрометр для иммунологических и вирусологических анализов. // Мед. техника, 1979, №2, с.30-34.
3. Бажора Ю.И., Кресюн В.И., Носкин Л.А., Годован В.В., Андронов Д.Ю., Волошенков Б.А. Лазерная корреляционная спектроскопия – новый метод мониторинга в токсикологии. // Совр. проблемы токсикологии.-1998.- №2.- С.7-11.
4. Клопов Н.В., Лебедев А.Д., Носкин В.А., Носкин Л.А. Лазерная корреляционная спектроскопия сыворотки крови - новый подход к идентификации групп риска по отдельным заболеваниям и интоксикациям в зонах экологических аномалий//Радиобиология.-1992.-т.32.- №2 .-С.247-255
5. Лазерная корреляционная спектроскопия крови: Методические рекомендации/ Сост: Бажора Ю.И., Соколовский В.С., Кресюн В.И. и др. -Одесса, 1995.-26 с.
6. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. – К.: Наукова думка,1987.-256с.
7. Молекулярно-генетические и биофизические методы исследования в медицине / Под ред. Ю.И. Бажоры, В.И. Кресюна, В.Н. Запорожана. - К.: Здоров'я, 1996.- 207 с.
8. Терновой К.С., Селезнева Т.Н., Аклеев А.В., Пашков И.А., Носкин Л.А., Клопов Н.В., Носкин В.А., Стародуб Н.Ф. Классификация результатов исследования плазмы крови с помощью лазерной корреляционной спектроскопии на основе семиотики предклинических и клинических состояний. // Украинский биохимический журнал, - 1998. - Т.70.- №2. - с.53-65.
9. Терновой К.С., Крыжановский Г.Н., Мусийчук Ю.И., Носкин Л.А., Клопов Н.В., Носкин В.А., Стародуб Н.Ф. Сравнительный анализ семиотических сдвигов, установленных методом ЛКС плазмы крови случайных

**выборок обследований из зон Чернобыльской  
аварии, " Уральского радиационного следа" и  
сотрудников С.- Петербургского Института Ядерной  
Физики РАН. // Украинский биохимический журнал, -  
1998. - Т.70.- №3. - с.81-85.**

**Навчальне видання**  
**Лазерна кореляційна спектроскопія сечі**  
**Методичні рекомендації Російською мовою.**