

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
УКРАИНЫ  
ОДЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ЛАЗЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ  
СПЕКТРОСКОПИЯ КРОВИ

*(Методические рекомендации)*

**Одесса-1995**

Методические рекомендации разработаны коллективом сотрудников Одесского государственного медицинского университета в соответствии с выполняемыми госбюджетными НИР, финансируемыми ГКНТ и МЗ Украины (соответственно №№ госрегистрации 0193 U 039622 и 0194 U 019980).

Авторы:

чл. корр АНТК Украины., д.м.н., проф. Бажора Ю.И.;  
д.м.н., проф. Соколовский В.С.;  
академик АНТК Украины., з.д.н.т., д.м.н., проф. Кресюн В.И.,  
д.б.н., проф. Носкин Л.А.,  
врач Андронов Д. Ю.

Рецензенты:

академик АНТК Украины., з.д.н.т., д.м.н., проф. Макулькин Р.Ф.,  
д.м.н., проф. Шандра А.А.

Ответственный за выпуск:

ректор ОГМУ академик Запорожан В.Н.

Спонсор издания:

МП "Кислородмаш-Полюс"

Методические рекомендации рекомендованы к изданию Ученым Советом ОГМУ 23.12.1993 г. (протокол N 5).

Методические рекомендации рассчитаны на врачей, научных работников и студентов.

## Введение

В научных периодических изданиях последних лет стали появляться работы, обобщающие опыт применения современного биофизического метода исследования различных биологических материалов лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС). Однако данный метод использовался ограниченно и только для субмолекулярного исследования гомогенных биологических жидкостей. При этом, как правило, не проводилось изучение нативных биологических объектов, а исследовались отдельные фракции биологических жидкостей (белки, липопротеиды и т.д.), полученные после трудоемких процедур предварительного разделения, что было связано с отсутствием адекватных методов математической обработки спектров квазиупругого рассеяния света в случае многокомпонентных полидисперсных систем. Наиболее современный подход в математической обработке данных ЛКС, успешно развиваемый в Санкт-Петербургском институте ядерной физики (г.Гатчина), позволяет решить ряд проблем, связанных с полидисперсностью нативных биологических объектов, в том числе восстанавливать вид распределения рассеивающих частиц по коэффициенту диффузии для полидисперсных многокомпонентных систем при отсутствии какой-либо априорной информации о виде данного распределения, что дает возможность производить исследование нативных объектов без предварительного фракционирования.

Это обстоятельство обуславливает главное преимущество лазерной корреляционной спектроскопии перед фракционными методами исследования (хроматографией, нативным электрофорезом, ультрацентрифугированием и т.д.). Кроме того, к преимуществам метода можно отнести следующие его качества:

- использование минимального объема исследуемого материала (100-200 мкл);
- простота подготовки образцов к исследованию;
- быстрота получения результатов исследований и высокая производительность, благодаря сопряженной работе спектрометра с компьютером (до 10 исследований в час);
- исследуемый материал не взаимодействует в процессе подготовки и измерения с другими средами, что сохраняет его нативность;
- автоматизация и компьютеризация измерений и обработки результатов, возможность создания компьютерных банков данных, обеспечивающих удобство хранения и статистической обработки информации.

Разработанная и постоянно совершенствуемая аппаратура, производимая малосерийными партиями на базе Санкт-Петербургского института ядерной физики РАН (г.Гатчина) и НПО "ПРОГРЕСС" АН Украины (г.Одесса), дает возможность подойти вплотную к решению вышеизложенной проблемы применительно к задачам здравоохранения.

Цель методических рекомендаций - унифицировать техно-

логию подготовительного этапа ЛКС, а именно: забор крови, ее транспортировку, хранение и подготовку к исследованию, что позволит избежать нежелательных артефактов, получать сопоставимые результаты из различных лабораторий и в последующем трактовать полученные данные.

Представляется перспективным использовать данный метод для выявления групп риска при массовом скрининге, для диагностики доклинических проявлений различных заболеваний, динамики и прогноза их течения, оценки эффективности проведенного лечения. Методические рекомендации могут быть использованы при проведении ЛКС крови в клинических лабораториях больниц и поликлиник, в экспериментальных лабораториях медицинского и биологического профиля.

## 1. Общие положения

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

В результате взаимодействия излучения с коллоидными частицами, находящимися в броуновском движении, происходит уширение спектра рассеянного света, причем форма линий спектра является характеристикой дисперсного состава системы.

В целом метод ЛКС можно рассматривать как мощный современный инструмент 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 надежность 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 из 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 теперь кратко устройство лазерного корреляционного спектрометра и физические основы процесса измерения.

Измерения проводятся на малогабаритном спектрометре,

разработанном в Санкт-Петербургском институте ядерной физики РАН. В данном приборе 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 лазерном корреляционном спектрометре обычно регистрируется корреляционная функция флуктуаций фототока, обусловленных интерференцией рассеянного и опорного пучков света. Принципиальная схема прибора изображена на Рис. 1.

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.

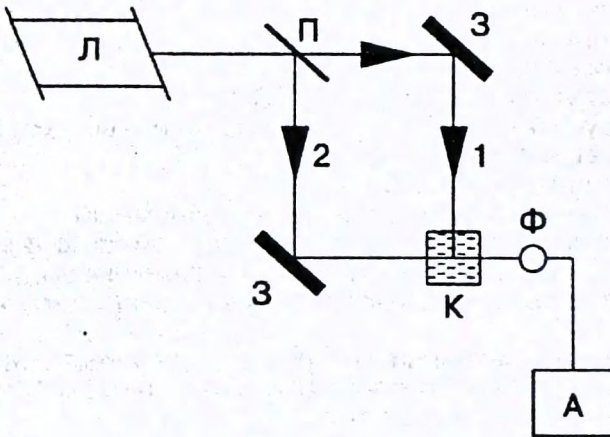


Рис. 1. Схема гетеродинного детектирования света.

Л - He-Ne лазер; П - светоделительная пластина; З - зеркало; К - кювета; А - анализатор; Ф - фотоэлектронный умножитель.

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 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.

## 2. Оборудование, инструментарий и реактивы

### 2.1. Стандартное оборудование:

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

- мощность лазера 8мВт;
- длина волны излучения лазера 0,633мкм;
- диапазон размеров измеряемых частиц 5...10000 нм.

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

- Персональный компьютер типа IBM PC-AT/287;
- Центрифуга настольная ОПН-8 или аналогичная с частотой оборотов не менее  $120 \text{ с}^{-1}$  (8000 об./мин.);
- Термостат суховоздушный ТС-80;
- Шкаф сушильный ГП-20 или аналогичный, который обеспечивает нагрев до  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ ;
- Стерилизатор электрический;
- Насос перистальтический или вакуумный;
- Низкотемпературная морозильная камера с температурой не ниже  $-12 \text{ }^\circ\text{C}$  (можно использовать морозильную камеру обычного бытового холодильника, имеющего маркировку \*\* или \*\*\*);
- Дозаторы пипеточные П-1 или аналогичные отечественного или зарубежного производства объемом 100 и 200 мкл;
- Наконечники для дозаторов;
- Пробирки "Эппендорф" объемом 0,5 и 1,5 мл (эппендорф);
- Скарификаторы одноразовые;
- Пинцеты анатомические;
- Химические сосуды-колбы для растворов, чашки Петри или эксикаторы для хранения стерильных инструментов, пробирки термоустойчивые, стаканы для кипячения эппендорфов.

### 2.2. Нестандартное оборудование:

- соломка для коктейля пластиковая;
- стеклогграф для обозначения пробирок;
- вата, бинты, резиновые перчатки;
- штативы для эппендорфов (можно заменить использованными планшетами для иммунологических реакций).

### 2.3. Реактивы:

- раствор натрия хлорида 0,9%;
- раствор натрия цитрата 4%;
- вода дистиллированная;
- спирт этиловый 96%;
- синтетическое моющее средство.

2.4. Комплекты материалов и оборудования для взятия крови и подготовки ее для исследований.

Для сокращения затрат труда и времени для получения результатов ЛКС- исследований целесообразно готовить комплекты материалов, приведенные в таблицах 1,2 и 3.

**Таблица 1.**  
Комплект материалов многократного использования

№п/п	Наименование	Един.	Кол.
1.	Дозатор автоматический на 100 мкл	шт.	1
2.	Дозатор автоматический на 500 мкл	шт.	1
3.	Пинцет хирургический	шт.	2
4.	Чашка Петри	шт.	3
5.	Штативы для эппендорфов	шт.	2
6.	Стеклограф	шт.	1
7.	Резиновые перчатки	пара	3
8.	Жгут резиновый эластичный	шт.	1

**Таблица 2.**  
Комплект материалов и реактивов одноразового использования (для обследования 100 человек), которые подлежат длительному (не менее 1 года) хранению при комнатной температуре (взятие крови из пальца).

№п/п	Наименование	Един.	Кол.
1.	Скарификаторы стерильные одноразовые	шт.	100
2.	Вата стерильная	г.	100
3.	Отрезки соломки стерильные	шт.	100
4.	Наконечники для дозаторов	шт.	100
5.	Пробирки типа "Эппендорф" емкостью 0,5 или 1,5 мл	шт.	100
6.	Спирт этиловый 96%	мл.	200
7.	Раствор натрия хлорида 0,9%	мл.	80
8.	Раствор натрия цитрата 4%	мл.	80

**Таблица 3.**  
Комплект материалов и реактивов одноразового использования (для обследования 100 человек), которые подлежат длительному (не менее 1 года) хранению при комнатной температуре (взятие крови из вены).

№п/п	Наименование	Един.	Кол.
1.	Иглы инъекционные стерильные	шт.	100
2.	Вата стерильная	г.	200
3.	Пробирки стеклянные конические, емкостью не менее 5 мл.	шт.	100
4.	Эппендорфы емкостью 0,5 или 1,5 мл	шт.	100
5.	Наконечники для дозаторов	шт.	100
6.	Спирт этиловый 96%	мл.	200
7.	Раствор натрия цитрата 4%	мл.	400

2.5. Рабочий журнал для учета поступающего в лабораторию биологического материала (см. Приложение).

### **3. Подготовка инструментов, материалов и посуды к работе.**

#### **3.1. Подготовка эппендорфов.**

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

Использованные ранее эппендорфы замачивают на сутки в теплой 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, сгустки крови и прочее. После этого эппендорфы промывают снаружи и внутри проточной водой не менее 3 раз. Вымытые пробирки помещают в термостойкий сосуд, заливают дистиллированной водой, кипятят не менее 20 мин., затем высушивают в сушильном шкафу при температуре от 90 до 110 °С. 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 стеклографом, нанося номер или шифр образца. В эппендорфы с помощью автоматической пипетки объемом 100-200 мкл вносится 800 мкл физиологического раствора или цитрата натрия 4%.

Вместо эппендорфов можно использовать пластиковые или стеклянные пробирки или ампулы при условии выполнения всех выше указанных подготовительных процедур. Пробирки должны иметь объем не более 3 мл, плотно закрываться (ампулы запаиваться). Кроме того, пробирки с образцами должны выдерживать центрифугирование до 6000 об/мин, что необходимо предварительно проверить.

#### **3.2. Подготовка и применение автоматических дозаторов.**

Автоматические дозаторы используются для взятия крови и отбора точных объемов растворов. В процессе работы они не соприкасаются непосредственно с кровью, поэтому не требуют стерилизации. Последовательность работы с дозатором изложена в разделе 4.

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 необходимо менять наконечник при смене жидкости. При взятии крови один наконечник может использоваться для нескольких пациентов, так как он не соприкасается непосредственно с кровью (набор осуществляется солодкой). Поэтому при заборе крови может использоваться ограниченное количество наконечников,

#### **3.3. Подготовка и использование пластиковой солодки.**



Пластиковая соломка для взятия крови представляет собой порезанную на отрезки длиной 5 см соломку для коктейля. Отрезки соломки кипятятся в стерилизаторе в течение 30 мин, высушиваются в сушильном шкафу (при температуре от 90 до 110 °С), помещаются в стерильный контейнер (например, стерильную чашку Петри) и в дальнейшем используются при заборе материала. Соломка является предметом ОДНОРАЗОВОГО применения. Каждый отрезок применяется для взятия крови у одного пациента и затем не используется.

#### 3.4. Подготовка скарификаторов.

Скарификаторы также представляют собой ОДНОРАЗОВЫЙ инструмент. Скарификаторы извлекаются из фабричной упаковки, помещаются острием вниз в стеклянные пробирки, которые закрываются ватно-марлевыми пробками, и стерилизуются сухим жаром в шкафу при температуре не ниже 180 °С в течение 45 мин.

Перед взятием крови скарификатор извлекается пинцетом из пробирки. Скарификаторы повторному использованию **не подлежат!**

#### 3.5. Приготовление растворов.

3.5.1. Раствор натрия хлорида 0,9%. Обычно используется готовый стерильный (изотонический) раствор. При его отсутствии раствор можно приготовить самостоятельно, профильтровать и сохранять в холодильнике в течение 1 месяца.

3.5.2. Раствор натрия цитрата 4% применяется как антикоагулянт, если необходимо приготовить плазму крови. В 1 л. дистиллированной воды растворяется 30 г. натрия цитрата. Раствор фильтруется и сохраняется в холодильнике не более месяца.

## 4. Забор крови и ее обработка

Приступать к взятию образцов необходимо лишь после полной подготовки оборудования и материалов. Забор крови осуществляется натошак. Оптимальное время забора крови для исследования - утренние часы, когда после последнего приема пищи прошло более 9 часов.

4.1. Взятие крови из пальца осуществляется общепринятым методом с помощью одноразовых скарификаторов. На рабочем столе лаборанта непосредственно перед забором крови из пальца должны находиться:

- стерильные скарификаторы, помещенные в стерильный контейнер (стеклянная пробирка или чашка Петри);
- вата;
- спирт этиловый 96%;
- резиновые перчатки;
- пинцет; бранши которого погружены в спирт;
- нарезанная стерильная соломка, уложенная в стерильном закрывающемся контейнере;
- автоматический дозатор П-1 емкостью 100 мкл и наконечник к нему (наконечник может быть нестерильным, так как он не соприкасается с кровью);

- промаркированные (подписанные) эппендорфы, содержащие 800 мкл физиологического раствора или цитрата натрия; пробирки для удобства устанавливаются в штатив и закрываются во избежание их загрязнения;
- рабочий журнал.

Прокол производится в боковую поверхность дистальной фаланги безымянного пальца, причем палец не массируется и кровь не выдавливается (для предотвращения внутрикапиллярного гемолиза). Появившаяся капля крови удаляется ватой, а последующие капли аккуратно "втягиваются" в соломку с помощью автоматического дозатора (пипетки). Необходимо набрать 200 мкл крови.

Последовательность выполнения этой процедуры:

- а) надеть стерильный отрезок соломки на рабочий конец наконечника дозатора (используя для этого пинцет);
- б) нажать поршень дозатора до первого упора;
- в) окунуть конец соломки в появившуюся каплю крови и плавно отпустить поршень, втягивая тем самым кровь;
- г) перенести набранную кровь в эппендорф с 800 мкл физиологического раствора или натрия цитрата, выжимая поршень вначале до первого, а затем и до второго упора; аккуратно пропипетировать раствор несколько раз, нажимая и отпуская поршень, не вынимая при этом соломку из эппендорфа (избегать появления пузырей);
- д) снять с наконечника отрезок соломки и поместить в контейнер для отходов;
- е) закрыть крышку эппендорфа, не касаясь ее внутренней поверхности и отставить эппендорф в сторону или в другой штатив;
- ж) записать данные о пациенте в рабочий журнал.

**НЕ ЗАБЫВАТЬ** менять соломку перед каждым взятием крови

Образцы в эппендорфах (кровь с физраствором или цитратом) должны стоять при комнатной температуре не менее 30 мин, но не более 2-х часов с момента забора. Эппендорфы с образцами помещают в центрифугу (СЛЕДЯ ЗА УРАВНОВЕШЕННОСТЬЮ РОТОРА) и центрифугируют при 6000 об/мин в течение 30 мин. После центрифугирования эппендорфы аккуратно (не встряхивая) извлекают из гнезд ротора и помещают в штатив. Из эппендорфа автоматическим дозатором отбирают 700 мкл надосадочной жидкости (желательно из верхних слоев) и переносят в другой, чистый эппендорф с такой же маркировкой. Полученный таким образом биологический материал готов к хранению и транспортировке.

#### 4.2. Взятие крови из вены.

Указанная процедура осуществляется путем пункции одной из периферических вен с помощью одноразовых стерильных инъекционных игл.

На рабочем столе лаборанта при заборе крови из вены должны находиться:

- стерильные (желательно одноразовые) инъекционные иг-

- лы в стерильных колпачках или помещенные в стерильный контейнер;
- вата;
- спирт этиловый 96%;
- резиновые перчатки;
- резиновый эластичный жгут;
- промаркированные стерильные стеклянные конические пробирки емкостью не менее 5 мл, помещенные в штатив (для сыворотки);
- промаркированные стерильные стеклянные конические пробирки емкостью не менее 5 мл, содержащие 4 мл раствора цитрата натрия (для плазмы);
- рабочий журнал.

Порядок выполнения процедуры:

- а) наложить жгут на одну из рук пациента;
- б) снять колпачок со стерильной пункционной иглы;
- в) обработать область пункции спиртом;
- г) произвести пункцию одной из периферических вен;
- д) собрать венозную кровь в коническую пробирку, причем кровь должна поступать самотеком во избежание травматизации эритроцитов. Набор крови в шприц не рекомендуется. Для получения достаточного для исследования количества сыворотки необходимо не менее 5 мл крови.
- е) для приготовления плазмы необходимо отобрать из данной пробирки 1мл крови и перенести в пробирку с цитратом;
- ж) закрыть пробирки ватными пробками и поместить в другой штатив;
- з) записать данные о пациенте в рабочий журнал.

При приготовлении сыворотки образцы в пробирках сохраняются при комнатной температуре в течение 2-х часов для образования сгустка. Спустя 2 часа с момента взятия крови сгусток в пробирке обводит вдоль стенок стерильной стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 15 мин. при 3 тыс. об/мин. В случае приготовления плазмы образцы с цитратом можно центрифугировать уже через 15-20 мину, с момента забора крови в течение 15мин. при 3 тыс. об/мин.

Сыворотку или плазму после центрифугирования отбирают с помощью дозатора в стерильную посуду (пробирку) в объеме 1мл. Весь полученный объем сыворотки рекомендуется разделить на несколько порций по 500 м и разлить в чистые сухие эппендорфы. Полученный таким образом биологический материал готов к хранению и транспортировке.

## **5. Хранение и транспортировка материала**

5.1. После получения вышеописанным способом данный биологический материал (сыворотку или плазму) необходимо сразу же заморозить. Не рекомендуется хранить образцы в незамороженном состоянии более 1 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!**

5.2. При транспортировке полученного биологического материала непременным условием является сохранение образцов 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 лед" (углекислоту).

5.3. В сопроводительном листе к образцам должны указываться следующие данные:

- а) порядковый номер образца;
- б) Ф.И.О. пациента, у которого был взят данный биологический материал или его шифр;
- в) пол и возраст (дата рождения) пациента;
- г) группа крови;
- д) адрес постоянного места жительства;
- е) данные о враче и клинике, направившей пациента, номер истории болезни;
- ж) предварительные сведения (диагноз, физиологическое состояние, конституциональные особенности, уровень физического развития);
- з) дата и время забора биоматериала, а также время помещения в морозильную камеру;
- и) для женщин - фаза менструального цикла;
- к) для новорожденных и грудных детей - оценка в баллах по шкале Апгара и характер вскармливания;
- л) примечания, в которых должны быть указаны случаи отклонения от рекомендуемой методики забора и подготовки материала, если таковые имели место.

## **6. Проведение ЛКС - исследований**

6.1. Для проведения исследования необходимо следующее оборудование и реактивы:

### **6.1.1. Основная аппаратура:**

- а) 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...10000 нм.

В наших исследованиях на базе ОМИ им.Пирогова используется ЛКС, разработанный в отделе молекулярной и радиационной биофизики Санкт-Петербургского института ядерной физики РАН, изготовитель - НП "Прогресс" АН Украины (г.Одесса).

б) персональная ЭВМ типа IBM PC AT 286/287.

6.1.2. Вспомогательная аппаратура и реактивы перечислены в разделе 2.

6.2. 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 °С. Рекомендуется одномоментно размораживать до 10 образцов, так как хранение сыворотки в замороженном состоянии при комнатной температуре более 2-х часов нежелательно.

После размораживания образец необходимо отцентрифугировать при 6000 об/мин в течение 30 мин. для осаждения пылевых и других крупных частиц. После этой процедуры **НЕДОПУСТИМО ВСТРЯХИВАНИЕ ПРОБИРОК С ОБРАЗЦАМИ!**

6.3. Выполнение измерения.

6.3.1. Метод измерений. Основным преимуществом метода лазерной корреляционной спектроскопии 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. Более подробно основы метода ЛКС и принципы решения задач методом регуляризации изложены в книге Лебедева А.Д. с соавт. "ЛКС в биологии".

6.3.2. При подготовке прибора к измерению проводят следующие работы:

- а) приводят рукоятку ослабления опорного пучка в положение, соответствующее минимальному току фотоэлектронного умножителя;
- б) включают блок питания ФЭУ и предусилителя;
- в) включают в сеть источник питания лазера. Время прогрева спектрометра до начала проведения измерений составляет 30 мин;
- г) включают ПЭВМ;
- д) 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 (отсутствии менисков или пузырей в поле зрения). Затем обе крышки закрывают во избежание попадания в кювету пыли или паразитного света;

е) 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 исследований параметров, задаваемых программой, и в нашем случае составляло в среднем 7-10 минут на 1 образец.

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

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

6.3.5. Рабочая кювета промывается дистиллированной водой не менее 3-х раз, для чего кювета полностью заполняется дистиллированной водой с помощью дозатора и опорожняется с помощью насоса. Указанная процедура повторяется несколько раз. После этого прибор готов к измерению очередного образца.

6.3.6. Вся процедура измерения одного образца и первичной обработки данных занимает по времени 7-10 минут.

## **7. Интерпретация результатов ЛКС-исследований**

Зарегистрированные корреляционные функции подвергаются математической обработке методом регуляризации при помощи специальной процедуры, входящей в комплект программного обеспечения спектрометра. Результатом расчета является функция распределения светорассеивающих частиц по размерам (рис.2), представленная в виде гистограммы.

По оси ординат гистограммы отражается относительный вклад частиц в светорассеивание. Полученные таким образом распределения представляют фактически характеристику гомеостаза индивидуума.

Расчет распределений проводился в рамках моделей жестких сферических частиц.

Управляющая программа спектрометра позволяет формировать базу данных, состоящую из гистограмм полученных распределений.

Запись данных осуществляется непосредственно после регуляризации корреляционной функции при помощи специальной процедуры, входящей в управляющую систему.

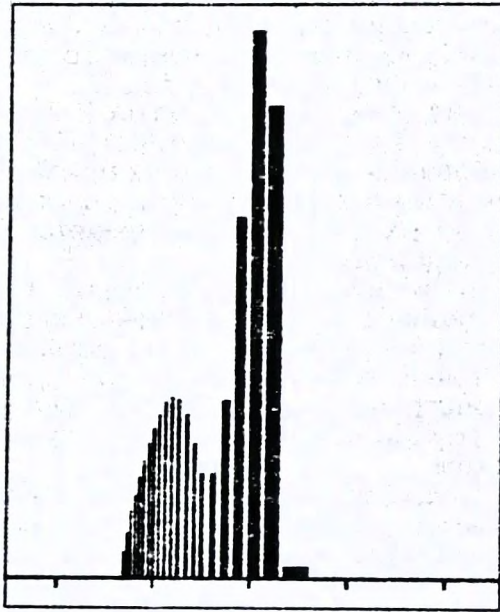


Рис.2. Индивидуальная гистограмма (ЛК - спектр) плазмы крови клинически здорового донора.

При формировании базы данных возможна кодировка заранее заданных признаков, принципы которых будут рассматриваться ниже.

С целью выявления общности и различий, полученных распределений по заранее заданным признакам проводится их групповое сравнение с помощью программы "Многомерный классификатор".

Программа "Многомерный классификатор", разработанная в Санкт-Петербургском институте ядерной физики позволяет проводить анализ гистограмм, характеризующих вышеуказанные распределения методом распознавания образцов и проводить кластеризацию данных в многомерном пространстве.

Каждая из гистограмм распределения частиц по размерам, формируемых управляющей программой спектрометра, состоит из 32-х столбцов, имеющих ширину, увеличивающуюся в логарифмическом масштабе при переходе от наиболее мелких к более крупным (рис.2).

"Многомерный классификатор" представляет каждую гистограмму в виде точки в 32-х-мерном пространстве, координаты которой определяются относительными весами столбцов гистограммы. Далее программа редуцирует размерность пространства координат до пяти, причем в качестве новых координат используются 5 первых центральных моментов распределения. В этих координатах программа выполняет сравнение групп спектров, предварительно сформированных пользователем, на основании тех или иных признаков.

Поскольку речь идет об исследовании человеческого гомеостаза, то такими признаками могут служить любые физиологические или клинические характеристики, например, пол, возраст, группа крови, наличие того или иного заболевания, проведение того или иного лечения и т.д.

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 лазерных корреляционных спектров представляется "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 и математически достоверное сравнение многочисленных спектров, входящих в группы, объединенные общим признаком между собой, и представление результата в наглядном и удобном для сравнения виде. Критерием различия между двумя группами на классификационной карте следует считать их удаленность друг от друга, а также величину области перекрытия. Пример классификационной карты представлен на Рис. 3.

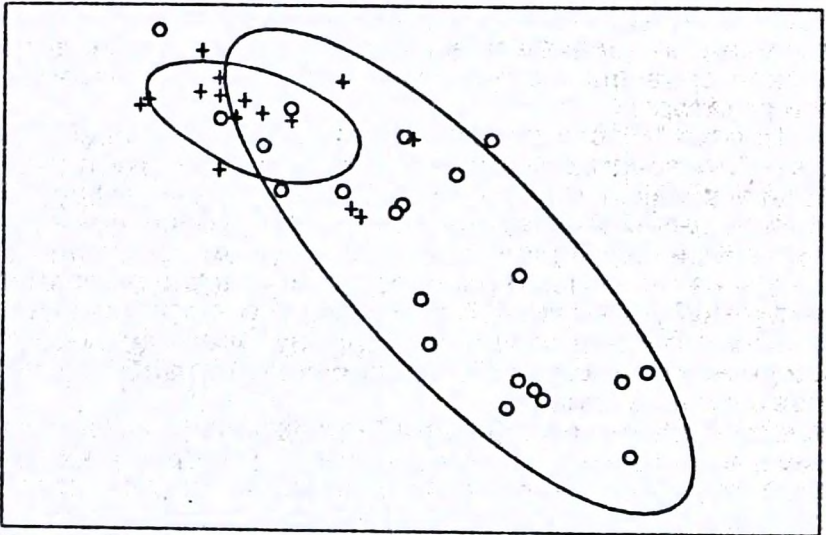


Рис.3. Классификационная карта сравнения плазмы доноров I и II групп крови.

0 - I группа крови; + - II группа крови.



Существование области перекрытия неизбежно ввиду неоднородности групп и трудностей, связанных с критериями отбора. Модельные эксперименты показали, что для групп, набранных 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 такого подхода связана с тем, что объемно 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, априорно относимых к одной группе, определяется зона доверительных интервалов.

С учетом пуассоновского распределения флуктуаций отдельных точек, зоны доверительных интервалов соответствуют эллипсоидным окружностям (плоскостное сечение объемного пуассоновского распределения), из которых внутренний эллипс включает точки спектров, которые принадлежат к данной совокупности в интервале 90% достоверности, а наружный эллипс - 70% достоверности.

Обсуждая возможность статистического анализа при помощи используемых классификационных программ, нельзя обойти вниманием следующий факт, который может вносить определенную корректировку в данный анализ.

Выше уже было указано, что на заданные координаты плоскости проецируются многомерные координаты спектра. А это означает, что при проекции точек из многомерного пространства на плоскость в зону определенной совокупности могут попадать некоторые точки, не принадлежащие этой совокупности. Другими словами, статистически значимые различия при таком визуальном плоскостном анализе принадлежат только тем наблюдениям, которые выходят за зоны доверительных интервалов. Те же точки, которые находятся в плоскости описываемого эллипса, необязательно находятся в 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, формируемых программой "Многомерный классификатор".

Примером классификационной таблицы может служить таблица, представленная на Рис.4. Рассмотрим принцип организации подобных таблиц.

		доноры с группой крови II	доноры с группой крови I
else	10%	11%	8%
доноры с группой крови II	44%	82%	44%
доноры с группой крови I	46%	7%	48%

Рис.4. Классификационная таблица сравнения доноров II и I групп крови.

Классификационная таблица характеризует вероятности распределения точек в многомерном пространстве по группам. Данную классификационную таблицу следует трактовать следующим образом. Например, нас интересует степень сходства доноров I и II групп крови.

Для того чтобы проанализировать данные по этой группе, надо найти соответствующий столбец в классификационной таблице. Вероятности нахождения точек этой группы в соответствующих областях многомерного пространства отражаются числами на пересечении данного столбца и соответствующих строк. Так, в нашем примере 82% доноров со II гр. крови попадают в зону, отвечающую месту нахождения в этой области пространства доноров II гр. крови (это отражает однородность самой группы), а 7% из них попадают в область нахождения доноров с I гр. крови (это отражает степень сходства доноров I гр. крови с II гр. 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.

В нашем примере 8% доноров I гр. крови и 11% доноров II гр. крови не попадают ни в одну из указанных групп. 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 столбе составляет общее количество точек, принадлежащих к данной группе.



## Литература

1. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. / Киев: Наукова думка, 1987.
2. Арефьев И.М., Еськов А.Н., Юдин И.К. Лазерный корреляционный спектроскоп для иммунологических и вирусологических анализов. / Мед.техника, 1979, N2, с. 30 - 34.
3. Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин Л.П. Лазерная диагностика в биологии и медицине. / М., Наука, 1983.
4. Климов А.Н., Шмелев Г.Е., Носкин В.А. и др. Спектроскопия оптического смещения и корреляция фотонов. / М., Мир, 1978.