

М.М. Кугейко, С.А. Лысенко

УРАВНЕНИЕ МНОЖЕСТВЕННОЙ РЕГРЕССИИ ДЛЯ ИНДИКАТРИСЫ
РАССЕЯНИЯ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И СПЕКТРАЛЬНЫХ
ЗНАЧЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЯ ПРЕЛОМЛЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

В медицине знание микрофизических характеристик крови позволяет оценивать состояние организма человека, а также устанавливать многие заболевания. Необходимость диагностики относительного показателя преломления эритроцитов крови ($n(\lambda)$, где λ – длина волны излучения) обусловлена, по меньшей мере, двумя причинами. Кроме вопросов косвенной идентификации вещественного состава эритроцитов, определенно коррелирующего с этим параметром, данные об $n(\lambda)$ необходимы в качестве априорной информации при решении «ограниченных» обратных задач светорассеяния кровью.

В настоящее время известен ряд работ, в которых предложены методы определения показателя преломления эритроцитов по оптическим характеристикам [2–5]. Однако ни один из этих методов не получил широкого распространения в клинической практике, что связано либо с чрезвычайной сложностью экспериментальной реализации этих методов (как например [3], где предлагается измерять 2 элемента матрицы рассеяния f_{33} и f_{34} в диапазоне углов $80^\circ \div 120^\circ$), либо с их принципиальными методическими ограничениями, не позволяющими обеспечить высокий уровень диагностики [4, 5, 6]. Методика [5], например, требует построения калибровочных кривых при различных значениях размера, показателя преломления эритроцитов и длины волны рассеянного излучения и позволяет определять $n(\lambda)$ только в случае если известен средний размер эритроцитов (т.е. предполагает проведение независимых одновременных измерений). Кроме того, большинство существующих методик предполагают проведение измерений в выделенных пробах эритроцитов, поскольку оперируют коэффициентами ослабления или поглощения, определяемыми поглощением проходящего излучения не только эритроцитами, но плазмой и другими биоконпонентами крови.

Обладающий достаточно высокой точностью определения показателя преломления одиночных сферических частиц ($\sim 5\%$) и стоящий особняком от вышеуказанных методик, метод «пролетной индикатрисы» [2] применительно к эритроцитам также обладает рядом существенных недостатков. Во-первых, существует необходимость выделения проб эритроцитов и как следствие отсутствие оперативности. Во-вторых, требуется предварительная сферизация эритроцитов, путем приготовления специальных суспензий, что вызвано сильным различием индикатрис рассеяния одиночных сферических частиц и сплюснутого дискоида (эритроцит). К сказанному следует также добавить,

что проточные цитометры представляют собой либо дорогостоящую импортную аппаратуру, либо специальное уникальное экспериментальное оборудование, что создает дополнительные экономические и технические проблемы при их внедрении.

Поскольку из-за значительного превышения концентрации эритроцитов над другими форменными элементами крови и размеров над макромолекулами плазмы и тромбоцитами рассеивающие свойства цельной крови определяются преимущественно микрофизическими параметрами эритроцитов [5], то для оперативной диагностики последних авторам представляется наиболее перспективным развитие и использование нефелометрических методов. Ниже рассматриваются возможности определения спектральных значений показателя преломления эритроцитов, основанные на измерении угловых оптических характеристик рассеивающей среды, исключающие отмеченные выше недостатки известных оптических методов.

При известных микроструктурных параметрах эритроцитов (функции распределения частиц по размерам $f(r)$, их комплексном показателе преломления m и счетной концентрации N) для их объемного коэффициента рассеяния β_{sca} справедливо следующее соотношение [6]:

$$\beta_{sca} = N \int_0^{\infty} \pi r^2 K_{sca}(m, x) f(r) dr,$$

где $x = 2\pi r/\lambda$ – параметр Ми, $K_{sca}(m, x)$ – фактор эффективности рассеяния излучения частицей с радиусом r на длине волны λ . Аналогичное выражение можно записать и для коэффициента направленного рассеяния $\beta(\theta)$.

Первый вопрос, который встает при решении обратной задачи (нахождение $f(r)$ и m) по данным оптических измерений, состоит в том, есть ли какая-нибудь информация о свойствах рассеивающего вещества в этих данных. Очевидно, что на этот вопрос можно ответить, рассчитав эти характеристики при различных микроструктурных параметрах рассеивающей среды. Поскольку гетерогенность цельной крови не усложняет исследование эритроцитов на фоне клеток различного рода, то ниже данные характеристики рассчитываются только для эритроцитов.

Используемая нами в дальнейшем модель эритроцитов предполагает, что все они имеют форму однородных сферических частиц, т.е. их оптические характеристики могут быть рассчитаны по формулам Ми. Такое упрощение обусловлено несколькими причинами. Во-первых, методики и алгоритмы расчета оптических характеристик несферических и неоднородных рассеивателей громоздки и имеют лишь ограниченную область применимости. Во-вторых, для сфероидов и цилиндров с умеренным параметром асферичности (от 0,5 до 2,0) индикатриса рассеяния света в переднюю полусферу, усред-

ненная по различным пространственным ориентациям, совпадает с индикатрисой шара того же объема [7]. Что касается распределения эритроцитов по размерам, то оно заменяется распределением по размерам сферических частиц $f(\tilde{r})$, эффективный радиус которых $\tilde{r} = (S/\pi)^{1/2}$, где S – эффективная рассеивающая площадь частицы. В качестве $f(\tilde{r})$ используется обобщенное гамма распределение, которое достаточно хорошо описывает данные многочисленных экспериментальных исследований эритроцитометрических кривых образцов крови [8, 9]. Ниже представлены результаты теоретического исследования чувствительности связи между индикатрисой рассеяния $g(\theta, \lambda) = \beta(\theta, \lambda)/\beta_{sca}(\lambda)$ и $n(\lambda)$ при $\theta = 1^\circ \div 180^\circ$ и $\lambda = 0,3 \div 1,2$ мкм к вариациям микроструктурных параметров эритроцитов в диапазонах, взятых из литературных данных [2, 8, 9].

На рис. 1 а представлена зависимость коэффициента корреляции между $\log|n(\lambda)-1|$ и $\log[g(\theta, \lambda)]$ в вышеуказанной области изменения θ и λ , полученная следующим образом:

1) задавалось 10^3 случайных состояний ансамбля эритроцитов, характеризующихся следующими параметрами: r_m – модальный радиус и ξ – полуширина их функции распределения по размерам; комплексный показатель преломления; счетная концентрация N из диапазонов их значений, выбранных из литературных данных [2, 8–11] и приведенных в таблице 1;

2) при каждой микрофизической комбинации определялась $g(\theta, \lambda_i)$, и по стандартным формулам математической статистики [12] проводился расчет соответствующих коэффициентов корреляции для углов $0^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$:

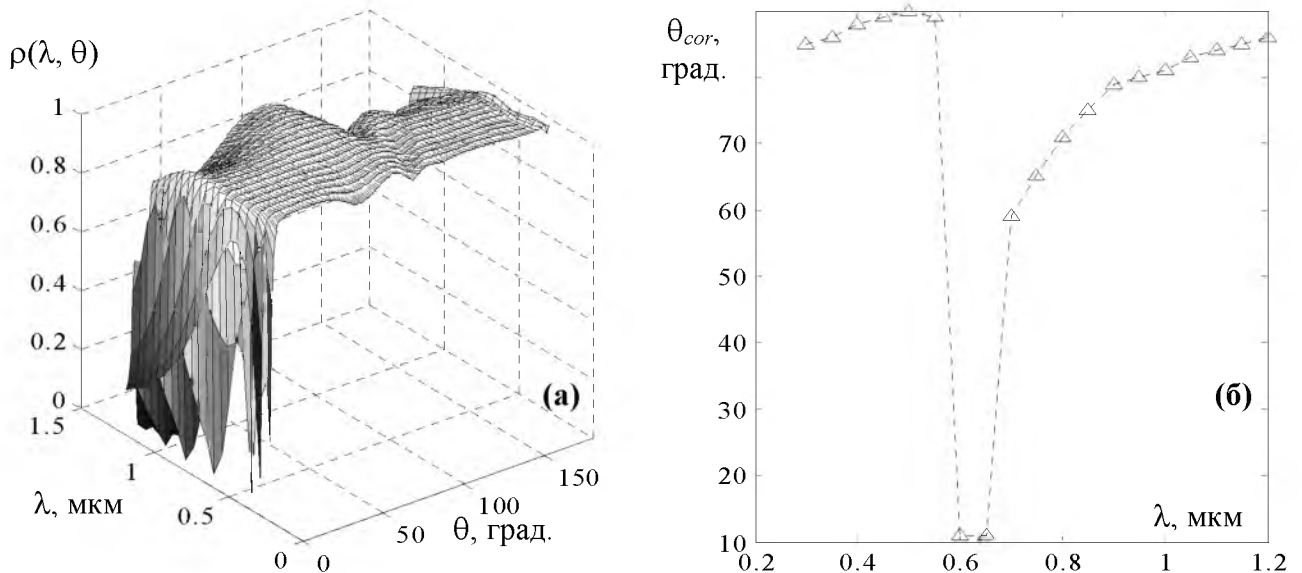
$$\rho(\theta, \lambda) = \frac{\sum_{i=1}^n (\log F_i(\lambda) - \overline{\log F(\lambda)}) (\log g_i(\theta, \lambda) - \overline{\log g(\theta, \lambda)})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\log F_i(\lambda) - \overline{\log F(\lambda)})^2 \sum_{i=1}^n (\log g_i(\theta, \lambda) - \overline{\log g(\theta, \lambda)})^2}},$$

где $i = 1, 2, \dots, n = 10^3$ – реализация состояния эритроцитов, с соответствующими ей индикатрисой рассеяния $g_i(\theta, \lambda)$ и показателем преломления $F_i(\lambda) = n_i(\lambda) - 1$, $\overline{\log g(\lambda, \theta)}$, $\overline{\log F(\lambda)}$ – математические ожидания логарифмов данных величин.

Таблица 1.

Диапазоны изменений микрофизических характеристик эритроцитов				
r_m	ξ	n	k	N
2,3 ÷ 3 мкм	8 ÷ 15	1,04 ÷ 1,07	$10^{-6} \div 2 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^9 \div 5,6 \cdot 10^9 \text{ см}^{-3}$

Рис. 1 б иллюстрирует зависимость угла максимальной корреляции между $\log|n(\lambda)-1|$ и $\log[g(\theta, \lambda)]$ от длины волны излучения λ . Как видно из рисунка θ_{cor} изменяется в указанном спектральном интервале в весьма широких пределах $-10^\circ \div 90^\circ$. Следовательно, для получения спектральной зависимости показателя преломления, необходимо производить измерения $g(\theta, \lambda)$ под несколькими углами из указанного диапазона значений θ_{cor} . При m углах приема



рассеянного излучения $n(\lambda)$ можно определять посредством уравнения множественной регрессии с коэффициентами a_0, a_k , зависящими от λ [12]:

Рис. 1. Зависимости коэффициента корреляции между $\log|n(\lambda)-1|$ и $\log[g(\theta, \lambda)]$ от λ и θ (а) и угла их наиболее тесной корреляции θ_{cor} от λ (б)

$$\log|n(\lambda) - 1| = a_0(\lambda) + \sum_{k=1}^m a_k(\lambda) \log[g(\theta_k, \lambda)]. \quad (1)$$

Здесь коэффициенты $a_0, a_1 \dots a_m$ определены методом наименьших квадратов:

$$\sum_{i=1}^n \left(\log[n_i(\lambda) - 1] - a_0(\lambda) - \sum_{k=1}^m a_k(\lambda) \cdot \log[g(\theta_k, \lambda)] \right)^2 \rightarrow \min.$$

Очевидно, что чем больше m , тем точнее из уравнения (1) определяется $n(\lambda)$. Однако при наличии ошибок измерения $g(\theta_k, \lambda)$, увеличение m (количества измерений) может и не приводить к желанному повышению точности восстановления спектрального хода показателя преломления. Поэтому в качестве критерия оптимальности выбора углов приема рассеянного излучения нами принимается минимум среднеспектральной погрешности восстановления $|n(\lambda)-1|$ с использованием (1) при наложении на значения $g(\theta_k, \lambda)$, $k = 1 \div m$ случайных ошибок в пределах 5 % (что учитывает чувствительность соответствующих регрессионных уравнений к ошибкам измерения $g(\theta_k, \lambda)$):

$$\min \left[\int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} \delta_{\max}(\lambda, \theta_1, \dots, \theta_m) d\lambda / (\lambda_{\max} - \lambda_{\min}) \right], \theta_i = 1^\circ \div 180^\circ, \quad (2)$$

где $\delta_{\max}(\lambda_n, \theta_1, \dots, \theta_m) = \max \{ \delta_i(\lambda_n, \theta_1, \dots, \theta_m) \}, i = 1 \div 10^3$ – максимальная по всему ансамблю реализации микроструктурных параметров погрешность определения $|n_i(\lambda) - 1|$ при $\lambda = \lambda_n$, возникающая с использованием уравнения (1) для углов $\theta_1, \dots, \theta_m$.

Проведенный расчет по составленной программе для $m = 2, 3, 4$ показывает, что оптимальной в плане точности восстановления $n(\lambda)$ является двухугловая схема измерения $g(\theta_k, \lambda)$ под углами $\theta_1 = 9^\circ$ и $\theta_2 = 87^\circ$. На рис. 2 а изображены спектральные зависимости коэффициентов a_k регрессионного уравнения (1), соответствующего данным углам. О точности восстановления $n(\lambda)$ при 5 %-й ошибке измерения индикатрисы под данными углами можно судить по рис. 2 б, на котором представлены средние (*MeanErr*) и максимальные (*MaxErr*) по ансамблю реализаций оптико-микроструктурных параметров эритроцитов ошибки восстановления $|n(\lambda) - 1|$. Как видно из рисунка, средние погрешности определения $n(\lambda)$ составляют единицы процентов.

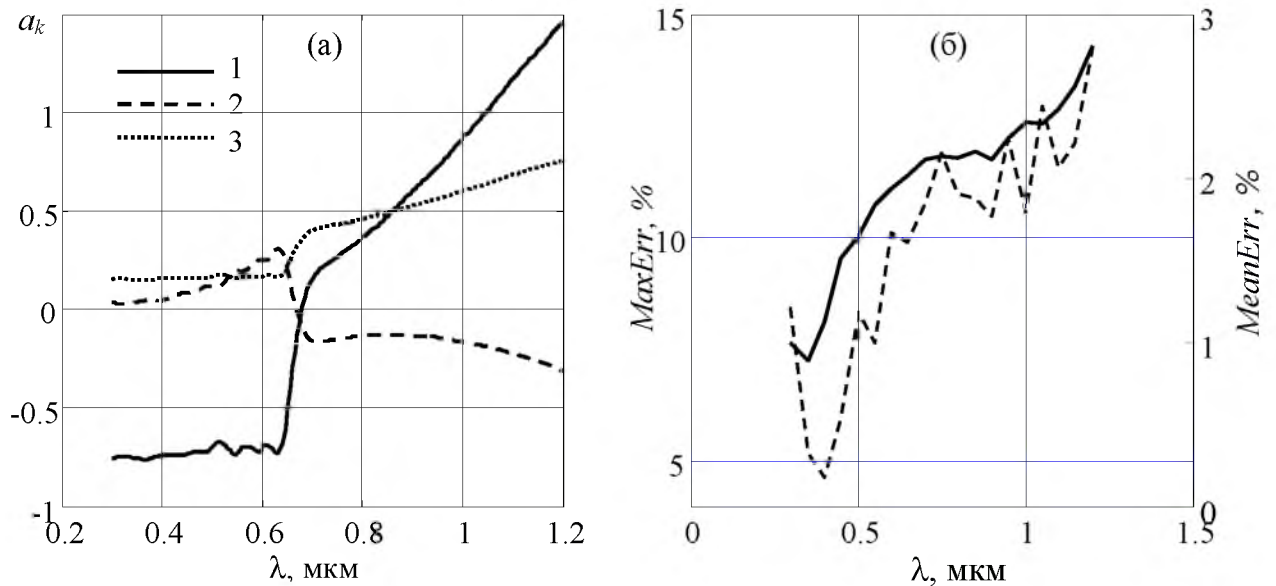


Рис. 2. (а) – спектральные зависимости регрессионных коэффициентов в (1); (б) – максимальные и средние по всему объему выборки микрофизических параметров эритроцитов, значения ошибок восстановления $n(\lambda)$ (которым соответствуют пунктирная кривая - левая шкала и сплошная кривая - правая шкала).

Таким образом, для практического применения данной методики (установления спектральных значений n) требуется измерить индикатрису рассеяния под двумя выше указанными углами на отдельной длине волн волн или в

некотором спектральном диапазоне, и с использованием соответствующих этим длинам волн коэффициентов a_k , и из уравнения (1) вычислить $n(\lambda)$.

На рис. 3 изображены результаты восстановления $n(\lambda)$ (соответствует эритроцитам, содержащим оксигемоглобин) с использованием вышеописанной методики. Заданные микрофизические параметры эритроцитов ($n(\lambda)$ – рис. 3 а, кривая 1; спектральная зависимость мнимой части показателя преломления; функция распределения по размерам) соответствуют их экспериментально полученным значениям в работах [4, 8, 13]. Как видно из рисунка форма кривой восстановленной зависимости $n(\lambda)$ даже при наличии 5 %-й ошибки измерения индикатрисы отчетливо отражает все основные особенности исходного профиля $n(\lambda)$. Кроме того, данный способ восстановления $n(\lambda)$ является слабо чувствительным к ошибкам измерения $g(\theta_k, \lambda)$, что подтверждается рис. 2 б и рис. 3 б. В самом деле, погрешность определения $|n-1|$ с использованием уравнения (1), вычисляемая методом конечных приращений [12] имеет вид:

$$\delta|n-1| = a_1\delta g_1 + a_2\delta g_2,$$

Причем, как видно из рис. 2 а, $|a_1|, |a_2| < 1$, следовательно $\delta|n-1| < \delta g_1 + \delta g_2$.

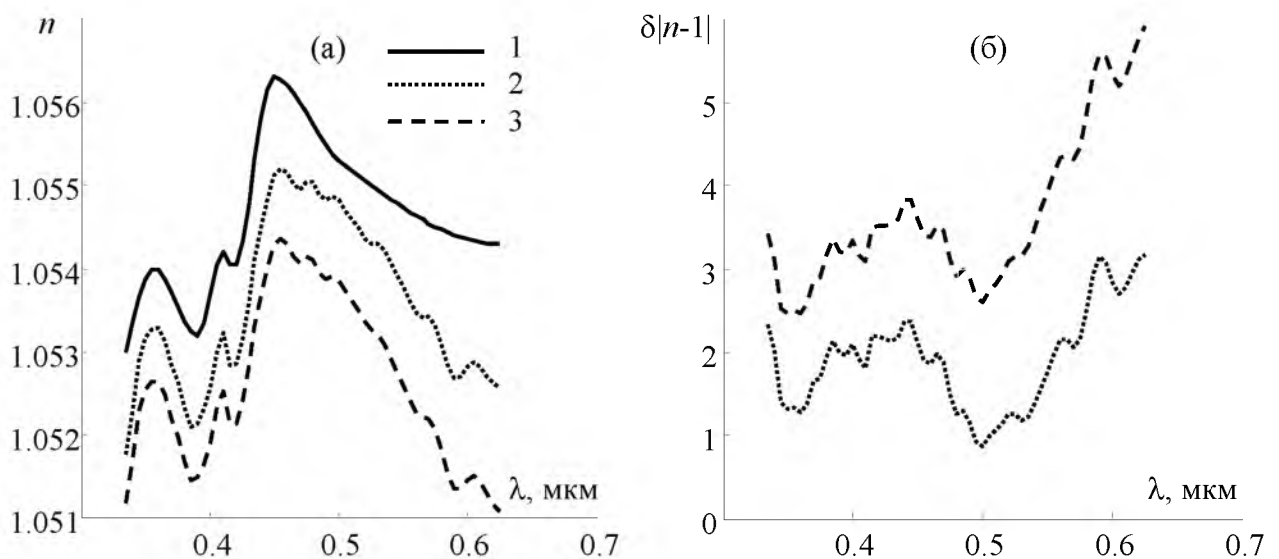


Рис. 3. Результаты восстановления спектральной зависимости показателя преломления эритроцитов, содержащих оксигемоглобин (а) (кривые 1, 2 и 3 соответствуют исходному профилю $n(\lambda)$ и профилям, восстановленным при отсутствии ошибок измерения $g(\theta_k, \lambda)$ и при наложении на них 5 %-й ошибки) и соответствующие им погрешности восстановления (б).

Таким образом, предлагаемая методика определения спектральных значений показателя преломления эритроцитов крови, включающая измерение индикатрисы рассеяния под двумя углами в требуемом спектральном диапазоне и использование уравнения множественной регрессии позволяет получать

данные характеристики с высокой точностью. Отсутствие необходимости приготовления специальных суспензий, использования калибровочных кристаллов, проведения независимых дополнительных измерений делает измерения по предлагаемой методике легко автоматизируемыми.

Литература

1. *Gutтер ., Хейльмейер Л.* правочник по клиническим функциональным исследованиям. М.: Медицина, 1966. 612 с.
2. *Лопатин В. Н., Приезжев А. В., Афанасенко А. Ю. и др.* Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2004. 384 с.
3. *Науменко Е. К., Олейник Т. В., Хайруллина А. Я.* Определение действительной части относительного показателя преломления сферических частиц по компонентам матрицы рассеяния// Оптика и спектроскопия. 1982. Т. 53, С. 480–492.
4. *Шумилина С. Ф.* Дисперсия действительной и мнимой частей комплексного показателя преломления эритроцитов крови человека в интервале 450 – 820 нм// Весці АН БССР. 1983. С. 79–84.
5. *Науменко Е. К., Хайруллина А. Я.* Определение показателя преломления и полидисперсности гидрозолей// Журн. прикл. спектр. 1989. Т. 9, С. 654–659.
6. *Зуев В. Е., Насц И. Э.* Обратные задачи лазерного зондирования атмосферы. Новосибирск: Наука, 1982. 242 с.
7. *Mishchenko M. I., Travis L. D., Lacis A. A.* Scattering, absorption, and emission of light by small particles. New York: Goddard Institute for space studies, 2004. 314 с.
8. *Хайруллина А.Я., Шумилина С.Ф.* Определение функции распределения эритроцитов по размерам методом спектральной прозрачности// ЖПС. 1973. Т. 19, № 3. С. 340–347.
9. *Кассирский И.А., Алексеев Г.А.* Клиническая методология. М.: Медицина, 1970. 800 с.
10. *Окороков А.Н.* Диагностика болезней внутренних органов. М.: Мед. Лит., 2003. 502 с.
11. *Науменко Е.К.* Изменение оптических свойств крови при агрегации эритроцитов. Мн.: Ин-т физики НАНБ, 2001. 20 с.
12. *Колемаев В.А., Калинина В.Н.* Теория вероятностей и математическая статистика, М.: ИНФРА-М, 1997. 301 с.
13. *Borovoi A. G., Naats E. I., Oppel U. G.* Scattering of light by red blood cell// J. Biomed. Opt. 1998. Vol. 3, P. 364–373.