

آنالیز کمی سرم خون بر اساس روش طیفسنجی رامان با استفاده از رگرسیون چندمتغیره حداقل مربعات جزئی

مریم بحرینی^۱، احمد حسین زادگان^۲، آرین رشیدی^۳، حمیدرضا میرزائی^۴، پرستو حاجیان^۴

^۱ آزمایشگاه طیفسنجی کاربردی، مرکز علم و فناوری لیزر و اپتیک، تهران

^۲ پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی ره، تهران

^۳ آزمایشگاه پاتولوژی، بیمارستان شهدای تجریش، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ره، تهران

^۴ مرکز تحقیقات سرطان، بیمارستان شهدای تجریش، گروه آنکولوژی رادیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ره، تهران

چکیده - آزمایش خون یک ابزار مهم برای تشخیص بیشتر بیماری‌ها می‌باشد. بنابراین روش‌های اندازه‌گیری آن اهمیت ویژه‌ای دارند. طیفسنجی رامان یک ابزار مناسب برای اندازه‌گیری اجزای خون می‌باشد، زیرا درعین حال که به مقدار اندکی از نمونه احتیاج دارد اما می‌تواند غلظت بسیار از اجزای موجود در خون را تنها با یک بار آزمایش و در مدت زمان کم اندازه‌گیری نماید. در این کار غلظت‌های تری-گلیسرید، کلسترول، گلوکز، *HDL* و *LDL* برای ۴۰ نمونه سرم خون با طیفسنجی رامان همراه با تحلیل چند متغیره رگرسیون حداقل مربعات جزئی بررسی شده است. در همه اندازه‌گیری‌ها از طول موج تحریک ۵۳۲ نانومتر استفاده شده است. برای همه کمیت‌ها ضریب همبستگی معنادار و بیش از ۹۴٪ بود. بعلاوه در این کار برای اولین بار ضریب همبستگی برای *LDL* بیشتر از ۹۵٪ به دست آمد. نتایج نشان می‌دهند که طیفسنجی رامان می‌تواند غلظت کمیت‌های موجود در سرم خون را تنها با یک آزمایش با دقت قابل قبول اندازه‌گیری کند.

کلیدواژه- سرم خون، رگرسیون حداقل مربعات جزئی، طیفسنجی رامان

Quantitative analysis of the blood serum based on Raman spectroscopy method using partial least squares regression

Maryam Bahreini 1, Ahmad Hosseinzadegan 2, Arian Rashidi 3, Hamid Reza Mirzaei 4, Parastoo Hajjian 4

1 Applied Spectroscopy Laboratory, Laser and Optics Science and Technology Center, Tehran

2 Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran

3 Clinical Pathology Laboratory, Shohadae Tajrish Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran

4 Cancer Research Center, Shohadae Tajrish Hospital, Department of Radiation Oncology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran

Abstract- Blood tests are one of the most important tools in most medical diagnosis. Therefore, the methods of measuring blood components are very important. Raman spectroscopy is a suitable tool for measuring blood components, because while it needs a small amount of sample, it can measure the concentration of the components in the blood with a single test, and in a short time. In this work, cholesterol, glucose, high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL) and triglycerides concentrations were investigated quantitatively for 40 serum samples using Raman spectroscopy with partial least square (PLS) regression. In all measurements, the 532 nm excitation wavelength is used. For all quantities, a correlation coefficient was significant and more than 94%. In addition, for the first time, the correlation coefficient for LDL was obtained more than about 95%. The results show that Raman spectroscopy can measure the concentration of blood serum components in a single test with an acceptable accuracy.

Keywords: Blood serum, Partial least square regression, Raman spectroscopy

۱- مقدمه

خون یکی از مهم‌ترین مایعات بدن می‌باشد که می‌تواند بیماری‌ها، جراحی و نارسایی اندام‌ها را نشان دهد. برای مثال به گزارش سازمان جهانی سلامت بیش از ۴۰۰ میلیون نفر به دیابت مبتلا هستند و نیاز دارند که چندین مرتبه در روز سطح قند خون آن‌ها اندازه‌گیری شود [۱]. این تعداد از آزمایش‌ها و اهمیت آن محققان را بر آن داشته تا روش‌های موجود را بهبود بخشند. یک روش ایده‌آل باید دقیق، سریع، ارزان قیمت و بدون نیاز به معرف باشد.

امروزه در آزمایشگاه‌های خون سطح گلوکز و کلسترول با استفاده از تست‌های آنزیمی اندازه‌گیری می‌شود [۲]. در این روش برای هر کمیت معرف منحصر به آن وجود دارد که این یعنی تعداد بسیار زیاد معرف‌ها. بنابراین روش‌های فاقد معرف نظیر روش‌های اپتیکی یک پیشرفت در زمینه آزمایش خون می‌باشند. از این رو بسیاری از پژوهشگران روش‌های اپتیکی را برای بررسی اجزای خون برگزیدند. فلورسانس، قطبش پذیری و طیف‌سنجی رامان از جمله روش‌هایی هستند که برای اندازه‌گیری خون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در مورد روش فلورسانس باید توجه داشت این روش کیفی بوده و برای اندازه‌گیری کمی مناسب نیست [۳]. در روش قطبش پذیری از تغییرات زاویه قطبش پرتو بازتابی از چشم غلظت گلوکز موجود در چشم را اندازه‌گیری می‌کند. در چشم تنها ماده فعال نوری گلوکز می‌باشد [۴]. این روش برای خون که در آن چندین ماده فعال نوری نظیر پروتئین وجود دارد موثر نیست.

بعلاوه روش‌هایی که بیان شد تنها یک کمیت را می‌توانند بررسی کنند در حالی که روش طیف‌سنجی رامان می‌تواند چندین المان را در یک آزمایش بررسی کند. این یک برتری بزرگ است که یک روش اندازه‌گیری قادر است چندین کمیت را یکجا بررسی کند. طیف‌سنجی رامان یک روش اپتیکی بر پایه پراکندگی غیر الاستیک نور با ماده می‌باشد. در این روش اختلاف انرژی بین باریکه فرودی و پراکنده برابر با انرژی یک نوسان مولکولی می‌باشد. بنابراین طیف‌سنجی رامان می‌تواند تغییرات در مرتبه مولکولی را تشخیص دهد. بعلاوه طیف‌سنجی رامان یک روش غیرتهاجمی می‌باشد که قادر است تغییرات مولکولی

را در لحظه بررسی کند. این ویژگی طیف‌سنجی رامان را به یک ابزار قدرتمند برای بررسی نمونه‌های زیستی تبدیل کرده است.

با توجه به مزیت‌های فراوان طیف‌سنجی رامان در اندازه‌گیری کمی خون در این کار غلظت‌های ترکیباتی چون: تری‌گلیسرید، کلسترول، گلوکز، لیپوپروتئین چگال^۱ (HDL) و لیپوپروتئین رقیق^۲ (LDL) با استفاده از طیف‌سنجی رامان و تحلیل رگرسیون حداقل مربعات جزئی^۳ (PLS) از سرم خون استخراج می‌شود.

۲- روش‌های تجربی

۱-۲- آماده سازی نمونه

برای جمع آوری نمونه در آزمایشگاه خون ۴۰ نمونه به شکل تصادفی انتخاب گردید. سپس برای جداسازی سرم، نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. غلظت‌های تری‌گلیسرید، کلسترول، گلوکز، HDL و LDL با استفاده از روش آنزیمی اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌های سرم در لوله‌های آزمایشگاهی شیشه‌ای به آزمایشگاه طیف‌سنجی جهت تست رامان منتقل گردید.

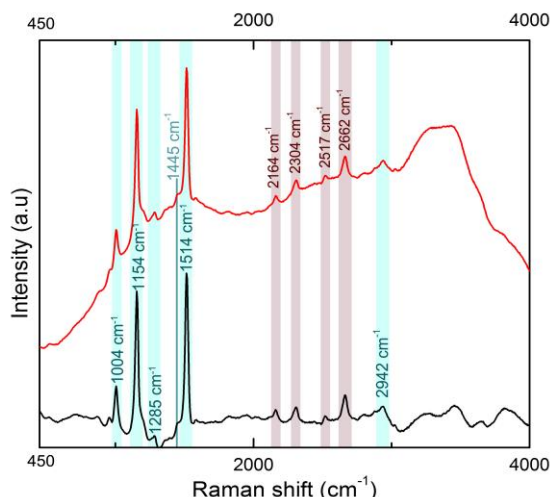
۲-۲- چیدمان تجربی

برای اندازه‌گیری‌های میکرو-رامان یک چیدمان بر اساس پراکندگی بازگشتی آماده‌سازی کردیم. در این چیدمان طول موج تحریک ۵۳۲ نانومتر و انرژی تحریک ۷۰ میلی-وات است. از یک شیئی ۲۰ برابر کننده برای تمرکز نور روی نمونه و جمع‌آوری نور پراکنده استفاده شده است. هر طیف از میانگین‌گیری ده طیف که هرکدام ۱ ثانیه جمع‌آوری شده به دست آمد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده در این چیدمان باریکه لیزر با شیئی روی نمونه متمرکز می‌شود، سپس نور پراکنده شده توسط شیئی جمع شده و به آینه دیکروئیک می‌رسد. آینه دیکروئیک همه پرتوهای پراکنده شده را عبور می‌دهد و قسمت عمده پرتو فرودی را بازتاب می‌دهد. برای حذف

^۱High Density Lipoprotein

^۲Low Density Lipoprotein

^۳Partial Least Square



شکل ۲: طیف رامان با زمینه فلورسانس و بدون زمینه فلورسانس

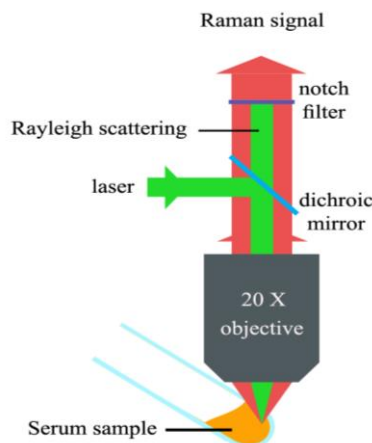
۳- نتایج

شکل ۲ طیف رامان نمونه سرم را قبل و بعد از حذف زمینه فلورسانس نشان می‌دهد. موقعیت هر قله در شکل مشخص شده است. در جدول ۱ مد نوسانی مربوط به هر قله معرفی شده است. به علاوه با استفاده از این مدها کمیت‌های رامان فعال خون نیز مشخص شده است. بنابراین گلوکز، فنیل آلانین، پروتئین و ساختارهای لیپیدی چون: کلسترول، تری‌گلیسرید، HDL و LDL رامان فعال می‌باشند و می‌توان تغییرات غلظت آن‌ها را بررسی کرد. در اینجا به جز فنیل آلانین و پروتئین سایر کمیت‌ها ارزیابی شدند.

جدول ۱: موقعیت قله، مد نوسانی و الوان موجود در خون مربوط به مد مربوطه

ساختار مرتبط	مد نوسانی	قله (cm^{-1})
فنیل آلانین، لیپید	حلقه اروماتیک اتم‌های کربن	۱۰۰۴
گلوکز، کلسترول	کشش پیوند C-C	۱۱۵۴
پروتئین	امید نوع III	۱۲۸۵
پروتئین، لیپید	کشش CH_3 و CH_2	۱۴۴۵
لیپید	کشش درون صفحه C=C	۱۵۱۴
پروتئین، لیپید	کشش درون صفحه نامتقارن CH_2	۲۹۴۲

نمودار تحلیل PLS برای تری‌گلیسرید، کلسترول، گلوکز، HDL و LDL در شکل ۳ آمده است. همان‌طور که از شکل پیداست یک همبستگی خوب بین داده‌ها ایجاد شده است. با توجه به داده‌های جدول ۲ برای همه کمیت‌ها ضریب همبستگی (r^2) بزرگ‌تر از ۰.۹۴ به دست آمده



شکل ۱: طرح‌واره‌ای از چیدمان رامان

تمام باریکه فرودی یک فیلتر ناچ بعد از آینه دیکروئیک قرار دادیم. در نهایت باریکه وارد طیف‌سنج می‌شود و طیف شکل می‌گیرد.

۳-۲- تحلیل داده‌ها

در تحلیل داده‌ها ابتدا باید زمینه فلورسانس طیف‌ها حذف شوند. بنابراین با به‌کارگیری روش چندجمله‌ای یک چندجمله‌ای درجه دوازدهم جهت حذف فلورسانس استفاده گردید. سپس داده‌های کمتر از 450 cm^{-1} و بیشتر از 4000 cm^{-1} حذف شده و مابقی به شدت قله 1514 cm^{-1} نرمال شده‌اند. فرض می‌کنیم که یک ارتباط خطی بین غلظت نمونه‌ها و شدت‌های طیفی برقرار است. چون در اینجا تعداد متغیرهای مستقل (داده‌های رامان) خیلی بیشتر از متغیرهای وابسته (غلظت نمونه‌ها برای هر کمیت) است روش رگرسیون PLS تنها روش ممکن برای تحلیل داده‌ها می‌باشد. روش PLS شامل یک مجموعه گسترده از روش‌ها می‌باشد که به‌طور کلی با استفاده از یک سری متغیرهای پنهان^۴ (LVs) بین یک مجموعه از متغیرهای مشاهده شده ارتباط برقرار کند. در واقع هر LV ترکیب خطی از متغیرهای مستقل (داده‌های رامان) می‌باشد که بیشتر ویژگی‌های آن‌ها را دارند. بنابراین PLS با این متغیرهای جدید که تعداد آن‌ها کمتر از متغیرهای مستقل است یک ارتباط بین متغیرهای مشاهده شده شکل می‌دهد. در این کار، تحلیل داده‌ها با استفاده از تابع plsregress در نرم‌افزار MATLAB انجام شده است.

^۴Latent Variables

جدول ۲: نتایج به دست آمده از مدل PLS برای کمیت‌های

MBTC (mg/dl)	RMSE (mg/dl)	موجود در سرم خون		کمیت
		r^2_{cv}	r^2	
۱۳۲	۸/۷۷	۰/۴۳۱	۰/۹۸۳	تری‌گلیسرید
۱۸۶	۷/۰۲	۰/۴۷۶	۰/۹۷۸	کلسترول
۱۰۲	۴/۱۹	۰/۳۴۲	۰/۹۴۵	گلوکز
۴۱	۲/۰۳	۰/۴۴۳	۰/۹۶۸	HDL
۱۱۲	۶/۹۵	۰/۵۵۸	۰/۹۶۵	LDL

رامان فعال در خون می‌باشند.

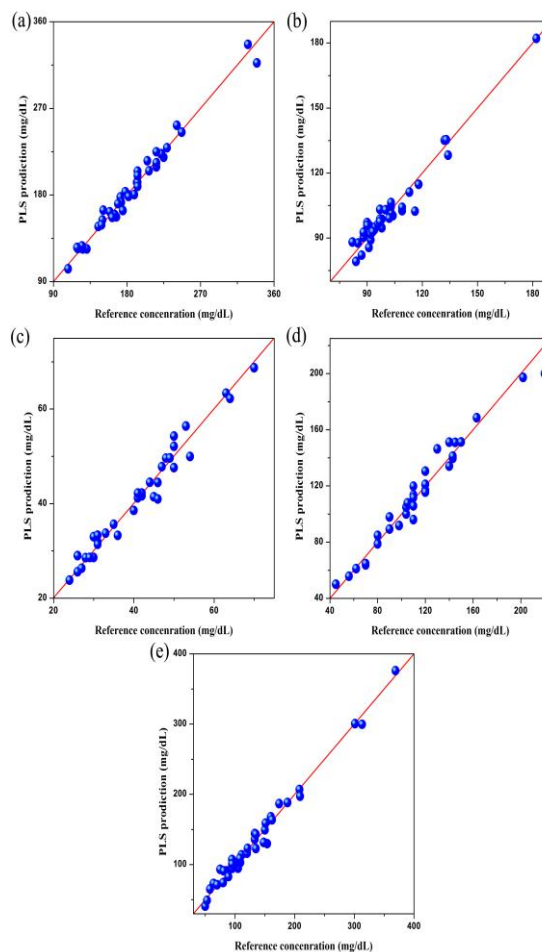
مقایسه ضریب همبستگی و RMSE گزارش شده برای کارهای پیشین با نتایج ما که در جدول ۲ گزارش شد نشان می‌دهد که در این پژوهش ضریب همبستگی برای تمام کمیت‌ها بهبود یافته است [۶-۸]. این در حالی است که RMSE همچنان قابل مقایسه با کمترین مقادیر گزارش شده می‌باشد. در این کار ما برای اولین بار موفق به گزارش ضریب همبستگی بیش از ۰/۹۵ برای LDL شدیم. در اینجا کل زمان طیف‌گیری ۱۰ ثانیه است.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش ما با روش طیف‌سنجی رامان همراه با آنالیز تحلیل چند متغیره غلظت کمیت‌های مهم در سرم خون را بررسی کردیم. برای تمام المان‌های اندازه‌گیری شده ضریب همبستگی بیش از ۰/۹۴ به دست آمد. نتایج ضریب همبستگی به دست آمده برای تمام کمیت‌ها بهتر از کارهای پیشین است. ما برای اولین بار موفق به اندازه‌گیری غلظت LDL در مرتبه بالای ۰/۹۵ شدیم. نتایج نشان می‌دهند که طیف‌سنجی رامان یک روش مناسب برای اندازه‌گیری کمی اجزای خون می‌باشد.

مراجع

- [1] *Global report on diabetes*, 2016, World Health Organization
- [2] On the enzymatic determination of blood glucose, 1960, *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*
- [3] Fluorescent substances in uremic and normal serum, 1985, *Clinical chemistry*
- [4] Noninvasive glucose sensing utilizing a digital closed-loop polarimetric approach, 1997, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*
- [5] PLS-regression: a basic tool of chemometrics, 2001, *Chemometrics and intelligent laboratory systems*
- [6] Blood analysis by Raman spectroscopy, 2002, *Optics letters*
- [7] Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy, 1999, *Applied Optics*
- [8] Quantitative analysis of serum and serum ultrafiltrate by means of Raman spectroscopy, 2004, *Analyst*



شکل ۳: تحلیل رگرسیون PLS، محور افقی اندازه‌های به دست آمده از تست آنزیمی و محور عمودی داده‌های به دست آمده از مدل PLS. (a) کلسترول، (b) گلوکز، (c) HDL، (d) LDL و (e) تری‌گلیسرید می‌باشد.

است. این ضریب میزان شباهت مقادیر مرجع را در مقایسه با مقادیر به دست آمده از مدل نشان می‌دهد. معناداری مدل با فاکتور معناداری (r^2_{cv}) مشخص می‌شود. اگر این فاکتور بزرگ‌تر از صفر باشد ضریب همبستگی معنادار می‌باشد [۵]. در اینجا برای همه کمیت‌ها فاکتور معناداری مثبت می‌باشد. در این جدول ریشه میانگین مربع خطا^۵ (RMSE) آمده که در با مشاهده بزرگی میانگین غلظت-های به دست آمده از تست خون^۶ (MBTC) خطای مدل بهتر ارزیابی می‌شود. می‌توان گفت که برای تمام کمیت‌ها مقدار RMSE کمتر از ۱۰٪ از مقادیر مرجع است. در مجموع این نتایج نشان می‌دهند که طیف‌سنجی رامان یک روش قابل اعتماد برای اندازه‌گیری غلظت کمیت‌هایی

^۵Root Mean Square Error

^۶Mean Blood Test Concentration