

Упрощенный алгоритм измерения дисперсии деформируемости эритроцитов на основе метода лазерной эктацитометрии

С.Ю.Никитин, Ю.С.Юрчук

Теоретически проанализирована возможность измерения дисперсии деформируемости эритроцитов методом лазерной дифрактометрии в сдвиговом потоке (эктацитометрия). Найден параметр дифракционной картины, чувствительный к дисперсии деформируемости эритроцитов и в меньшей степени – к таким параметрам, как уровень интенсивности рассеянного света, форма эритроцитов, концентрация эритроцитов в суспензии, геометрические размеры экспериментальной установки и т. п. Предложен новый алгоритм измерения дисперсии деформируемости эритроцитов на основе данных лазерной эктацитометрии.

Ключевые слова: эритроциты, деформируемость, лазерная эктацитометрия.

1. Введение

Одним из основных реологических параметров крови является деформируемость эритроцитов, определяемая как мера способности этих клеток изменять свою форму под действием внешних сил. Авторы многих работ отмечают важность измерения этого параметра для диагностики и лечения различных заболеваний. При этом ставится задача измерения не только средней деформируемости, но и функции распределения эритроцитов по деформируемости. Целью нашей работы является измерение характеристик деформируемости эритроцитов на основе данных лазерной эктацитометрии.

Лазерная дифрактометрия эритроцитов в сдвиговом потоке (эктацитометрия) [1] основана на наблюдении дифракционных картин (ДК). Дифракционная картина возникает при просвечивании лазерным пучком сильно разбавленной суспензии эритроцитов, в которой эритроциты деформированы силами вязкого трения. Примеры таких картин представлены в работах [2–6]. Точность измерений, проводимых этим методом, зависит от точности определения формы линий изоинтенсивности (ЛИ) дифракционной картины. Точность измерения формы ЛИ, в свою очередь, зависит от того, в какой части картины находится данная линия. Иными словами, она зависит от уровня интенсивности рассеянного света. При этом максимальная точность измерения достигается в той области экрана наблюдения, где интенсивность рассеянного света наиболее быстро меняется с координатой, т. е. в области максимального градиента интенсивности. Модели, развитые ранее [2–5], неприменимы в этой области, поэтому актуальна разработка новых теоретических моделей, которые охватывали бы указанную часть

ДК. Одна из таких моделей представлена в настоящей работе.

2. Основная идея

Основная идея модели состоит в том, что в области максимального градиента зависимость интенсивности рассеянного света от координаты точки на экране наблюдения описывается линейной функцией. Например, функция Эйри [7] (рис. 1)

$$\psi(q) = \left[\frac{2J_1(q)}{q} \right]^2 \quad (1)$$

хорошо аппроксимируется линейной функцией в области $1 \leq q \leq 2$, где $0.3 \leq \psi \leq 0.7$ [8]. В этой области функция Эйри может быть представлена в виде

$$\psi(q) = \alpha - \beta q \quad (\alpha = 1.24, \beta = 0.46), \quad (2)$$

а погрешность линейной аппроксимации не превышает 10%.

Функция $\psi(q)$, определяемая формулой (1), описывает дифракцию на круглом отверстии [7, 9], а также на круглых

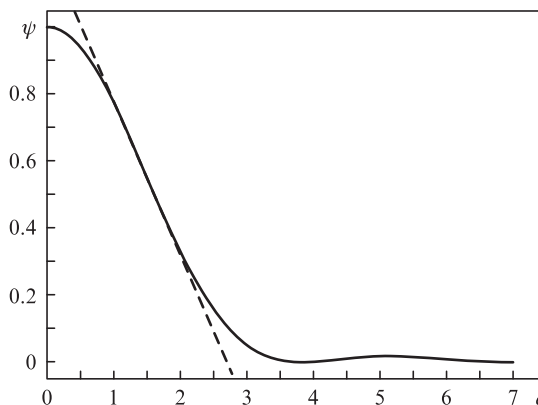


Рис. 1. Функция Эйри (сплошная кривая) и ее линейная аппроксимация (штриховая линия) в области максимального градиента функции.

С.Ю.Никитин, Ю.С.Юрчук. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: sergeynikitin007@yandex.ru, yur-yulya@yandex.ru

Поступила в редакцию 4 марта 2015 г., после доработки – 23 апреля 2015 г.

или эллиптических дисках [10]. Однако аппроксимация вида (2) применима для более широкого класса объектов, например для сферических или сфероидальных частиц, двояковогнутых дисков [11, 12]. В области максимального градиента функции, описывающие пространственные распределения интенсивности рассеянного света, для таких частиц также линейны, хотя и могут отличаться от (2) значениями постоянных коэффициентов α и β .

3. Модель эллиптических дисков

Как показывают наблюдения [13], эритроцит в сдвиговом потоке вытягивается вдоль потока и приобретает форму, близкую к эллипсоидной. Мы полагаем, что в этих условиях эритроцит можно моделировать плоским эллиптическим диском [10]. Расчеты [2–6] показывают, что эта модель обеспечивает достаточную точность. Вместе с тем она позволяет аналитически рассчитать картину рассеяния лазерного пучка на ансамбле эритроцитов в эктацитометре и установить функциональные соотношения между основными параметрами задачи, что важно для разработки новых алгоритмов обработки данных.

При рассеянии лазерного пучка на ансамбле идентичных одинаково ориентированных эллиптических дисков с полуосями a и b , распределение интенсивности света на экране наблюдения, расположенном в дальней зоне дифракции, описывается формулой [10]

$$I(x, y) = I_0 N |\gamma|^2 \left(\frac{S}{\lambda z} \right)^2 \psi(q), \quad (3)$$

где функция $\psi(q)$ определена формулой (1) и

$$q = \frac{k}{z} \sqrt{a^2 x^2 + b^2 y^2}. \quad (4)$$

Формула (3) соответствует усредненному по координатам эритроцитов распределению света в ДК. В реальном эксперименте по лазерной эктацитометрии такое усреднение происходит автоматически в результате непрерывного движения эритроцитов через лазерный пучок и конечной выдержки при фотографировании ДК.

В формулах (3) и (4) x, y – декартовы координаты точки на экране наблюдения в системе координат, начало которой выбрано в точке падения на экран прямого лазерного пучка, z – расстояние от измерительного объема до экрана наблюдения. Ось X направлена по горизонтали, ось Y – по вертикали. Физически направления этих осей выделены тем, что одна из них параллельна, а другая перпендикулярна сдвиговому потоку в эктацитометре. Остальные величины обозначают следующее: I_0 – интенсивность падающего лазерного пучка; N – число частиц, освещаемых лазерным пучком; $k = 2\pi/\lambda$ – волновое число; λ – длина световой волны; $S = \pi ab$ – площадь основания диска; γ – параметр, пропорциональный толщине эритроцита. В условиях лазерной дифрактометрии $|\gamma|^2 \approx 1$. Отметим, что формула (3) описывает распределение интенсивности света в тех точках экрана наблюдения, куда не попадает излучение прямого (нерассеянного) лазерного пучка.

4. Неоднородный ансамбль эритроцитов

В крови человека разные эритроциты обладают разной способностью к деформации (деформируемостью) [13–16]. Принимая во внимание это обстоятельство, бу-

дем считать размеры полуосей эллиптического диска a и b случайными величинами и определим их формулами [2–6]

$$a = a_0(1 + \varepsilon), \quad b = b_0(1 - \varepsilon). \quad (5)$$

Здесь a_0 и b_0 – средние размеры полуосей; ε – случайный параметр. Среднее значение этого параметра считаем равным нулю:

$$\langle \varepsilon \rangle = 0. \quad (6)$$

Характеристиками ансамбля частиц являются величина

$$s = a_0/b_0, \quad (7)$$

а также следующие статистические моменты величины ε :

$$\langle \varepsilon^2 \rangle = \mu, \quad \langle \varepsilon^3 \rangle = \nu. \quad (8)$$

Здесь s, μ, ν – средняя деформируемость эритроцитов, а также ширина и асимметрия их распределения по деформируемости соответственно. Мы полагаем, что неоднородность ансамбля по формам частиц является относительно слабой, т.е. $|\varepsilon| \ll 1$. В этом случае $\mu \ll 1, \nu \ll 1$. Эти соотношения, как правило, хорошо выполняются для реальных ансамблей эритроцитов.

5. Распределение интенсивности рассеянного света в центральной части дифракционной картины

В этом разделе мы вычислим распределение интенсивности рассеянного света в той части ДК, где справедлива аппроксимация (2). Эта часть картины лежит за пределами прямого лазерного пучка и представляет собой эллиптическую кольцевую зону, определяемую формулой

$$0.4 \leq I(x, y)/I(0) \leq 0.6. \quad (9)$$

Здесь $I(x, y)$ – интенсивность света в данной точке ДК; $I(0)$ – интенсивность центрального дифракционного максимума.

Подстановка выражений (5) в формулы (3), (4) приводит к тому, что распределение интенсивности света на экране наблюдения становится случайной функцией. В этом случае наблюдаемое распределение можно вычислить путем усреднения интенсивности по параметру ε :

$$I(x, y) = \left\langle I_0 N |\gamma|^2 \left(\frac{S}{\lambda z} \right)^2 \psi(q) \right\rangle_\varepsilon, \text{ или}$$

$$I(x, y) = I_0 N |\gamma|^2 \left(\frac{S_0}{\lambda z} \right)^2 \langle (1 - \varepsilon^2)^2 \psi(q) \rangle_\varepsilon,$$

где $S_0 = \pi a_0 b_0$;

$$q = (k/z) \sqrt{a_0^2(1 + \varepsilon)^2 x^2 + b_0^2(1 - \varepsilon)^2 y^2}. \quad (10)$$

В частности, интенсивность света в центре ДК

$$I(0) = I_0 N |\gamma|^2 \left(\frac{S_0}{\lambda z} \right)^2 \langle (1 - \varepsilon^2)^2 \rangle_\varepsilon,$$

или, приближенно,

$$I(0) = I_0 N |\gamma|^2 \left(\frac{S_0}{\lambda z}\right)^2 (1 - 2\mu).$$

Отметим, что приведенные формулы описывают распределение интенсивности света в тех точках экрана наблюдения, куда не попадает излучение прямого лазерного пучка. Центром ДК мы (для краткости) называем окрестность прямого лазерного пучка.

Интенсивность центрального дифракционного максимума $I(0)$ удобно использовать для нормировки интенсивности рассеянного света. Введя функцию

$$f(x, y) = I(x, y)/I(0), \tag{11}$$

получим

$$(1 - 2\mu)f(x, y) = \langle (1 - \varepsilon^2)^2 \psi(q) \rangle_\varepsilon. \tag{12}$$

Для нормировки координат на экране наблюдения введем величины

$$A = z/(ka_0), \quad B = z/(kb_0), \tag{13}$$

определяющие размеры ДК по горизонтали и по вертикали. Тогда выражение (10) можно представить в виде $q = \sqrt{(1 + \varepsilon)^2 u^2 + (1 - \varepsilon)^2 v^2}$ с нормированными координатами

$$u = x/A, \quad v = y/B. \tag{14}$$

Выделив явную зависимость величины q от параметра ε , получим $q = \sqrt{(1 + \varepsilon^2)g + 2h\varepsilon}$ с функциями координат $g = u^2 + v^2, h = u^2 - v^2$.

Используя аппроксимацию (2) и формулу (12), распределение интенсивности в центральной части ДК представим в виде

$$(1 - 2\mu)f = \langle \Phi(\varepsilon) \rangle_\varepsilon. \tag{15}$$

Здесь функция $\Phi(\varepsilon) = (1 - \varepsilon^2)^2 [\alpha - \beta q(\varepsilon)]$. Разложив Φ в ряд по степеням малого параметра ε и сохранив члены до третьего порядка включительно, получим

$$\begin{aligned} \Phi(\varepsilon) = & \alpha - \beta\sqrt{g} - \frac{\beta h}{\sqrt{g}}\varepsilon \\ & + \left(-4\alpha + 3\beta\sqrt{g} + \frac{\beta h^2}{g\sqrt{g}}\right)\frac{\varepsilon^2}{2} + \frac{\beta h}{2\sqrt{g}}\left(5 - \frac{h^2}{g^2}\right)\varepsilon^3. \end{aligned} \tag{16}$$

Подставим (16) в (15) и усредним полученное выражение по случайному параметру ε , принимая во внимание (6) и (8). Далее введем полярные координаты r, φ , определив их формулами

$$u = r \cos \varphi, \quad v = r \sin \varphi. \tag{17}$$

Тогда $g = r^2, h = r^2 \cos 2\varphi$, и выражение для нормированной интенсивности света приобретает вид

$$(1 - 2\mu)f = \alpha - \beta r + \frac{\mu}{2}(-4\alpha + 3\beta r + \beta r \cos^2 2\varphi)$$

$$+ \frac{\nu}{2}\beta r \cos 2\varphi (5 - \cos^2 2\varphi). \tag{18}$$

Эта формула описывает искомое распределение нормированной интенсивности рассеянного света в центральной части ДК.

6. Линия изоинтенсивности, ее полярные и характеристические точки

В лазерной эктацитометрии анализ ДК проводят, используя понятие линии изоинтенсивности. Так называется линия на экране наблюдения, на которой интенсивность рассеянного света имеет некоторое постоянное значение. Математически такая линия определяется уравнением

$$f = \text{const}. \tag{19}$$

Из (18) и (19) следует, что

$$\begin{aligned} & \frac{\beta}{(\alpha - f)(1 - 2\mu)} r(\varphi) \\ & = \left[1 - \frac{\mu}{2}(3 + \cos^2 2\varphi) - \frac{\nu}{2}(5 - \cos^2 2\varphi) \cos 2\varphi\right]^{-1}. \end{aligned} \tag{20}$$

Функция $r(\varphi)$, определяемая этой формулой, описывает форму ЛИ в полярных координатах.

Допустим, что случайный параметр ε описывается четной функцией распределения плотности вероятности $w(\varepsilon)$, т. е.

$$w(\varepsilon) = w(-\varepsilon). \tag{21}$$

В соответствии с (8) для такого ансамбля $\nu = 0$, и формула (20) приобретает вид

$$\frac{\beta}{(\alpha - f)(1 - 2\mu)} r(\varphi) = \left[1 - \frac{\mu}{2}(3 + \cos^2 2\varphi)\right]^{-1}. \tag{22}$$

Неоднородный ансамбль частиц, удовлетворяющий условию (21), назовем симметричным ансамблем. Далее мы ограничимся рассмотрением неоднородного симметричного ансамбля эритроцитов.

Назовем полярными точками ЛИ точки ее пересечения с горизонтальной и вертикальной осями координат. Вычислим координаты полярных точек. Декартовы координаты произвольной точки ЛИ определяются формулами (14), (17) и могут быть представлены в виде $x = \text{Arcos}\varphi, y = B r \sin\varphi$.

Координата x_p полярной точки, лежащей на оси X , определяется условием $y = 0$, или $\varphi = 0$. Следовательно,

$$x_p = A r(0). \tag{23}$$

Координата y_p полярной точки, лежащей на оси Y , определяется условием $x = 0$, или $\varphi = \pi/2$. Следовательно,

$$y_p = B r(\pi/2) = B r(0). \tag{24}$$

Обозначим

$$D = y_p/x_p. \tag{25}$$

Тогда из (7), (13), (23)–(25) следует, что $D = s$. Таким образом, в случае симметричного ансамбля частиц координаты полярных точек ЛИ характеризуют среднюю деформируемость эритроцитов в сдвиговом потоке лазерного эктацитометра.

Назовем характеристическими точками ЛИ точки, координаты которых определяются формулами $x_c = Ar(\pi/4)\cos(\pi/4)$, $y_c = Br(\pi/4)\sin(\pi/4)$, или

$$x_c = (A/\sqrt{2})r_c, \quad y_c = (B/\sqrt{2})r_c, \quad (26)$$

где

$$r_c = r(\pi/4), \quad (27)$$

и функция $r(\varphi)$ определяется формулой (22). Из (23), (24), (26) следует, что $y_c/x_c = B/A = y_p/x_p$. Это соотношение позволяет найти характеристические точки на линии изоинтенсивности с помощью следующей процедуры. Построим прямоугольник с вертикальными и горизонтальными сторонами, проходящими через полярные точки. Этот прямоугольник охватывает ЛИ, касаясь ее в полярных точках. Проведем диагонали этого прямоугольника и найдем точки пересечения диагоналей с ЛИ. Они и являются характеристическими точками. Полярные и характеристические точки ЛИ показаны на рис.2.

В нашей модели дисперсия деформируемости эритроцитов характеризуется параметром μ , определяемым формулой (8). Полученные выше формулы позволяют построить алгоритм определения этого параметра, состоящий в следующем. Введем параметр

$$P = \frac{1}{2} \left(\frac{x_c}{x_p} + \frac{y_c}{y_p} \right), \quad (28)$$

который мы назовем параметром характеристической точки. Подставив (23), (24), (26) в (28), получим $P =$

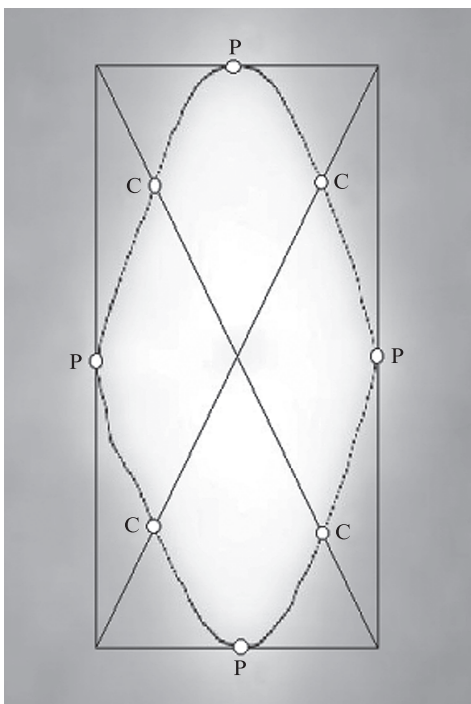


Рис.2. Линия изоинтенсивности, ее полярные (P) и характеристические (C) точки.

$r_c/(\sqrt{2}r(0))$ или, в силу (22), (27), $P = \sqrt{2}(1 - 2\mu)/(2 - 3\mu)$. Отсюда

$$\mu = \frac{\sqrt{2} - 2P}{2\sqrt{2} - 3P}. \quad (29)$$

Это уравнение выражает основной результат расчета. Оно связывает между собой параметр ДК P , определяемый формулой (28), с характеристикой ансамбля эритроцитов μ , определяемой формулой (8). Уравнение (29) применимо при условии, что ЛИ, выбранная для измерений, расположена в центральной части ДК, определяемой условием (9). Отметим, что уравнение (29) не содержит параметра f , определяемого формулой (11), а также параметров α и β , определяемых формулой (2). Это означает, что ЛИ в данной части дифракционной картины мало чувствительны к уровню интенсивности рассеянного света, а также к особенностям формы эритроцитов. Вместе с тем эти линии сохраняют чувствительность к такой популяционной характеристике, как дисперсия деформируемости эритроцитов в исследуемом образце крови.

7. Алгоритм измерения дисперсии деформируемости эритроцитов

Формула (29) позволяет определить дисперсию деформируемости эритроцитов в исследуемом образце крови по данным лазерной эктацитометрии. Для этого достаточно выбрать ЛИ в той части дифракционной картины, которая удовлетворяет условию (9). Затем нужно найти полярные и характеристические точки ЛИ (см. рис.2), измерить их координаты и вычислить параметр P , определяемый формулой (28). После этого можно вычислить параметр μ по формуле (29).

Мы проверили этот алгоритм, используя экспериментальные данные, приведенные в работе [16]. В ней авторы исследовали специально подготовленные образцы крови с известными распределениями эритроцитов по деформируемости. Мы выбрали ЛИ, полученную для симметричного ансамбля эритроцитов и соответствующую уровню

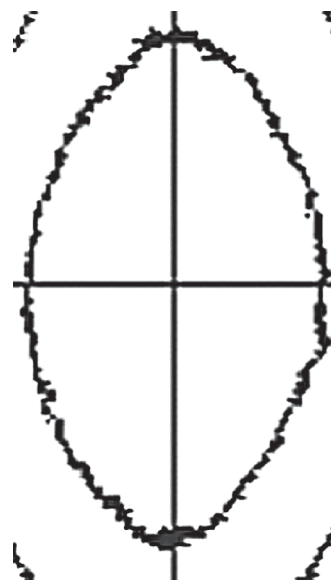


Рис.3. Линия изоинтенсивности дифракционной картины, полученная для симметричного ансамбля эритроцитов и интенсивности рассеянного света $I/I_0 = 0.5$ [16].

интенсивности рассеянного света $f = 0.5$. Эта линия показана на рис.3. Используя описанный выше алгоритм, мы получили для этой линии $P = 0.67$, $\mu = 0.09$ и $\sqrt{\mu} = 0.30$. Как показано в работе [3], оценка этого же параметра P , исходя из известного состава образца крови, дает $\sqrt{\mu} = 0.27$. Таким образом, предложенный алгоритм измерения дисперсии деформируемости эритроцитов позволяет получать достоверные данные.

8. Обсуждение результатов

Выше мы провели анализ ЛИ, лежащей в центральной части дифракционной картины. Границы этой области определяются условием (9). Данные, полученные в работах [16, 4, 5], показывают, что центральная часть ДК менее чувствительна к параметрам ансамбля эритроцитов, чем ее периферийная часть. Вероятно, по этой причине в лазерной эктацитометрии эритроцитов традиционно выбирают для измерений ЛИ, лежащие вблизи первого минимума ДК. Однако в других отношениях центральная часть ДК имеет определенные преимущества. В этой части картины выше уровень интенсивности рассеянного света, а потому меньше влияние помех. Здесь же форма ЛИ может быть измерена наиболее точно. В центре дифракционной картины форма ЛИ менее чувствительна к особенностям формы эритроцитов, а также к уровню интенсивности рассеянного света. При этом ЛИ сохраняет чувствительность к такому параметру, как разброс эритроцитов по деформируемости. Таким образом, использование ЛИ, лежащих в центральной части дифракционной картины, перспективно для измерений характеристик деформируемости эритроцитов.

9. Заключение

Таким образом, в настоящей работе теоретически проанализирована возможность измерения дисперсии деформируемости эритроцитов методом лазерной дифрактометрии эритроцитов в сдвиговом потоке (эктацитометрии). Найден параметр дифракционной картины, кото-

рый чувствителен к дисперсии деформируемости эритроцитов, и в меньшей степени чувствителен к таким параметрам, как уровень интенсивности рассеянного света, форма эритроцитов, концентрация эритроцитов в суспензии, геометрические размеры экспериментальной установки и т. п. Предложен новый алгоритм измерения дисперсии деформируемости эритроцитов на основе данных лазерной эктацитометрии.

Авторы благодарны А.В.Приезжеву, А.Е.Луговцову и В.Д.Устинову за обсуждение результатов работы. Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-02-01372).

1. Bessis M., Mohandas N. *Blood Cells*, **1**, 307 (1975).
2. Никитин С.Ю., Кормачева М.А., Приезжев А.В., Луговцов А.Е. *Квантовая электроника*, **43** (1), 90 (2013).
3. Nikitin S.Yu., Priezhev A.V., Lugovtsov A.E. *J. Quantitat. Spectrosc. Rad. Transfer*, **121**, 1 (2013).
4. Никитин С.Ю., Приезжев А.В., Луговцов А.Е., Устинов В.Д. *Квантовая электроника*, **44** (8), 774 (2014).
5. Nikitin S.Yu., Priezhev A.V., Lugovtsov A.E., Ustinov V.D., Razgulina A.V. *J. Quantitat. Spectrosc. Rad. Transfer*, **146**, 365 (2014).
6. Nikitin S.Yu., Lugovtsov A.E., Ustinov V.D., Lin M.D., Priezhev A.V. *J. Innovat. Opt. Health Sci.*, **8** (4), 1550031 (2015).
7. Борн М., Вольф Э. *Основы оптики* (М.: Наука, 1973, с. 364).
8. Янке Е., Эмде Ф., Лёш Ф. *Специальные функции* (М.: Наука, 1977).
9. Ахманов С.А., Никитин С.Ю. *Физическая оптика* (М.: Наука, 2004).
10. Nikitin S.Yu., Priezhev A.V., Lugovtsov A.E., in *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses*. Ed. by V.V. Tuchin (Weinheim: Wiley-VCH, 2011, p. 133).
11. Луговцов А.Е., Никитин С.Ю., Приезжев А.В. *Квантовая электроника*, **38** (6), 606 (2008).
12. Priezhev A.V., Nikitin S.Yu., Lugovtsov A.E. *J. Quantitat. Spectrosc. Rad. Transfer*, **110**, 1535 (2009).
13. Dobbe J.G.G., Streekstra G.J., Hardeman M.R., Ince C., Grimbergen C.A. *Cytometry*, **50**, 313 (2002).
14. Plasek J., Marik T. *Appl. Opt.*, **21** (23), 4335 (1982).
15. Rasia R.J., Schutz G. *Clin. Hemorheol.*, **13**, 641 (1993).
16. Streekstra G.J., Dobbe J.G.G., Hoekstra A.G. *Opt. Express*, **18** (13), 14173 (2010).