

Рассеяние лазерного пучка на влажном мазке крови и измерение распределения эритроцитов по размерам

Ю.С.Юрчук, В.Д.Устинов, С.Ю.Никитин, А.В.Приезжев

Создана автоматизированная лазерная установка, позволяющая измерять распределения эритроцитов по размерам. Проведены эксперименты по рассеянию лазерного пучка на суспензии ориентированных эритроцитов (влажный мазок крови). На основе анализа углового распределения интенсивности света в дифракционной картине восстановлено распределение эритроцитов по размерам. Средний диаметр эритроцита определен с погрешностью менее 1%, разброс эритроцитов по размерам – с погрешностью около 20%. Обсуждаются проблемы фотометрирования и обработки дифракционных картин, приготовления образцов крови, а также алгоритмы обработки данных, включая методы решения обратной задачи рассеяния.

Ключевые слова: влажный мазок крови, лазерная дифрактометрия, распределение эритроцитов по размерам.

1. Введение

Распределение эритроцитов по размерам (кривая Прайс-Джонса) является важной реологической характеристикой крови. При стандартных анализах крови измеряют основные параметры этого распределения – средний объем эритроцитов (MCV) и ширину распределения эритроцитов по объему (RDW). В норме средний объем эритроцита составляет около 90 мкм³, а ширина распределения эритроцитов равна 12%–14%. Повышенная ширина распределения приводит к риску сердечно-сосудистых и ряда других заболеваний [1]. Приблизительно оценить этот параметр можно путем визуального анализа мазка крови с помощью микроскопа. Более точное измерение возможно с помощью автоматизированного анализа изображения мазка, выполняемого компьютером [2]. Однако оба эти метода сложны в практической реализации и требуют много времени для измерений.

Современные автоматические гемонализаторы строят распределения эритроцитов по размерам, используя электрические (счетчик Коултера [3]) или оптические (проточная цитометрия) методы [4]. В обоих случаях измерения проводят на отдельных клетках (около 10000). Эти измерения также весьма трудоемки или требуют применения дорогостоящей аппаратуры. Еще один способ измерения основан на лазерной дифрактометрии. В этом случае распределение эритроцитов по размерам находят путем анализа дифракционной картины, возникающей при рассеянии лазерного пучка на эритроцитах. В принципе такие измерения возможны на сухих мазках крови [5, 6] или на суспензиях эритроцитов [7, 8]. Однако для их практической реализации необходимо решить ряд про-

блем, таких как приготовление качественных мазков крови, фотометрия дифракционных картин, подавление спекл-структуры дифракционных картин, создание специальных алгоритмов обработки данных. Важную роль играет и разработка теоретических моделей. Нами разработана аналитическая модель рассеяния лазерного пучка на неоднородном ансамбле частиц, моделирующих эритроциты [9]. С помощью этой модели найдено приближенное соотношение между дисперсией размеров частиц и видимостью дифракционной картины [10]. Более точные модели основаны на применении современных численных методов расчетов, таких как дискретно-дипольное приближение [11], метод граничных элементов [12], метод интегральных уравнений [13] и ряд других.

В работе [14] с помощью фазового микроскопа исследована форма эритроцитов на сухом мазке крови. Полученные данные показывают, что форма эритроцита в этих условиях существенно отличается от формы двояковогнутого диска, которую имеет эритроцит в жидкой среде. В связи с этим мы использовали тонкий слой суспензии эритроцитов (влажный мазок крови). Мы получали такой мазок, помещая разбавленную суспензию эритроцитов между двумя стеклами, расстояние между которыми составляло около 100 мкм. Как показали наши наблюдения, при горизонтальном расположении мазка эритроциты располагаются на дне кюветы и ориентируются параллельно поверхности стекла. Таким образом, влажный мазок сочетает в себе достоинства сухого мазка (ориентация эритроцитов) и суспензии (сохранение естественной формы клеток). Отметим еще одно важное обстоятельство. На влажном мазке крови скачок показателя преломления на поверхности эритроцита значительно меньше, чем в случае сухого мазка. Это дает возможность рассматривать эритроциты в жидкости как оптически мягкие частицы. Эритроцит, находящийся в жидкости, можно моделировать плоским прозрачным диском, причем точность этого приближения достаточно высока [15], что существенно упрощает теоретическую модель и анализ экспериментальных данных. В настоящей работе рассмотрена возможность измерения распределения эритроцитов

Ю.С.Юрчук, В.Д.Устинов, С.Ю.Никитин, А.В.Приезжев. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы, 1; e-mail: sergeynikitin007@yandex.ru

Поступила в редакцию 21 апреля 2016 г.

по размерам на влажном мазке крови методом лазерной дифрактометрии.

2. Теоретическая модель

В экспериментах мы используем излучение гелий-неонового лазера с длиной волны 633 нм. На этой длине волны эритроциты слабо поглощают свет, поэтому будем считать их прозрачными частицами. Нормальный эритроцит представляет собой двояковогнутый диск со средним диаметром около 7.5 мкм, толщиной в центре около 1 мкм и толщиной по краю около 2 мкм. Эритроциты находятся в жидкой среде, где их относительный показатель преломления равен 1.05. Для анализа будем использовать часть дифракционной картины, лежащую за пределами прямого лазерного пучка и содержащую минимумы интенсивности первого и второго порядков. Это область углов рассеяния от 1 до 10°. Как показано в [15], в этих условиях рассеяние лазерного пучка на эритроците мало отличается от рассеяния на плоском диске того же размера.

Рассмотрим дифракцию лазерного пучка на мазке крови. Будем считать эритроциты прозрачными плоскими дисками и предположим, что все клетки лежат в одной плоскости, перпендикулярной лазерному пучку. Для учета разброса эритроцитов по размерам будем считать радиус эритроцита дискретной случайной величиной с функцией распределения $p_j(R_j)$. Положим для простоты $R_j = \bar{R} + jr$, где \bar{R} – среднее значение радиуса эритроцита; r – шаг изменения радиуса; $j = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm m$. Задача заключается в том, чтобы найти распределение эритроцитов по размерам на основе анализа дифракционной картины, возникающей при рассеянии лазерного пучка на мазке крови.

В приближении аномальной дифракции [16] рассеяние лазерного пучка на прозрачной плоской пластинке эквивалентно дифракции плоской световой волны на отверстии такой же формы [9, 17]. В частности, рассеяние на круглом прозрачном диске в дальней зоне дифракции описывается формулой [18, 19]

$$I(\theta) = I_0 |\gamma|^2 \left(\frac{\pi R^2}{\lambda z} \right)^2 \left[\frac{J_1(2\pi R\theta/\lambda)}{\pi R\theta/\lambda} \right]^2. \quad (1)$$

Здесь $J_1(x)$ – функция Бесселя первого порядка; I – интенсивность света; θ – угол рассеяния; I_0 – интенсивность лазерного излучения; R – радиус пластинки; λ – длина световой волны; z – расстояние от пластинки до экрана наблюдения; $\gamma = \exp(-i\Delta\varphi) - 1$ – параметр, зависящий от материала пластинки и ее толщины h ; $\Delta\varphi = kn_0 h(m-1)$ – фазовый набег лучей, прошедших через частицу, по сравнению с фазовым набегом лучей, прошедших мимо нее; $k = 2\pi/\lambda$ – волновое число; m – относительный показатель преломления пластинки; n_0 – абсолютный показатель преломления окружающей среды.

Отметим, что эта модель является одной из основных в теории рассеяния света эритроцитами (см., напр., [5]). Ее называют «моделью теневого сечения» [20]. Экспериментальным обоснованием этой модели является схожесть картины рассеяния лазерного пучка на мазке крови с картиной дифракции плоской световой волны на круглом отверстии (см., напр., [17, 21]). Достоинство этой модели состоит в том, что она позволяет аналитически описать рассеяние лазерного пучка на ансамбле эритроцитов, что важно для разработки алгоритмов обработки данных. В

частности, с помощью этой модели найдены приближенные выражения для среднего радиуса эритроцита \bar{R} и разброса эритроцитов по размерам $\delta_R = \langle (R/\bar{R} - 1)^2 \rangle^{1/2}$ на мазке крови [10, 17]. Эти выражения имеют следующий вид:

$$\bar{R} = 0.61\lambda/\theta_1, \quad \delta_R = \sqrt{(1-v)/76}.$$

Здесь θ_1 – угол, под которым виден первый минимум в дифракционной картине; $v = (I_2 - I_1)/(I_2 + I_1)$ – видность определенной фрагмента дифракционной картины; I_1, I_2 – интенсивности первого минимума и первого максимума в дифракционной картине соответственно.

При рассеянии лазерного пучка на отдельном эритроците зона дифракции Фраунгофера начинается на расстоянии $z_d = kd^2/2 = 0.3$ мм от эритроцита (d – диаметр эритроцита). Однако нам нужно, чтобы первый минимум дифракционной картины выходил за пределы прямого лазерного пучка. При диаметре пучка $D = 2$ мм это происходит на расстоянии $z = Dd/2.44\lambda \approx 1$ см от мазка крови. Следовательно, экран наблюдения должен находиться от него на расстоянии не менее 1 см. Это условие было выполнено в наших экспериментах.

Используя теоретическую модель, развитую в работах [9, 10, 17], запишем нормированное угловое распределение интенсивности света, рассеянного на мазке крови:

$$F(\theta) = \beta \sum_j p_j \left(\frac{\pi R_j^2}{\lambda z} \right)^2 \left[\frac{J_1(2\pi R_j\theta/\lambda)}{\pi R_j\theta/\lambda} \right]^2 + \Phi, \quad (2)$$

где z – расстояние от мазка крови до экрана наблюдения. Параметры β и Φ суть постоянные безразмерные величины. Первый из них позволяет записать распределение интенсивности в произвольных единицах (что удобно для сравнения теории с экспериментом), а второй учитывает существование фона в дифракционной картине. Этот фон вызван шумами различной природы, хаотической ориентацией части эритроцитов в пространстве и т. п.

Формула (2) получена при следующих предположениях: экран наблюдения расположен в дальней дифракционной зоне, все клетки имеют одинаковую толщину, клетки на мазке расположены хаотически и проведено усреднение дифракционной картины по случайным координатам клеток, обеспечивающее подавление спекл-структуры дифракционной картины.

Формула (2) дает решение прямой задачи дифракции, т. е. выражает распределение интенсивности света в дифракционной картине через характеристики ансамбля частиц. Для решения обратной задачи, т. е. для отыскания распределения эритроцитов по размерам на основе данных лазерной дифрактометрии, соотношение (2) следует записать для нескольких конкретных углов рассеяния $\theta_1, \theta_2, \dots$. Тогда мы получим линейную систему уравнений, связывающих между собой параметры $F(\theta_1), F(\theta_2), \dots$ и p_1, p_2, \dots . Решая эту систему, можно определить набор параметров p_1, p_2, \dots , т. е. восстановить распределение $p_j(R_j)$.

3. Методика эксперимента

3.1. Подготовка образцов крови

Мы исследовали три образца крови здоровых доноров (мужчины 20–23 лет). Для приготовления суспензии кровь отмывалась от плазмы фосфатным буферным раствором. Отмытые эритроциты получают в результате цен-

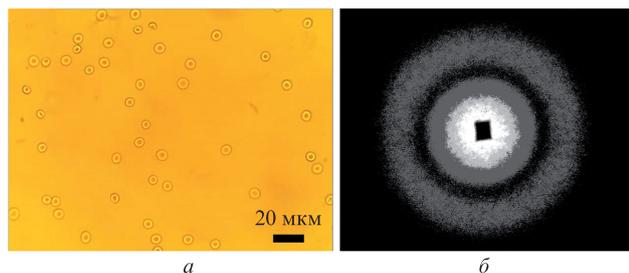


Рис.1. Вид влажного мазка крови под микроскопом (а) и дифракционная картина, возникающая при рассеянии лазерного пучка на мазке крови (б).

трифугирования и удаления надосадочной жидкости. Такая процедура проводится 2–3 раза и приводит к очистке эритроцитарной массы от белков плазмы. В результате способность эритроцитов к агрегации (склеиванию) снижается. Полученный раствор в количестве 10 мкл помещали между покровным и предметным стеклами, зазор между которыми составлял примерно 100 мкм. Концентрация эритроцитов в растворе должна быть достаточной для наблюдения дифракционной картины, однако слишком большая концентрация клеток может приводить к их контакту и к образованию сложных структур, схожих с кристаллическими. Данный процесс может стать причиной изменения распределения интенсивности в дифракционной картине [5]. Вид влажного мазка крови под микроскопом показан на рис.1,а.

3.2. Экспериментальная установка

Наша экспериментальная установка включает в себя гелий-неоновый лазер, поляризационный аттенуатор, систему формирования светового пучка, экран для наблюдения дифракционной картины, фотоаппарат и компьютер. В настоящей работе использовалась техническая камера Hamamatsu ORCA Flash 4.0, полупрозрачным экраном служил лист белой бумаги. Схема установки представлена на рис.2.

Мощность излучения гелий-неонового лазера с длиной волны 633 нм регулировалась системой скрещенных поляризаторов. Ослабление интенсивности излучения лазера необходимо, чтобы при регистрации дифракционной картины не выходило за пределы динамического диапазона светочувствительной матрицы фотоаппарата. Мощность лазерного излучения до системы поляризаторов составляла 1 мВт. Из-за хаотического расположения

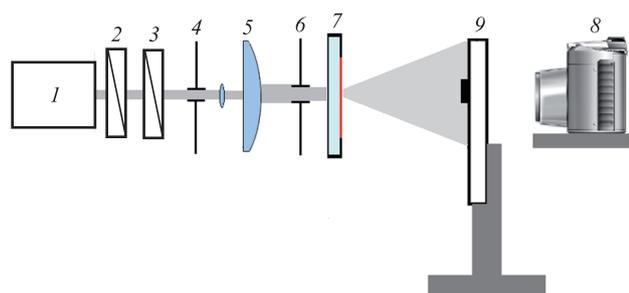


Рис.2. Схема экспериментальной установки: 1 – He–Ne-лазер; 2, 3 – поляризаторы; 4, 6 – диафрагмы; 5 – система линз; 7 – мазок крови; 8 – фотокамера; 9 – полупрозрачный экран с поглощающей лазерный пучок накладкой.

эритроцитов на поверхности мазка дифракционная картина была зашумлена спекл-структурой. Чтобы спеклы (пятна) были малы по сравнению с размером дифракционной картины, мы увеличивали диаметр лазерного пучка с помощью телескопической системы линз примерно в два раза (до 2 мм). На линзах и поляризаторах имеются пылинки и царапины, на которых лазерный пучок дифрагировал и частично рассеивался. При этом появлялась паразитная интерференционная картина в виде контрастных концентрических колец, нарушающая однородность освещения. Для устранения этого эффекта мы использовали пространственные фильтры – диафрагмы 4 и 6. После рассеяния на мазке крови 7 свет попадал на экран наблюдения и фотографировался.

Для предотвращения попадания нерассеянного лазерного излучения на матрицу фотокамеры на бумажный экран крепились непроницаемая для излучения квадратная накладка со стороной 5 мм. Место крепления накладки определялось тем, куда падал лазерный пучок в отсутствие мазка. Сенсор технической камеры – чернобелый КМОП размером 13.3 × 13.3 мм с разрешением 2048 × 2048 пикселей и 16-битным АЦП. Воздушное охлаждение позволяло снижать температуру сенсора до –10 °С, что снижало уровень шумов и соответственно увеличивало динамический диапазон измерений. Управление камерой осуществлялось с помощью компьютера, который также позволял обрабатывать зарегистрированные изображения.

3.3. Дифракция лазерного пучка на эталонном объекте

Чтобы продемонстрировать возможность получения корректной информации о распределении интенсивности в регистрируемой картине рассеяния, на собранной установке был проведен эксперимент с эталонным объектом, которым служила тонкая щель. На рис.3 представлено измеренное распределение интенсивности света в дифракционной картине. Дифракция плоской световой волны на щели шириной d описывается формулой [19]

$$\frac{I}{I_0} = \left[\frac{\lambda z}{\pi dx} \sin\left(\frac{\pi dx}{\lambda z}\right) \right]^2, \tag{3}$$

где x – координата на экране наблюдения; z – расстояние от экрана со щелью до экрана наблюдения. Теоретическая кривая, построенная по формуле (3) при $d = 128$ мкм, показана на рис.3. Измерение ширины щели с помощью микроскопа дало $d = 127$ мкм, что в пределах погрешности согласуется с данными лазерной дифрактометрии. Данные, представленные на рис.3, позволяют сделать вывод о том, что фотометрирование дифракционной картины проведено корректно в достаточно широком диапазоне изменения интенсивности света.

4. Результаты экспериментов и их обработка

4.1. Рассеяние лазерного пучка на мазке крови

Дифракционная картина, полученная при рассеянии лазерного пучка на мазке крови, представлена на рис.1,б. Мазок крови закреплен на вертикальном трансляторе (см. рис.2). Чтобы уменьшить влияние спекл-структуры, мы несколько раз во время съемки смещали мазок на 1 мм в плоскости, перпендикулярной плоскости рисунка. Для

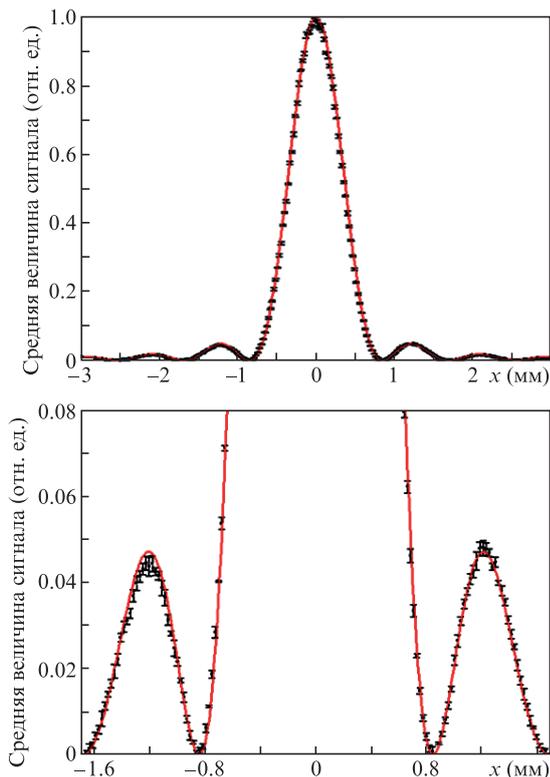


Рис.3. Распределение интенсивности света в дифракционной картине, полученной на щели. Точки – данные фотометрии дифракционной картины, полученные с помощью фотоаппарата, сплошная кривая построена по формуле (3).

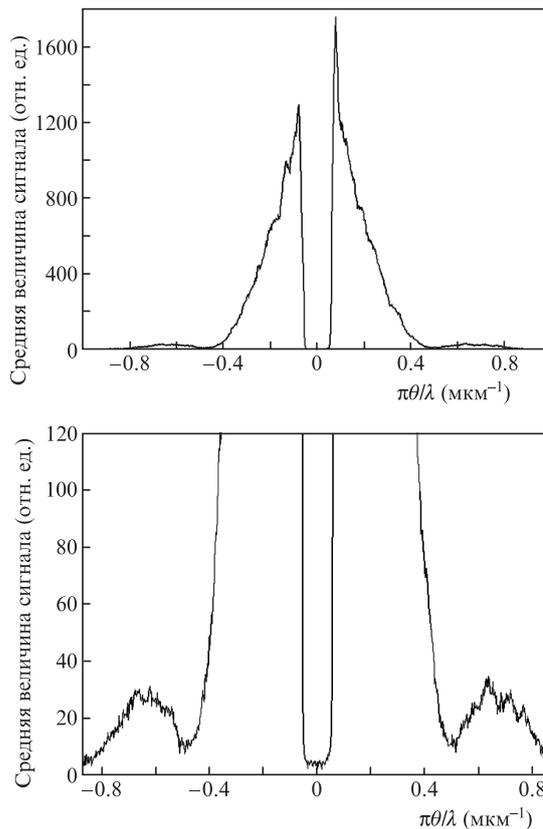


Рис.4. Угловое распределение интенсивности света в дифракционной картине, полученной от влажного мазка крови.

уменьшения влияния фоновой засветки съемка проводилась в затемненной комнате.

Зарегистрированные распределения интенсивности усреднялись по 20 кадрам с целью подавления спекл-структуры дифракционной картины. Кроме того, после каждого измерения проводилась регистрация изображений при выключенном лазере. Оцененные по таким фотографиям уровни фона вычитались из данных, содержащих информацию о распределении интенсивности в дифракционной картине. Это позволяет уменьшить влияние шумовых компонентов и избавиться от фоновой засветки. Описанные процедуры обработки реализованы нами с помощью программного пакета MATLAB и графической среды разработки приложений LabVIEW. Распределения, полученные от мазков крови, сглаживались методом бегущего среднего. Окно сглаживания выбиралось таким, чтобы глубина провала первого дифракционного минимума не менялась. Распределение интенсивности, полученное в результате обработки регистрируемых изображений, представлено на рис.4.

4.2. Анализ экспериментальных данных с использованием упрощенной модели эритроцита

В этом разделе мы проанализируем полученные данные на основе упрощенной модели эритроцита – модели плоского диска, в рамках которой распределение интенсивности света в дифракционной картине описывается формулой (2). Параметры β и Φ , а также распределение $p_j(R_j)$ в этой формуле подобраны таким образом, чтобы обеспечить наилучшее совпадение теоретического распределения интенсивности с экспериментальными данными,

приведенными на рис.4. Результат аппроксимации представлен на рис.5. Видно, что экспериментальное и теоретическое распределения хорошо совпадают друг с другом. Используя найденное таким образом распределение эритроцитов по размерам $p_j(R_j)$, мы вычислили средний радиус эритроцита \bar{R} , а также разброс эритроцитов по размерам δ_R для данного образца крови. Затем эти же параметры измерили с помощью микроскопа. Описанные процедуры мы повторили для двух других образцов крови. Полученные данные представлены в табл.1. Здесь приведены результаты измерений среднего радиуса эритроцитов, а также разброса эритроцитов по размерам, выполненных методами дифрактометрии и микроскопии. Видно, что погрешность измерения указанных параметров методом дифрактометрии не превышает 10%. Это позволяет сделать вывод об адекватности нашей теоретической модели, а также о том, что метод лазерной дифрактометрии

Табл.1. Параметры распределения эритроцитов по размерам, найденные методами дифрактометрии и микроскопии.

Донор	Метод	
	Дифрактометрия	Микроскопия
1	$\bar{R} = 3.9 \pm 0.4$ мкм	$\bar{R} = 3.9 \pm 0.4$ мкм
	$\delta_R = 7.0 \pm 0.8\%$	$\delta_R = 7.2 \pm 0.8\%$
2	$\bar{R} = 4.2 \pm 0.5$ мкм	$\bar{R} = 3.9 \pm 0.4$ мкм
	$\delta_R = 7.8 \pm 0.9\%$	$\delta_R = 8.5 \pm 0.9\%$
3	$\bar{R} = 4.0 \pm 0.4$ мкм	$\bar{R} = 3.9 \pm 0.4$ мкм
	$\delta_R = 8.6 \pm 0.9\%$	$\delta_R = 9.5 \pm 0.9\%$

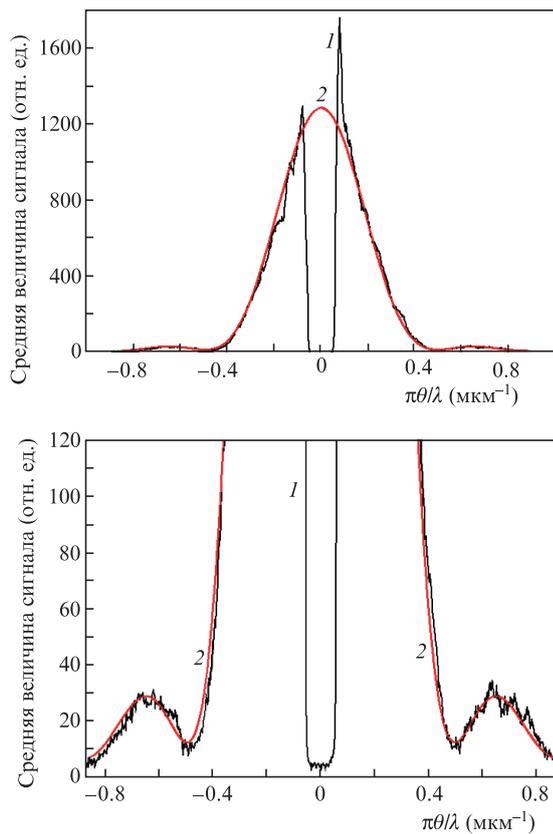


Рис.5. Экспериментальное (1) и теоретическое (2) распределения интенсивности света в дифракционной картине, полученной при рассеянии лазерного пучка на влажном мазке крови. Теоретическое распределение построено по формуле (2).

можно использовать для измерения параметров распределения эритроцитов по размерам.

4.3. Решение обратной задачи рассеяния с учетом реальной формы эритроцита

В этом разделе изложена общая методика решения обратной задачи рассеяния и проанализированы экспериментальные данные лазерной дифрактометрии влажного мазка крови с учетом реальной формы эритроцитов. Наблюдаемое в дальней зоне дифракции угловое распределение интенсивности рассеянного света обозначим $\tilde{I}(\theta)$. В реальном эксперименте оно определяется с некоторой ошибкой, причем мы можем считать известной норму

$$\int_{\theta_1}^{\theta_2} |\tilde{I}(\theta) - \bar{I}(\theta)|^2 d\theta = \|\tilde{I} - \bar{I}\|^2 = \delta^2$$

разности между измеренным в эксперименте распределением интенсивности и распределением, соответствующим теоретической модели $\bar{I}(\theta)$ в классе функций $L_2[\theta_1, \theta_2]$. В этот класс входят как все непрерывные функции, так и функции, разрывные в конечном числе точек. Здесь $[\theta_1, \theta_2]$ – границы углового диапазона, в котором наблюдается дифракция.

Пусть $w(R)$ – распределение плотности вероятности для радиуса эритроцита, а $I(R, \theta)$ – интенсивность света, рассеянного на одном эритроците радиусом R в направлении θ . Тогда функцию $w(R)$ можно рассматривать как решение интегрального уравнения

$$N \int_{R_1}^{R_2} I(R, \theta) w(R) dR = \tilde{I}(\theta), \tag{4}$$

где N – число эритроцитов, облучаемых лазером; R_1 и R_2 – минимальный и максимальный радиусы эритроцитов в ансамбле соответственно. Вид функции $I(R, \theta)$ зависит от принятых приближений относительно формы эритроцита. Здесь мы используем более точную модель эритроцита – модель двояковогнутого диска. Толщину эритроцита в центре диска будем считать равной $2R/7.5$, а на периферии клетки – $4R/7.5$ при радиусе диска R (в мкм). Расчет функции $I(R, \theta)$ будем проводить численно, используя дискретно-дипольное приближение и программу ADDA, описанную в [22].

Как показано в [23], устойчивость решения уравнения (4) существенно повысится, если умножить левую и правую части (4) на θ^3 , умножить и поделить подынтегральное выражение на R и искать неизвестную функцию $Rw(R)$. Таким образом, далее вместо уравнения (4) мы будем иметь в виду эквивалентное ему, но обладающее лучшими свойствами уравнение

$$N \int_{R_1}^{R_2} \left[\frac{\theta^3 I(R, \theta)}{R} \right] [Rw(R)] dR = \theta^3 \tilde{I}(\theta). \tag{5}$$

Известно (см., напр., [23]), что задача (4) является некорректно поставленной в том смысле, что хотя у нее существует единственное решение, оно, тем не менее, неустойчиво. Интегральный оператор в левой части (4) в силу непрерывности функции ядра $I(R, \theta)$ является линейным и вполне непрерывным. Это значит, что для него применим метод регуляризации Тихонова (см., напр., [24]). Рассмотрим функционал Тихонова

$$M(w) = \|Aw - \tilde{I}\|^2 + \alpha \|w\|^2, \tag{6}$$

где A – интегральный оператор в левой части уравнения (4); первая норма взята в классе функций $L_2[\theta_1, \theta_2]$, а вторая – в более узком классе функций $W_2^1(R_1, R_2)$, к которому фактически принадлежат только непрерывные функции. Параметр регуляризации α определялся подбором. Для улучшения точности восстановления данных была учтена следующая априорная информация о функции $w(R)$: гладкость функции ($w(R) \in W_2^1(R_1, R_2)$), конечность диапазона изменения радиусов частиц ($R_1 \leq R \leq R_2$), а также неотрицательность функции ($w(R) \geq 0$). Для корректного учета последних двух условий минимизация функционала (6) проводилась в соответствии со следующей итеративной процедурой [25]:

$$w_{k+1} = w_k + \beta A^T \tilde{I} - \beta (A^T A + \alpha H) w_k, \tag{7}$$

где β – действительная достаточно малая константа, определяемая условием $0 < \beta < 2/\lambda_{\max}$; λ_{\max} – максимальное собственное значение матрицы $A^T A + \alpha H$. Матрица H определяется шагом разбиения отрезка $[R_1, R_2]$. Явный вид этой матрицы приведен в [24] (гл.1, пар.5). Если при расчете правой части (7) $w_{k+1}(R_i) < 0$, то мы полагали, что $H = 0$. Кроме того, при любом значении k мы полагали, что $w_{k+1}(R_1) = w_{k+1}(R_2) = 0$. В наших расчетах этот метод приводил к корректным результатам уже при достаточно малом (~ 10) числе итераций, хотя формально в численном эксперименте сходимость достигается лишь при числе итераций $\sim 10^4$. Для всех расчетов из экспериментальных

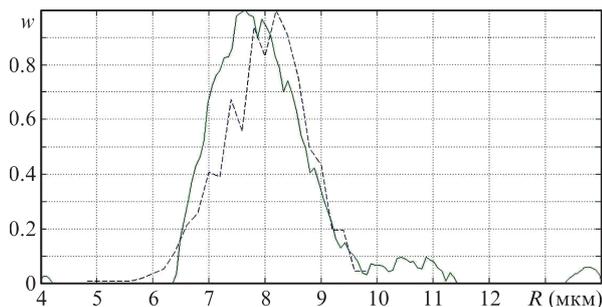


Рис.6. Распределения эритроцитов по размерам, найденные методами дифрактометрии (сплошная кривая) и микроскопии (штриховая кривая) для влажного мазка крови. При измерениях обоими методами обработаны ансамбли эритроцитов, содержащие примерно 1000 клеток. В теоретической модели учтена реальная форма эритроцита (двоояковогнутый диск). Расчет рассеяния лазерного пучка на эритроците выполнен в дискретно-дипольном приближении с использованием программы ADDA, решение обратной задачи рассеяния проведено с использованием метода регуляризации Тихонова.

данных интенсивности $\tilde{I}(\theta)$ был выбран отрезок $[\theta_1, \theta_2]$ от 2 до 10° с дискретным равномерным разбиением на 60 точек. Отрезок $[R_1, R_2]$ был задан равным 2 – 7 мкм с разбиением на 200 точек, что дает достаточно хорошее приближение интеграла в левой части (4) конечной частичной суммой. Полученное таким образом распределение $w(R)$ для одного из образцов крови показано сплошной кривой на рис. 6. Там же штриховой кривой показано распределение эритроцитов по размерам, найденное с помощью микроскопа. Отметим сходство полученных распределений. В частности, согласно оценкам, средние диаметры эритроцитов в данном образце крови, полученные методами дифрактометрии и микроскопии, различаются менее чем на 1%, а разброс эритроцитов по размерам составляет примерно 20%.

5. Выводы

В настоящей работе мы создали экспериментальную установку для лазерной дифрактометрии мазка крови и измерения распределения эритроцитов по размерам. Эксперименты с эталонным объектом (узкая щель) показали, что на этой установке возможна фотометрия дифракционных картин в достаточно широком диапазоне изменения интенсивности света. Для дифрактометрии мы использовали влажный мазок крови, который фактически представлял собой тонкий слой суспензии эритроцитов. Для интерпретации экспериментальных данных применялись теоретические модели, в которых эритроциты представлены плоскими или двоояковогнутыми дисками. С помощью упрощенной модели эритроцита (модель плоского диска) мы решили прямую задачу рассеяния и рассчитали распределение интенсивности света в дифракционной картине, исходя из известного распределения эритроцитов по размерам. Расчет показал хорошее согласие экспериментального и теоретического распределений. Это позволяет сделать вывод об адекватности нашей

теоретической модели. Используя более точную модель эритроцита (модель двоояковогнутаго диска), мы решили обратную задачу рассеяния и восстановили распределение эритроцитов по размерам в исследуемом образце крови. Полученное таким образом распределение оказалось весьма сходным с распределением, измеренным с помощью микроскопа. В частности, средний диаметр эритроцита определен с погрешностью менее 1%, а разброс эритроцитов по размерам – с погрешностью около 20%. Таким образом, метод лазерной дифрактометрии позволяет проводить измерения распределений эритроцитов по размерам в суспензиях ориентированных эритроцитов.

Авторы благодарны И.В.Головнину за полезные обсуждения и ценные советы. Работа поддержана РФФИ (гранты № 13-02-01372 и 15-32-51068), а также грантом УМНИК по проекту «Создание инновационного лазерного анализатора красных клеток крови».

1. Kushang V. P., Luigi F., Ershler W.B., Longo D.L., Guralnik J.M. *Arch. Intern. Med.*, **169** (5), 515 (2009).
2. Canham P.B., Burton A.C. *Circulation Research*, **22**, 405 (1968); doi: 10.1161/01.RES.22.3.405.
3. <http://www.coultercounter.co.uk/>.
4. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А., Боев С.Ф., Сазонов В.В. *Клетки крови – современные технологии их анализа* (М.: Триада-Фарм, 2002).
5. Krakau S.E.T. *Biophys. J.*, **6**, 801(1966).
6. Аксенов Е.Т., Мокрова Д.В. *Письма в ЖТФ*, **34** (20), 38 (2008).
7. Yang Y., Zhang Z., Yang X., Yeo J.H., Jiang L.J., Jiang D. *J. Biomed. Opt.*, **9** (5), 995 (2004).
8. Yao C., Li Z., Zhang Z. *Chin. Opt. Lett.*, **2** (6), 343 (2004).
9. Nikitin S.Yu., Priezzhev A.V., Lugovtsov A.E., in *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses*. Ed. by Valery V.Tuchin (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2011, p. 133).
10. Никитин С.Ю., Луговцов А.Е., Приезжев А.В., Устинов В.Д. *Квантовая электроника*, **41** (9), 843 (2011).
11. Yurkin M.A., Semyanov K.A., Tarasov P.A., Chernyshev A.V., Hoekstra A.G., Maltsev V.P. *Appl. Opt.*, **44** (25), 5249 (2005).
12. Constantinides G.N., Gintides D., Kattis S.E., Kiriaki K., Paraskeva C.A., Payatakes A.C., Polyzos D., Tsinopoulos S.V., Yannopoulos S.N. *Appl. Opt.*, **37** (31), 7310 (1998).
13. Ergul O., Arslan-Ergul A., Gurel L. *J. Biomed. Opt.*, **15** (4), 1 (2010).
14. Lim J., Ding H., Mir M., Zhu R., Tangella K., Popescu G. *Biomed. Opt. Express*, **2** (10), 2784 (2011).
15. Nikitin S.Yu., Priezzhev A.V., Lugovtsov A.E. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*, **121**, 1 (2013).
16. Ван де Хюлст Г. *Рассеяние света малыми частицами* (М.: ИЛ, 1961).
17. Никитин С.Ю., Луговцов А.Е., Приезжев А.В. *Квантовая электроника*, **40** (12), 1074 (2010).
18. Борн М., Вольф Э. *Основы оптики* (М.: Наука, 1973).
19. Ахманов С.А., Никитин С.Ю. *Физическая оптика* (М.: Наука, 2004).
20. Бессмельцев С.С., Лендяев А.В., Тарлыков В.А. В сб. статей «*Оптические лазерные технологии*» (СПб.: ИТМО, 2001, с. 120).
21. Магулин В.Г., Тарлыков В.А. *Когерентная оптика* (СПб.: изд-е СПбГУ ИТМО, 2006).
22. Yurkin M.A., Hoekstra A.G. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*, **112** (13), 2234 (2011).
23. Riley J.V., Agrawal Y.C. *Appl. Opt.*, **30** (33), 4800 (1991).
24. Тихонов А.Н., Гончарский А.В., Степанов В.В., Ягола А.Г. *Численные методы решения некорректных задач* (М.: Наука, 1990).
25. Васильев Ф.П. *Методы оптимизации* (М.: Факториал пресс, 2002).