

## УДК 535.51

Петрук В.Г., Кватернюк С.М., Васильківський І.В. (Україна, Вінниця)

Іванов А.П., Барун В.В. (Белорусь, Мінськ)

### ЗАСОБИ АВТОМАТИЗОВАНОГО КОНТРОЛЮ ОПТИЧНО М'ЯКИХ ЧАСТИНОК ГУМОРАЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ НА ОСНОВІ МЕТОДУ СПЕКТРОПОЛЯРИЗАЦІЙНИХ ЗОБРАЖЕНЬ

#### Вступ

До гуморальних рідин, які є об'єктом контролю у даній роботі, відносять кров та її деривати, спинномозкову рідину, осад сечі, сперму, мокроту, вміст шлунку тощо. Всі вони є складними природними полідисперсними системами, що включають в себе дисперсні частки різних розмірів і форми, різні речовини (колоїдні та істинні розчини), які знаходяться у складній взаємодії як між собою, так і з завислими у них дисперсними частками. Гуморальні рідини мають набір міжнародно стандартизованих параметрів, які необхідно контролювати, причому параметри для норми (умовно здорових реципієнтів) та різноманітних патологій визначені досить чітко.

До формуючих елементів крові відносяться еритроцити, лейкоцити і тромбоцити. Нормальний еритроцит має форму увігнутого з двох боків диска діаметром 7,1–9,2 мкм, товщиною у центрі 0,9–1,2 мкм, а по краю 1,7–2,4 мкм. Складається еритроцит з гемоглобіну (32%), води (65%) і компонентів мембрани (3%). Важливо, що еритроцит не містить ядра. Еритроцит має тонку мембрану з товщиною 7 нм. Еритроцити перешкоджають дифузії гемоглобіну з кровоносного русла. Клітини еритроцитів живуть приблизно 90-120 днів. Зменшення кількості еритроцитів в одиниці об'єму крові (еритропенія) або, навпаки, підвищення їх числа (еритроцитоз), крім фізіологічних явищ, відзначається при різних захворюваннях. Лейкоцити мають форму сфер діаметрами 8–22 мкм, а тромбоцити – тонких дисків діаметрами 2–4 мкм. Тромбоцити — система гемостазу (зшивання між молекулами). Тромби - це склеювання еритроцитів джгутами фібріногена [1]. Оптичні параметри тромбоцитів і лейкоцитів мало вивчені, однак їх відносять до слабопоглинаючих м'яких частинок для областей хвиль понад 600 нм.

#### Аналіз експериментальних методів дослідження параметрів гуморальних середовищ

Для дослідження гуморальних середовищ використовується кондуктометричний метод, заснований на вимірюванні опору на частотах 10-25 кГц. Еритроцити на даній частоті практично є діелектриками внаслідок чого електричний опір крові між електродами збільшується. Даний метод є недостатньо чутливим та не дозволяє оцінювати агрегацію еритроцитів. У основу електрокінетичного методу покладений ефект Дорна, який полягає в тому, що при русі заряджених частинок в нерухомому стовпі рідини в ній виникає різниця потенціалів. Вимірювання потенціалу Дорна дозволяє визначити електрокінетичну характеристику осідання еритроцитів, мембрани яких мають негативний заряд.

Існує ряд оптичних методів дослідження гуморальних середовищ.

При оптичній діагностиці гуморальних середовищ можна використовувати різні режими роботи [2]:

– Неперервне джерело випромінювання, розрізнення за інтенсивністю. Режим найбільш поширений оскільки дозволяє використовувати порівняно недорогі фотоприймальні та підсилювальні пристрої, що є прийнятним, як для побутової, так і для клінічної медичної апаратури.

– Короткі імпульси з джерела випромінювання ( $10^{-9}$ – $10^{-11}$  с), розрізнення за часом. Інформативним параметром у даному випадку є часовий зсув, а не інтенсивність сигналу. Відповідно точність вимірювань визначається кореляційною обробкою сигналів. Оскільки у наш час досягнуто значний процес у обробці імпульсів наносекундної тривалості це дозволяє суттєво підвищити точність вимірювань і достовірність діагностики, однак значно підвищує складність апаратури та її вартість.

– Модуляція джерела випромінювання за інтенсивністю на частотах 100 МГц – 10 ГГц, розрізнення за зсувом фаз на частотах модуляції. Модуляційний метод є більш простим та надійним у порівнянні з розрізненням за часом, має вищу завадостійкість та дозволяє використати апаратуру,

розроблену для контролю дисперсії у волоконно-оптичних лініях зв'язку. Просторова розділова здатність на основі цього методу досягає 1 мм, що дозволяє використовувати його в задачах візуалізації макронеоднорідностей у гуморальних рідинах, однак недостатня для аналізу форми та розмірів дисперсних часток.

Найбільш поширеним у клінічній практиці є фотометричний метод, що дозволяє визначати біохімічний склад гуморальних рідин, однак не дозволяє аналізувати форму та розміри частинок. При використанні методу спектрофотометрії у якості зондуючого випромінювання використовується монохроматор зі змінною довжиною хвилі, що дозволяє вийти на характеристичні для даного гуморального середовища чи типу дисперсних часток довжини хвиль. Для вимірювання спектру коефіцієнту дифузного відбивання використовують метод інтегрувальної сфери, що дозволяє вловити потік розсіяного назад випромінювання. Метод рефрактометрії полягає у вимірюванні показника заломлення для гуморального середовища, що суттєво відрізняється для його дисперсних часток та розчинів у яких вони знаходяться.

Раніше при дослідженнях нехтувався векторний характер випромінювання, що поширюється в розсіюючих середовищах, таких, як гуморальні середовища, оскільки вважалось, що через випадковий характер неоднорідних середовищ відбувається швидка деполяризація світла при його поширенні в середовищі. Проте у ряді випадків ступінь поляризації пройденого або відбитого світла виявляється цілком вимірюваним. При цьому інформативними параметрами, що характеризують структуру гуморальних середовищ, є як ступінь деполяризації падаючого поляризованого світла, характер перетворення поляризації з одного вигляду в інший, так і поява поляризованої компоненти в розсіяному світлі при опромінюванні об'єкту неполяризованим випромінюванням. У практичному плані очікується, що поляризаційні методи повинні привести до простіших, в порівнянні з часовим і фазо-частотним методами, схем оптичної медичної діагностики, а також дати нову інформацію про структуру біотканин та гуморальних середовищ.

Найбільш повно пружне розсіювання світла окремими частинками чи ансамблями частинок описується за допомогою матриці розсіювання світла (МРС) – матриці Мюллера, кожний з елементів якої є функцією довжини хвилі, розміру, форми і складу частинок [3, 4]. Для вимірювання МРС використовують методи поляризаційної нефелометрії, тобто здійснюється вимірювання індикатрис розсіювання для всіх 16 елементів матриці Мюллера при відповідних положеннях поляризатора та аналізатора.

Для дослідження гуморальних рідин широко використовується скануюча проточна цитометрія (СПЦ) [5], особливістю якого є дослідження частинок в тонкому потоці створеному гідрофокусуною головкою. СПЦ дозволяє визначати розмір і показник заломлення одиночних часток у реальному часі без використання процедури калібрування. При цьому точність у визначенні розмірів часток досягає декількох нанометрів, що можна порівнювати з точністю електронного мікроскопа. Індикатриса світлорозсіювання і флуоресценція частинки вимірюються зі швидкістю до 500 часток в секунду. Основною перевагою розробленої технології аналізу одиночних часток по світлорозсіюванню є висока швидкість і універсальність технології.

Метод лазерної дифрактометрії, заснований на явищі дифракції лазерного випромінювання на одиночних і множинних біологічних мікрооб'єктах, характеризується високою точністю, чутливістю, швидкодією, мінімальною дією на об'єкт дослідження, можливістю одночасної реєстрації великої кількості малих частинок. Параметри дифракційної картини (ДК) однозначно пов'язані з параметрами мікрооб'єктів, що дозволяє визначати їх розміри, форму, внутрішню структуру. Особливо зріс інтерес до дифрактометрії останніми роками у зв'язку з дослідженням деформованості еритроцитів [6].

### **Спектрополяриметричні методи та засоби контролю параметрів оптично м'яких частинок гуморальних середовищ**

Недоліком методів поляризаційної нефелометрії, скануючої проточної цитометрії та лазерної дифрактометрії є сукупний спосіб вимірювань, коли визначаються середні розміри і форма частинок у суспензії, а параметри окремої частинки не досліджуються. Досліджувати окремі частинки гуморальних середовищ можна використовуючи методи мікроскопії. Однак, оскільки формуючі елементи крові є оптично м'якими частками, то світлове випромінювання, що проходить через них, змінює не лише свою інтенсивність, але й фазу. І саме фазовий зсув несе більше інформації про структуру об'єкту. Для того щоб отримати зображення оптично м'яких частинок гуморальних

середовищ, яке залежить як від інтенсивності сигналу, так і його фази використовують поляризаційну, інтерференційну та голографічну мікроскопію.

Метод поляриметрії зображень (відеополяриметрії) для гуморальних середовищ полягає у реєстрації CCD-камерою поляризаційного зображення для елементів матриці Мюллера, що утворене після проходження поляризованого лазерного випромінювання через кювету з гуморальним середовищем чи відбиванні від поверхні. Метод обмежений роботою на одній довжині хвилі, на яку налаштований лазер та  $\lambda/4$ -пластинки компенсаторів. При спектрополяриметрії зображень аналогічні вимірювання здійснюють на різних довжинах хвиль [7]. У найпростішому випадку це може набір лазерів з різними довжинами хвиль [8]. При цьому здійснюється вимірювання елементів матриці Мюллера для кожної довжини хвилі, а потім отримання різницевих зображень. Це дозволяє значно підвищити контрастність та якість зображення частинки, вилучити або суттєво зменшити вплив фону і завад. Крім того можуть бути отримані різницеві зображення різноманітних поляриметричних параметрів: ступеня поляризації (DOP), ступеня лінійної поляризації (DOLP), ступеня циркулярної поляризації (DOCP), еліптичності, азимута, ексцентриситету тощо.

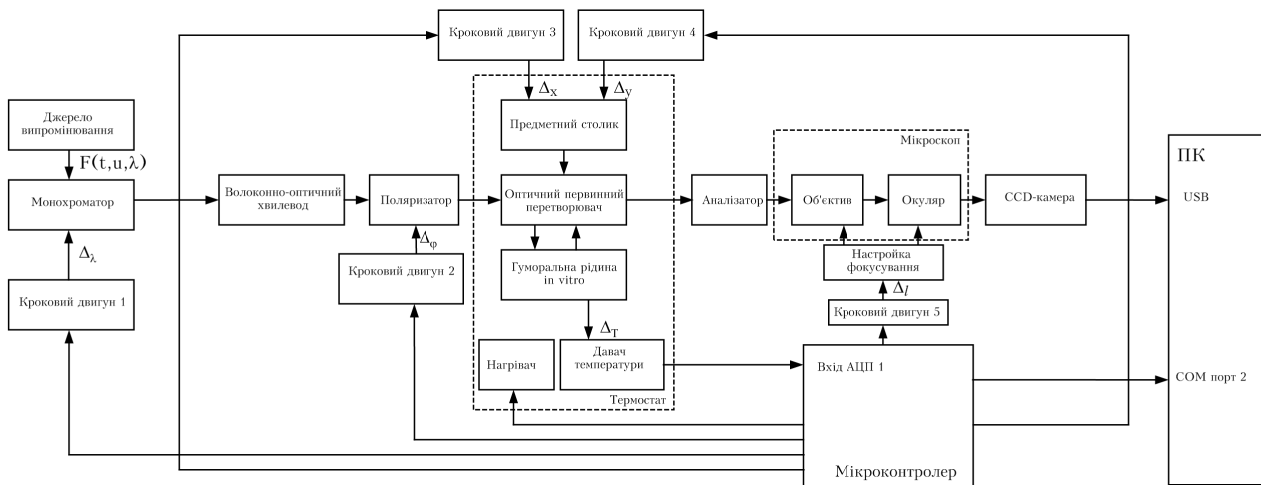


Рисунок 1 – Система автоматизованого контролю параметрів оптично м'яких частинок гуморальних середовищ на основі методу спектрополяриметричних зображень

Запропонована система автоматизованого контролю параметрів оптично м'яких частинок гуморальних середовищ на основі методу спектрополяриметричних зображень представлена на рис. 1. Випромінювання від перестроюваного монохроматора МУМ-2 проходить волоконно-оптичних хвилевід до поляриметричної системи. Монохроматор перестроюється з кроком 0,625 нм кроковим двигуном 1. Щілина монохроматора забезпечує смугу вихідного випромінювання 20нм та зміну робочої хвилі від 400 до 1200 нм. Далі випромінювання потрапляє на плівковий лінійний поляризатор, який розміщений на поворотному пристрої, що рухається кроковим двигуном 2 з кроком 0,5°. Випромінювання проходить первинний вимірювальний перетворювач – плоску кювету з тонким шаром досліджуваної гуморальної рідини. При дослідженні окремих часток шар рідини повинен бути 10–20 мкм, при дослідженні сукупних параметрів часток (середнього розміру і форми) можливо збільшити товщину шару до 1 мм. Подальше збільшення шару призведе до значного впливу затухання та розсіювання у об'єкті контролю, що ускладнить адекватне трактування результатів вимірювань. Оскільки параметри гуморальних середовищ суттєво залежать від температури у вимірювальному каналі на первинному вимірювальному перетворювачі встановлено цифровий датчик температури, сигнал з якого подається до мікроконтролера і реєструються поряд з іншими даними експерименту. При вимірюванні параметрів оптично м'яких частинок нативної крові термостатом підтримується стабільна температура  $+30 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Предметний столик з розміщеним об'єктом контролю може рухатись у двох напрямках за допомогою відповідних крокових двигунів 3 та 4. Далі світло проходить через плівковий лінійний аналізатор. Збільшення зображення до прийнятних розмірів здійснюється за допомогою оптичної системи мікроскопа. Контрастне зображення при цьому виставляється автоматично за допомогою крокового двигуна 5. У результаті випромінювання потрапляє на CCD-камеру. Далі зображення обробляється у комп'ютері з врахуванням вагових

коефіцієнтів, за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення та проблемно-орієнтованої експертної системи прийняття діагностичних рішень на основі нечіткої логіки.

### Висновок

Проведено огляд та аналіз методів контролю гуморальних середовищ. Оскільки гуморальні рідини є полідисперсними середовищами з оптично м'якими частками, то для дослідження їх параметрів використано метод спектрополяризаційних зображень, що дозволяє виділити інформацію як про інтенсивність, так і фазу світла, що пройшло через об'єкт контролю. Розроблено систему автоматизованого контролю параметрів оптично м'яких частинок гуморальних середовищ на основі методу спектрополяриметричних зображень *in vitro*.

Дослідження виконувались у рамках міжнародних україно-білоруських проектів кафедри екології та екологічної безпеки Вінницького національного технічного університету та лабораторії оптики світлорозсіювальних середовищ Інституту фізики ім. Степанова Національної Академії Наук Білорусі за підтримки Управління міжнародного науково-технічного співробітництва Міністерства освіти і науки України та Державного комітету з науки і технологій Республіки Білорусь.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред. Н.У. Тица. – М.: Лабинформ, 1997. – 960 с.
2. Тучин В.В. Исследование биотканей методами светорассеивания. // Успехи физических наук. — 1997. — Т. 165. — Вып. 5. — С. 517-539.
3. Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин Л.П. Лазерная диагностика в биологии и медицине. –М.: Наука, 1989. – 240 с.
4. Науменко Е. К., Царюк О. В. Применение поляризованного лазерного излучения для зондирования крови // Лазерная и оптико-электронная техника: Сб. науч. статей. - Вып.7. - Минск: БГУ, 2002. - С.162-166.
5. Мальцев В.П. Сканирующая проточная цитометрия: Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора физико-математических наук. – Новосибирск, 2000. – 30 с.
6. Аксенов Е.Т., Мокрова Д.В. Модифицированный лазерный дифрактометр для исследования биологических микрообъектов // Письма в ЖТФ, 2008, том 34, вып. 20. – С.38-43.
7. Петрук В.Г., Кватернюк С.М., Иванов А.П., Барун В.В. Спектрополяриметр зображення для діагностики матеріалів біомедичного походження. Патент України на корисну модель №35499 від 25.09.2008.
8. George C. Giakos Multifusion Multispectral Lightwave Polarimetric Detection Principles and Systems // IEEE transactions on instrumentation and measurement, Vol. 55, No.6, 2006, P.1904-1912.