

В результате выполненных измерений удалось построить профили концентрации озона от уровня менее 1 км до 32 км. Граничный уровень между измерениями в нижнем и верхнем слое атмосферы находился на уровне 8 км. На рис. 1 приведен один из высотных профилей концентрации озона в тропосфере (светлая кривая) и стратосфере (темная кривая). Результаты проведенных экспериментов показали практическую возможность посредством разработанной аппаратуры непрерывно измерять профили концентрации озона в тропосфере и стратосфере. Общий вид созданного и усовершенствованного аппаратурного комплекса представлен на рис. 2.

УДК 535.34: 535.36: 53.082.53

Барун В. В., Дик В. П., Иванов А. П. (Беларусь, Минск)

АППАРАТУРНЫЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ИЗЛУЧЕНИЯ, РАССЕЯННОГО БИОЛОГИЧЕСКИМИ ТКАНЯМИ И ГУМОРАЛЬНЫМИ СРЕДАМИ

Введение. Спектральные методы прочно вошли в практику определения компонентного состава, структурных и оптических характеристик различных сред. Однако применение этих методов для неинвазивной диагностики биологических тканей не столь широко, несмотря на очевидные преимущества по сравнению с другими известными способами, например, безболезненность светового воздействия, оперативность получения информации, отсутствие дорогостоящих реактивов и расходных материалов. В полной мере воспользоваться указанными достоинствами оптической диагностики к настоящему времени не удается по ряду причин. Одна из них связана с отсутствием промышленно выпускаемых технических средств, предназначенных для измерения характеристик света, рассеянного биотканями в условиях *in vivo*. Вторая причина заключается в том, что известные и стандартные спектроскопические методики измерения и обработки данных основаны на использовании закона Бугера – Ламберта – Бера и поэтому применимы лишь для прозрачных или слабо рассеивающих свет сред. Биологические ткани являются сильно мутными объектами, и уже для геометрически тонкой среды реализуются условия многократного рассеяния света. Это существенно затрудняет выделение полезной информации из измеряемого оптического сигнала и требует создания специальных алгоритмов и компьютерных программ для решения обратной задачи. Цель данной работы – разработка компактной и легко транспортируемой системы, сочетающей удобство измерения в условиях *in vivo* различных спектральных характеристик рассеянного света, обеспечение возможности комплексного изучения режимов однократно и многократно рассеянного излучения биотканей и гуморальных сред, получение экспериментальных результатов в абсолютных единицах, позволяющих воспользоваться аналитическими методиками решения обратной задачи по восстановлению структурных и биофизических параметров среды.

Структура измерительной системы. Прибор укомплектован по модульному принципу. Это обеспечивает гибкость системы в эксплуатации, возможность ее простой сборки и разборки, малые габариты. В качестве базовой комплектации использованы отдельные блоки, выпускаемые фирмой OceanOptics. Для каждого варианта режима работы общими модулями являются источник света на базе галогенной лампы HL-2000-LL, спектрометр USB4000-VIS-NIR (приемник излучения) и персональный компьютер. Кроме того, система включает ряд общих вспомогательных блоков и приспособлений, среди которых – программное обеспечение SPECTRASUITE, приемное и передающее волокна оптического типа QP400-2-VIS-BX, коллиматор типа 74-ACR, эталон оптический типа WS-1. При измерении различных характеристик рассеянного света дополнительно используются взаимозаменяемые модули, часть которых произведена OceanOptics, а другая разработана и изготовлена в Институте физики НАН Беларуси.

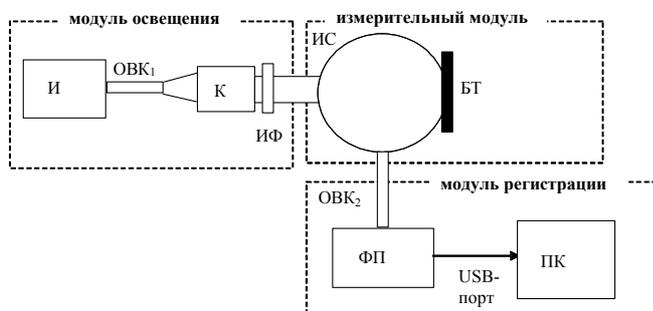


Рис. 1. Структурная схема прибора: И – источник света; ОВК₁ – передающий оптоволоконный кабель; К – коллиматор; ИФ – интерференционный фильтр; ИС – интегрирующая сфера; БТ – образец биоткани или гуморальной жидкости; ОВК₂ – приемный оптоволоконный кабель; ФП – фоторегистрирующее устройство; ПК – персональный компьютер

На рис. 1 представлена структурная схема системы в режиме измерения спектральных коэффициентов диффузного отражения. Свет от источника И поступает в оптоволоконный кабель ОВК₁ и выходит из него в виде расходящегося пучка с полным углом расходимости порядка 25°. Коллиматор К формирует параллельный пучок диаметром примерно 3 мм. При необходимости устанавливается интерференционный фильтр ИФ, который выбирает требуемую длину волны излучения. Далее свет поступает в интегрирующую сферу ИС (фотометрический шар) типа ISP-80-8-R, в измерительном порте которой вначале помещается калибровочный оптический эталон, а затем образец биоткани или гуморальной жидкости.

Оптический эталон во всем спектральном диапазоне 360 – 1000 нм имеет сертифицированный коэффициент отражения, близкий к 1. Отраженное объектами излучение по оптоволоконному кабелю ОВК₂ поступает в фотоприемник ФП, который измеряет спектр оптического сигнала (360 – 1000 нм), и, после калибровки, коэффициент диффузного отражения света от биоткани, передаваемый в компьютер. Тип регистратора спектрометра – ПЗС-линейка. Программное обеспечение служит для представления экспериментальных данных в совместимом с компьютером виде и формате. От ФП измеренный спектр подается в порт USB персонального компьютера ПК, где производится его окончательная обработка. Скорость передачи данных – каждые 5 мс через USB порт (обеспечивается программным путем). Операционной системой является Windows 98/2000/XP.

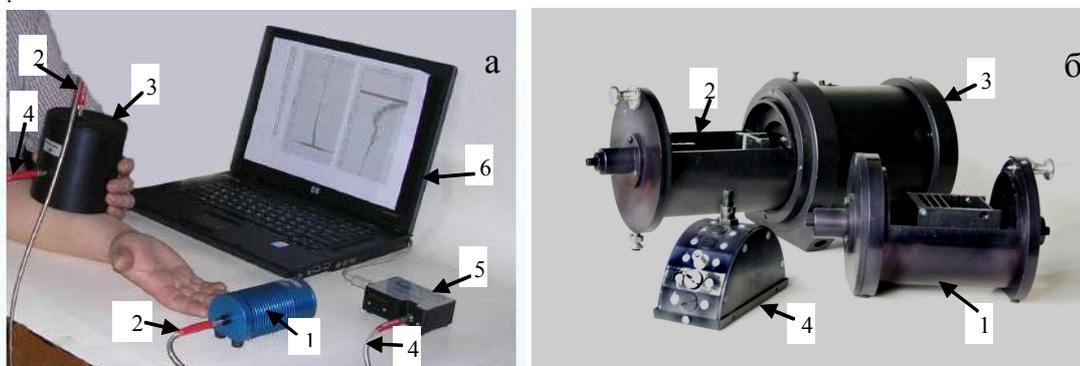


Рис. 2. Комплекс для измерения спектральных характеристик рассеянного света от кожи человека или гуморальной жидкости. (а) Измерение коэффициента диффузного отражения от кожи: 1 – источник света, 2 – ОВК₁, 3 – ИС, 4 – ОВК₂, 5 – ФП, 6 – ПК. (б) Комплект приставок: 1 – кюветная камера для измерения коэффициента направленного пропускания света гуморальной жидкостью, 2 – кюветная камера для измерения коэффициентов диффузного отражения и пропускания гуморальной жидкости, 3 – ИС, 4 – блок измерения индикатрисы отражения биообъекта

Измеряемые спектральные характеристики. Система может работать в следующих режимах измерений:

1. Коэффициенты диффузного отражения биообъектов, например, кожи (рис. 2а) или пробы гуморальной жидкости с использованием ИС (рис.2б). В первом случае к приемной апертуре интегрирующей сферы приставляется исследуемый образец. Во втором – кюветная камера с гуморальной жидкостью. Кювету с пробой устанавливают в посадочные места камеры.

2. Коэффициенты диффузного пропускания пробы гуморальной жидкости с использованием ИС и кюветной камеры для измерения многократно рассеянного света (рис.2б).

3. Коэффициенты направленного пропускания (показатели ослабления) пробы гуморальной жидкости в кювете для измерения интенсивности однократно рассеянного света (рис.2б)

4. Индикатрисы отражения света биообъектами с использованием гониометра (рис.2б). Гониометр своей приемной апертурой устанавливается на исследуемый образец. Освещение образца осуществляется по нормали к поверхности, а прием излучения – под некоторым углом. Этот угол может варьироваться в пределах 15 – 75° относительно нормали к поверхности.

Принцип измерения коэффициентов отражения биообъектов – стандартный и понятен из рис. 1. Измерение коэффициентов диффузного пропускания проб гуморальной жидкости осуществляется аналогично, но кюветную камеру с пробой устанавливают на входе ИС. Пучок белого света от источника через передающее волокно и коллиматор поступает в кювету и рассеивается исследуемой жидкостью. Возникший диффузный свет поступает в ИС, а от нее через второй коллиматор и приемное волокно – на приемник спектрометр. Спектрометр регистрирует спектр рассеянного излучения и, после калибровки, коэффициенты диффузного пропускания света гуморальной жидкостью.

При измерении пропускания прямого света в условиях *in vitro* (для проб гуморальных сред или тонких срезов биоткани) пучок белого света от источника через передающее волокно и коллиматор поступает в кюветную камеру, проходит кювету с исследуемой жидкостью и через второй коллиматор поступает в приемное волокно и далее на спектрометр. Последний регистрирует спектральную интенсивность ослабленного жидкостью излучения и, после калибровки относительно эталонной кюветы, передает значения коэффициента пропускания на различных длинах волн в компьютер. Два указанных коллиматора служат для задания требуемой расходимости облучаемого и регистрируемого света, что позволяет повысить точность измерения коэффициента пропускания.

При измерениях индикатрис отражения биообъектов используется указанная ранее комплектующая техника (без интегрирующей сферы и кюветных камер) Для получения экспериментальных данных в абсолютных единицах применяется оптический эталон.

Оценка погрешностей измерителя коэффициентов отражения. Правильность любых измерений определяется случайными и систематическими ошибками. Остановимся на их анализе, при этом основное внимание уделим определению коэффициента диффузного отражения. Случайные ошибки в данном приборе связаны, в первую очередь, с шумами регистрирующей системы.

Остановимся на *шумах системы регистрации*. В приборе программным путем можно менять спектральный интервал усреднения регистрируемого сигнала. Учитывая плавные зависимости коэффициентом отражения от длины волны, для анализа шумов выбран усредненный спектральный интервал 10 нм, что соответствует усреднению по 25 пикселям ПЗС-линейки. В качестве материала, на котором проводились исследования, выбрана серая бумага. Серая бумага имела коэффициент отражения порядка 20 %. Анализировались шумы при изменении времени накопления регистрируемого сигнала, количестве реализаций. Наибольшие шумы имеют место в УФ и ближней ИК областях спектра. Они определялись стандартным способом по разбросу результатов большого числа измерений. На основании проведенных исследований сделан вывод о целесообразности проведения измерений при времени накопления не более 4 сек и четырех реализациях. При этом в интервале 0.4 – 1 мкм погрешности, определяемые шумами, не более процента.

Перейдем к рассмотрению других возможных ошибок. Они могут быть самыми разнообразными. Остановимся на некоторых из них.

Влияние люминесценции и рассеяния света в спектрометре. Прибор предназначен для измерения спектрального коэффициента отражения биообъекта $R(\lambda)$. Однако биообъект может под действием света люминесцировать. В самом спектрометре может возникать рассеянный свет на диспергирующих элементах. В результате на приемник излучения попадет не только излучение, отраженное биообъектом, но и люминесцентный и рассеянный свет на разных длинах волн. Это приведет к неправильному определению $R(\lambda)$. Для оценки ошибок выполнялись измерения коэффициента отражения R с установкой за осветителем различных отсекающих светофильтров и без них. Во всех этих случаях регистрируемый коэффициент отражения практически не изменялся, что свидетельствовало об отсутствии люминесценции и рассеянного света в приборе

Влияние расстояния между поверхностью интегрирующей сферы и биообъектом. Между исследуемой поверхностью (эталон, кожа), установленной в измерительной апертуре ИС, и внутренней поверхностью сферы всегда есть зазор, ограничивающий угол приема ИС и влияющий на количество света, попадающего внутрь сферы. Вследствие этого возникают ошибки измеряемого коэффициента отражения. Определить их непосредственно с помощью вдавливания ткани *in vivo* некорректно, поскольку нарушается кровонаполнение, что также изменяет отражательную способность. Поэтому упомянутые ошибки оценивались путем изменения зазора между поверхностью сферы и образцами мягких бумаг, имевших нейтральный по спектру, но разные по величине абсолютные коэффициенты отражения. В результате экспериментально показано, что при уменьшении зазора R возрастает на 1 – 3 % вследствие увеличения угла приема.

Учет фонового светового потока, попадающего на стенки фотометрического шара. Выше отмечалось, что полный угол расходимости излучения в осветительном канале после ОВК₁ составляет примерно 25°. Однако незначительный по интенсивности свет присутствует и вне этого угла. Данное излучение прямо попадет после коллиматора на стенки фотометрического шара и скажется на результатах измерения. Если измерить отношение сигналов на приемнике α , когда вначале в отверстии сферы черная ловушка, а затем эталон, полностью отражающий свет, то оно будет долей света, попавшей на стенку сферы. Измерения показали, что в интервале 400 – 1000 нм значения α изменяются от 0.017 до 0.03. Нетрудно показать, что истинный коэффициент отражения R связан с измеренным R_m соотношением

$$R = \frac{1.01(R_m - \alpha)}{1 - \alpha}. \quad (1)$$

Влияние размытия осветительного пятна в объеме биоткани. При попадании света на поверхность кожи он не только проникает вглубь ткани, но и рассеивается (размывается) в радиальном направлении. Характерный размер размытого пучка может быть больше, чем диаметр измерительной апертуры ИС, так что часть отраженного света не попадет в сферу, и измеряемый коэффициент отражения будет занижен. Проведенные эксперименты показали, что это наблюдается при $\lambda > 500$ нм, а по расчетам отношение γ истинного коэффициента отражения к измеренному при длинах волн 600, 700, 800 нм равно 1.01, 1.07, 1.1. В связи с этим в (1) в числителе необходимо вставить множитель γ .

Заключение. Созданный комплекс позволяет осуществлять неинвазивную (неразрушающую) диагностику концентрации капилляров и степени оксигенации крови в дерме, концентрации меланина и толщины эпидермиса, а также определение степени оксигенации, гемоглобинного состава, размеров и степени агрегации эритроцитов в пробах крови [1]; выявлять ряд патологий приповерхностных участков кожи и проб крови по отклонению измеренных структурных и биофизических параметров ткани и крови от нормальных значений [2]; оценивать глубины проникновения света в ткань при светотерапии, включая лазерную; оценивать температурный режим биоткани при лазерной гипертермии или криотермии поверхности кожи [3]. Прибор укомплектован по модульному принципу; его вес 7 – 8 кг (в зависимости от комплектации); имеет программное обеспечение и связь с портом USB персонального компьютера для передачи оцифрованных данных и их обработки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барун В. В., Иванов А. П., Кватернюк С. М., Петрук В. Г. Способ определения степени агрегации эритроцитов. Заявка на изобретение (BY) рег. № а 20100492 от 29.02.20102.

2. Барун В. В., Иванов А. П., Вологовская А. В., Улащик В. С. // Журн. прикл. спектр. – 2007. – Т.74. – С. 387 – 394.
3. Кулешова Д. В., Лощенов В. Б., Шевчик С. А., Барун В. В., Иванов А. П. // Мат. VI Межд. конф. «Лазерная физ. и оптич. технологии», под ред. Н.С.Казака, Гродно. – 2006. – Ч.2. – С. 184 – 186.

УДК 535:34, 535:36

Иванов А. П., Барун В. В., (Беларусь, Минск), Петрук В. Г., Кватернюк С. М. (Украина, Винница)

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ КРОВИ

Введение. В настоящее время хорошо разработан спектрофотометрический метод определения ряда характеристик гемолизированной крови. Он основан на измерении ослабления света и расчете концентрации поглощающего материала по найденной оптической плотности раствора в соответствии с законом Бугера – Бера. Однако аналогичная задача для суспензии эритроцитов имеет ряд особенностей, связанных с рассеянием света. Для восстановления параметров среды по измерению рассеянного ею света нужно использовать достаточно громоздкие и неудобные при обработке вычислительные методики (в основном, инверсный метод Монте Карло [1]) Это затрудняет их широкое внедрение в практику. В данной работе, на основании аналитических подходов предложены достаточно простые спектрофотометрические способы измерения таких характеристик как степень агрегации эритроцитов, концентрация гемоглобина, степень оксигенации крови.

Определение степени агрегации эритроцитов. Эритроциты в норме представляют собой двояковогнутые диски. Их диаметр составляет 7 – 9 мкм, по краю толщина 1.7 – 2.4 мкм, а в центре 0.9 – 1.2 мкм [2, 3]. Эритроциты способны агрегировать, связываясь друг с другом основаниями дисков, и образовывать цилиндрические цепочки. Число эритроцитов в агрегате может быть от нескольких до сотен штук [2, 3]. Поэтому длина l цепочки может сильно варьироваться – от примерно 2 мкм до 200 и более мкм, тогда как ее диаметр меняется в существенно более узких пределах. Нарушение степени агрегации (длины l) эритроцитов может свидетельствовать о ряде патологий крови. Поэтому контроль степени агрегации эритроцитов важен для выявления ряда заболеваний крови и организма человека в целом.

Будем моделировать эритроциты цилиндром с круговым основанием диаметром $d = 8$ мкм и высотой $l_0 = 2$ мкм. В [4] показано, что двояковогнутую структуру частиц можно просто учесть путем введения в показатель поглощения множителя, несколько изменяющего объем гемоглобина. Соответственно, агрегат эритроцитов будем полагать цилиндром, диаметр которого равен d , а длина – $l = l_0 N$, где N – число частиц в агрегате. Известно, что показатели поглощения раствора вещества и суспензии частиц из того же вещества могут сильно различаться. В первом случае показатель поглощения крови есть просто средневзвешенная сумма соответствующих показателей компонент (учитываем только основные компоненты – окси- HbO₂ и деоксигемоглобин Hb)

$$k_b^*(\lambda) = \alpha Hf [Sk_{HbO_2}(\lambda) + (1-S)k_{Hb}(\lambda)] = \alpha Hk_e(\lambda), \quad (1)$$

где α – коэффициент, характеризующий степень возможного разбавления пробы ($\alpha \leq 1$), который равен 1 для цельной крови, H – гематокрит (объемная доля эритроцитов в крови), f – объемная доля гемоглобина в эритроцитах, k_{HbO_2} , k_{Hb} и k_e – показатели поглощения соответственно окси-, деоксигемоглобина и эритроцитов, S – степень оксигенации крови, представляющая собой отношение концентраций оксигемоглобина и всего гемоглобина. Типичные значения $H = 0.4$, $f = 0.25$. В случае суспензии не весь свет попадает в эритроциты, содержащие гемоглобин. Часть его проходит вне частиц и не поглощается. В результате показатель поглощения суспензии при том же количестве гемоглобина будет меньше и равен

$$k_b(\lambda) = \alpha c Hf [Sk_{HbO_2}(\lambda) + (1-S)k_{Hb}(\lambda)] = \alpha c Hk_e(\lambda). \quad (2)$$

Здесь $c \leq 1$ – поправочный коэффициент, говорящий о нарушении закона Бера для дисперсного поглотителя. Его значения как раз указывает долю массы, эффективно участвующей в поглощении. Значения c зависят от сечения поглощения эритроцитов. Сечение поглощения, в свою очередь, определяется известными показателями поглощения дериватов гемоглобина HbO₂, Hb [5], размерами эритроцитов, в частности, искомой длиной l агрегатов, их ориентацией в пространстве. Аналитические выражения c и его расчет приведен в [6]. Показано, что поправочный коэффициент c с ростом средней оптической толщины эритроцита убывает. Если измерить c , то можно определить l . Это делается следующим образом.

Исходная проба крови делится на две одинаковые части. Одна часть гемолизуется, т. е. получаем раствор гемоглобина. Другая остается суспензией. Помещаем пробы в две кюветы одинаковой длины L и измеряем коэффициенты пропускания прямого света в обоих случаях. Эти коэффициенты (T^* , T) описываются экспоненциальными зависимостями, и соответствующие им оптические плотности равны

$$D^* = \ln(1/T^*) = k_b^* L, \quad D = \ln(1/T) = k_b L. \quad (3)$$

Здесь параметры со звездочками соответствуют раствору, без звездочки – суспензии; L – толщина кюветы через которую проходит свет. Следует отметить, что второе выражение в (3) справедливо при условии, что можно в оптической плотности пренебречь влиянием показателя рассеяния суспензии. Эритроциты в плазме оптически “мягкие частицы”, имеющие сильно вытянутую вперед индикатрису рассеяния. Поэтому, если