

УДК 551.508

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОФИЗИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПОПУЛЯЦИЙ НАТИВНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

М.М. КУГЕЙКО, Д.А. СМУНЕВ

Белорусский государственный университет
пр. Независимости, 4, Минск, 220030, Беларусь

Поступила в редакцию 8 ноября 2016

Разработаны методы определения микрофизических параметров (МФП) популяций нативных эритроцитов на основе установления устойчивых регрессионных соотношений между определяемыми МФП и измеряемыми оптическими характеристиками. Показана возможность создания простого экспресс-анализатора форменных элементов крови.

Ключевые слова: нативные эритроциты, микрофизические параметры, оптические характеристики, регрессионные соотношения.

Введение

Под нативным эритроцитом подразумевается эритроцит в своей естественной форме, которая сохраняется и вне плазмы крови, например, с использованием антикоагулянта с последующим разбавлением физиологическим раствором. Нативный эритроцит в наибольшей степени совпадает с формой двояковогнутого дискоида [1]. Рассмотрим методы определения микрофизических параметров (МФП) популяций нативных эритроцитов на основе регрессионных соотношений между определяемыми микрофизическими и измеряемыми оптическими характеристиками. Как было показано в [2], регрессионные соотношения в значительной мере чувствительны к заложенным математическим моделям эритроцита. Так, даже если будет производиться трансформация формы таким образом, чтобы сохранить основные микрофизические параметры популяции, погрешности в регрессионных соотношениях для разных форм будут значительно отличаться: от 1 % для двояковогнутого дискоида до 8 % для сплюснутого дискоида и до 21 % для шара. Очевидно, таким образом, что для расчета коэффициентов регрессионных соотношений наиболее эффективно использовать математическую модель двояковогнутого дискоида и расчет светорассеяния модифицированным методом дискретных диполей (МДД), достоинством которого является возможность учитывать особенности формы [3]. В данных методах измерительная информация оперативно (за секунды) обрабатывается с применением установленных заранее регрессионных соотношений.

Методы определения микрофизических параметров нативных эритроцитов с использованием неполяризованного падающего излучения

Наименьшие погрешности для неполяризованного падающего излучения дает регрессионное соотношение, включающее измерение четырех компонентов рассеяния – двух коэффициентов углового рассеяния $\beta(\Theta)$ и двух компонентов коэффициента поляризации $P(\Theta)$, представленное ниже в следующем виде:

$$\ln(x_i) = a_0 + a_1 \ln \beta(\Theta_1) + a_2 \ln \beta(\Theta_2) + a_3 \ln P(\Theta_3) + a_4 \ln P(\Theta_4). \quad (1)$$

Углы Θ_i и коэффициенты a_i представлены в табл. 1 и 2 соответственно. В табл. 2 приведены погрешности, соответствующие измеряемым МФП. Необходимо снова отметить, что для N использовались только коэффициенты направленного рассеяния $\beta(\Theta)$. Соотношение (1)

использовалось в численных экспериментах по замкнутой схеме для восстановления определяемых МФП для 10^3 популяций эритроцитов, что, в свою очередь, позволяло судить о точности определения МФП по значениям измеряемых оптических параметров популяций эритроцитов (по гистограммам погрешностей определения МФП при их различных комбинациях).

Таблица 1. Углы, используемые в (1)

Параметр	Θ_1°	Θ_2°	Θ_3°	Θ_4°
$\langle V \rangle$	6	20	82	120
$\langle S \rangle$	7	13	79	115
D_0	13	20	65	79
ΔD	13	20	65	74
n	10	15	66	88
N	7	17	107	147

Таблица 2. Коэффициенты регрессионного соотношения (1) и погрешности определяемых МФП

Параметр	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	$\delta, \%$
$\langle V \rangle$	3,4104	0,1995	-0,1901	-0,0252	-0,7153	1,9289
$\langle S \rangle$	4,0677	0,1688	-0,1541	0,1781	-1,1997	1,2389
D_0	2,4283	-0,3385	0,3148	0,9258	-1,0309	1,8708
ΔD	-1,0572	1,7451	-1,7491	2,0700	-2,6672	7,0012
n	2,4364	0,0679	-0,0551	-1,2267	0,0198	1,9107
N	10,1709	0,6576	0,8710	-0,8862	-0,3426	2,4984

Как видно из погрешностей, приведенных в табл. 2, при измерении двух угловых коэффициентов рассеяния $\beta(\Theta)$ и двух коэффициентов поляризации $P(\Theta)$ можно оперативно определять одновременно такие важные диагностические МФП, как средний объем и средняя площадь поверхности популяций нативных эритроцитов. Это соответствует довольно простой нефелометрической схеме измерений (нефелометрический метод анализа базируется на измерении интенсивности света, рассеянного средой под углом). При этом не требуется сферизация эритроцитов, и данные параметры наиболее соответствуют реальному эритроциту. Более того, следует отметить, что метод определения средней площади поверхности популяций нативных эритроцитов не был известен.

Методы определения микрофизических параметров нативных эритроцитов с использованием поляризованного падающего излучения

Рассмотрим возможности методов с использованием регрессионных соотношений при посылке поляризованного оптического излучения. Наименьшие погрешности для поляризованного падающего излучения получаются при использовании регрессионного соотношения, включающего измерение четырех коэффициентов углового рассеяния $\beta(\Theta)$ и представленного ниже в следующем виде:

$$\ln(x_i) = a_0 + a_1 \ln(\beta(\Theta_1)) + a_2 \ln(\beta(\Theta_2)) + a_3 \ln(\beta(\Theta_3)) + a_4 \ln(\beta(\Theta_4)). \quad (2)$$

Требуемые для измерения углы Θ_i и коэффициенты a_i , соответствующие данным углам, представлены в табл. 3, 4. Использование же в регрессионных соотношениях коэффициента деполаризации для падающего поляризованного излучения, как следует из результатов моделирования, менее информативно, что и приводит к тому, что наименьшим погрешностям в определении МФП популяций нативных эритроцитов будут соответствовать регрессионные соотношения, включающие только $\beta(\Theta)$. Как и в случае использования неполяризованного излучения, можно оперативно определять одновременно такие важные диагностические МФП, как средний объем и средняя площадь поверхности популяций нативных эритроцитов. При этом также не требуется сферизация эритроцитов, и данные параметры наиболее соответствуют реальному эритроциту.

Таблица 3. Углы, используемые в (2)

Параметр	Θ_1°	Θ_2°	Θ_3°	Θ_4°
$\langle V \rangle$	12	17	29	50
$\langle S \rangle$	12	17	44	50
D_0	12	17	39	44
ΔD	12	17	30	44
n	10	15	29	36
N	10	16	91	144

Таблица 4. Коэффициенты регрессионного соотношения (2) и погрешности определяемых МФП

Параметр	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	$\delta, \%$
$\langle V \rangle$	5,0177	-0,3536	-0,6389	1,1774	-0,2669	2,9714
$\langle S \rangle$	6,5217	-0,3045	-0,5108	0,712	0,0082	1,8156
D_0	3,4716	-0,1505	-0,6132	0,5359	0,1552	3,1956
ΔD	-0,6094	-0,6386	3,2796	-3,3675	0,8191	8,1171
n	11,0261	-0,1333	-0,3334	0,6203	0,1430	2,3114
N	22,1994	0,6729	0,5626	-0,6326	0,3872	2,8789

Однако, как следует из приведенных выше погрешностей в табл. 2 и 4, при использовании неполяризованного излучения погрешности определения МФП популяций нативных эритроцитов на единицы процентов меньше (для концентрации N практически одинаковы, поскольку в обоих случаях измеряется только $\beta(\Theta)$). Следует также отметить, что построение измерительной схемы при использовании источника линейно поляризованного излучения проще по причине отсутствия поляризационных измерений и из-за достаточно малой расходимости когерентных пучков.

Особо следует подчеркнуть, что важным преимуществом методов с использованием регрессионных соотношений между определяемыми и измеряемыми параметрами перед цитометрическими измерениями является экспрессность, то есть анализ можно провести непосредственно в реальном времени. Перед анализом не потребуется дополнительное время для сферизации частиц, также исключаются специальные реагенты для сферизации, что, в свою очередь, ведет к уменьшению стоимости проведения анализа. Обработка измерительной информации в данных методах проводится также в реальном времени (за секунды).

Возможная реализация измерительной системы

Наиболее информативными системами измерения МФП эритроцитов являются сканирующие проточные цитометры [1]. Однако они широко не используются на практике из-за дороговизны и сложности настройки. Принцип их работы основан на измерении светорассеяния каждой отдельной частицы из популяции, при их движении в капилляре гидрофокусирующей системы при постоянном освещении лазером вдоль движения. Сканирующий проточный цитометр позволяет регистрировать индикатрису в широком диапазоне углов без принципиальных ограничений по угловому разрешению. В общем случае интенсивность рассеянного излучения зависит не только от размера и показателя преломления частиц, но и от их ориентации, формы, внутренней структуры. Эти дополнительные факторы усложняют картину рассеяния и затрудняют ее интерпретацию, ограничивая точность определения микрофизических параметров частиц. В основном, за исключением [1], применяют алгоритмы интерпретации измерительной информации, соответствующие представлению частиц в виде сферы или сфероида. Таким образом, при этом требуется предварительная сферизация и достаточно сложные оптические и гидрофокусирующие системы для измерения индикатрисы рассеяния частицы.

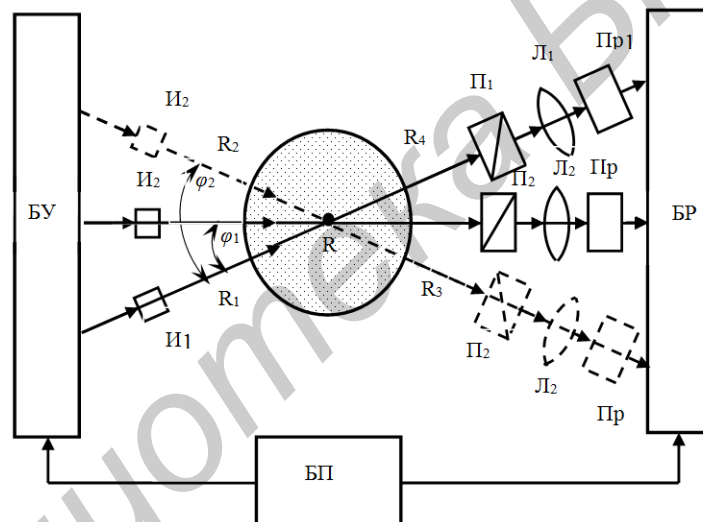
Реализация рассмотренных выше методов определения МФП эритроцитов на базе установленных регрессионных соотношений между измеряемыми и определяемыми параметрами осуществима по довольно простой нефелометрической схеме измерений, которая не требует ни наличия сложной гидрофокусирующей системы, ни сферизации эритроцитов. Отсутствие необходимости пропускания единичных частиц через узкий капилляр позволяет

упростить и удешевить систему, проводить измерения в разбавленной или цельной крови. Обработка измерительной информации в данных методах будет осуществляться в реальном времени, что, в связи с изложенным, позволяет говорить о разработке экспресс-метода в диагностике МФП нативных эритроцитов. Основное требование к измерительной системе: измерители должны обладать устойчивостью к различным дестабилизирующим факторам. Теоретические основы метода измерения коэффициентов рассеяния оптического излучения, обладающего отмеченными достоинствами, изложены в [4]. Соответствующая оптическая схема измерителя приведена на рисунке.

Выражение для коэффициента направленного рассеяния рассеивающего объема R под углом Θ имеет вид:

$$\beta(\Theta) = \sqrt{\frac{P_{\Theta}(R_1, R_3)P_{\Theta}(R_2, R_4)}{P(R_1, R_4)P(R_2, R_3)}} \quad (3)$$

Из (3) видно, что результат измерения коэффициента направленного рассеяния $\beta(\Theta)$, проведенного с помощью описанной схемы, зависит только от измеренных сигналов и не зависит от аппаратных констант приемников, мощности излучателей, а также коэффициента ослабления излучения на участках между рассеивающим объемом и приемниками, источниками излучения. Последнее позволяет говорить, что загрязнения стенок кюветы не будут сказываться на результатах измерений.



Оптическая схема измерителя коэффициентов рассеяния с использованием двух источников и двух приемников излучения (И – источник излучения, Пр – приемник излучения, Л – линза, П – поляризатор, R – рассеивающий объем, находящийся в поле зрения приемника, R_{1,2}, R_{3,4} – соответственно точки расположения источников и приемников, БУ – блок управления, БП – блок питания, БР – блок регистрации и обработки)

Если в измерительную схему добавить поляризаторы, то устройство будет способно измерять и степень поляризации рассеянного излучения, сохраняя при этом отмеченные выше достоинства. Алгоритм работы измерительной системы представляется следующим образом. Через кювету с кровью попеременно первым и вторым источниками (рисунок) посылается зондирующее излучение (параллельный пучок). При этом система «источник 1 – приемник 2» является статичной, а «источник 2 – приемник 1» может вращаться (двигаться) вокруг оси, проходящей через точку взаимного пересечения лучей, следствием чего является возможность изменения угла Θ между источниками. На приемник П.1 поступает прямо прошедшее излучение от источника И.2 и рассеянное в точке R под углом Θ излучение от источника И.1. Аналогично и для приемника П.2. Для проведения поляризационных измерений необходимо наличие в системе возможности ввода в измерительную схему поляризаторов (например, также с использованием поворотного устройства).

В качестве источников излучения наиболее эффективно использовать полупроводниковые лазеры, излучение которых с использованием коллимирующего

устройства легко сделать малорасходящимся. Применение лазеров других типов (более мощных) может приводить к разрушению форменных элементов крови, а также к увеличению габаритных размеров, стоимости и т.п. Формирование высоконаправленных пучков излучения от таких источников, как светоизлучающие диоды, пространственное совмещение пучков от источников с разными длинами волн и фокусировка рассеянного излучения на фотоприемниках требует применения оптических элементов, например, линз, что и отражено в приведенной на рисунке схеме.

Таким образом, рассмотренный выше измеритель является эксплуатационно устойчивым, имеет повышенную надежность, так как влияние таких неконтролируемых факторов, как загрязнение оптических поверхностей, изменение мощностей излучателей и аппаратурных констант приемников, будет практически исключено. Это позволяет создать эксплуатационно устойчивую измерительную систему, не требующую проведения частых калибровочных измерений.

METHODS FOR DETERMINATION OF MICROPHYSICAL PARAMETERS OF NATIVE ERYTHROCYTES POPULATIONS

M.M. KUGEIKO, D.A. SMUNEV

Abstract

The determination methods of the microphysical parameters of native erythrocytes populations by establishing stable regression relationships between the defined parameters and measured optical characteristics are developed. The possibility of creating a simple rapid analyzer of blood cells is shown.

Keywords: red blood cells, microphysical parameters, optical characteristics, regression correlations.

Список литературы

1. Юркин М.А. Моделирование светорассеяния клетками крови с помощью метода дискретных диполей : дисс. ... канд. физ.-мат. наук. Новосибирск, 2008.
2. Кугейко М.М., Смунев Д.А. // Журнал прикладной спектроскопии. 2016. Т. 83, № 2. С. 222–229.
3. Smunев D.A., Chaumet P.C., Yurkin M.A. // J. of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. 2015. Vol. 156, № 5. P. 67–79.
4. Кугейко М.М., Оношко Д.М. Теория и методы оптико-физической диагностики неоднородных рассеивающих сред. Минск, 203.

УДК 517.958: 57, 517.958: 531.72

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ ЭДЕМОМЕТР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОРОЭЛАСТИЧНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК СЛОЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТКАНИ

В.А. МАНСУРОВ, А.И. КУБАРКО, В.Л. КАЗУЩИК, В.Г. ЛЕЩЕНКО, А.В. ШОТТ

*Белорусский государственный медицинский университет
Дзержинского, 83, 220119, Минск, Беларусь*

Поступила в редакцию 14 ноября 2016

Исследование биомеханических характеристик биоткани позволяет получить важные данные не только о механическом поведении ткани при нагрузках, но еще получить оценки о движении внутритканевой жидкости. Последнее является важным при изучении