

Рассеяние лазерного пучка на неоднородном ансамбле эллиптических дисков, моделирующих красные клетки крови в эктацитометре

С.Ю.Никитин, М.А.Кормачева, А.В.Приезжев, А.Е.Луговцов

Теоретически рассмотрено влияние различий в форме частиц на вид дифракционной картины, возникающей при рассеянии лазерного пучка на разбавленной суспензии эритроцитов в эктацитометре. Предложены алгоритмы обработки экспериментальных данных, позволяющие оценивать дисперсию параметра формы эритроцитов в условиях лазерной эктацитометрии. Выполнена экспериментальная проверка выводов теоретического анализа.

Ключевые слова: дифракция, лазер, частица, эритроцит, деформируемость, эктацитометр, эллиптический диск, разброс частиц по формам, сдвиговое напряжение.

1. Введение

Характер движения крови по мелким сосудам (капиллярам) в значительной степени зависит от деформируемости эритроцитов, т. е. от способности красных клеток крови изменять свою форму под действием внешних сил и сдвиговых напряжений. Одним из методов экспериментального исследования деформируемости эритроцитов вне организма (in vitro) является лазерная эктацитометрия, основанная на использовании силы вязкого трения и дифракции света [1]. При освещении небольшого объема суспензии эритроцитов на экране наблюдения, расположенном в дальней зоне, возникает дифракционная картина, которая содержит информацию о форме исследуемых частиц.

В популяции эритроцитов даже здорового, а тем более больного человека разные клетки обладают, вообще говоря, разной способностью к деформации. Это дает основание рассматривать деформируемость как статистическую характеристику ансамбля частиц и использовать для ее описания такие понятия, как функция распределения, среднее значение и дисперсия.

Цель настоящей работы состоит в аналитическом анализе влияния различий в форме частиц, деформированных сдвиговым напряжением, на вид дифракционной картины, наблюдаемой при лазерной дифрактометрии эритроцитов, а также в экспериментальном подтверждении теоретических выводов.

С.Ю.Никитин, М.А.Кормачева. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: sergeynikitin007@yandex.ru, kormacheva.marie@gmail.com

А.В.Приезжев. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: avp2@mail.ru; avp2@phys.msu.ru

А.Е.Луговцов. Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: anlug@tut.by

Поступила в редакцию 4 июля 2012 г., после доработки – 17 сентября 2012 г.

2. Принцип работы эктацитометра

В эктацитометре суспензию эритроцитов помещают в зазор между стенками двух прозрачных коаксиальных дисков или цилиндрических стаканов, один из которых неподвижен, а другой может приводиться во вращение со ступенчато изменяемой скоростью (так называемая ячейка Куэтта)*. Вращение подвижного стакана вызывает течение жидкости и появление в ней сдвиговых напряжений, которые деформируют эритроциты. В куэттовском потоке сдвиговая скорость и пропорциональное ей сдвиговое напряжение постоянны вдоль радиальной координаты при фиксированной скорости вращения цилиндра. В определенном (ограниченном сверху) диапазоне напряжений сдвига и в отсутствие взаимодействия между частицами (что характерно для разбавленных суспензий) деформируемые клетки вытягиваются и ориентируются вдоль потока. Для наблюдения за изменением формы частиц суспензию эритроцитов просвечивают лазерным пучком. В эктацитометрии реализуются условия однократного рассеяния, которые нетрудно обеспечить соответствующим разбавлением исследуемой суспензии клеток физраствором.

Заметим, что при стандартных концентрациях суспензии в пределах лазерного пучка в зазоре ячейки Куэтта одновременно находится порядка тысячи клеток, при этом одни клетки постоянно заменяются другими при движении в потоке. Это приводит к усреднению наблюдаемой дифракционной картины по популяции клеток.

Как правило, в случае нормальной крови дифракционная картина содержит центральный максимум и несколько слабо различимых интерференционных линий, близких по форме к окружностям в отсутствие сдвиговых напряжений и к эллипсам при их наличии [1]. Это свидетельствует о том, что нормальные эритроциты в потоке приобретают форму, близкую к эллипсоидальной. Дифракционная картина регистрируется видеокамерой и передается в компьютер. С помощью специальной программы на экране наблюдения выделяются точки, в ко-

* В дальнейшем для определенности мы будем обсуждать вариант с цилиндрической ячейкой Куэтта.

торых интенсивность света одинакова. Обычно для этой цели используют границу центрального дифракционного максимума (т.е. первый минимум дифракционной картины), которую аппроксимируют эллипсом. Отношение полуосей этого эллипса как функция сдвиговой скорости (или сдвигового напряжения) в ячейке Куэтта характеризует среднюю деформируемость эритроцитов, которая и измеряется в подобных опытах.

3. Модель эритроцита

Мы моделируем эритроцит прозрачным эллиптическим диском, т.е. цилиндром, в основании которого лежит эллипс. Основанием для такой модели служат изображения эритроцитов в сдвиговом потоке, полученные с помощью микроскопа и показанные на рис. 1 [2, 3]. Другим аргументом в пользу нашей модели является близость фазовых функций рассеяния от двояковогнутого и плоского дисков, рассчитанных в дискретно-дипольном приближении в области малых углов. Длины полуосей эллиптического диска a и b считаем случайными величинами:

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

где a_0 и b_0 – средние длины полуосей; ε – случайный параметр (параметр формы частицы). Мы полагаем, что среднее значение параметра формы равно нулю: $\langle \varepsilon \rangle = 0$, а его дисперсия $\langle \varepsilon^2 \rangle \equiv \mu^2 \ll 1$. Таким образом, неоднородность ансамбля по формам частиц считается слабой. Кроме того, $ab \approx a_0b_0$, т.е. эллиптические диски имеют примерно одинаковые площади поверхностей и объемы, но разный эксцентриситет.

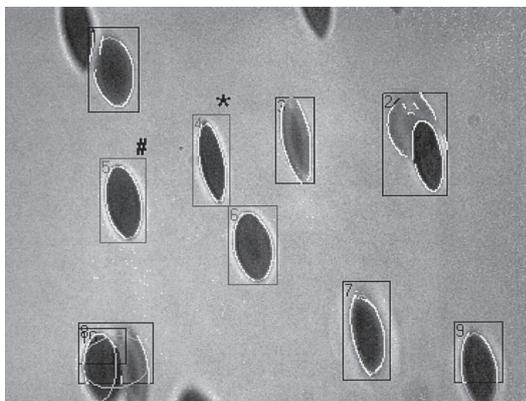


Рис.1. Изображения эритроцитов в сдвиговом потоке, полученные с помощью микроскопа [2, 3].

4. Результаты

Используя подход, развитый в наших работах [4–6], мы получили приближенное аналитическое выражение для распределения интенсивности света на экране наблюдения вблизи границы центрального максимума дифракционной картины. Оно имеет вид

$$f \equiv \frac{1}{4\beta^2} \frac{I}{I(0)} = (1 - r)^2 + \mu^2 \cos^2 2\varphi. \quad (1)$$

Здесь I – интенсивность рассеянного света; $I(0)$ – интенсивность в центральном максимуме дифракционной кар-

тины. Полярные координаты r и φ определяются формулами

$$\frac{x}{A} = r \cos \varphi, \quad \frac{y}{B} = r \sin \varphi, \quad (2)$$

где x и y – декартовы координаты точки на экране наблюдения; $A = q_1 z / (ka_0)$ и $B = q_1 z / (kb_0)$ – параметры, определяющие размеры дифракционной картины (т.е. расстояния от центра картины до первого дифракционного минимума); z – расстояние от исследуемого объема до экрана наблюдения; $k = 2\pi/\lambda$ – волновое число; λ – длина световой волны. Постоянные величины q_1 и β представляют собой параметры функции Бесселя и определяются формулами $q_1 = 3.82 = \text{const}$, $\beta = -0.4 = \text{const}$. При выводе формулы (1) предполагалось, что основания эллиптических дисков лежат в одной и той же плоскости, перпендикулярной оси лазерного пучка. Это соответствует экспериментальным наблюдениям.

Отметим, что начало системы координат выбрано в центре дифракционной картины. Ось x направлена по горизонтали, ось y – по вертикали, при этом одна из них параллельна направлению потока жидкости в ячейке Куэтта, а другая – перпендикулярна.

5. Характеристики дифракционной картины

Для интерпретации экспериментальных данных, полученных методом лазерной дифрактометрии эритроцитов, введем несколько новых понятий, таких как скелетная линия, полярная линия, полярная интенсивность, темные точки, светлые точки, характеристические точки. Дадим их определения.

Скелетная линия – это геометрическое место точек на экране наблюдения, в которых интенсивность света как функция расстояния от точки до центра дифракционной картины в первый раз достигает минимума. Такая линия может быть найдена на экране наблюдения в случае как однородного, так и неоднородного ансамбля частиц. Различие заключается в том, что для однородного ансамбля частиц скелетная линия является линией изоинтенсивности, а для неоднородного ансамбля интенсивность света в различных точках скелетной линии не будет одинаковой.

Линия изоинтенсивности – это линия на экране наблюдения, на которой интенсивность света постоянна.

Темные точки – это точки скелетной линии, в которых интенсивность света достигает минимума и становится равной нулю.

Полярные (светлые) точки – это точки скелетной линии, в которых интенсивность света достигает максимума.

Полярная интенсивность – это минимальная интенсивность света, при которой линия изоинтенсивности охватывает центр дифракционной картины.

Полярная линия – это линия изоинтенсивности, проходящая через полярные точки. В эксперименте полярная линия может быть найдена как линия минимальной постоянной интенсивности света, охватывающая центр дифракционной картины.

Характеристические точки – это точки, в которых радиусы-векторы темных точек пересекают полярную линию.

Используя формулы (1) и (2), нетрудно получить уравнения скелетной и полярной линий, а также определить координаты темных, светлых и характеристических точек. Уравнение скелетной линии имеет вид $r = 1$, или

$$\frac{x^2}{A^2} + \frac{y^2}{B^2} = 1.$$

Таким образом, скелетная линия представляет собой эллипс с полуосями A и B . Заметим, что на этой линии располагался бы первый минимум дифракционной картины в отсутствие разброса частиц по формам (когда $\mu = 0$). Отношение полуосей скелетной линии равно отношению размеров средних полуосей эллиптических дисков: $A/B = b_0/a_0$. Распределение нормированной интенсивности света на скелетной линии описывается выражением

$$f_s = \mu^2 \cos^2 2\varphi. \tag{3}$$

Уравнение линии изоинтенсивности имеет вид $r = 1 \pm \sqrt{f - \mu^2 \cos^2 2\varphi}$. Наименьшая интенсивность света, при которой линия изоинтенсивности является замкнутой и охватывает центр дифракционной картины, определяется формулой $f_p = \mu^2$, или

$$\frac{1}{4\beta^2} \frac{I_p}{I(0)} = \mu^2, \tag{4}$$

где I_p – полярная интенсивность. Такая же интенсивность света I_p будет и на полярной линии, которая фактически представляет собой границу центрального максимума дифракционной картины. Согласно формуле (4), эта граница будет тем светлее, чем больше неоднородность ансамбля частиц.

Уравнение полярной линии имеет вид

$$r(\varphi) = 1 - \mu |\sin 2\varphi|, \tag{5}$$

или, в декартовых координатах,

$$x(\varphi) = A(1 - \mu |\sin 2\varphi|) \cos \varphi, \tag{6}$$

$$y(\varphi) = B(1 - \mu |\sin 2\varphi|) \sin \varphi.$$

Темные точки имеют координаты $x_d = \pm A/\sqrt{2}$ и $y_d = \pm B/\sqrt{2}$. Эти выражения следуют из формул (2) при $r = 1$ и $\varphi = \pi/4 + n\pi/2$, где $n = 0, 1, 2, \dots$. Темные точки образуют на экране наблюдения вершины прямоугольника. Отношение его сторон равно отношению длин средних полуосей эллиптических дисков: $x_d/y_d = b_0/a_0$. Согласно нашей модели, интенсивность света в темных точках должна быть равна нулю.

Светлые (полярные) точки имеют координаты $x_p = 0$, $y_p = \pm B$ и $x_p = \pm A$, $y_p = 0$. Эти точки лежат на пересечениях полярной линии с осями координат и образуют вершины ромба. Координаты характеристических точек таковы: $x_c = (1 - \mu)(A/\sqrt{2})$, $y_c = (1 - \mu)(B/\sqrt{2})$.

Скелетная линия, темные и полярные точки показаны на рис.2. Там же показаны полярная линия и характеристические точки. Заметим, что форма полярной линии весьма близка к форме линий изоинтенсивности, полученных в работе [7], где методом лазерной дифрактометрии была исследована суспензия эритроцитов, содержащая нормальные клетки и клетки с пониженной деформируемостью. Этот факт можно рассматривать как экспериментальное подтверждение нашей модели.

Существование на границе центрального дифракционного максимума четырех темных точек, образующих вершины прямоугольника, можно рассматривать как при-

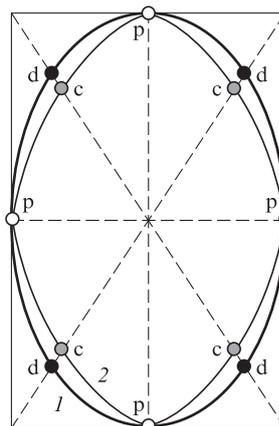


Рис.2. Скелетная (1) и полярная (2) линии, темные (d), полярные (p) и характеристические (c) точки. Полярная линия построена по формулам (3) для $\mu = 0.1$.

знаком неоднородности ансамбля по формам (степени вытянутости) клеток.

Введенные нами линии и точки можно найти на дифракционной картине.

6. Способы оценки дисперсии параметра формы частиц

Дисперсия параметра формы частиц может быть определена по характеристикам полярной линии, темных, светлых и характеристических точек. Приведем несколько способов оценки параметра μ по экспериментальным данным, полученным методом лазерной дифрактометрии.

Оценка по интенсивности света в полярных точках:

$$\mu^2 = 1.5I_p/I(0), \tag{7}$$

по координатам темных и характеристических точек:

$$\mu = 1 - l_c/l_d, \tag{8}$$

по координатам характеристических точек:

$$\mu = 1 - l_c \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{A^2 + B^2}}, \tag{9}$$

по направлению касательной к полярной линии в полярной точке:

$$\mu = \frac{A}{2B} \tan \chi, \tag{10}$$

где l_c – расстояние от центра дифракционной картины до характеристической точки; l_d – расстояние от центра дифракционной картины до темной точки; χ – угол между вертикалью и касательной к полярной линии в полярной точке.

Наконец, дисперсию параметра формы частиц можно определить непосредственно с помощью формул (6). В последнем случае следует рассматривать μ как подгоночный параметр теоретической модели. Величину μ следует искать, исходя из условия наилучшего совпадения форм экспериментальной линии изоинтенсивности и полярной линии.

Более точные оценки можно получить на основе численных расчетов дифракционных картин и более сложных моделей эритроцитов. Для этой цели можно использовать дискретно-дипольное [8] и лучеволновое [9, 10] приближения.

7. Экспериментальное исследование неоднородного ансамбля эритроцитов

Данные, представленные на рис.2, показывают, что при рассеянии лазерного пучка на однородном ансамбле деформируемых эритроцитов граница центрального дифракционного максимума должна иметь эллиптическую форму (скелетная линия на рис.2). Если же ансамбль эритроцитов содержит клетки различной формы, то граница центрального дифракционного максимума приобретает не эллиптическую, а, например, ромбовидную форму (полярная линия на рис.2). Для проверки выводов нашей модели мы провели эксперимент по рассеянию лазерного пучка на суспензии эритроцитов, содержащей клетки различной формы. В этом опыте использовались эритроциты крысы. Была приготовлена суспензия эритроцитов, содержащая в равных количествах клетки двух типов: нормальные (деформируемые) эритроциты и эритроциты с пониженной деформируемостью. Последние были получены путем обработки клеток раствором глютаральдегида. Фотография дифракционной картины приведена на рис.3,б. Для сравнения на рис.3,а показана фотография дифракционной картины, которая наблюдалась при рассеянии лазерного пучка на суспензии нормальных (деформируемых) эритроцитов крысы. Видно, что на рис.3,а граница центрального дифракционного максимума имеет эллиптическую форму, а на рис.3,б – ромбовидную. Таким образом, экспериментальные данные подтверждают основные выводы нашей теоретической модели.

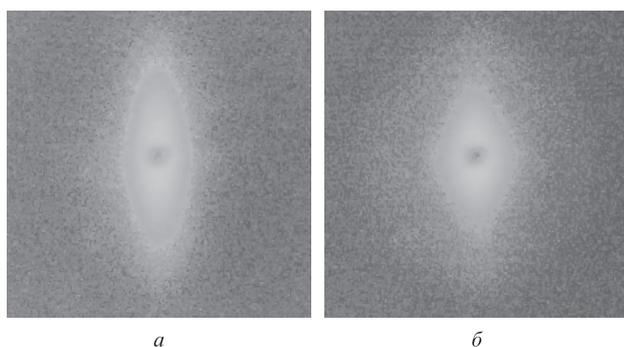


Рис.3. Фотографии дифракционных картин, полученных с помощью лабораторного эктацитометра при рассеянии лазерного пучка на суспензиях различных эритроцитов крысы: нормальных (деформируемых) эритроцитов (а) и смеси нормальных (деформируемых) и недеформируемых эритроцитов в соотношении 1:1 (б).

8. Заключение

В настоящей работе рассмотрено влияние различий в форме (степени вытянутости) частиц на вид дифракционной картины, возникающей при рассеянии лазерного

пучка на разбавленной суспензии эритроцитов в эктацитометре. Получено аналитическое выражение для распределения интенсивности света в дифракционной картине вблизи границы центрального дифракционного максимума. Установлена связь дисперсии параметра формы эритроцитов с характеристиками наблюдаемой дифракционной картины. Предложены алгоритмы обработки экспериментальных данных, полученных методом лазерной дифрактометрии, позволяющие оценивать дисперсию параметра формы эритроцитов в исследуемой суспензии.

Согласно нашим расчетам, дифракционная картина, возникающая при рассеянии лазерного пучка на неоднородном ансамбле эритроцитов в режиме однократного рассеяния, должна иметь характерные особенности. Признаком неоднородности ансамбля по формам частиц может быть наличие на границе центрального дифракционного максимума четырех темных точек, образующих вершины прямоугольника. Чем светлее граница центрального дифракционного максимума (т.е. чем выше интенсивность света на полярной линии), тем больше неоднородность ансамбля частиц. Другим признаком неоднородности ансамбля эритроцитов по формам частиц является то, что граница центрального максимума дифракционной картины приобретает ромбовидную форму. Эти и другие особенности позволяют сделать количественную оценку такой популяционной характеристики, как дисперсия параметра формы эритроцитов.

Обычно с помощью эктацитометра измеряют среднюю деформируемость эритроцитов в образце крови. Мы полагаем, что его можно использовать также для измерения дисперсии деформируемости эритроцитов. Для этого следует измерять распределения интенсивности света вдоль прямых линий, проходящих через центр дифракционной картины (назовем их секущими линиями). Наиболее важными секущими являются горизонтальная и вертикальная линии, а также линии, проходящие через темные и характеристические точки дифракционной картины.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 12-02-01329-а).

1. Mohandas N., Clark M.R., Jacobs M.S., Shohet S.B. *J. Clin. Invest.*, **66**, 563 (1980).
2. Dobbe J.G.G., Hardeman M.R., Streekstra G.J., Strackee J., Ince C., Grimbergen C.A. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **28** (3), 373 (2002).
3. Dobbe J.G.G., Streekstra G.J., Hardeman M.R., Ince C., Grimbergen C.A. *Cytometry (Clinical Cytometry)*, **50**, 313 (2002).
4. Nikitin S.Yu., Priezzhev A.V., Lugovtsov A.E., in *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses*. Ed. by V.V.Tuchin (Weinheim: Wiley-VCH, 2011, pp 133–154).
5. Никитин С.Ю., Луговцов А.Е., Приезжев А.В. *Квантовая электроника*, **40** (12), 1074 (2010).
6. Никитин С.Ю., Луговцов А.Е., Приезжев А.В., Устинов В.Д. *Квантовая электроника*, **41** (9), 843 (2011).
7. Streekstra G.J., Dobbe J.G.G., Hoekstra A.G. *Opt. Express*, **18** (13), 14173 (2010).
8. Yurkin M.A., Maltsev V.P., Hoekstra A.G. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*, **106**, 546 (2007).
9. Priezzhev A.V., Nikitin S.Yu., Lugovtsov A.E. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*, **110**, 1535 (2009).
10. Луговцов А.Е., Никитин С.Ю., Приезжев А.В. *Квантовая электроника*, **38** (6), 606 (2008).