

Измерение асимметрии распределения эритроцитов по деформируемости методом лазерной эктацитометрии

С.Ю.Никитин, А.В.Приезжев, А.Е.Луговцов, В.Д.Устинов

Предложен алгоритм измерения параметров распределения эритроцитов по деформируемости на основе данных лазерной дифрактометрии эритроцитов в сдвиговом потоке (эктацитометрии). Алгоритм испытан на специально подготовленных образцах крови крыс. В этих опытах нам удалось измерить среднюю деформируемость, дисперсию деформируемости и коэффициент асимметрии распределения эритроцитов по деформируемости с погрешностями 10%, 15% и 35% соответственно.

Ключевые слова: эритроциты, деформируемость, лазерная эктацитометрия.

1. Введение

Для диагностики и лечения многих заболеваний важно иметь возможность постоянно контролировать такую характеристику крови человека, как распределение эритроцитов по деформируемости [1]. В принципе, это можно делать методом фотографирования эритроцитов в сдвиговом потоке [2]. Однако этот метод, предложенный в 2002 г. и называемый также методом реоскопии, пока не нашел широкого практического применения, поэтому поиск альтернативных решений остается актуальным. Мы полагаем, что измерение характеристик распределения эритроцитов по деформируемости возможно на основе метода лазерной дифрактометрии эритроцитов в сдвиговом потоке (эктацитометрии).

Лазерная эктацитометрия представляет собой метод измерения деформируемости эритроцитов, основанный на регистрации и анализе дифракционных картин. Дифракционная картина возникает при рассеянии лазерного пучка на суспензии эритроцитов, деформированных в сдвиговом потоке силами вязкого трения. В ротационном эктацитометре такой поток создается с помощью ячейки Куэтта. Анализ дифракционной картины проводят, используя линии изоинтенсивности – линии на экране наблюдения, на которых интенсивность рассеянного света имеет некоторое постоянное значение. Обычно линию изоинтенсивности аппроксимируют эллипсом и измеряют отношение его полуосей, которое служит мерой деформации эритроцитов в сдвиговом потоке. Деформация как функция сдвигового напряжения характеризует деформируемость эритроцитов, которая и измеряется в подобных экспериментах. Исследования показывают, что деформируемость эритроцитов, сильно влияющая на микроцирку-

ляцию крови, с одной стороны, зависит от состояния организма человека, а с другой – во многом его определяет. Например, у пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения деформируемость эритроцитов заметно ниже, чем у здоровых людей такого же возраста [3]. В этом и в других случаях лазерная эктацитометрия помогает выявить реологическое нарушение, оценить его степень и подобрать адекватное лечение. Более подробно метод лазерной эктацитометрии эритроцитов описан в работах [3–7].

Лазерная эктацитометрия была предложена в 1975 г. [4] и с тех пор используется без существенных изменений, позволяя оценивать лишь среднюю деформируемость эритроцитов в исследуемом образце крови. Возникает вопрос: можно ли этим методом измерить распределение эритроцитов по деформируемости или хотя бы оценить основные параметры такого распределения? Чтобы ответить на этот вопрос, мы теоретически исследовали рассеяние лазерного пучка на ансамбле эллиптических дисков, моделирующих клетки крови [3, 6, 7]. В работе [7] показано, что метод лазерной эктацитометрии позволяет оценивать разброс эритроцитов по деформируемости. Для такой оценки необходимо знать форму линии изоинтенсивности и саму интенсивность рассеянного света на данной линии относительно интенсивности центрального дифракционного максимума. Эти результаты непосредственно применимы в случае симметричного распределения эритроцитов по деформируемости. Проверка алгоритма [7] на экспериментальных данных [8], полученных со специально подготовленными образцами крови, показала, что он позволяет получать достоверные данные. Следующим шагом является разработка алгоритма измерения третьего момента распределения эритроцитов по деформируемости, т.е. коэффициента асимметрии этого распределения. В настоящей статье мы рассматриваем вопрос о том, как измерить указанный параметр на основе данных лазерной эктацитометрии эритроцитов.

2. Модель ансамбля эритроцитов

Как и в работах [3, 6, 7], будем представлять эритроциты прозрачными эллиптическими дисками. Основанием для такой модели являются изображения эритроцитов в сдвиговом потоке, полученные с помощью микроскопа в

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

В.Д.Устинов. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, факультет вычислительной математики и кибернетики, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 8 июля 2014 г.

работе [2]. Кроме того, в области малых углов рассеяния фазовые функции плоского и двояковогнутого дисков мало отличаются друг от друга [7]. Будем считать, что диски имеют приблизительно одинаковые площади оснований и объемы, но различный эксцентриситет (удлинение). Форма эритроцита рассматривается как случайная величина и характеризуется такими понятиями, как среднее значение, дисперсия и коэффициент асимметрии распределения по формам. Эта модель позволяет описать популяцию эритроцитов с учетом того обстоятельства, что разные эритроциты имеют различную способность к деформации. Более подробно модель описана в наших работах [6, 7].

Полуоси оснований эллиптических дисков, моделирующих красные клетки крови, считаем случайными величинами и описываем формулами

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

Здесь a_0, b_0 – средние размеры полуосей, а ε – случайный параметр формы частицы. Мы предполагаем, что неоднородность ансамбля по формам частиц является относительно слабой, т. е. $|\varepsilon| \ll 1$. Считаем, что среднее значение параметра $\langle \varepsilon \rangle = 0$. Характеристиками распределения эритроцитов по формам являются статистические моменты величины ε , а именно дисперсия и коэффициент асимметрии распределения частиц по формам

$$\mu \equiv \langle \varepsilon^2 \rangle \text{ и } \nu \equiv \langle \varepsilon^3 \rangle \quad (2)$$

соответственно. Условие $|\varepsilon| \ll 1$ приводит к ограничению на эти параметры

$$\mu, \nu \ll 1. \quad (3)$$

Далее мы обсудим вопрос о том, как определить параметры $s = a_0/b_0, \mu$ и ν , используя экспериментальные данные лазерной эктацитометрии. Для этого мы обобщим теорию, развитую в наших работах [6, 7], на случай неоднородного ансамбля с асимметричным распределением по формам частиц.

3. Форма линии изоинтенсивности

Для расчета формы линии изоинтенсивности мы положили, что клетки крови в сдвиговом потоке эктацитометра представляют собой неоднородный ансамбль прозрачных эллиптических дисков. Расчеты показали, что в интересующей нас области экрана наблюдения (граница центрального дифракционного максимума или первый минимум дифракционной картины) форма линии изоинтенсивности приближенно описывается выражением

$$r = 1 - \sqrt{f} + \mu \frac{\cos^2 2\varphi}{2\sqrt{f}} + \nu \cos 2\varphi \left(1 - \frac{2 - 3 \sin^2 2\varphi}{2\sqrt{f}} \right), \quad (4)$$

где

$$f = \frac{1}{4\beta^2} \frac{I}{I(0)} (1 - 2\mu) \quad (5)$$

– нормированная интенсивность рассеянного света; I – интенсивность рассеянного света на данной линии изоинтенсивности; $I(0)$ – интенсивность центрального дифрак-

ционного максимума; $\beta = -0.4$ – параметр функции Бесселя. Величины r, φ представляют собой обобщенные полярные координаты точки на экране наблюдения и определяются формулами

$$x = \text{Arcos}\varphi, y = B \text{rsin}\varphi. \quad (6)$$

Здесь x, y – декартовы координаты точки на экране наблюдения в системе координат, начало которой расположено в центре дифракционной картины (точка падения лазерного пучка). Ось x направлена по горизонтали (параллельно сдвиговому потоку в эктацитометре), ось y – по вертикали (перпендикулярна ему). Параметры

$$A = m_1 z / (ka_0) \text{ и } B = m_1 z / (kb_0) \quad (7)$$

определяют размеры дифракционной картины (т. е. расстояния от центра картины до первого дифракционного минимума по горизонтали и по вертикали соответственно); z – расстояние от измерительного объема до экрана наблюдения; $k = 2\pi/\lambda$ – волновое число; λ – длина волны; $m_1 = 3.82$ – корень функции Бесселя J_1 . Для дальнейшего удобно представить выражение (4) в виде

$$r = r_0 + \mu f_2(\varphi) + \nu f_3(\varphi), \quad (8)$$

где

$$r_0 = 1 - \sqrt{f_0}; f_2(\varphi) = \sqrt{f_0} + \frac{\cos^2 2\varphi}{2\sqrt{f_0}}; \quad (9)$$

$$f_3(\varphi) = \left(1 - \frac{2 - 3 \sin^2 2\varphi}{2\sqrt{f_0}} \right) \cos 2\varphi;$$

$$f_0 = \frac{1}{4\beta^2} \frac{I}{I(0)}. \quad (10)$$

Смысл введения параметра f_0 заключается в том, что он является характеристикой только дифракционной картины как таковой. В то же время параметр f (5) зависит как от вида дифракционной картины, так и от свойств исследуемого ансамбля эритроцитов. Между параметрами f и f_0 существует очевидное соотношение: $f = f_0(1 - 2\mu)$, откуда в силу малости μ следует $\sqrt{f} \approx \sqrt{f_0} - \mu\sqrt{f_0}$. Это равенство использовано при выводе формул (8) и (9). Таким образом, формулы (8)–(10) приближенно описывают форму линии изоинтенсивности в полярных координатах с учетом асимметрии распределения эритроцитов по формам.

4. Полярные точки линии изоинтенсивности

Назовем полярными точки линии изоинтенсивности, в которых эта линия пересекается с декартовыми осями координат x и y . Пусть x_p и y_p – координаты полярных точек, лежащих на горизонтальной и вертикальной осях координат соответственно. Обе эти величины могут быть измерены экспериментально. Вычислим отношение $D = y_p/x_p$. Используя формулы (6), (8), (9) и принимая во внимание малость ν , получаем

$$D = \frac{B}{A} \left(1 + 2 \frac{\nu}{\sqrt{f_0}} \right). \quad (11)$$

Из формулы (11) следует, что из-за асимметрии распределения частиц по формам происходит вытягивание линии изоинтенсивности или ее сплющивание в зависимости от знака v . Она показывает также, что в случае асимметричного по формам ансамбля частиц отношение полуосей линии изоинтенсивности не равно среднему отношению полуосей частиц, как это обычно считается в лазерной экситометрии эритроцитов.

Окончательный результат представим в виде

$$D/s = 1 + vq_0, \quad (12)$$

где $s = a_0/b_0 = B/A$ и

$$q_0 = 2/\sqrt{f_0}. \quad (13)$$

5. Кривизна линии изоинтенсивности в полярных точках

Другими характеристиками линии изоинтенсивности, которые могут быть измерены экспериментально, являются радиусы кривизны этой линии в полярных точках $R(x_p)$ и $R(y_p)$. Для удобства введем безразмерные параметры, характеризующие кривизну линии изоинтенсивности в полярных точках:

$$C_1 = \sqrt{x_p/R(x_p)}, \quad C_2 = \sqrt{y_p/R(y_p)}. \quad (14)$$

Радиусы кривизны можно вычислить по формулам

$$\frac{1}{R(x_p)} = \left| \frac{d^2 x_p}{dy^2} \right|, \quad \frac{1}{R(y_p)} = \left| \frac{d^2 y_p}{dx^2} \right|, \quad (15)$$

где $d^2 x_p/dy^2$ и $d^2 y_p/dx^2$ – производные, взятые в полярных точках x_p и y_p . Отсюда следует, что

$$C_1 = \sqrt{x_p \left| \frac{d^2 x_p}{dy^2} \right|}, \quad C_2 = \sqrt{y_p \left| \frac{d^2 y_p}{dx^2} \right|}.$$

Используя формулы (6), (8) и (9), получаем

$$C_1 s = 1 + \mu q_1 - v q_2, \quad (16)$$

$$C_2/s = 1 + \mu q_1 + v q_2. \quad (17)$$

Параметры q_1 и q_2 описываются выражениями

$$q_1 = \frac{q_0}{1 - \sqrt{f_0}}, \quad q_2 = (4 - \sqrt{f_0}) q_1. \quad (18)$$

Уравнения (12), (16) и (17) связывают между собой популяционные характеристики ансамбля эритроцитов (среднюю деформируемость, дисперсию деформируемости и асимметрию распределения эритроцитов по деформируемости в исследуемом образце крови) и параметры дифракционной картины, которые могут быть измерены экспериментально (координаты полярных точек линии изоинтенсивности, радиусы кривизны линии изоинтенсивности в полярных точках и величину $II(0)$). На основании этих уравнений мы строим алгоритм измерения статистических характеристик распределения эритроцитов по деформируемости.

6. Алгоритм кривизны линии изоинтенсивности

Предлагаемый алгоритм, который мы назовем алгоритмом кривизны линии изоинтенсивности, состоит в следующем. В эксперименте по лазерной дифрактометрии необходимо измерить шесть величин: $I(0)$, I , x_p , y_p , $R(x_p)$ и $R(y_p)$. Используя полученные экспериментальные данные, нужно вычислить четыре безразмерных параметра: f_0 , D , C_1 и C_2 , которые связаны с величинами s , μ и v , введенными выше и подлежащими определению, с помощью соотношений (12), (16), (17) и (13), (18). Решение уравнений (12), (16) и (17) имеет следующий вид:

$$s = \frac{Q}{1 + \sqrt{1 - 2QqC_1}}, \quad \mu = \frac{1}{2q_1}(C_2/s + C_1s) - \frac{1}{q_1}, \quad (19)$$

$$v = \frac{1}{2q_2}(C_2/s - C_1s),$$

где $Q = 2(D - qC_2)$ и $q = q_0/2q_2$.

Формулы (19) выражают алгоритм измерения: они дают явные выражения искомым характеристикам ансамбля эритроцитов через параметры дифракционной картины, доступные для измерения.

7. Экспериментальные исследования. Проверка работы алгоритма

Для проверки работоспособности алгоритма кривизны линии мы провели эксперименты с эритроцитами крыс на приборе ЛАДЭ 6 (Реомедлаб, Россия). Дифракционные картины были получены для бимодальных ансамблей эритроцитов, т.е. ансамблей, состоящих из частиц всего лишь двух типов (форм). Экспериментально такие ансамбли создавались путем обработки части клеток раствором глютаральдегида, уменьшающим их деформируемость.

Полученные данные представлены на рис.1, на котором показаны линии изоинтенсивности для четырех разных образцов крови с различной концентрацией клеток, обработанных раствором глютаральдегида (0, 20%, 50% и 100%). Все линии относятся к одной и той же сдвиговой скорости и к одинаковому уровню интенсивности рассеянного света: $II(0) = 0.06$.

Для анализа мы выбрали линию, показанную на рис.1,б. На рис.2 представлены дифракционная картина, линия изоинтенсивности и процедура обработки этой линии.

В нашей модели бимодальный ансамбль характеризуется тремя величинами. Две из них, $s_1 = a_1/b_1$ и $s_2 = a_2/b_2$, описывают формы клеток обоих компонент ансамбля, а p – долю частиц первого типа. Введенные ранее параметры s , μ и v в частном случае бимодального ансамбля клеток можно определить двумя способами. При вычислении первым способом считаются известными формы частиц и соотношение их концентраций. При вычислении вторым способом считается известным распределение интенсивности света в дифракционной картине, возникающей при рассеянии лазерного пучка на рассматриваемом ансамбле частиц. В частности, мы полагаем известной форму линии изоинтенсивности, лежащей вблизи границы центрального дифракционного максимума и соответствующей некоторой определенной интенсивности рассеянного света.

В рамках нашей модели эллиптических дисков, которая описывается формулами (1), бимодальный ансамбль описывается уравнениями

$$\begin{aligned} a_1 &= a_0(1 + \varepsilon_1), \quad b_1 = b_0(1 - \varepsilon_1), \\ a_2 &= a_0(1 + \varepsilon_2), \quad b_2 = b_0(1 - \varepsilon_2), \\ p\varepsilon_1 + (1 - p)\varepsilon_2 &= 0. \end{aligned} \quad (20)$$

Отметим, что последнее уравнение вытекает из условия $\langle \varepsilon \rangle = 0$ в случае бимодального ансамбля. Решая уравнение (20), получаем

$$s = M + \sqrt{M^2 + s_1 s_2}, \quad \varepsilon_1 = \frac{s_1 - s}{s_1 + s}, \quad \varepsilon_2 = \frac{s_2 - s}{s_2 + s}, \quad (21)$$

$$\langle \varepsilon^2 \rangle = p\varepsilon_1^2 + (1 - p)\varepsilon_2^2, \quad \langle \varepsilon^3 \rangle = p\varepsilon_1^3 + (1 - p)\varepsilon_2^3, \quad (22)$$

где

$$M = (s_1 - s_2)(p - 1/2). \quad (23)$$

В частности, для условий наших экспериментов ($s_1 = 1$, $s_2 = 2.54$, $p = 0.2$) по формулам (21)–(23) получаем

$$s = 2.1, \quad \mu = 0.032, \quad \nu = -0.0087. \quad (24)$$

Теперь оценим те же самые величины с помощью алгоритма кривизны линии изоинтенсивности. Используя линию изоинтенсивности, показанную на рис.2, мы вычислили параметры

$$D = y_p/x_p = 1.82, \quad (25)$$

$$C_1 = \sqrt{x_p/R(x_p)} = 0.82, \quad C_2 = \sqrt{y_p/R(y_p)} = 2.18.$$

Поскольку уровень интенсивности рассеянного света на данной линии нами определен как $I/I(0) = 0.06$, по формуле (10) ($\beta = -0.4$) получаем $f_0 = 0.094$. Используя значения параметров D , C_1 , C_2 и f_0 , по формулам нашей модели (19) получаем

$$s = 1.9, \quad \mu = 0.037 \text{ и } \nu = -0.0056. \quad (26)$$

Из сравнения результатов (24) и (26) следует, что погрешности определения параметров s , μ и ν с помощью алгоритма кривизны линии изоинтенсивности составляют 10%, 15% и 35% соответственно.

8. Обсуждение результатов

Как видно из рис.1, при увеличении доли недеформируемых эритроцитов p в образце крови линия изоинтенсивности последовательно меняет свою форму от эллипса к ромбу и затем к окружности. Именно такой характер изменения формы линии изоинтенсивности предсказывает модель неоднородного ансамбля эллиптических дисков, изложенная выше. Таким образом, наша теоретическая модель находит свое экспериментальное подтверждение.

Согласно формуле (11), асимметрия распределения эритроцитов по деформируемости приводит к тому, что отношение полуосей линии изоинтенсивности $D = y_p/x_p$ не равно среднему отношению полуосей частиц $s = a_0/b_0$, как это обычно считается в лазерной эктацитометрии эритроцитов. Как показывает наш анализ, соотношение между этими параметрами зависит от величины и знака коэффициента асимметрии распределения эритроцитов по деформируемости. В частности, в примере, рассмотренном в п.7, имеем $D/s = 0.94$. Это значит, что в рассматриваемых условиях параметры s и D отличаются друг от друга примерно на 6%. Таким образом, наша модель дает не только способ измерения новых характеристик распределения эритроцитов по деформируемости, но и уточняет оценку основного параметра, измеряемого методом лазерной эктацитометрии, а именно средней деформируемости эритроцитов в исследуемом образце крови.

Касаясь погрешности измерения параметров s , μ и ν с помощью алгоритма кривизны линии изоинтенсивности, отметим следующее. Ошибку в определении указанных параметров могут давать используемые нами приближения, а также неточность измерения интенсивности рассеянного света на выбранной линии изоинтенсивности. Кроме того, свой вклад могут вносить факторы, которые не учитываются в нашей модели. Это разброс эритроцитов по размерам и ориентациям в пространстве, конечный размер измерительного объема, конечное время усреднения дифракционных картин, флуктуации различных параметров и т. п. Тем не менее видно, что в целом новый алгоритм обработки данных работоспособен. Мы надеемся, что при

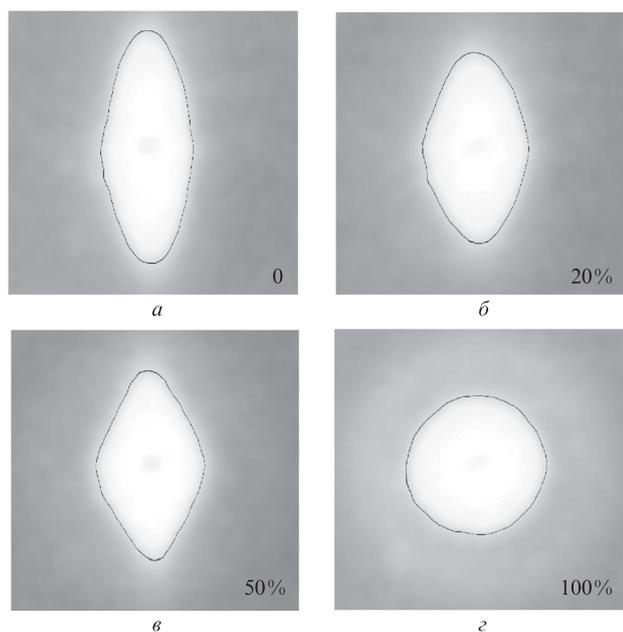


Рис.1. Линии изоинтенсивности, полученные для бимодальных ансамблей эритроцитов крысы при разных концентрациях (0–100%) клеток, обработанных раствором глутаральдегида.

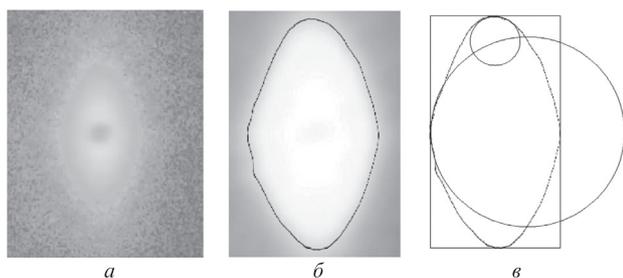


Рис.2. Дифракционная картина (а), линия изоинтенсивности (б) и процедура обработки линии (в).

его дальнейшего развития точность измерения параметров деформируемости эритроцитов будет повышена.

9. Заключение

Предложен новый алгоритм измерения популяционных характеристик эритроцитов на основе анализа данных лазерной дифрактометрии эритроцитов в сдвиговом потоке (эктацитометрии). Это такие характеристики, как средняя деформируемость эритроцитов, дисперсия деформируемости и коэффициент асимметрии распределения эритроцитов по деформируемости.

Для измерения указанных параметров с помощью алгоритма кривизны линии изоинтенсивности требуется измерить интенсивность рассеянного света относительно интенсивности центрального дифракционного максимума на некоторой линии изоинтенсивности, лежащей вблизи границы центрального максимума дифракционной картины. Кроме того, нужно измерить координаты полярных точек данной линии изоинтенсивности (они лежат на пересечениях линии изоинтенсивности с горизонтальной и вертикальной осями координат), а также радиусы кривизны линии изоинтенсивности в полярных точках.

Для проверки работы алгоритма мы провели опыты со специально подготовленными образцами крови крыс. Нам удалось измерить среднюю деформируемость, дисперсию деформируемости и коэффициент асимметрии распределения эритроцитов по деформируемости с погрешностями 10%, 15% и 35% соответственно.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-02-01372).

1. Musielak M. *Clin. Hemorheol. Microcirculation*, **42**, 47 (2009).
2. Dobbe J.G.G., Hardeman M.R., Streekstra G.J., Starckee J., Ince C., Grimbergen C.A. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **28**, 373 (2002).
3. 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, p. 133).
4. Bessis M., Mohandas N. *Blood Cells*, **1**, 307 (1975).
5. Фирсов Н.Н., Джанашия П.Х. *Введение в экспериментальную и клиническую гемореологию* (М.: РГМУ, 2008).
6. Никитин С.Ю., Кормачева М.А., Приезжев А.В., Луговцов А.Е. *Квантовая электроника*, **43** (1), 90 (2013).
7. Nikitin S.Yu., Priezzhev A.V., Lugovtsov A.E. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*, **121**, 1 (2013).
8. Streekstra G.J., Dobbe J.G.G., Hoekstra A.G. *Opt. Express*, **18**, 14173 (2010).