

Измерение геометрических параметров эритроцитов с помощью голографической интерферометрии

Аннотация

Рассматриваются вопросы, связанные с изменениями формы и размеров эритроцитов при атеросклерозе, возможностью применения метода физической оптики, в частности голографии, для исследования клеток крови (эритроцитов). Показана возможность применения методики, позволяющей по полученным интерферограммам клеток крови (эритроцитов) определять размеры их поперечного сечения, а также анализировать форму и давать количественную оценку размеров эритроцитов. Экспериментально получены данные для сравнительной характеристики эритроцитов в норме и патологии.

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в экономически развитых странах смертность от сердечно-сосудистых заболеваний составляет 46 % всех случаев смерти. Среди сердечно-сосудистых заболеваний атеросклероз занимает ведущее место. Наиболее часто он поражает венозные артерии сердца, что ведет к развитию ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда. Одним из симптомов атеросклероза является изменение геометрических параметров элементов крови – эритроцитов. Эритроциты имеют вид круглых образований диаметром около 6...7 мкм, по форме напоминающих двояковогнутые диски [1]-[3]. Основное их содержание составляет гемоглобин. Эритроциты обладают антигенными свойствами, участвуют в гемостазе, но основная их роль – снабжение тканей кислородом и участие в транспорте углекислоты. При атеросклерозе эритроциты реагируют на биохимические и физико-химические сдвиги изменениями форм поверхности.

Все существующие методы определения размеров [2]-[4], концентрации и формы эритроцитов можно разбить на две большие группы: визуальные и автоматические. Визуальные, в свою очередь, делятся на оптическую, электронную и лазерную растровую микроскопию, а автоматические методы – на измерение по индикатрисе рассеяния и измерения по изменению электрической проницаемости. Но все эти методы не лишены недостатков. Общие недостатки данных методов заключаются в том, что при их применении не сохраняются прижизненные состояния эритроцитов и не осуществляется их консервация. Устранить эти недостатки возможно, применив метод физической оптики (метод голографии) [4]-[6]. Этот метод обладает рядом существенных достоинств: во-первых, он бесконтактный; во-вторых, для него характерны высокая точность и информативность измерений. До настоящего времени работы по применению голографии для исследования элементов крови не проводились, а были связаны с изучением микрообъектов других типов. Поэтому перенести разработанные ранее рекомендации «автоматически» на исследуемые микрочастицы невозможно. Таким образом, целью рассматриваемой работы является исследование возможности применения метода голографической интерферометрии для измерения геометрических параметров эритроцитов.

Для достижения этой цели необходимо решить следующие задачи:

- выбрать схему записи голограмм и восстановления зарегистрированных волновых фронтов;
- разработать методику проведения эксперимента;
- провести экспериментальные исследования по определению размеров эритроцитов.

Получение экспериментальных интерферограмм клеток крови (эритроцитов)

На данном этапе исследований решалась задача получения экспериментальных интерферограмм клеток крови (эритроци-

тов) с целью разработки количественной оценки размеров и формы эритроцитов. Для ее решения были произведены оптимизация и юстировка оптической схемы экспериментальной установки. Работа на ней включает в себя два этапа. На первом этапе выполняется регистрация голограммы, на втором – наблюдение и регистрация голографических интерферограмм эритроцитов. Рассмотрим последовательно оба этих этапа.

Первый этап. Схема регистрации голографических интерферограмм эритроцитов показана на рис. 1. Излучение от He-Ne-лазера 1 попадает в телескопическую систему, состоящую из двух линз 2 и 4. В фокальной плоскости системы устанавливается диафрагма 3, выделяющая одномодовую составляющую пучка излучения, который поступает на светоделитель 5, разделяющий пучок на объектную и опорную составляющие. Объектный пучок отражается от зеркала 6, фокусируется конденсором 7 на поверхности оптически однородного предмета (предметное стекло 8) и через объектив 9 попадает на голограмму 10. Опорный пучок отражается от зеркала 12, через оптическую систему 13 и 14 попадает на голограмму 10.

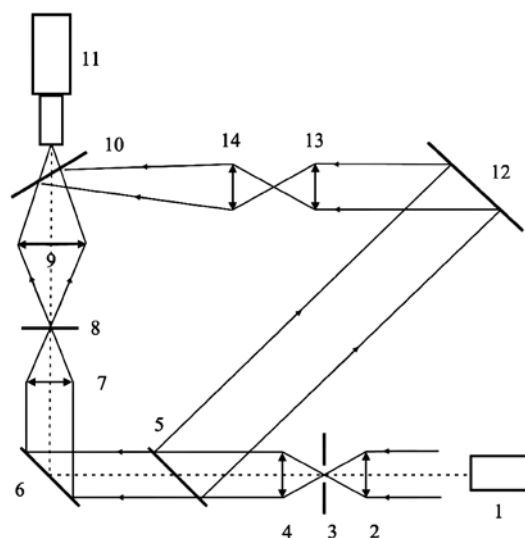


Рис. 1. Оптическая схема экспериментальной установки:
1 – лазер; 2...4, 13...14 – телескопические системы;
3 – диафрагма; 5 – светоделитель; 6, 12 – зеркала;
7, 9 – объективы; 8 – предметное стекло; 10 – голограмма;
11 – микроскоп

В ходе эксперимента, кроме пластинок ПФГ-01 (пластинки фотографические для голографии), голограммы также регистрировались на фотопластинках ПФГ-03, чувствительных к красной области спектра (длина волны – 0,6328 мкм). В процессе работы были подобраны режимы экспонирования и фотохимической обработки голограмм. Время экспонирования составило 2 с, установка голограммы производилась эмульсией от объекта.

Перед записью производилась обработка фотопластинок 10%-ным раствором триэаноламина в течение 5 мин, а затем их сушка. Время проявления голограммы составило 7 мин: 20 мл проявителя Петрова плюс 400 мл H₂O.

После фотохимической обработки и установки на прежнее место фотопластинку наклоняли на малый угол, измеряемый угловыми минутами, и освещали опорным пучком. Поскольку осуществлялась регистрация фазового объекта (предметного стекла) и проявление пластинки производилось не на месте экспонирования, при установке голограммы и восстановлении ее через окуляр микроскопа наблюдалась система прямых интерференционных полос. Период этих полос определяется углом поворота фотопластинки относительно того положения, в котором производилась запись голограммы. Интерферограммы такого типа называются интерферограммами в полосах конечной ширины [7]-[10].

Второй этап. На этапе наблюдения исследуемые микрообъекты (эритроциты) наносили на предметное стекло. После этого предметное стекло с эритроцитами помещали в область наблюдения. На этом этапе излучение проходит через объект (эритроцит) и его волновой фронт деформируется в соответствии с фазовой структурой (толщиной) объекта.

Далее излучение проходит через объектив и голограмму. За голограммой формируется интерференционная картина в результате суперпозиции волны, рассеянной объектом, и волны, восстановленной голограммой с помощью опорного пучка излучения. Интерференционная картина может визуально наблюдаться через окуляр микроскопа и представляет собой чередующиеся прямые темные и светлые полосы [8]-[11], которые искривляются при внесении в поле объектива эритроцита. По отклонению интерференционной полосы можно судить о толщине эритроцита в данной точке. Рассчитав значение толщины эритроцита вдоль его диаметра, можно построить поперечное сечение клетки. Исходя из осевой симметрии эритроцитов, зная их сечение, можно рассчитать площадь поверхности и объем эритроцитов.

Фоторегистрация экспериментальных интерферограмм эритроцитов осуществлялась на фотопленку чувствительностью 64 ед. Производился подбор диафрагм и выдержек при установке окуляра микроскопа с увеличением 25^x. Время экспонирования составляло 1/125, 1/250 при диафрагме 1:4.

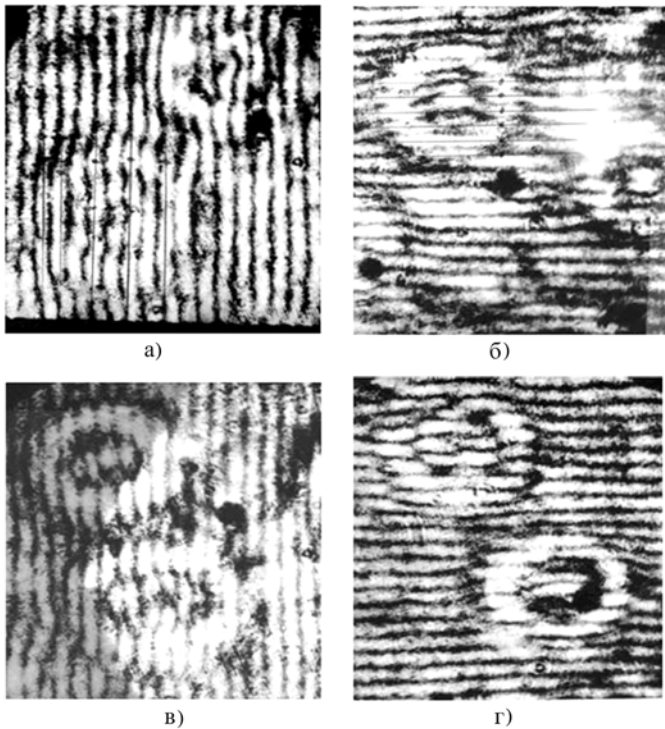


Рис. 2. Интерферограммы эритроцитов

На рис. 2 представлен результат интерференции этих световых пучков – интерференционная картина, структура которой дает возможность с точностью до 0,06 мкм определять толщину исследуемого объекта (эритроцита).

Расчет поперечных размеров сечения эритроцитов по интерферограммам

На рис. 3 представлено пояснение к расчету поперечных размеров сечения эритроцитов по интерферограммам.

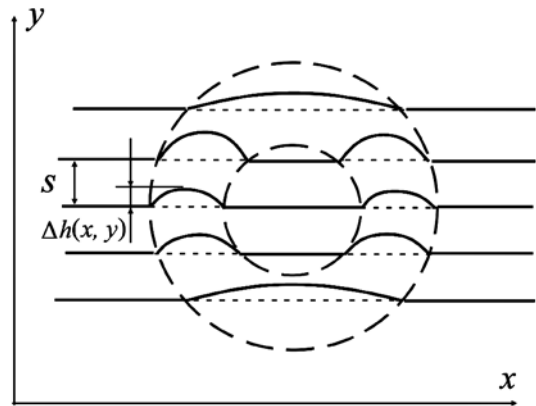


Рис. 3. К расчету поперечных размеров сечения эритроцитов по интерферограммам

Отклонение интерференционной полосы от прямой линии при внесении в поле объектива эритроцита определяется уравнением [12]

$$2\pi \frac{\Delta h(x, y)}{S} = \frac{2\pi}{\lambda} T(x, y) \Delta n(x, y),$$

где $\Delta h(x, y)$ – отклонение интерференционной полосы от своего невозмущенного положения; S – шаг интерференционных полос; $T(x, y)$ – толщина эритроцита в анализируемой точке; $\Delta n(x, y)$ – разность показателей преломления внутри и вне клетки; λ – длина волны излучения He-Ne-лазера (0,6328 мкм).

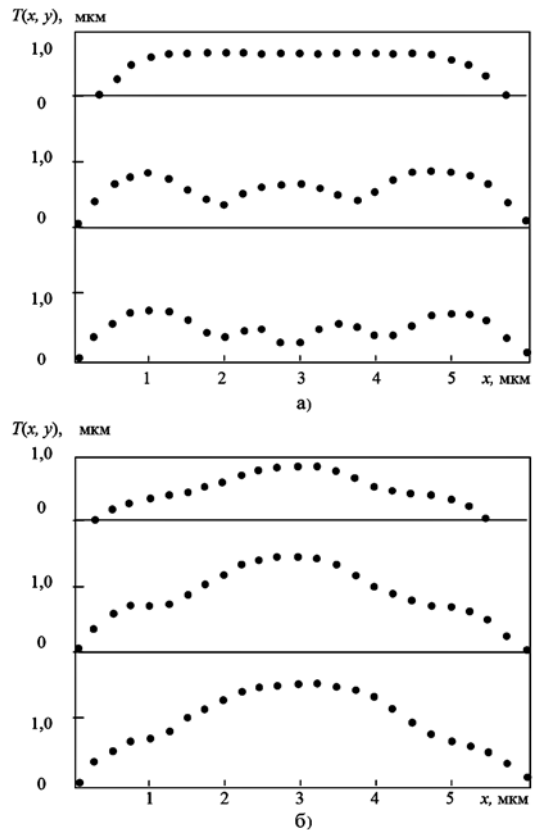


Рис. 4. Сечение эритроцитов (расшифровка интерферограмм); а) норма; б) патология

Из приведенного уравнения следует

$$T(x, y) = \frac{\lambda \Delta h(x, y)}{S \Delta n(x, y)}.$$

Таким образом, измеряя шаг полос S и отклонения полос $\Delta h(x, y)$, зная разность показателей преломления внутри и вне клетки $\Delta n(x, y)$, можно получить информацию о величине поперечного сечения эритроцитов $T(x, y)$. Для клетки $n = 1,4$. Следовательно, $\Delta n(x, y) = 0,4$.

На рис. 4 представлены результаты расчета поперечного сечения эритроцитов по полученным интерферограммам. В процессе эксперимента также предпринималась попытка получить интерферограммы эритроцитов, находящихся в растворе в кювете. Однако, как следует из рис. 5, вследствие сильного рассеяния на интерферограмме зарегистрирован лишь когерентный шум [4], [5], [10], [11].

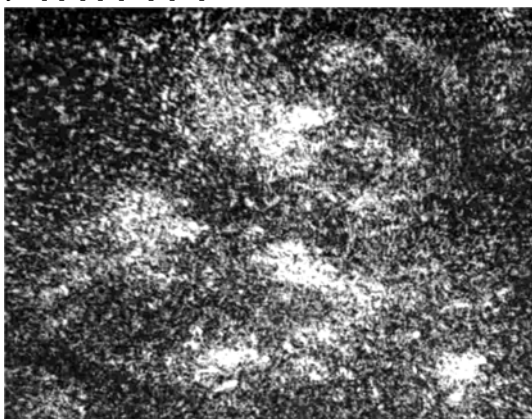


Рис. 5. Интерферограмма кюветы с раствором эритроцитов

Заключение

В статье представлена экспериментальная установка получения интерферограмм клеток крови (эритроцитов). Подробно рассмотрена работа схемы установки для фоторегистрации экспериментальных интерферограмм эритроцитов, а также проведена методика получения интерферограмм клеток крови, их анализа и расчета размеров поперечного сечения эритроцитов. По полученным на установке интерферограммам эритроцитов рассчитаны размеры их поперечного сечения. Таким образом, показана возможность исследования формы клеток в норме и патологии на новом качественном уровне.

Оценка предлагаемой методики по ряду технико-экономических показателей показала перспективность ее применения [13]-[15]. *Технологические показатели:* по показателю «точность измерений» результаты не уступают методам [1]-[4], по показателю «информативность измерений» результаты сопоставимы с показателями, получаемыми при использовании приборов [6]-[11]. *Экономические показатели:* цена базовой установки не меняется, затраты на эксплуатацию остаются прежними, ценами расходных материалов на этапе возможности применения метода можно пренебречь из-за их незначительности.

Список литературы:

1. Серженко В.И., Новикова И.И., Власов В.Б., Ефимов В.С., Семенова Т.И. Агрегатное состояние крови и система микроциркуляции при экспериментальном атеросклерозе, его спонтанной регрессии и гемосорбции // Бюл. экспер. биол. и мед. 1986. Т. 101. № 5. С. 542-554.
2. Крымский Л.Д., Нестайко Г.В., Рыбалов А.Г. Растровая электронная микроскопия сосудов и крови. – М.: Медицина, 1976. С. 166.
3. Лопухин Ю.М., Арчанов А.И., Владимиров Ю.А., Коган Э.М. Холестериноз. – М.: Медицина, 1983. С. 352.
4. Франсон М. Оптика спеклов / Пер. с франц. под ред. проф. Ю.И. Островского. – М.: Мир, 1980. С. 171.

5. Майоров Е.Е., Прокопенко В.Т. Интерферометрия диффузно отражающих объектов. – СПб.: Изд-во НИУ ИТМО, 2014. С. 193.
6. Майоров Е.Е., Прокопенко В.Т. Когерентно-ограниченная интерферометрическая система в исследовании биологических объектов // Медицинская техника. 2012. № 3 (237). С. 24-26.
7. Майоров Е.Е., Прокопенко В.Т., Шерстобитова А.С. Исследование оптико-электронной системы расшифровки голографических интерферограмм // Оптический журнал. 2013. Т. 80. № 3. С. 47-51.
8. Майоров Е.Е., Прокопенко В.Т., Ушверидзе Л.А. Система когерентной обработки спеклограмм для исследования поверхностей зубной ткани // Медицинская техника. 2013. № 6 (282). С. 25-27.
9. Прокопенко В.Т., Майоров Е.Е., Машек А.Ч., Удахина С.В., Цыганкова Г.А., Хайдаров А.Г., Черняк Т.А. Оптико-электронный прибор для контроля геометрических параметров диффузно отражающих объектов // Известия высших учебных заведений // Приборостроение. 2016. Т. 59. № 5. С. 388-394.
10. Прокопенко В.Т., Майоров Е.Е., Машек А.Ч., Цыганкова Г.А., Абрамян В.К., Зайцев Ю.Е., Хайдаров А.Г., Хайдаров Г.Г. Применение поперечно-сдвиговой интерферометрии в голографии для контроля геометрических параметров диффузно отражающих поверхностей // Известия высших учебных заведений. Приборостроение. 2017. Т. 60. № 4. С. 331-339.
11. Майоров Е.Е., Дагаев А.В., Пономарев С.В., Черняк Т.А. Исследование интерферометра сдвига в фазоизмерительных приборах и системах расшифровки голографических интерферограмм // Научное приборостроение. 2017. Т. 27. № 2. С. 32-40.
12. Вест Ч. Голографическая интерферометрия. – М.: Мир, 1982. С. 504.
13. Арсеньева И.В., Большаков О.П., Котов И.Р., Майорова О.В. Использование методов голографической интерферометрии в медико-биологических исследованиях / Фундаментальные исследования и инноваций в технических университетах. Материалы XIII Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы. – Изд-во СПбГТУ, 2009. Т. 1. С. 105.
14. Большаков О.П., Котов И.Р., Майорова О.В. Когерентно-оптические методы отображения информации в прикладной анатомии и экспериментальной хирургии / Инновационные технологии в морфологии. Материалы научной конференции. – СПб.: ВМА, 2007. Вып. 2. С. 44-48.
15. Зленко А.Н., Веремченко А.П., Метлушко Е.А. Математическая модель экспертной системы для оптического приборостроения / Сборник тезисов докладов конгресса молодых ученых. – СПб.: Университет ИТМО, 2014. Вып. 2. С. 22-24.

Евгений Евгеньевич Майоров,
канд. техн. наук, зав. кафедрой,

Мария Сергеевна Туровская,
канд. эконом. наук, доцент,

Университет при Межпарламентской Ассамблее ЕвразЭС,
Людмила Ивановна Шаламай,

канд. мед. наук, доцент,

Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,

Александр Николаевич Литвиненко,

д-р эконом. наук, профессор,

Санкт-Петербургский университет МВД России,
Татьяна Анатольевна Черняк,

канд. эконом. наук, доцент,

Санкт-Петербургский государственный
университет аэрокосмического приборостроения,

г. Санкт-Петербург,

Галина Александровна Цыганкова,

канд. физ.-мат. наук, преподаватель,

Военно-морской политехнический институт,
г. Пушкин,

e-mail: majorov_ee@mail.ru