

О восстановлении функций распределения для мелкодисперсных и ультрадисперсных сред по рассеянию лазерного излучения.

Шайтан К.В. (sasha@biophys.msu.ru), Лобков А.Ф.,
Тимофеев И.Б., Чижов А.А., Терешкин Э.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Разработка методов определения свойств вещества, в частности определения функций распределений по размерам частиц, по особенностям рассеяния является важной проблемой с которой связан ряд медико-биологических, биофизических и геофизических задач.

Клеточный объем является одним из основных показателей функционального и структурного состояния клетки [1]. В норме регуляцию клеточного объема осуществляет множество взаимосвязанных физиологических и биохимических процессов [1,2]. Известно, что при некоторых патологических состояниях происходит нарушение этой регуляции [3-5]. Существенную роль в жизнедеятельности организма играет регуляция объема эритроцитов, поэтому важным параметром, определяющих реологические свойства крови, является отношение площади поверхности к объему этих клеток [6]. Величина дисперсности взвесей водных сред и атмосферы является важным показателем экологического состояния окружающей среды [7,8].

Это делает весьма актуальной разработку методов, позволяющих эффективно определять функции распределения частиц по размерам и, в частности, оптических экспрессных систем мониторинга состояния окружающей среды. Данная работа посвящена методическим вопросам лазерного цитомониторинга на модельных системах. В качестве экспериментальной модельной системы для определения средних размеров были выбраны нормальные эритроциты человека. Особенности строения и доступность получения этих клеток делают их удобным объектом для изучения. Для определения функций распределения эритроцитов по размерам использовалась оригинальная многоцелевая аналитическая система (лазерный цитомонитор), работающая в автоматическом режиме. Метод лазерного цитомониторинга, в основе которого лежит измерение малоуглового светорассеяния на биологических, терригенных и других гидро-, аэрозольных взвесах, позволяет получить функции распределения частиц по размерам и проследить их эволюцию во времени с высоким временным разрешением 0,02 с.

ОСНОВЫ МЕТОДА

При облучении взвеси частиц параллельным пучком света обратная задача рассеяния сводится к обращению линейного интегрального уравнения первого рода [7]:

$$S(\beta, \lambda) = N \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} \sigma(\beta, \lambda, r) f(r) dr \quad (1)$$

где r -радиус частиц, $S(\beta, \lambda)$ -общий показатель рассеяния, или показатель рассеяния под фиксированным углом β , $\sigma(\beta, \lambda, r)$ -его значение для отдельной частицы радиуса - r ; а N -общая концентрация; $f(r)$ -функция распределения частиц по размерам, r_{\min} и r_{\max} -граничные радиусы частиц взвеси. Для рассеяния на малые углы уравнение (1) принимает вид [7]:

$$I(\beta) = I_0 / \beta^2 \int_0^{\infty} f(r) r^2 J_1^2(\rho \beta) dr, \quad (2)$$

$$\rho = \frac{2\pi m_0}{\lambda} r$$

здесь I и I_0 интенсивности рассеянного и исходного излучения, β -угол рассеяния, m_0 -показатель преломления, λ -длина волны лазерного излучения. Для определения функции распределения частиц по размерам, рассчитываемой по измеряемой индикатрисе рассеяния света, необходимо решить обратную задачу рассеяния. Исходя из теории обращенных трансформаций Фурье-Бесселя интегральное уравнение (3) может быть точно обращено [9]:

$$f(\rho) = (-4\pi^2 I_0 / r^2 \lambda) \int_0^{\infty} F(\rho \beta) \{d[I(\beta) \beta^3] / d\beta\} d\beta, \quad (3)$$

$$F(x) = x J_1(x) Y_1(x)$$

где J_1 и Y_1 -функции Бесселя 1-го и 2-го рода.

Эта задача относится к классу некорректных и не имеет однозначного решения [10]. Принципиальные трудности восстановления функции распределения связаны с конечной точностью измерения индикатрисы рассеяния. Ниже в работе используется численная обработка результатов оптических измерений в терминах функций распределения частиц по размерам. Применение вышеупомянутого метода Шифрина [7] требует предварительного сглаживания индикатрисы рассеяния перед численным дифференцированием. Этот метод принципиально непригоден для описания рассеяния на малых частицах (для рассматриваемой установки - менее 2 мкм), что связано с использованием асимптотического решения. Метод приводит к появлению в функции распределения участков с отрицательными значениями. Использование метода также требует обрезания экспериментальной индикатрисы рассеяния по углам: сверху - из-за нарастания влияния на результат экспериментальных погрешностей при больших углах рассеяния и снизу - для устранения области аппаратного искажения индикатрисы при малых углах.

Для регуляризации данной задачи, повышения точности и надежности конечных результатов целесообразно использовать дополнительные соображения относительно изучаемых объектов.

Будем полагать, что в суспензии исследуемых частиц имеется несколько достаточно хорошо выраженных по размерам классов (К). Представим функцию распределения рассеивающих центров (РЦ) по размерам в виде:

$$\frac{\partial N_k}{\partial r} = \eta_k \Lambda_k(r) N, \quad k = 0 \dots K-1, \quad (4)$$

здесь η_k - доля РЦ в классе k , $\Lambda_k = \Lambda_k(r)$ - распределение РЦ по размерам внутри класса k (ниже используется нормальное распределение), N - полное число клеток, N_k - число клеток в классе k .

В результате непрерывная функция распределения по размерам заменяется распределением населенностей по дискретным классам η_k .

Часть классов соответствует не только увеличившимся в размерах единичным клеткам, но и кластерам, состоящим из двух, трех и т.д. слипшихся клеток. Очевидно, что сохранение суммарного числа клеток приводит к наличию нормировочных соотношений вида:

$$\sum_{k_\sigma'}^{k_\sigma''} \eta_k w_k = X_\sigma \quad \sigma = 0 \dots \Sigma - 1, \quad (5)$$

здесь w_k - весовой фактор (число клеток в РЦ), k_σ' и k_σ'' - начальный и конечный номер классов клеток вида σ , X_σ - доля клеток вида σ .

В рассматриваемом методе производятся многократные измерения индикатрисы рассеяния в различные моменты времени t_λ :

$$I = I(t, \beta) = I_{\lambda k}, \quad \lambda = 0 \dots \Omega - 1, \quad k = 0 \dots M - 1. \quad (6)$$

Шумовые составляющие могут быть достаточно эффективно устранены усреднением результатов измерений по нескольким близким моментам времени. Однако, если время заметного изменения населенностей клеточных классов сравнимо с интервалом усреднения индикатрисы или меньше его, то при этом усреднении теряется информация о динамике распределения клеток по размерам. Подавление высокочастотных знакопеременных шумов в этом случае проводится с использованием гладкости временной зависимости населенности η_k класса k . Представим далее функцию $\eta_k = \eta_k(t)$ многочленом степени $T < \Omega$:

$$\eta_k(t) = \sum_{\tau=0}^{T-1} \eta_{k\tau} t^\tau, \quad (7)$$

Сформулируем метод восстановления функции распределения по размерам, учитывающий вышеуказанные особенности методики измерения и исследуемых объектов - клеточных популяций. Для этого представим интенсивность I_{ap} , зависящую как от угла

рассеяния β , так и от времени t , в виде разложения по функциям $h_k = h_k(\beta)$, описывающим вклады в индикатрисы рассеяния от частиц с размерами r , относящимися к классам k :

$$I_{ap}(\beta, t) = N \sum_{k=0}^{K-1} \eta_k(t) h_k(\beta). \tag{8}$$

Функция $h_k(\beta)$ определяется интегралом:

$$N h_k(\beta) = \int_0^{\infty} \Lambda_k(r) N I(r, \beta) dr, \tag{9}$$

здесь $N h_k(\beta)$ - теоретическая индикатриса рассеяния от частиц размера r , получаемая с помощью асимптотических формул метода Шифрина. Подставив (7) и (9) в (8), получим

$$\begin{aligned} I_{ap}(\beta, t) &= N \sum_{k=0}^{K-1} \left[\int_0^{\infty} \Lambda_k(r) I(r, \beta) dr \right] \sum_{\tau=0}^{T-1} \eta_{k\tau} t^\tau = \\ &= N \sum_{k=0}^{K-1} h_k(\beta) \sum_{\tau=0}^{T-1} \eta_{k\tau} t^\tau. \end{aligned} \tag{10}$$

Отметим, что вид функций $h_k(\beta)$ определен заранее и зависит от заданных типов классов. В известных точках β_k эти функции рассчитываются заранее, также как и величины t_{λ}^τ в точках t_{λ} . Т.е. вся информация содержится в матрице размерностью $K \times T$.

Система условных уравнений для определения параметров включает $M \times \Omega$ уравнений

$$I_{ap}(t_{\lambda}, \beta_{\kappa}) = I_{\lambda\kappa}, \quad \lambda = 0 \dots \Omega - 1, \quad \kappa = 0 \dots M - 1, \tag{11}$$

и $\Sigma \times \Omega$ условий нормировки

$$\sum_{k_{\sigma}}^{k_{\sigma}''} \eta_k(t_{\lambda}) w_k = X_{\lambda}, \quad \sigma = 0 \dots \Sigma - 1, \quad \lambda = 0 \dots \Omega - 1. \tag{12}$$

Задача о наилучшем возможном согласии между $I_{ap}(\beta, t)$ и измеренными значениями $I_{\lambda\kappa}$ при удовлетворении нормировочных соотношений (5) решается стандартными методами. Под наилучшим возможным согласием понимается наименьшая сумма квадратов отклонений $I_{ap}(\beta, t)$ от $I_{\lambda\kappa}$ и квадратов отклонений от соотношения (5):

$$\begin{aligned} S &= \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} \left[I_{ap}(t_{\lambda}, \beta_{\kappa}) - I_{\lambda\kappa} \right]^2 + \langle I \rangle^2 \mu \sum_{\sigma=0}^{\Sigma-1} \left[X_{\sigma} - \sum_{k=k_{\sigma}}^{k_{\sigma}''} \eta_k w_k \right]^2, \\ \langle I \rangle^2 &= \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} I_{\lambda\kappa}^2 / (\Omega M). \end{aligned} \tag{13}$$

здесь $\langle I \rangle^2$ - средний квадрат интенсивности, вводится для согласования размерностей в сумме (13), а фактор $\mu \geq 1$ может делать нормировку более строго выполняемой, чем совпадение I и I_{ap} в некоторой точке $\lambda, \hat{\epsilon}$.

С учетом (8), (10) уравнение (13) принимает вид:

$$S = \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} \left[N \sum_{k=0}^{K-1} h_k(\beta_k) \sum_{\tau=0}^{T-1} \eta_{k\tau} t_{\lambda}^{\tau} - I_{\lambda k} \right]^2 + \langle I \rangle^2 \mu \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} \sum_{\sigma=0}^{\Sigma-1} \left[X_{\sigma} - \sum_{k=k_{\sigma}}^{k_{\sigma}''} w_k \sum_{\tau=0}^{T-1} \eta_{k\tau} t_{\lambda}^{\tau} \right]^2. \tag{14}$$

Условие минимума функции S от $K \times T$ переменных $v_{k\tau}$ имеет вид:

$$\frac{\partial S}{\partial \eta_{k\tau}} = 0, \quad k = 0 \dots K - 1, \quad \tau = 0 \dots T - 1, \tag{15}$$

или, с учетом (14) и после элементарных преобразований:

$$\sum_{\sigma=0}^{\Sigma-1} \sum_{k=k_{\sigma}}^{k_{\sigma}''} \sum_{\tau=0}^{T-1} \eta_{k\tau} \left[2 N^2 \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} h_k(\beta_k) t_{\lambda}^{\tau} h_{k'}(\beta_{k'}) t_{\lambda}^{\tau'} + \langle I \rangle^2 \mu \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} 2 w_k t_{\lambda}^{\tau} w_{k'} t_{\lambda}^{\tau'} \right] = 2 \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} I_{k\lambda} N h_{k'}(\beta_{k'}) t_{\lambda}^{\tau'} + \langle I \rangle^2 \mu 2 \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} w_{k'} t_{\lambda}^{\tau'} X_{\sigma}, \tag{16}$$

$$k' = 0 \dots K - 1, \quad \tau' = 0 \dots T - 1,$$

или

$$\sum_{\gamma=0}^{\Gamma-1} \eta_{\gamma} a_{\gamma\delta} = b_{\delta}, \quad \delta = 0 \dots \Gamma - 1, \quad \Gamma = KT, \tag{17}$$

где индекс γ пробегает все пары значений $k = 0 \dots K-1, \tau = 0 \dots T-1$, индекс δ - значения $k'=0 \dots K-1, \tau' = 0 \dots T-1$,

$$a_{\gamma\delta} = 2N^2 \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} h_k(\beta_k) h_{k'}(\beta_{k'}) t_{\lambda}^{\tau+\tau'} + \langle I \rangle^2 \mu 2 \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} w_k w_{k'} t_{\lambda}^{\tau+\tau'}, \tag{18}$$

$$b_{\delta} = 2N \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} I_{k\lambda} h_{k'}(\beta_{k'}) t_{\lambda}^{\tau'} + 2 \langle I \rangle^2 \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} w_{k'} t_{\lambda}^{\tau'} X_{k'}.$$

Заметим, что $a_{\gamma\delta} = a_{\delta\gamma}$, индексы k и τ, k' и τ' ($\tau+\tau'$) в $a_{\gamma\delta}$ входят одинаковым образом, что сокращает объем вычислений $a_{\gamma\delta}$. Вводя следующие обозначения

$$\Pi_{kk'} = \sum_{k=0}^{M-1} h_k(\beta_k) h_{k'}(\beta_k),$$

$$\Delta_i = \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} t_\lambda^i, \quad (19)$$

запишет уравнения (18) в виде:

$$\dot{a}_{\gamma\delta} = 2N^2 \Delta_{\tau+\tau'} \Pi_{kk'} + 2\mu \langle I \rangle^2 w_k w_{k'} \Delta_{\tau+\tau'},$$

$$b_\delta = 2N \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} t_\lambda^{\tau'} \sum_{k=0}^{M-1} I_{k\lambda} h_{k'}(\beta_k) + 2\mu \langle I \rangle^2 w_{k'} x_{k'} \Delta_{\tau'}. \quad (20)$$

Итак, решение задачи определения динамики функции распределения сводится к определению элементов матрицы $v_{\kappa\tau}$ (т.е. v_γ) путем решения системы $K \times T$ линейных уравнений (17), для чего предварительно вычисляются элементы матриц $a_{\gamma\delta}$ и b_δ по (18) или (20).

Отметим, что предлагаемый метод не требует предварительного сглаживания экспериментальной индикатрисы рассеяния и обрезания ее сверху и снизу по углам. В нем явно не использованы также свойства функции Бесселя (что важно в методе [7]), т.е. возможно расширение области применимости измерений в сторону меньших размеров частиц, рассеяние на каждой из которых дает индикатрису, отличную от функции Бесселя. Громоздкие вычисления функций распределения могут выполняться предварительно - один раз для данного набора классов клеток (точнее, вычисляются не сами эти функции, а их интегралы $\Pi_{kk'}$), что упрощает численную процедуру.

Предлагаемый метод изучения кинетики изменения размеров клеток использует информацию о структуре распределения исследуемых клеток по размерам и нормировочные соотношения, вытекающие из сохранения числа клеток (но не рассеивающих центров). При этом целесообразно использовать также стандартные методы подавления высокочастотных экспериментальных шумов.

Погрешности во входных данных и известная неустойчивость решения, свойственная обратным задачам, в принципе, может приводить к появлению отрицательных значений населенностей η_k , особенно при малой реальной населенности данного класса k . Поясним пути устранения этих погрешностей для случая: $\Omega = 1$, $T = 1$. Поиск решения связан с отысканием наименьшего значения функции S (см.(12)) от переменных $\eta_0, \eta_1, \eta_k, \eta_{k-1}$, которая в данном случае принимает вид:

$$S = S(\eta_0, \eta_1, \dots, \eta_k, \dots, \eta_{K-1}) =$$

$$\sum_{k=0}^{M-1} \left[N \sum_{k=0}^{K-1} h_k(\beta_k) h_k - I_{k\lambda} \right]^2 + \langle I \rangle^2 \mu \sum_{\sigma=0}^{\Sigma-1} \left[X_\sigma - \sum_{k=K'_\sigma}^{k''_\sigma} w_k h_k \right]^2. \quad (21)$$

Если у функции S нет седловых точек, а единственный минимум по η_k достигается при отрицательном значении $\eta_{k''} = \eta_{k''}^* < 0$, то для нахождения наименьшего значения S при неотрицательных аргументах достаточно найти минимум функции $S=S'$ как функции только тех аргументов η_k , у которых координаты η_k^* минимума S положительны.

Практически, для этого достаточно:

- найти населенности $\eta_0, \eta_1, \dots, \eta_{k-1}$ по вышеописанной методике, т.е. координаты минимума $S(\eta_0, \eta_1, \dots, \eta_{k-1})$ - значения $\eta_0^*, \eta_1^*, \dots, \eta_{k-1}^*$;
- исключить из рассмотрения те классы k'' , в которых $\eta_{k''}^* < 0$;
- повторить вычисление минимума $S=S(\eta_0, \dots, \eta_{k''}=0, \dots, \eta_{k-1})$ как функции оставшихся населенностей $\eta_k, k \neq k''$ (т.е. найти минимум S в пространстве меньшей размерности).

Не исключена также возможность появления при этом новых отрицательных значений параметра η_k . Тогда последние два шага следует повторить.

Определение средних размеров клеток и функций распределения по размерам проводили с использованием лазерного цитомонитора, конструкция которого разработана на кафедре физической электроники МГУ и произведена его заводская сборка [11,12]. Прибор укомплектован РС с CPU Athlon T-K7 1.1 ГГц.

На рис.1 представлена блок-схема лазерного цитомонитора. Основными элементами являются: источник когерентного излучения - He-Ne лазер (1) с длиной волны 633 нм; расширитель лазерного луча - двухлинзовая оптическая система, помещенная в цилиндрический металлический корпус (2), стекло направляющее часть входного светового пучка на фотодиод для определения интенсивности излучения (3); стекло направляющее часть выходного лазерного пучка на фотодиод для определения интенсивности излучения (5); подвесной съемный модуль рабочей кюветы с исследуемой суспензией клеток крови человека (4); длиннофокусная собирающая линза, проектирующая изображение щели в фокальной плоскости (6); жестко фиксируемая юстировочная система для фотоприемника (ПЗС-линейки) (8). Непосредственно перед фотоприемником помещается нейтральный фильтр (9) для уменьшения паразитной засветки и подвижный "нож" (7), ограничивающий сечение прямого лазерного луча; щель, вырезающая из симметричной картины рассеяния радиальную полосу (11). Видеосигнал с ПЗС-линейки обрабатывается схемой прибора.

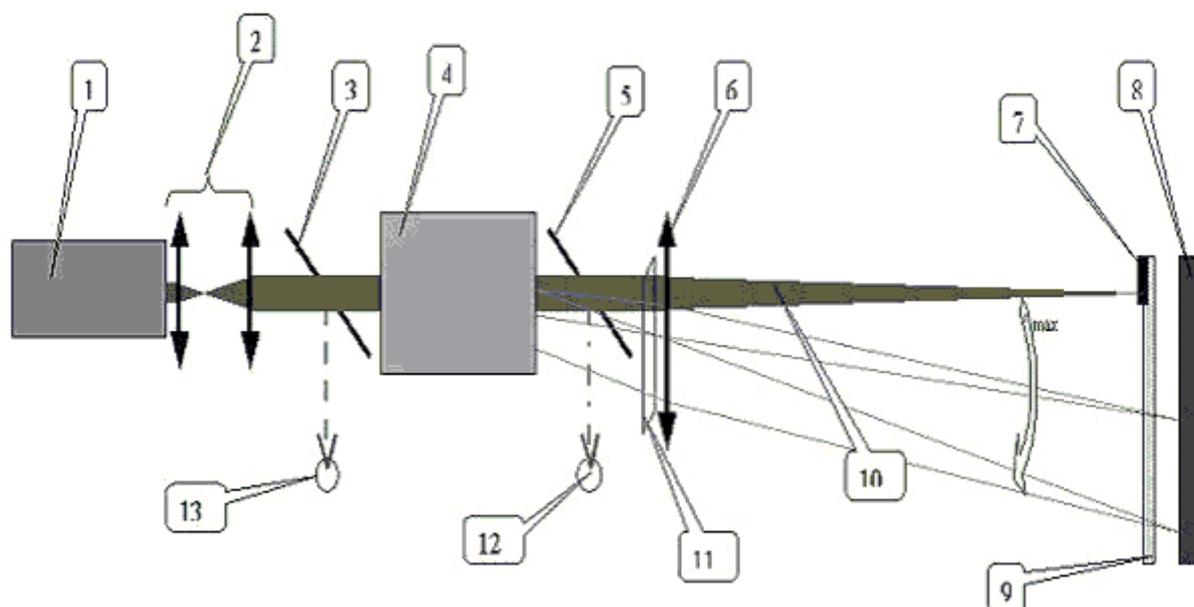


Рис. 1. Оптическая схема лазерного цитомонитора

1. He-Ne лазер.
2. Расширитель лазерного луча - двух линзовая оптическая система.
3. Стекло направляющее часть входного светового пучка на фотодиод для определения его интенсивности.
4. Кювета с исследуемым веществом.
5. Стекло направляющее часть выходного лазерного пучка на фотодиод для определения его интенсивности.
6. Собирающая линза.
7. “Нож”
8. ПЗС линейка.
9. Ослабляющий фильтр.
10. Лазерный луч.
11. Щель.
12. и 13. Фотодиоды.

Кюветное отделение лазерного цитомонитора с объемом кюветы 5 мл имеет встроенную магнитную мешалку. Прибор имеет систему термостатирования для поддержания температуры клеточной суспензии в кювете цитомонитора на заданном уровне в диапазоне 10 - 60°C с точностью не хуже 0,2° С, с цифровой индикацией температуры и с установкой необходимой погрешности измерений. В качестве нагревательного элемента служит мощный p-p-n транзистор, работающий в режиме эмиттерного повторителя. Рассеиваемая им мощность достигает 20 Вт, что позволяет нагревать необходимый объем суспензии на 20⁰ С за 1 мин.

Лазерное излучение, проходя через кювету с суспензией эритроцитов, рассеивается клетками. Для определения функции распределения по размерам необходимо измерить индикатрису рассеяния $I(\beta)$. Чтобы избавиться от исходного пучка, который мешает выделить сигнал при малых углах рассеяния, измерения проводятся за пределами фокального пятна, в котором собран исходный пучок. При этом перемещение частиц вдоль и поперек пучка не меняют распределения интенсивности в фокальной плоскости. Свет, рассеянный под данным углом, распределен в фокальной плоскости линзы на соответствующее угловое расстояние от центра и образует ореол вокруг фокального пятна от исходного пучка лазера. Размеры фокального пятна обычно соответствуют углу $\beta_{\min} \approx 10'$. Измерения $I(\beta)$ проводились для углов $\beta > \beta_{\min}$ и захватывали область до $\beta \approx 4^\circ$ (или от 50 до 3700 элемента ПЗС).

Область применения метода ограничивается также следующими допущениями [7,8]:

- Рассеяние света происходит безотносительно к другим частицам, т.е. не учитывается интерференция волн, рассеянных отдельными частицами. Критерием отсутствия интерференции принято считать соотношение $l \gg 5\lambda$, где λ - длина волны подающего света, l – расстояние между частицами. Предельное расстояние между частицами, при котором можно еще не учитывать интерференцию волн, рассеянных каждой частицей, $l = 3r$. Расстояние между частицами в условиях плотной упаковки

$$l = \left(\frac{4\pi r^3}{3q} \right)^{1/3}$$

где q – объемная относительная концентрация дисперсной фазы. Отсюда $q_{\max} = 0.16$, что превышает значение q в исследовательских задачах.

- Рассеяние однократно. Критерием выполнения данного допущения служит: $\tau = \ln(I_0 / I) \leq 0.3$, где I – интенсивность рассеяния.
- Задача обращения интегрального уравнения и нахождения функции распределения по асимптотическим формулам решается только при $\rho = \frac{2 \cdot \pi \cdot m_0}{\lambda} r > 20$, где m_0 – показатель преломления, λ – длина волны. Из этого условия можно получить минимальный радиус частиц, при котором еще можно пользоваться формулой $r_{\min} = 10\lambda / \pi$.
- Все частицы имеют сферическую форму или близки к ней. При определении спектра частиц несферической формы возможно использовать несколько способов оценки размеров частиц. В одном из них истинное распределение частиц по размерам заменяется распределением по размерам сферических частиц, эффективный радиус которых (r_i):

$$r_i = \left(\frac{S_i}{\pi} \right)^{1/2}$$

где S_i - эффективная рассеивающая площадь частицы.

Второй способ оценки размеров частиц основан на том, что для эллипсоидальных частиц с малым эксцентриситетом индикатриса рассеяния света, усредненная по различным пространственным ориентациям, совпадает с индикатрисой шара того же объема. Средняя индикатриса хаотично расположенных палочек так же совпадает с индикатрисой шаров того же объема.

В эксперименте излучение рассеивается на исследуемой суспензии эритроцитов.

Приготовление модельных суспензий

В работе использовали кровь здоровых доноров, взятую на гепарине (5 ед. акт/мл). Эритроциты осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 минут, удаляли плазму и клетки белой крови, осадок дважды отмывали 10 - кратным объемом изотонического HEPES-буфера (5 mM KCl, 10 mM HEPES, 145 mM NaCl, pH = 7,4) при том же режиме центрифугирования и инкубировали в HEPES-буфере. Все измерения проводились не позднее последующих 24 часов с момента взятия крови, при температуре $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Осмотичность растворов определяли с помощью криоскопического осмометра ОМКА 1Ц-01. Перед измерением суспензию эритроцитов разбавляли до необходимой концентрации клеток HEPES-буфером, содержащим NaCl в концентрации, обеспечивающей необходимое значение осмотичности.

Контроль за изменением формы эритроцитов осуществляли с помощью светового микроскопа.

Определение среднего эффективного размера и функций распределения проводилось с помощью лазерного цитомонитора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 показаны индикатрисы рассеяния на суспензии эритроцитов с концентрациями клеток 20,30, 50 тысяч на 1 мл в изоосмотической среде (295~300 мосМ).

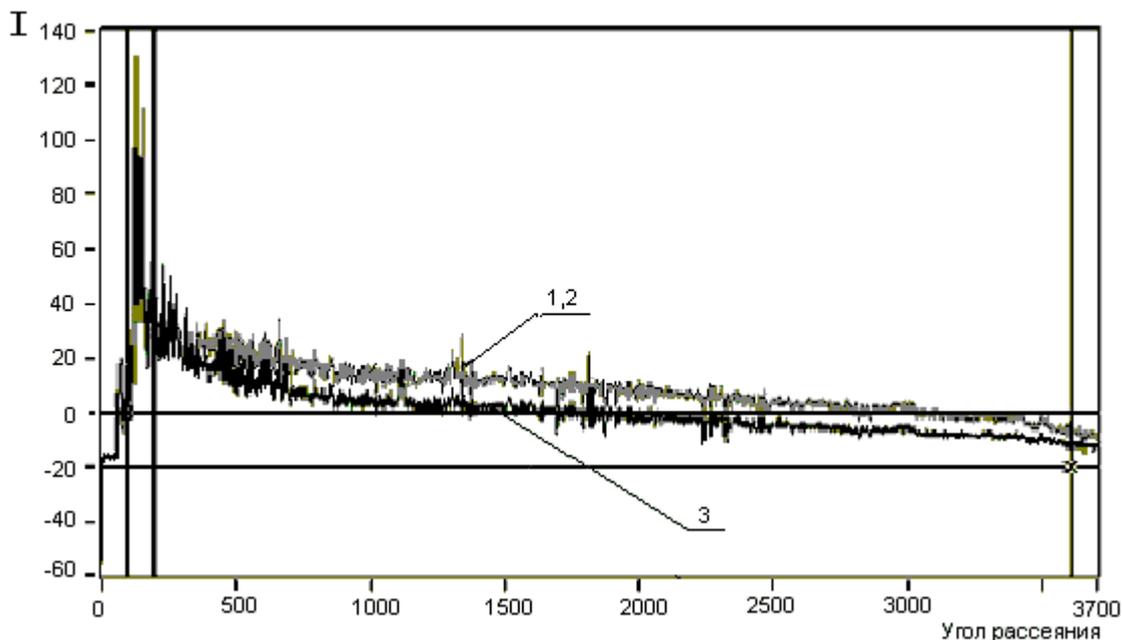


Рис. 2. Индикатрисы рассеяния на суспензии эритроцитов в
изоосмотической среде

По оси абсцисс отложена величина угла рассеяния в относительных единицах (соответствует углу в градусах от 0 до 4), а по оси ординат – интенсивность рассеянного света.

Возрастание концентрации клеток в суспензии выше 50 тыс/мл сопровождается быстрым увеличением поглощения света, рассеянного взвесью. При этом регистрируемая интенсивность рассеяния снижается, и становится невозможным восстановление функции распределения по размерам. Как видно из рисунка 2, индикатрисы, соответствующие суспензиям с концентрацией клеток 20 и 30 тыс/мл (кривые 1,2), практически совпадают, а интенсивность рассеяния для концентрации 50 тыс/мл (кривая 3) несколько ниже. Поэтому в дальнейшем использовали концентрацию эритроцитов ~30 тыс. /мл.

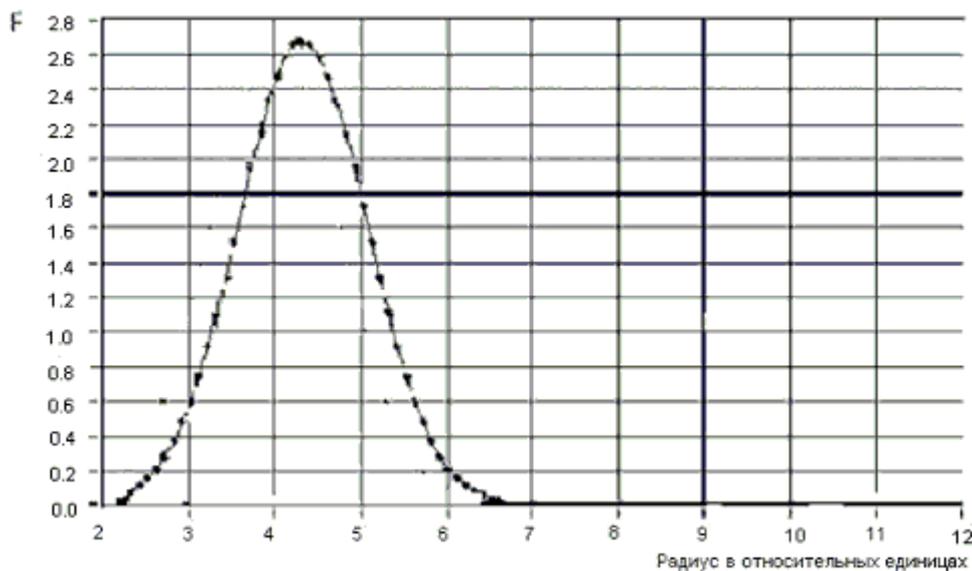


Рис. 3. Функция распределения по размерам для эритроцитов, ресуспендированных в изотонической среде ($\pi = 295$ мосМ.)

Математическая обработка индикатрисы рассеяния вышеописанным методом позволяет получить функции распределения клеток по размерам. На рис. 3 представлена восстановленная функция распределения по размерам эритроцитов, ресуспендированных в изотонической среде. На графике по оси абсцисс отложен эффективный радиус R в относительных единицах, а по оси ординат – доля частиц данного размера. Видно, что средний эффективный радиус клеток $R \sim 4,3$ в относительных единицах.

Таблица 1. Величина эффективного радиуса R в средах с разной осмотичностью

Осмотичность сред (π , мосМ)	160	180	220	260	300	360	430	460
Эффективный радиус (R , усл.ед.)	7,1	6,7	6	5,2	4,3	3,5	2,8	2,2

В таблице 1 приведены величины средних эффективных радиусов клеток (R) клеток, ресуспендированных в средах с разными значениями осмотичности (π). С изменением π меняется величина набухания и, соответственно, объем клеток. При этом в гипотонических условиях объем увеличивается, а в гипертонических – уменьшается. Из таблицы 1 видно, что при возрастании осмотичности среды инкубации от 160 до 430 мосМ средний эффективный радиус эритроцитов уменьшается с 7 до 2,5 относительных единиц. Проверялась воспроизводимость результатов измерений в серии из семи опытов. Отклонение от выше приведенных значений среднего радиуса составляло $\pm 0,1$.

Для сравнения R с реальным объемом использовалась эмпирическая зависимость объема от обратной осмотичности [13]:

$$V = V_0 + f_0 \frac{1}{\pi}, \quad (22)$$

где π – осмотичность среды, f_0 – константа, связанная с проницаемостью и механическими свойствами мембраны, V – объем клетки. В координатах V и $1/\pi$ она имеет линейный характер. В расчетах использовались значения для констант: $V_0=40$, $f_0=15000$.

Таблица 2. Величины W и V при одинаковых значениях осмотичности сред

Осмотичность	160	180	220	260	300	360	430	460
--------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

сред (и, мосМ)								
V (мкм ³)	133,7	123,4	108,2	97,7	90	81,7	74,9	72,6
W (усл.ед)	357,9	300,7	216	140,6	79,5	42,8	21,9	10,6

В таблице 2 сопоставлены величины эффективного объема $R^3 \equiv W$ полученного, методом лазерного цитомониторинга, и величины V при одинаковых значениях осмотичности сред. Зависимость между W и V близка к линейной. С помощью линейной регрессии получено уравнение, связывающее объемы определенные по светорассеянию и эмпирической зависимости (22):

$$V=73 + 0.17W.$$

Размер клеток животных и человека является одним из важных показателей их состояния. Сохранение нормального объема является задачей системы ионного гомеостаза – одной из важнейших систем клетки [14]. Многие повреждающие факторы, например, окислительный стресс, лекарственные препараты, приводят к изменению объема клетки, что одновременно сказывается и на ее жизнеспособности.

Разработанный аппаратно-программный комплекс для определения размеров частиц повышает точность решения обратной задачи малоуглового рассеяния. Этот метод позволяет получить функции распределения частиц в биологических, терригенных и других гидро-, аэрозольных взвесах. Полученные в данной работе результаты показывают, что регуляризованный метод лазерного цитомониторинга чувствителен к изменению объема эритроцитов в гипертонических и гипотонических средах. Сравнивая зависимости реального объема эритроцитов от осмотичности, полученного по эмпирическому уравнению (22) и методом цитомониторинга, можно получить функцию для перехода от W к V . Поскольку метод позволяет получать функции распределения клеток по размерам с высоким временным разрешением может оказаться возможным использовать его для исследования кинетики изменения размеров клеток при различных воздействиях, например, при действии ионофоров. По-видимому, характер калибровочных кривых будет изменяться в зависимости от оптических свойств исследуемых взвесей. В частности, он может зависеть от содержания гемоглобина в эритроцитах. Поэтому, для получения точных оценок может потребоваться построение калибровочных функций для каждой исследуемой взвеси.

Авторы благодарны Н.Ф. Еланскому, Ф.И. Атауллаханову и И.Л. Лисовской за многочисленные полезные обсуждения.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 01-04-49302), Минпромнауки, Правительства Москвы (гранты Москвы № 1.1.144 и 1.2.45 за 2001г).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. // *Physiol. Rev.* 1998. V. 78. P. 247-306.
2. Hoffmann E.K., Simonsen L.O. // *Physiol. Rev.* 1989, V. 69. P. 315-382.
3. Iolascon A., Miraglia del Giudice, Perrotta S., Morle L., Delaunay J. // *Haematologica* 1998 V. 83. P. 240-257.
4. Reinhart W. H. // *J. Thorac. Cardiovasc Surg.* 1990. V100 (4). P. 538-543.
5. Hallgren R., Svenson K., Johansson E., Lindh U. // *Arthritis Rheum.* 1985. V.28. P. 169-173.
6. Clark M.R., Mohandas N., Shohet S.B. // *Blood.* 1983. V.61. P. 899-910.
7. Шифрин.К.С. Введение в оптику океана .Л.: Гидрометеиздат, 1983
8. Ван де Хюлст. Рассеяние света малыми частицами. М.: Иностранная литература, 1961.
9. Шифрин К. С. Рассеяние света в мутной среде. М.: Гостехтеориздат, 1951.
10. Тихонов.А.Н., Арсенин.В.Я. Методы решения некорректных задач. М.:Наука, 1979.
11. Александров А.Ф., Свистов Д.А., Тимофеев И.Б., Тимофеев Б.И., Черников В.А., Чижов А.А., Чувашев С.Н. // *Биомедицинская радиоэлектроника* 2000. №5, С. 50-64.
12. Шайтан К.В., Лобков А.Ф., Тимофеев И.Б., Лисовская И.Л., Чижов А.А., Терешкин Э.В. Метод лазерного цитомониторинга и его применение для определения размеров эритроцитов // *Биологические мембраны* 2002(в печати)
13. Атауллаханов Ф. И., Витвицкий В. М., Лисовская И. Л., Тужилова Е. Г. // *Биофизика.* Т.39, №4 1994. С. 672-680
14. Therien A., G, Blostein R. // *Amer. J. Cell Physiol.* 2000. V.279. P.541-566.