

07;12

Модифицированный лазерный дифрактометр для исследования биологических микрообъектов

© *Е.Т. Аксенов, Д.В. Мокрова*

Санкт-Петербургский государственный политехнический университет
E-mail: dashkeria@gmail.com

Поступило в Редакцию 15 апреля 2008 г.

В работе предложена и исследована лабораторная модель двухканального оптоэлектронного лазерного дифрактометра. В отличие от известных лазерных дифрактометров, этот дифрактометр содержит два измерительных канала: спектральный и изображения. Проведенные исследования параметров как искусственных неорганических, так и натуральных биологических микрообъектов подтверждают работоспособность предложенного дифрактометра и его практическую перспективность.

PACS: 42.25.Fx, 42.62.Bc

Методы когерентной оптики находят все более широкое применение в медицине и биологии при исследовании и диагностике биологических микрообъектов и их ансамблей [1–3]. Возможности применения методов Фурье-оптики для исследования биологических частиц микронного размера и хорошая воспроизводимость результатов продемонстрированы, например, в [4–6]. Потенциальные возможности оптической обработки очевидны: двумерность, работа в реальном масштабе времени, высокая скорость обработки больших массивов данных, широкая полоса частот и т.д. Теория, описывающая работу соответствующих приборов, достаточно хорошо развита.

Существует несколько когерентно-оптических методов для исследования микрообъектов. Метод лазерной дифрактометрии, основанный на явлении дифракции лазерного излучения на одиночных и множественных биологических микрообъектах, характеризуется высокой точностью, чувствительностью, быстродействием, минимальным воздействием на объект исследования, возможностью одновременной регистрации большого количества малых частиц. Параметры дифрак-

ционной картины однозначно связаны с параметрами микрообъектов, что позволяет определять их размеры, форму, внутреннюю структуру. Оптическая дифрактометрия получила достаточно широкое применение при решении некоторых задач биомедоптики, однако поиск новых областей применения, совершенствование и развитие методов дифрактометрии в сочетании с методами оптической обработки информации (сигналов, изображений), а также создание комбинированных оптико-электронных систем, включающих современные цифровые устройства обработки информации (персональные компьютеры, спецпроцессоры и т.п.) является актуальной научно-технической задачей, имеющей значительную практическую перспективу.

Целью данной работы являлось изучение особенностей построения лазерного дифрактометра для оценки оптико-физических параметров биологических микрообъектов и разработка лабораторной модели двухканального лазерного дифрактометра, позволяющего получать информацию об исследуемых объектах одновременно как в спектральном виде, так и в виде изображения, что открывает новые возможности по характеристике этих объектов. При этом предполагается, что в канале формирования изображения закладываются возможности обработки этих изображений, например, идентификации.

Структурная схема предлагаемого оптического процессора представлена на рис. 1.

Световой пучок лазера с длиной волны $0.6328 \mu\text{m}$ и мощностью излучения 1 mW проходит каскад формирующей оптики и освещает исследуемый объект. Промодулированная объектом световая волна светоделительным кубом разделяется на два канала: изображения и спектральный. Линза L1 осуществляет двумерное преобразование Фурье информационного светового поля. В задней фокальной плоскости линзы L1 формируется распределение светового поля, представляющее Фурье-образ (пространственный спектр) функции пропускания образца. Спектр пространственных частот регистрируется с помощью ПЗС камеры. Затем данные отображаются на мониторе ПК, записываются и выбранное сечение дифракционной картины (ДК) анализируется на компьютере. Для анализа данных на компьютере использовалась утилита AVerCap и программа Vision Assistant. Утилита AVerCap позволяет захватывать изображение с ПЗС. Программа Vision Assistant включена в модуль National Instruments Vision Development Module, который предназначен для решения задач технического зрения. С по-

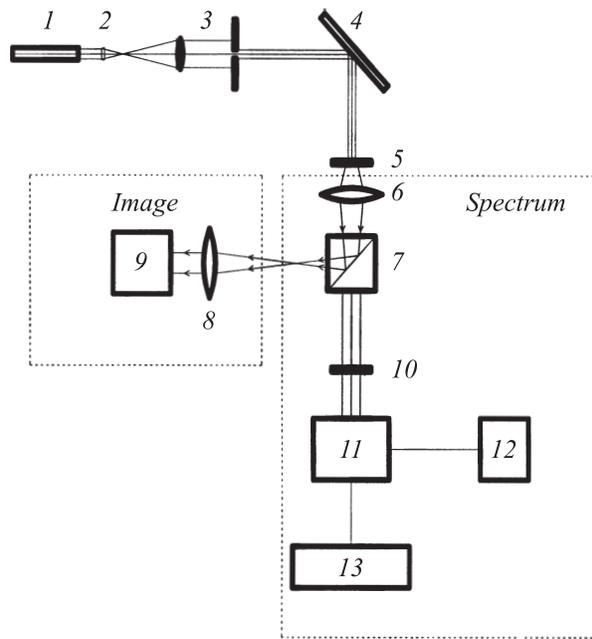


Рис. 1. Структурная схема оптического процессора: 1 — лазер, 2 — коллиматор, 3 — диафрагма, 4 — зеркало, 5 — образец, 6 — линза L1, 7 — светоделительный куб, 8 — линза L2, 9 — регистрирующее устройство, 10 — светофильтр, 11 — ПЗС, 12 — ПК, 13 — монитор.

мощью программы Vision Assistant анализировались полученные ДК. Извлекались сечения ДК в различных направлениях, строились графики интенсивности света в выбранных сечениях с помощью программы Mathcad.

В канале изображения с помощью линзы L2 происходит обратное преобразование Фурье и регистрируется изображение образца. В данной измерительной установке изображение регистрировалось цифровой фотокамерой, размещаемой за микроскопом, входящим в структуру канала изображения. Полученное таким образом изображение вводилось в ПК и могло быть обработано, в случае необходимости, программными методами. Для автоматизации регистрации получаемых изображений

фотокамера должна быть заменена на ПЗС передающую камеру, сопряженную с ПК.

В данной работе для оценки измерительных возможностей предложенной схемы и лабораторной модели оптоэлектронного дифрактометра проводилось исследование ряда объектов как модельных, так и натуральных. Необходимо отметить, что, т.к. в качестве натуральных тестовых объектов в работе применялись образцы мазков цельной крови, то и модельные объекты изготавливались как имитаторы таких объектов.

На выходе спектрального канала как в случае модельных, так и натуральных образцов наблюдались распределения световых полей в виде дифракционных колец, параметры которых позволяли оценивать размеры исследуемых микрочастиц. Для определения диаметра кольца по сечениям при получении ДК в световой пучок в плоскости образца вводилась проволочка диаметром $450\ \mu\text{m}$, ДК которой известна и может служить измерительным масштабом.

Эксперименты с модельными образцами показали хорошее совпадение получаемых на дифрактометре размеров исследуемых микрочастиц с регистрируемыми известными измерительными методами.

Помимо модельных образцов, в работе было проведено качественное исследование дифракционных параметров мазков цельной крови и их динамики по мере высыхания мазка. Кроме того, регистрировались изображения мазков.

Для исследования мазка методом лазерной дифракции образцы подготавливались таким образом, чтобы оптическая толщина слоя крови была мала для обеспечения однократного рассеяния света, что позволяет не учитывать вклад переотражения от областей перекрытия. Концентрация эритроцитов при этом должна быть достаточной для наблюдения ДК высокой интенсивности. В соответствии с этим капля крови помещалась между двумя стеклами, зазор между которыми определялся прокладками из лавсана толщиной $10\ \mu\text{m}$. Под покровное стекло кровь вводилась через край зазора за счет сил поверхностного натяжения. Кровь бралась из пальца руки. При исследованиях использовались третья-четвертая капли, а первые капли крови в момент ее взятия оставляли на тампоне для предотвращения попадания в образец тканевого тромболластина, выделяющегося в момент прокола.

Через 10 минут после начала эксперимента визуально наблюдалось изменение структуры мазка крови из-за его высыхания. Соответствующая динамика изменения ДК показана на рис. 2, *a, b*. Со временем

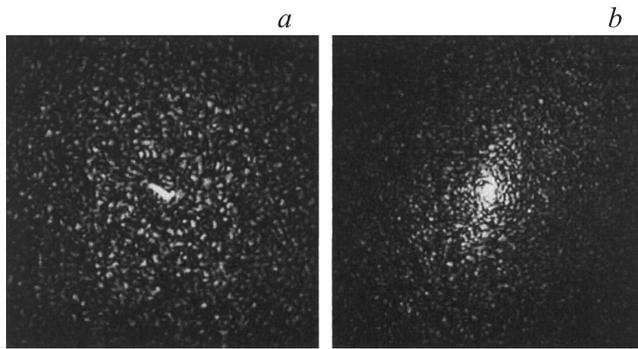


Рис. 2. *a)* ДК образца мазка цельной крови (начало эксперимента); *b)* ДК образца мазка цельной крови (прошло 10 минут).

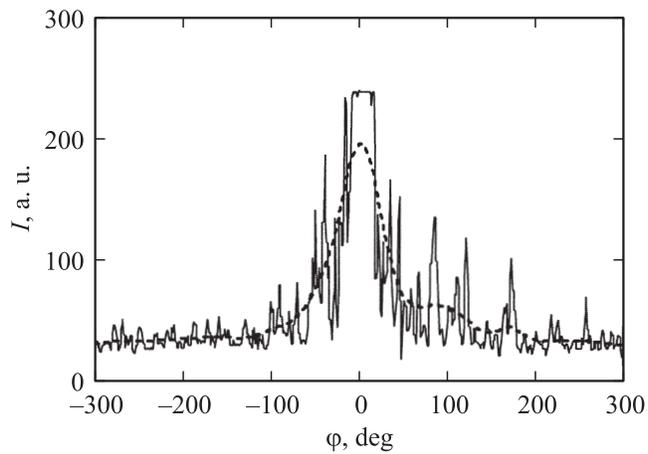


Рис. 3. Сечение ДК, полученное с помощью программы Vision Assistant. Графики построены с помощью программы Mathcad. 10 минут после начала эксперимента, сечение в плоскости, расположенной параллельно малой оси эллипса.

ДК принимает эллиптический вид. Пример сечения ДК представлен на рис. 3. Эллиптичность ДК может объясняться эллиптичностью эритроцитов, вызываемой механическими напряжениями в мазке, ини-

цированными покровным стеклом. При наличии направленного сдвигового усилия, возникающего при приготовлении мазка, возможно вытягивание эритроцитов в направлении действия силы. В результате этого они принимают эллиптическую форму. При принятии отдельным эритроцитом или их совокупностью эллиптической формы ДК тоже становится эллиптической, а эллипс ДК разворачивается относительно эллипса исходного объекта на 90° .

Следует отметить, что в случае наличия в мазке крови деформированных эритроцитов до высыхания мазка, их присутствие сразу бы отразилось на форме регистрируемой дифракционной картины.

Таким образом, предложенная схема двухканального лазерного дифрактометра открывает новые возможности по характеристике микрообъектов, в т. ч. биологических. В разработанной лабораторной модели дифрактометра используется простейший вариант оптической схемы формирования изображения исследуемого образца. Эта схема может быть преобразована так, чтобы стало возможным проводить обработку изображений, например, решать задачу распознавания образов или обрабатывать полученное изображение различными программными методами на ПК.

Авторы благодарят Е.С. Петухову за помощь в выполнении экспериментов.

Список литературы

- [1] *Старк Г.* Применение методов Фурье-оптики. М.: Радио и связь, 1988. 535 с.
- [2] *Петрова Г.П., Пертусевич Ю.М., Тен Д.И.* // Квантовая электроника. 2002. Т. 32. № 10. С. 897–901.
- [3] *Лопатин В.В., Приезжев А.В.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физ. Астрон. 1999. № 5. С. 19–22.
- [4] *Bessmeltsev S., Lendiaev A., Tarlykov V., Hodus I.* // Proc. SPIE. 2002. V. 4680. P. 177–180.
- [5] *Ашкинази И.Я.* // Бюлл. экспер. биол. 1972. № 7. С. 28–31.
- [6] *Alexandrova L., Bessmeltsev S., Lendiaev A. et al.* // Proc. SPIE. 2004. V. 5447. P. 330–337.