

Исследование фракционирования молока как типичной биологической жидкости методом цифровой голографической интерферометрии

© Т.Б. Кузьмина, Н.В. Андреева, А.О. Исмагилов, О.В. Андреева

Университет ИТМО,
197101 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: kuzmina.t.94@gmail.com

Поступила в редакцию 17.10.2018 г.

Представлены результаты исследования молока как сложной биологической жидкости. Показано одновременное протекание как прямой, так и обратной седиментации, связываемой соответственно с белковыми и жировыми компонентами молока. Использование метода цифровой голографической интерферометрии позволяет оценить пространственно-временные изменения показателя преломления исследуемого препарата, обусловленные процессами фракционирования, с точностью 10^{-6} , что превышает возможности других методов исследования. Результаты работы могут быть использованы при создании математической модели процессов фракционирования биологических жидкостей и при разработке физических моделей (фантомов) таких систем.

DOI: 10.21883/OS.2019.02.47204.298-18

Введение

Биологические жидкости играют большую роль как в поддержании здоровья человека, так и в диагностике различного рода заболеваний. Богатый и разнообразный состав биологических жидкостей человеческого организма успешно используется для диагностики его состояния в современной медицине [1–5].

Исследование параметров биологических жидкостей, их трансформации под влиянием внешних факторов и выявление изменений, свидетельствующих о наличии патологий, является важной задачей при разработке методов ранней диагностики и способов лечения социально значимых заболеваний [6–8]. Трудности на этом пути обусловлены не только тем, что биологические жидкости отдельного индивидуума имеют свои особенности, но также и тем, что состав биологических жидкостей включает частицы различного состава с широким диапазоном размеров.

Процесс фракционирования биологической жидкости сложного состава и ее препаратов (полученных, например, путем центрифугирования) является одним из наиболее чувствительных методов диагностики изменений структуры исследуемой жидкости. Однако такие методы, как ультрацентрифугирование и ряд известных весовых методов определения скорости седиментационных процессов, направлены на исследование грубодисперсных систем, не обладающих большим разнообразием фракций [9]. Используемые на данный момент в медицине методы изначально рассматривают поведение отдельной фракции частиц в биологических жидкостях и не позволяют оценить поведение всей системы [10]. Изучение процесса фракционирования систем такого сложного состава и интерпретация полученных результатов пред-

ставляют значительный интерес для биомедицинских исследований.

В настоящей работе рассмотрена возможность использования метода цифровой голографической интерферометрии (ЦГИ) [11–13] для оценки пространственно-временных изменений препаратов биологической жидкости сложного состава на примере молока.

Объект и метод исследования

В качестве объекта исследования использовано молоко, которое сходно со многими биологическими жидкостями по составу и структуре и представляет собой безопасный и доступный материал, удобный в экспериментальных исследованиях.

Как известно [14,15], основными структурными компонентами молока являются взвешенные в воде частицы молочного жира с плотностью $\rho \approx (940 \pm 50) \text{ kg/m}^3$ и частицы белка (казеин) с плотностью $\rho \approx (1400 \pm 50) \text{ kg/m}^3$. Кроме того, в состав молока входят частицы, составляющие молочную плазму, концентрация которых незначительна по сравнению с основными компонентами. Таким образом, молоко содержит частицы разного размера и разной плотности как выше, так и ниже плотности воды ($\rho \approx 1000 \text{ kg/m}^3$), что ведет к сложному характеру фракционирования его водных препаратов в поле силы тяжести.

Процесс гравитационного фракционирования, т. е. разделение частиц за счет изменения их положения в вертикальном направлении (вдоль оси z) в поле силы тяжести F_g , определяется также действием силы Архимеда F_A (выталкивающая, гидростатическая подъемная сила) с учетом вязкого сопротивления жидкости и броуновского движения. Схема, представляющая изменение

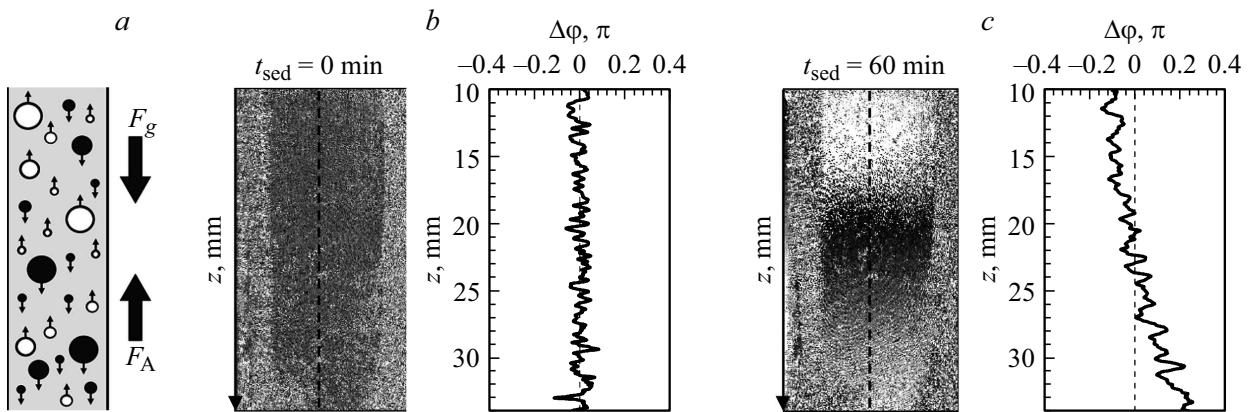


Рис. 1. *a* — Схема движения частиц с плотностью $\rho_p > \rho_l$ (•) и $\rho_p < \rho_l$ (○) в водных препаратах; F_g — сила тяжести, F_A — сила Архимеда (выталкивающая). *b, c* — водный препарат SiO_2 (0.01%) в исходном состоянии (*b*) и через 60 min после изготовления (*c*): слева — интерферограмма, справа — зависимость $\Delta\varphi(z)$.

положения частиц разной плотности по высоте столба жидкости, дана на рис. 1, *a*.

Для изучения пространственно-временных изменений препаратов молока был использован экспериментальный стенд, предназначенный для диагностики трансформаций прозрачных объектов методом цифровой голографической интерферометрии [11]. В узел объекта, вынесенный за пределы основной интерферометрической схемы, устанавливались две идентичные кюветы размером $10 \times 10 \times 40$ mm: одна — с исследуемым препаратом, вторая — с дистиллированной водой. Кювета с дистиллированной водой предназначалась для контроля пространственно-временной стабильности зондирующего пучка в течение эксперимента. Пучок зондирующего излучения ($\lambda = 532$ nm, рабочая область $\sim 25 \times 25$ mm) симметрично освещал обе кюветы на высоте $z = 10$ mm от поверхности жидкости.

Регистрация цифровых голограмм производилась в автоматическом режиме. Время проведения одной экспериментальной серии составляло 60 min: интервал между актами регистрации голограмм (1–10) s, время экспозиции ~ 0.001 s. Обработка экспериментальных результатов заключалась в выборке последовательности голограмм, характеризующих текущее состояние исследуемого образца, получении цифровых интерферограмм путем вычитания голограммы исходного состояния образцов из голограммы их текущего состояния и определении величины фазовых изменений $\Delta\varphi$ исследуемого препарата на высоте z в текущий момент времени по сравнению с его исходным состоянием (определение $\Delta\varphi(z)$ производилась по центральному сечению кюветы — пунктир на рис. 1, *b, c*). Учет пространственно-временных изменений зондирующего излучения производился по текущему состоянию контрольной кюветы с водой. Связь величины $\Delta\varphi$ с изменением показателя преломления исследуемого образца Δn устанавливалась

с помощью выражения:

$$\Delta\varphi = (2\pi \cdot \Delta n \cdot l) / \lambda, \quad (1)$$

где Δn — изменение показателя преломления образца в текущий момент времени по сравнению с его исходным состоянием при данном значении z , l — толщина кюветы, λ — длина волны зондирующего излучения в образце.

Вид зависимости $\Delta\varphi(z)$ характеризует изменения в структуре препарата по сравнению с его исходным состоянием и определяется, главным образом, процессом фракционирования. Рис. 1, *b* (справа) демонстрирует отсутствие фракционирования в начальном состоянии препарата, где изменения плотности ρ по высоте столба жидкости z не происходит и $\Delta\varphi(z) \approx \text{const}$. В то же время на рис. 1, *c* (справа) явно видно различие значений $\Delta\varphi(z)$ при разных значениях z . Для препарата кварца очевидно характерна прямая седиментация, сопровождающаяся увеличением плотности препарата в нижней части кюветы, и принятый положительным фазовый сдвиг $\Delta\varphi = +0.2\pi$ в нижней части кюветы ($z = 35$ mm) противоположен отрицательному сдвигу $\Delta\varphi = -0.2\pi$ в верхней части кюветы ($z = 10$ mm). В ситуации, когда $\Delta\varphi$ в верхней части кюветы выше, чем в нижней, превалирует процесс обратной седиментации.

Состав молока, содержащего взвешенные в воде тяжелые белковые и легкие жировые компоненты, допускает существование процессов как прямой, так и обратной седиментации. С целью обеспечения максимальной адекватности интерпретации экспериментальных результатов в проводимых исследованиях кроме препаратов молока были использованы водные препараты тонкодисперсного кварца и жировой эмульсии Интралипид в качестве модельных систем.

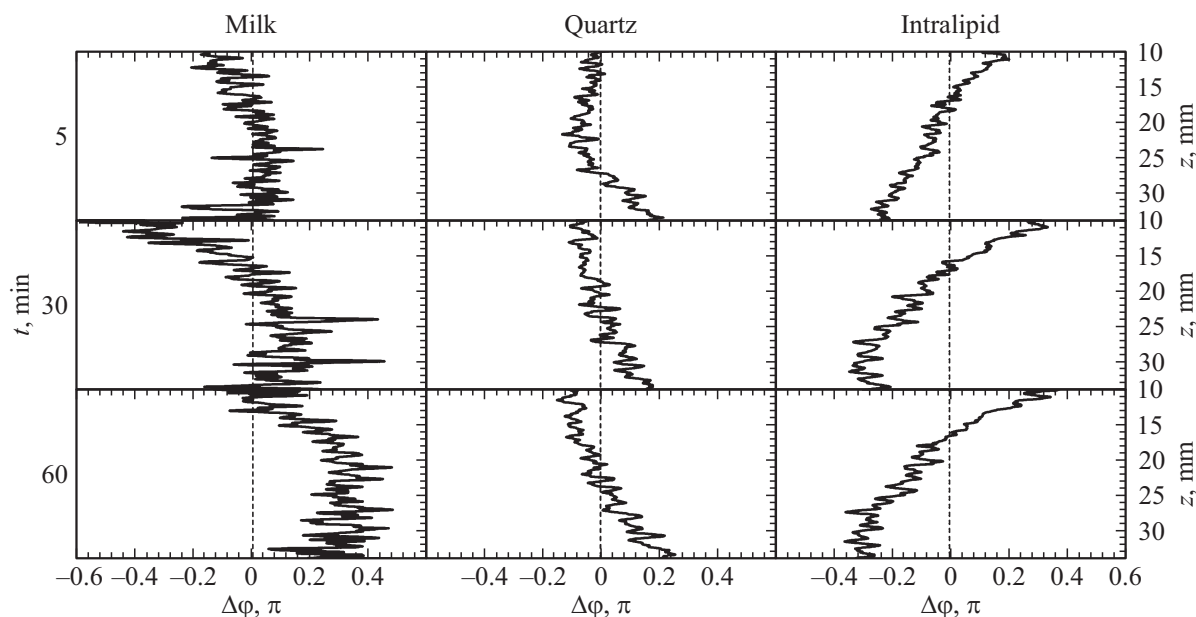


Рис. 2. Зависимость $\Delta\varphi(z)$ через 5, 30, 60 min после изготовления водных препаратов молока (0.1%), кварца (0.01%) и Интралипида (0.01%).

Экспериментальные результаты

Экспериментальные результаты приведены на рис. 2 в виде зависимости $\Delta\varphi(z)$ для водных препаратов молока, кварца и Интралипида через 5, 30 и 60 min после изготовления и в виде таблицы изменения показателя преломления исследуемых препаратов на разной высоте столба жидкости ($z = 10, 20, 30$ mm) также через 5, 30, 60 min после изготовления (табл. 1). Значения $\Delta n/n_o$ в табл. 1 получены по данным рис. 2 с использованием формулы (1) при значениях экспериментальных параметров $l = 10$ mm, $\lambda = 532$ nm (в воздухе), $n_o = 1.33$.

Результаты эксперимента показывают, что исследование водных препаратов методом ЦГИ позволяет устойчиво диагностировать наличие изменений по высоте столба жидкости за время наблюдения в препаратах как молока, так и кварца и Интралипида. Как и следовало ожидать, зарегистрированные изменения водного препарата Интралипида противоположны поведению кварца и указывают на обратную седиментацию.

Характер изменений в водных препаратах молока свидетельствует о том, что в них происходят как прямая, так и обратная седиментация соответственно белковых и жировых компонент молока. Скорости этих процессов различны и их одновременное действие приводит к сложной трансформации зависимости $\Delta\varphi(z)$ с течением времени: наблюдается уменьшение $\Delta\varphi$ в верхней части кюветы при $t = 30$ min и ее увеличение в дальнейшем; увеличение $\Delta\varphi$ в средней и нижней частях кюветы при $t = 60$ min.

Исследования препаратов методом ЦГИ сопровождались измерениями распределения частиц по размерам

Таблица 1. Изменения показателя преломления $\Delta n/n_o$ водных препаратов молока (0.1%), кварца (0.01%) и Интралипида (0.01%) на разной высоте столба жидкости z через 5, 30, 60 min после изготовления

$t, \text{ min}$	$z, \text{ mm}$	$\Delta n/n_o, 10^{-5}$		
		Молоко	Кварц	Интралипид
5	10	$-(0.3 \pm 0.1)$	$+(0.0 \pm 0.1)$	$+(0.4 \pm 0.1)$
	20	$+(0.0 \pm 0.1)$	$-(0.1 \pm 0.1)$	$-(0.1 \pm 0.1)$
	30	$+(0.1 \pm 0.2)$	$+(0.1 \pm 0.1)$	$-(0.4 \pm 0.1)$
30	10	$-(0.9 \pm 0.2)$	$-(0.1 \pm 0.1)$	$+(0.6 \pm 0.1)$
	20	$+(0.1 \pm 0.1)$	$+(0.0 \pm 0.1)$	$-(0.2 \pm 0.1)$
	30	$+(0.2 \pm 0.2)$	$+(0.2 \pm 0.1)$	$-(0.5 \pm 0.1)$
60	10	$+(0.1 \pm 0.2)$	$-(0.2 \pm 0.1)$	$+(0.6 \pm 0.1)$
	20	$+(0.6 \pm 0.2)$	$+(0.0 \pm 0.1)$	$-(0.2 \pm 0.1)$
	30	$+(0.7 \pm 0.3)$	$+(0.3 \pm 0.1)$	$-(0.6 \pm 0.1)$

Таблица 2. Параметры функции распределения частиц по размерам в водных препаратах молока (0.1%), тонкодисперсного кварца (0.01%) и Интралипида (0.01%) на высоте столба жидкости $z = 20$ mm, полученные методом динамического рассеяния света

	Молоко	Кварц	Интралипид
$D_{\text{char}}, \text{ nm}$	230 ± 10	$(280 \pm 20)/(2400 \pm 400)$	330 ± 4
$Q_{\text{char}} \%$	13 ± 1	7 ± 2	16 ± 1

методом динамического рассеяния света (ДРС) с использованием анализатора размера частиц Horiba LB-550.

Таблица 3. Смещение частиц исследуемых водных препаратов за 60 min в вертикальном направлении, S_Z , и за счет броуновской диффузии, S_B . Столбец I — диаметр частиц D_{exp} определен методом ДРС (см. табл. 2). Столбец II — размер частиц D_{calc} определен по формуле (4) для $S_Z = 10 \text{ mm}$

Препарат	$\rho_p, \text{ kg/m}^3$	I			II		
		$D_{\text{exp}}, \text{ nm}$	$S_Z, \text{ nm}$	$S_B, \text{ nm}$	$D_{\text{calc}}, \mu\text{m}$	$S_Z, \mu\text{m}$	$S_B, \text{ nm}$
Молоко-жир Молоко-белок	940	230	-6	± 117	9.1	+10	± 19
	1400		+42	± 117	3.5	-10	± 30
Кварц	2000	280	+154	± 106	2.2	+10	± 38
	2000	2400	+11 300	± 36			
Интралипид	920	330	-17	± 98	7.9	-10	± 20

Для каждого исследуемого препарата были измерены функции распределения частиц по размерам и определен характерный диаметр частиц D_{char} , соответствующий максимальной концентрации частиц в данном распределении Q_{char} . В табл. 2 приведены результаты измерений параметров препаратов, усредненные по четырем сериям измерений: в исходном состоянии, через 5, 30, 60 min после изготовления. Пучок тестирующего излучения диаметром $\sim 5 \text{ mm}$ проходил через кювету на высоте $z \sim 20 \text{ mm}$.

Как следует из рассмотрения результатов, полученных методом ДРС, за 60 min наблюдения изменения функции распределения частиц по размерам и характерного диаметра частиц, D_{char} , находятся в пределах погрешности измерений.

Следует отметить, что метод ДРС не позволяет оценивать функцию распределения частиц по размерам, если размер частиц более $6 \mu\text{m}$. Рассмотрение препаратов молока и Интралипида под микроскопом показало наличие в поле зрения отдельных крупных частиц размером порядка $10 \mu\text{m}$, которые не могли быть выявлены и измерены методом ДРС.

Анализ экспериментальных результатов

Полученные экспериментальные результаты были проанализированы с использованием формализма седиментационного анализа [9]. В первую очередь были проведены оценки возможного смещения частиц исследуемых препаратов в данных экспериментальных условиях при использовании выражений:

$$S_Z = \frac{2|\rho_p - \rho_l|gD^2}{8\mu} t, \quad (2)$$

$$S_B = \sqrt{\frac{kT}{3\pi\mu D}} t, \quad (3)$$

где S_Z — смещение частицы в вертикальном направлении, S_B — смещение частицы за счет броуновской диффузии, t — время наблюдения, D — диаметр частицы (предполагается сферическая форма), ρ_p и ρ_l —

плотность вещества частицы и жидкости соответственно, μ — вязкость жидкости, g — ускорение свободного падения, T — абсолютная температура.

Результаты расчета смещения частиц исследуемых водных препаратов за 60 min в вертикальном направлении, S_Z , и за счет броуновской диффузии, S_B , приведены в табл. 3 (столбец I) для частиц, размер которых D_{exp} определен методом ДРС (табл. 2). Как видно из полученных данных, смещение частиц молока и Интралипида в вертикальном направлении соизмеримо с хаотическим смещением за счет броуновского движения и не может обеспечить реального изменения плотности препарата по высоте столба жидкости в данных условиях. В столбце II табл. 3 приведены результаты расчетов, которые показывают, какой размер должны иметь частицы, чтобы их смещение за 60 min в вертикальном направлении составляло 10 mm и могло обеспечить диагностируемые данным методом изменения функции $\Delta\varphi(z)$. Расчеты величины D_{calc} производились по формуле (4) при $S = 10 \text{ mm}$.

$$D_{\text{calc}} = \sqrt{\frac{S \cdot 18\mu}{|\rho_p - \rho_l|gt}}. \quad (4)$$

Как показали расчеты, частицы исследуемых препаратов диаметром менее 250 nm практически не изменяют своего положения в вертикальном направлении, так как вертикальное смещение в определенном направлении сравнимо с хаотическим смещением за счет броуновского движения. Заметные пространственно-временные изменения в исследуемых препаратах, скорее всего, обусловлены наличием частиц с размерами порядка нескольких микрометров, которые невозможно проанализировать методом ДРС. В то же время метод ЦГИ позволяет оценить пространственно-временные изменения оптических параметров препаратов независимо от размеров и структуры составляющих его частиц.

Заключение

В работе показано, что метод цифровой голографической интерферометрии позволяет исследовать измене-

ние показателя преломления водных препаратов сложных биологических систем по высоте столба жидкости (при использовании стандартных кювет) с точностью 10^{-6} , что представляет значительные преимущества перед другими методами исследования.

Представлены экспериментальные результаты пространственно-временных трансформаций водных препаратов молока, представляющего собой биологическую жидкость с типичными компонентами. Анализ полученных результатов проведен с использованием экспериментальных данных и численного моделирования поведения отдельных компонент типичной биологической жидкости.

Установлено, что экспериментально наблюдаемые изменения показателя преломления препаратов молока обусловлены процессами как прямой, так и обратной седиментации отдельных компонент. Показано, что процессы седиментации отдельных компонент идут с различной скоростью, что приводит к сложному характеру фракционирования.

Результаты изучения пространственно-временной динамики фракционирования препаратов биологической жидкости в сочетании с другими методами исследования могут быть использованы при создании материальной модели (фантома) сложной биологической жидкости с заданными пространственно-временными характеристиками и при создании математической модели описания процессов фракционирования подобных систем.

Работа выполнена при государственной поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 08-08).

Список литературы

- [1] Тучин В.В. Оптическая биомедицинская диагностика. В 2-х томах. Т. 2. М.: Физмалит, 2007. 368 с.
- [2] Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. М.: Физмалит, 2010. 478 с.
- [3] Шляхто Е.В. Нанотехнологии в биологии и медицине. СПб.: Любавич, 2009. 320 с.
- [4] *Cerbino R., Cicuta P.* // J. Chem. Phys. 2017. V. 147. I. 11. P. 110901.
- [5] *Das S.K., Chois U.S., Yu W., Pradeep T.* Nanofluids: Science and Technology. Wiley-Interscience, 2008. 397 p.
- [6] Гордецов А.С. // Современные технологии в медицине. 2010. № 1. С. 84.
- [7] *Maslova M., Zaritskiy A., Chaykov L.* // Biophysical J. 2014. T. 106. N 2. С. 457a.
- [8] *Maurer-Spurej E., Labrie A., Pittendreigh C. et al.* // Transfusion. 2009. T. 49. № 11. С. 2276.
- [9] Фигуровский Н.А., Ребиндер П.А. Седиментометрический анализ. АН СССР, 1948. 332 с.
- [10] *Nishisako H., Kunishima H., Shimizu G. et al.* // J. General and Family Medicine. 2017. T. 18. N 3. С. 146–147.
- [11] Манухин Б.Г., Гусев М.Е., Кучер Д.А., Чивилихин С.А., Андреева О.В. // Опт. и спектр. 2015. Т. 119. № 3. С. 418; *Manukhin B.G., Gusev M.E., Kucher D.A., Chivilikhin S.A., Andreeva O.V.* // Opt. Spectrosc. 2015. V. 119. N 3. P. 392.
- [12] *Chigrin R.N., Andreeva N.V., Andreeva O.V.* // J. Phys.: Conference Series. 2016. V. 737. N 1. P. 012055.
- [13] Григорук В.И., Понезжа Г.В., Понезжа С.Г. // Опт. и спектр. 2008. Т. 104. № 6. С. 1033–1039; *Grigoruk V.I., Ponezha G.V., Ponezha S.G.* // Opt. Spectrosc. 2008. T. 104. N 6. С. 940–945.
- [14] Твердохлеб Г.В., Раманаускас Р.И. Химия и физика молока и молочных продуктов. М.: ДеЛи принт, 2006. 360 с.
- [15] Акулинин И.В., Осинцев А.М., Брагинский В.И. // Техника и технология пищевых производств. 2016. Т. 43. № 4. С. 212.