

MOGUĆNOSTI PRIMENE FAZNE DOPPLER ANEMOMETRIJE U ANALIZI KRVI

Ilić Jelena, Mašinski fakultet, Beograd
 Ristić Slavica, VTI Beograd
 Srećković Mileša, Elektrotehnički fakultet, Beograd

Sadržaj – U radu su analizirane mogućnosti primene fazne Doppler anemometrije, potvrđene metode merenja veličine čestice, u ispitivanju sastojaka krvi. Utvrđeno je koje parametre sastojaka krvi je neophodno prethodno ponavati i koji uslovi moraju biti ispunjeni, radi brzog dobijanja pouzdanih rezultata analize krvi.

1. UVOD

Optička merenja u krvi *in vivo* i *in vitro* su oblast koja je u poslednje vreme u ekspanziji. Razlog za to je što se pomoću njih mogu dobiti korisne informacije o značajnim hematološkim parametrima na nedestruktivni i relativno jednostavan način. Do skora su optička merenja parametara krvi uglavnom bila vezana za apsorpciju svetlosti od strane krvi. Ukupna prosečna apsorpcija svetlosti u krvnim ćelijama pruža podatke o stanju više bitnih fizioloških parametara krvi kao, što su stepen saturacije kiseonika, koncentracija hemoglobina i druge. Apсорpcija svetlosti u krvi se često meri detektovanjem ukupne odbijene i propuštene svetlosti jednog uzorka krvi ili prokrvljenog tkiva [1].

Međutim, makroskopski parametri rasejanja svetlosti u krvi ne otkrivaju detalje o morfologiji krvnih ćelija. Zbog toga poslednjih godina raste interes za proučavanjem rasejavajućih karakteristika pojedinačnih krvnih ćelija. Ta istraživanja u kombinaciji sa već razvijenim tehnikama merenja veličine i brojanja čestica bi mogla osetno da unaprede procedure analize krvi. Mada se još uvek radi na njenom usavršavanju u pomenute tehnike može da se ubroji i fazna Doppler anemometrija. U ovom radu će biti razmotreno pod kojim uslovima se princip ove metode može primeniti na analizu sastojaka krvi.

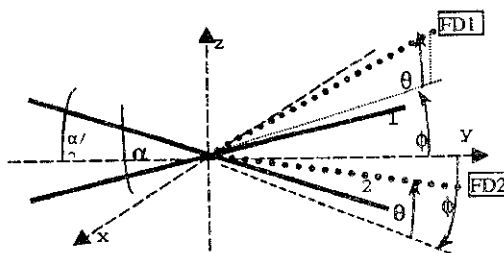
2. TEORIJSKE OSNOVE PDA

Fazna Doppler anemometrija (PDA) je metoda čija je pouzdanost u merenju veličine čestica potvrđena u širokom opsegu njihovih veličina (od nekoliko desetih delova do nekoliko stotina mikrometara) [2]. Zasnovana je na činjenici da signal na izlazu fotodetektora standardnog laser Doppler anemometrijskog sistema (sa ukrštenim snopovima), osim što daje podatak o brzini čestice koja prolazi kroz presek snopova (jednoznačno je određena njegovom frekvencijom), zavisi i od veličine i materijala čestice. Ranije se za očitavanje podatka o veličini čestice koristila vidljivost laser Doppler anemometrijskog - LDA signala tj. odnos intenziteta promenljive komponente (sa Dopplerovom frekvencijom) i jednosmerne komponente signala [3]. Međutim kalibracione krive za ovakav pristup merenju veličine čestice se nisu lako dobijale (određuje ih veliki broj faktora) i manje više sve su imale oscilatoran karakter [4]. Na sreću uočena je činjenica

da fazna razlika signala sa dva adekvatno postavljena detektora je linearno povezana sa prečnikom čestice. Ta jednostavna veza se objašnjava teorijom geometrijske optike.

Još je Van de Hulst pokazao [5] da se rasejanje na sfernim česticama za koje je Mie - ov parametar veći od 10 (što za slučaj talasne dužine snopa HeNe lasera predstavlja čestice poluprečnika od 1 μm pa više) može posmatrati kao istovremeno dešavanje četiri nezavisne pojave: odbijanje prelamanje, difrakcija i apsorpcija. Pošto je svetlost rasejana difrakcijom, kod pomenutih veličina čestica, koncentrisana u pravcima bliskim pravcu i smeru upadnog snopa, za uglove rasejanja veće od 20° u odnosu na upadni snop, rasejana svetlost je posledica odbijanja i prelamanja svetlosti.

Rezultat interferencije dva zraka, od kojih je svaki iz jednog od dva laserska snopa koji se seku, i prelama se kroz posmatranu česticu na primer bez unutrašnje refleksije (ili sa istim brojem refleksija, ili se odbija) određen je optičkom putnom razlikom ta dva zraka. Ta optička putna razlika je određena poluprečnikom i indeksom prelamanja čestice, talasnom dužinom svetlosti i geometrijom sistema tj. uglom pod kojim se seku snopovi α i pravcem u kome se prihvata rasejana svetlost (θ i ϕ). Kod standardnih fazno Doppler anemometrijskih sistema (PDA sistema) foto detektori se postavljaju pod istim uglom elevacije θ u odnosu na ravan u kojoj se nalaze laserski snopovi (off - axis), a pod malim uglovima ϕ (često simetrično) u odnosu na ravan koja je normalna na ravan snopova i sadrži simetralu ugla između njih. Skica geometrije jednog takvog sistema data je na slici 1.



S1. 1. Geometrija standardnog PDA sistema

Pravac toka čestice se poklapa sa pravcem x ose. Dva detektora FD1 i FD2 su postavljena simetrično u odnosu na ravan simetrije sistema pod uglom ϕ . Fazni pomeraj između signala sa ova dva detektora, u slučaju da je jedan mod rasejanja dominantan, upravo je proporcionalan prečniku

rasejavajuće čestice. U oblastima uglova za koje je dominantan mod rasejanja odbijanje, fazna razlika signala sa dva detektora je:

$$\Delta\psi = \frac{2\pi d}{\lambda} \frac{\sin\theta \sin\phi}{\sqrt{2\left(1 - \cos\theta \cos\phi \cos\frac{\alpha}{2}\right)}} \quad (1)$$

gde je d prečnik čestice, λ talasna dužina svetlosti laserskog snopa. U oblastima uglova za koje je dominantni mod rasejanja prelamanje prvog reda (tj. bez unutrašnje refleksije) fazni pomeraj signala sa dva detektora je:

$$\Delta\psi = \frac{-2\pi d}{\lambda} \frac{n \sin\theta \sin\phi}{\sqrt{2\left(1 + \cos\theta \cos\phi \cos\frac{\alpha}{2}\right)} \left(1 + n^2 - n \sqrt{2\left(1 + \cos\theta \cos\phi \cos\frac{\alpha}{2}\right)}\right)} \quad (2)$$

gde je n relativni indeks prelamanja čestice u odnosu na fluid u kome je suspendovana.

Ograničenje ove metode je što striktna teorija fazne Doppler anemometrije važi samo za čestice sfernog oblika. Ovde je pogodno obratiti pažnju na činjenicu da, pošto se detektori u praksi postavljaju pod malim uglovima ϕ , sva svetlost, koja kroz rasejavajuću česticu dopire do njih, prolazi kroz uzani odsečak sfere, praktično disk, čije su osnovne paralelne y - z ravni. Sve ravni rasejanja, kojima pripadaju zraci koji dopiru do fotodetektora, blisko stoje uz y - z ravan i same su pod veoma malim uglovima u odnosu na nju. To znači da, ako bi imali ne sferu nego odsečak sfere – skoro disk u y - z ravni fazni Doppler anemometar bi davao podatak o prečniku tog diska – bitan je samo položaj diska u odnosu na laserske snopove i detektore. Ovo je značajan zaključak, u vezi sa analizom sastojaka krvi jer su eritociti približno oblika diska.

3. KARAKTERISTIKE SASTOJAKA KRV I

Krv i plazma su komplikovani koloidni rastvori. Krv se sastoji od krvne plazme u kojoj su dispergovane slobodne ćelije krvi. Krvna plazma je međućelijska viskozna tečnost žućkaste boje. Njen indeks prelamanja svetlosti je $n_0=1,345$ [1] za svetlost HeNe lasera. U slobodne ćelije krvi spadaju krvne ćelije – eritociti i leukociti, i citoplazmatični fragmenti – krvne pločice. U normalnom hematokritu (odnos zapremine tečnosti i zapremine slobodnih ćelija krvi) 35-50% zapremine krvi zauzimaju čestice krvi od kojih najviše zauzimaju eritociti 42-47%, a zatim 1% leukociti i vrlo malo pločice [6]. Ovim redom se i izdvajaju na zidovima prilikom centrifuge radi merenja tih zapremina.

Normalni eritociti (crvena krvna zrnca) su pločice u obliku bikonkavnog sočiva. Prosečni prečnik je $7,7\mu\text{m}$ ($6,5$ - $8\mu\text{m}$). Debljina na širem delu im je $2\mu\text{m}$ a na najužem delu u sredini $1\mu\text{m}$. Prosečna zapremina im je $83\mu\text{m}^3$. Međutim prolazeći kroz kapilare oni menjaju oblik. Praktično se mogu zamisliti kao vreće, koje mogu da zauzmu bilo koji oblik. Membrana je velika u odnosu na sadržaj ćelije i od deformacije ne puca, što se inače dešava ostalim ćelijama.

Njihova normalna koncentracija u krvi je $5,2 \times 10^6$ $1/\text{cm}^3$ kod muškaraca i $4,7 \times 10^6$ $1/\text{cm}^3$ kod žena. Relativni indeks prelamanja materijala eritrocita u odnosu na krvnu plazmu je $n=1,045$.

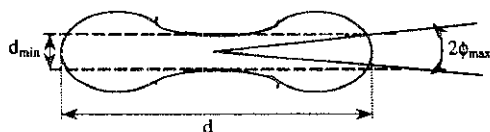
Leukociti (bela krvna zrnca) se dele na granulocite (granularnog oblika) i agranulocite. U granulocite spadaju neutrofilni (najbrojniji 55-70%, veličine 7 - $9\mu\text{m}$), eozinofili (2-4%, veličine 9 - $10\mu\text{m}$), bazofili (0,5-1%, veličine 7 - $8\mu\text{m}$) i štapičasti (3-5%). U agranulocite spadaju monociti (4-6% veličine 10 - $12\mu\text{m}$) i limfociti (20-40%, mali veličine 6 - $8\mu\text{m}$ i tzv. veliki 10 - $12\mu\text{m}$).

Pošto granulociti imaju granularni oblik, blizak sfernom, može se očekivati da će za njih važiti teorija PDA, mada je potrebno i razmotriti koliko njihova neravna površina utiče na grešku merenja njihove veličine. Nije poznato da je meren njihov indeks prelamanja svetlosti – rasejanje unazad – mogla da da broj i veličinu granulocita ali, zbog preklapanja opsega njihovih veličina ne bi se dobila njihova raspodela po vrsti (leukocitna formula). Za to bi bilo neophodno poznavati i njihove indekse prelamanja, koji su, može se očekivati različiti za različite vrste ćelija, a zatim primeniti PDA istovremeno: 1. sa odbijenom svetlošću tj. rasejane unazad (da bi se odredila veličina) i 2. sa svetlošću koja je pretrpela prelamanje prvog reda – oštri uglovi rasejanja, da bi se na osnovu poznate veličine odredio indeks prelamanja ćelije a samim tim i njena vrsta. Ipak, zbog značajne apsorpcije, moguće je da bi refleksioni mod ometao merenje u refrakcionom modu.

Rasejavajuća svojstva eritrocita su mnogo više proučavana, zato što su oni mnogo brojniji pa samim tim i glavni rasejivači svetlosti u krvi. LDA se inače normalno koristi u merenjima tokova krvi u tkivima [7] [8], pa je radi usavršavanja te i sličnih metoda potrebno detaljnije proučavanje rasejanja svetlosti na krvi a pogotovu na eritrocitima. Primenljivost Lorenz-Mie-ove teorije, u ovim istraživanjima, nije očigledna jer su eritociti bikonkavni diskovi, a ne sfere. Međutim, neki proračuni koeficijenta apsorpcije i koeficijenta rasejanja kao i fazne funkcije (faktora anizotropije g) na osnovu te teorije su dale rezultate, koji se zadovoljavajuće poklapaju sa merenjima [9]. Pri proučavanju rasejanja svetlosti na krvi, kao fantom za njenu simulaciju su korišćene sfere polistirena dispergovane u vodi sa prihvatljivim poklapanjima rezultata [9].

Za razliku od prethodno pomenutih ispitivanja makroskopskih rasejavajućih svojstava krvi i eritrocita, od nedavno se sve više sreću izveštaji o pokušajima za dobijanje podataka o mikroskopskim karakteristikama eritrocita kao što su veličina, oblik, orijentacija u prostoru i dr. Da bi se ovi podaci dobili neophodan je eksplicitni model koji tretira rasejanje na pojedinačnom eritocitu. Postoji nekoliko metoda rešavanja Maksvelovih jednačina za oblike slične obliku eritrocita [1]. Svaki od njih koristi drugačije aproksimacije. Pošto je prečnik eritrocita oko deset puta veći od talasne dužine vidljive svetlosti na njih nije primenljiva ni Rayleigh – eva teorija. U referenci [1] je, radi utvrđivanja

uticaja oblika ćelije na rasejanje, korišćen formalizam T-matrice što predstavlja metod rešavanja Maxwellovih jednačina za spljoštene i izdužene sferoide. Zaključeno je da površina čestice na udaru snopa mnogo utiče na rasejanje unazad, a da ukupan oblik ćelije i njena optička gustina određuje rasejanje unapred. Zatim je utvrđeno da je neophodno da su ćelije na dovoljno velikom rastojanju ($>$ dva maksimalna prečnika) da bi mogle da se smatraju nezavisnim rasejavajcima. Takođe su dati dijagrami rasejanja čije detaljno proučavanje bi koristilo u određivanju položaja fotodetektora kod primena LDA sistema u ispitivanju eritrocita.



Sl. 2. Eritrocit u položaju u kome ga detektor "vidi" kao sferu

Uzimajući u obzir zapažanje izneto u drugom delu ovog rada, ako je eritrocit postavljen tako da je njegov najveći presek u y-z ravni i ϕ je dovoljno malo tako da svi zraci, koji dolaze do detektora prolaze samo kroz deo eritrocita koji se može smatrati ošekom sfere, onda fotodetektor i "ne primećuju" da eritrocit nije sfernog oblika. U tom slučaju teorija PDA važi i za oblik eritrocita i sistem kao rezultat daje prečnik njegovog najvećeg preseka. Da bi ovo važilo neophodno je ispuniti dva uslova:

1) da eritrocit prolazi kroz presek snopova tako da je njegov najveći presek u ravni simetrije PDA sistema. Retko se sreće slučaj da su eritrociti haotično orijentisani zato što su za vreme merenja uglavnom u toku. Takav je slučaj i kod PDA sistema. Dakle, svi eritrociti će biti orijentisani na isti način, ali kakav tok krvi treba obezbediti da bi se ispunio prvi uslov, problem je iz oblasti hidrodinamike. Rešenje tog problema se može proveriti i modelom krvi uz primenu odgovarajućih principa dinamičke sličnosti.

$$2) \operatorname{tg} \phi = \frac{l}{2R} < \frac{d_{\min}}{d} \approx \frac{1}{8} \Rightarrow \phi < 7,1^\circ$$

gde je l rastojanje između fotodetektora, a R njihovo rastojanje od mernе zapremine. d_{\min} je debljina eritrocita na najužem delu, a d prečnik najvećeg poprečnog preseka.

Detaljnija analiza oblika eritrocita možda bi dozvolila i neki stabiliji uslov za rastojanje između fotodetektora. Međutim, kako se faza meri po modulu 2π ovaj uslov mora da bude i još strožiji. Na primer, ako je $\phi=2^\circ$, vrednosti faze razlike signala, kod dominantnog moda prelamanja prvog reda, pri prolasku eritrocita kroz meernu zapreminu, kretaće se od 2,8 (za najmanje eritrocite od $6,5\mu\text{m}$) do 3,44 ($8\mu\text{m}$). 3,4 po modulu π je 0,3 što odgovara veličini sfere od $0,7\mu\text{m}$. Dakle ϕ je preveliko za dati opseg veličina.

4. ZAKLJUČAK

U radu su analizirane mogućnosti primene PDA u analizi krvi, pri čemu su uzimani u obzir oblik veličina i druga rasejavajuća svojstva sastojaka krvi. Pod određenim uslovima metoda je primenljiva u ispitivanju sastojaka krvi. Očekuje se da će istraživanja rasejanja svetlosti na pojedinačnim krvnim ćelijama, koja se trenutno rade u svetu, doneti i nove informacije korisne za uspešniju primenu PDA u analizi krvi.

LITERATURA

- [1] A.M.K. Nilsson, P. Alsholm, A. Karlsson, S. Andeersson-Engels, "T-matrix computations of light scattering by red blood cells", *Appl. Opt.* 37, str. 2735-2747, 1998.
- [2] Dantec Measurement Technology Presentation, 2000.
- [3] W.M. Farmer, "Measurement of Particle Size, Number Density and Velocity Using Laser Interferometer", *Appl. Opt.*, 11, str. 2603-2612, 1972.
- [4] W.P. Chew, D.M. Robinson, "Scattering from a moving spherical particle by two cross coherent plane waves", *Appl. Opt.* 16, str. 619-626, 1977.
- [5] H.C. van de Hulst, *Light Scattering by Small Particles*, New York: Wiley Inc. 1957.
- [6] Ured. D. Perović, *Histologija*, Gornji Milanovac: Dečije Novine, 1990.
- [7] F.Ring, "Infrared Laser Doppler Imaging - Skin Temperature and Perfusion Studies", 7th European Congress of Thermology", 1998.
- [8] B. Mathews, N. Vongsavan, Advantages and Limitations of Laser Doppler Flowmeters, Lawrenz Bibliography, 1998.
- [9] A. Kienle, M.S. Patterson, L. Ott, R. Steiner, "Determination of the scattering coefficient and the anisotropy factor from laser Doppler spectra of liquids including blood", *Appl. Opt.* 35, str. 3404-3412, 1996.

Abstract - The possibilities of the application of phase Doppler anemometry, as approved particle sizing technique, on blood constituents analysis are considered in the paper. The parameters of blood constituents that has to be known beforehand and the conditions that must be fulfilled in order to obtain reliable results quickly, are identified.

POSSIBILITIES OF PHASE DOPPLER ANEMOMETRY APPLICATION IN ANALYSIS OF BLOOD

J.Ilić, S.Ristić, M. Srećković