

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физики и методико-
информационных технологий

**Контроль формы эритроцитов
методами интерференционной
микроскопии**

АВТОРЕФЕРАТ К ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЕ
БАКАЛАВРА

студента 5 курса 561 группы
направления подготовки 44.03.01
«Педагогическое образование»,
профиль «Физика»
физического факультета
Хмелевского Никиты Валерьевича

Научный руководитель:
старший преподаватель



20.06.2016г.

М.Н. Нурлыгаянова

Зав. кафедрой ФиМИТ,
д.ф.-м.н., профессор



Б.Е. Железовский

Саратов 2016

Введение

Голография была открыта Габором, как новый безлинзовый метод визуализации в электронной микроскопии. Главное продвижение практического применения голографического метода для восстановления волнового фронта амплитуды и фазы появилось с изобретением лазера, как сильного источника когерентного света [1]. Разделение действительного изображения от двойного выполняется путем наклона опорной волны (внеосевая геометрия) было предложено Лейтом и Упатниексом. Это стало крупным достижением голографии. В основном голографические методы используются для обнаружения смещений объекта, статических напряжений, изменения температуры или контроля вибрации. С 1970-ых голографические методы, основанные на вне - осевой голографии Лейта, были также применены в междисциплинарных областях биомедицины и наук о жизни так же как в новых областях исследования, таких как биофотоника [1]. При помощи методов голографической микроскопии для биомедицинских исследований открываются новые возможности для визуализации и слежения смещения, движения, поскольку эти методы позволяют проводить неинвазивное исследование морфологии биологических тканей и отдельных клеток. К примеру, для раннего диагноза злокачественных опухолей, это особенно интересно, чтобы различить различные эластичности ткани, особенно в комбинации с эндоскопическим осмотром углубления [1]. В совокупности с микроскопией, современными ПЗС технологиями, и системами обработки изображения, цифровая голография имеет высокую разрешающую способность и мультифокусный анализ восстановленных поверхностей. В связи с установившимся алгоритмом для численной реконструкции цифровых голограмм и для автоматической оценки измерений, были созданы настраиваемые и компактные цифровые голографические инструменты микроскопии, для интеграции в современных системах микроскопии. Таким образом, становятся доступными новые

применения для количественной визуализации живых клеток и методов с высокой разрешающей способностью.

Цель работы: исследование изменения формы и фотодинамической активности эритроцитов методами интерференционной микроскопии.

Основная часть

Эритроциты (также известные под названием красные кровяные тельца) — клетки крови человека, позвоночных животных и некоторых беспозвоночных. Основной функцией эритроцитов является перенос кислорода из лёгких к тканям тела и транспорт диоксида углерода (CO₂) в обратном направлении.

Помимо участия в процессе дыхания, они выполняют в организме следующие функции:

- участие в регулировке кислотно-щелочного равновесия(pH);
- участие в процессе свертывания крови за счет содержания факторов свертывающей и противосвертывающей систем крови
- абсорбируют из плазмы крови аминокислоты, липиды и переносят их к тканям.
- дыхательная функция: выполняется эритроцитами за счёт гемоглобина, который обладает способностью присоединять к себе и отдавать кислород и углекислый газ.
- питательная функция: состоит в транспортировке аминокислот к клеткам организма от органов пищеварения.
- защитная: определяется функцией эритроцитов связывать токсины за счёт наличия на их поверхности специальных веществ белковой природы — антител.
- ферментативная: эритроциты являются носителями разнообразных ферментов

Формирование эритроцитов (эритропоэз) происходит в костном мозге черепа, рёбер и позвоночника, а у детей — ещё и в костном мозге в окончаниях длинных костей рук и ног. Продолжительность жизни — 3—4 месяца, гемолиз происходит в печени и селезёнке. Прежде чем выйти в кровь, эритроциты последовательно проходят несколько стадий пролиферации и дифференцировки в составе эритрона — красного ростка кроветворения. Содержимое эритроцита представлено главным образом дыхательным пигментом гемоглобином, обуславливающим красный цвет крови. Однако на ранних стадиях количество гемоглобина в них мало, и на стадии эритробластов цвет клетки синий; позже клетка становится серой и, лишь полностью созрев, приобретает красную окраску [2].

Изменения морфологии эритроцитов

Морфология эритроцитов изменяется при гематологических заболеваниях и синдромах. Они выражаются в уменьшении размеров, изменении формы эритроцитов, интенсивности и характера окрашивания, появлении патологических включений. О морфологии эритроцитов судят при исследовании окрашенных мазков крови с помощью иммерсионной системы микроскопа.

Изменения размера

Микроцитоз — преобладание в мазках крови эритроцитов с диаметром 5,0—6,5 мкм. Наблюдается при наследственном сфероцитозе, железодефицитной анемии, талассемии. Все эти клетки имеют уменьшенный объем и меньшее количество гемоглобина. В основе изменений размеров эритроцитов лежит нарушение синтеза гемоглобина.

Макроцитоз — присутствие в мазках крови эритроцитов диаметром >9,0 мкм. Выявляют при макроцитарных анемиях, заболеваниях печени, дефиците витамина В12 и фолиевой кислоты, анемии беременных, злокачественных образованиях, гипотиреозе, лей козах.

Мегалоцитоз — появление в мазках крови эритроцитов диаметром 11,0—12,0 мкм, гиперхромных, без просветления в центре, овальной формы. Наличие мегалоцитов в мазках крови характерно для анемий, обусловленных дефицитом витамина В12 и фолиевой кислоты, а также для анемии при глистных инвазиях.

Анизоцитоз — присутствие в мазках крови эритроцитов, различающихся по размеру: с преобладанием эритроцитов малого диаметра (микроанизоцитоз) и большого диаметра (макроанизоцитоз). Анизоцитоз — ранний признак анемии, изолированно, без других морфологических изменений в эритроцитах развивается при легких формах анемии.

Изменения окраски

Среди изменений окраски эритроцитов наиболее часто встречается бледная окраска эритроцитов с более широкой неокрашенной центральной частью — гипохромия эритроцитов, которая обусловлена низким насыщением эритроцита гемоглобином. Гипохромия эритроцитов — характерный признак железодефицитных анемий, при этом гипохромия, как правило, сочетается с микроцитозом. Гипохромия возможна при отравлениях свинцом, талассемии и других наследственных повреждениях эритроцитов. Усиленная окраска эритроцитов — гиперхромия — связана с повышенным насыщением эритроцитов гемоглобином. Она встречается значительно реже, сочетается с макро- и мегалоцитозом. Эти изменения характерны для больных с дефицитом витамина В12 и фолиевой кислоты, могут наблюдаться при анемии Аддисона—Бирмера, дифиллоботриозе, злокачественных опухолях желудка, кишечника, алкоголизме. Изменение окраски эритроцитов в виде полихроматофилии (эритроциты сероватого цвета) обусловлено окраской кислыми и основными красителями. В норме встречаются единичные полихроматофильные эритроциты. Их количество повышается при усиленном эритропоэзе (постгеморрагические анемии, гемолитические анемии после криза).

Включения в эритроцитах

Включения являются элементами патологической регенерации костного мозга. Кольца Кебота — остатки ядерной оболочки мегалобласта, имеют вид колечка, восьмерки, окрашиваются в красный цвет. Кольца Кебота обнаруживают при дизэритропоэзе, в частности при мегалобластных анемиях (В12 и фолиеводефицитные), талассемии, остром эритромиелозе. Тельца Жолли — мелкие фиолетово-красные включения, встречаются по 2—3 в одном эритроците, являются остатками ядра мегалобласта. В норме тельца Жолли выявляют только в крови новорожденных. Их постоянно находят в мазках крови после спленэктомии. Тельца Жолли можно обнаружить при отравлениях гемолитическими ядами, анемиях различного генеза. Базофильная зернистость — агрегированная базофильная субстанция в виде синих гранул, лучше выявляется при окраске метиленовым синим. Появление базофильной зернистости в эритроцитах характерно для свинцового отравления (образована агрегатами рибосом и железосодержащих митохондрий), но может встречаться при сидеро- и мегалобластной анемиях, талассемии. Тельца Гейнца—Эрлиха — единичные или множественные включения, образованные из денатурированного гемоглобина, выявляют при окраске метиловым фиолетовым. Тельца Гейнца—Эрлиха — первый признак наступающего гемолиза, их находят при отравлениях гемолитическими ядами, анемиях, вызванных дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы.

Итак, исследование живых биологических клеток при помощи световой микроскопии широко распространено в медицине. Однако, проводя анализ клеток, мы имеем не полную информацию об их структуре и внутренних свойствах [6]. Различные участки поверхности объекта имеют различную отражающую способность, чему могут быть различные причины. Например, рассеивающие и поглощающие свойства веществ, из которых состоит объект,

и их спектральная зависимость, что приводит к появлению не только темных или светлых участков на микроскопическом изображении, но и к окрашиванию поверхности, наличие рельефа поверхности, при отражении от которого излучение выходит за пределы угловой апертуры микрообъектива и не возвращается в микроскоп, в результате чего участок поверхности выглядит темным. Зачастую по микроскопическому изображению сложно разделить влияние тех или иных причин, приведших к формированию наблюдаемого в нем распределения освещенности. Более того, так называемые фазовые неоднородности объекта, изменяющие только фазу светового поля в изображении, не изменяют его освещенность. Это послужило одной из причин для разработки ряда методов контрастирования микроскопических изображений, таких как метод фазового контраста, флуоресцентная микроскопия, метод темного поля и метод интерференционной микроскопии [7]. В следующей главе перейдем непосредственно к методам изучения.

Микроскопическое изображение, получаемое посредством светового микроскопа, представляет собой двумерное распределение отражающей способности по поверхности образца (или пропускания, если используется схема в проходящем свете и прозрачный объект), при этом теряется существенная часть информации об этой поверхности – информация о рельефе [7]. По микроскопическому изображению можно сделать лишь общие качественные выводы о характере рельефа, но сказать, какова высота какого-либо участка поверхности относительно другого нельзя. Причина этого заключается в том, что микроскопическое изображение в основном несет информацию о том, какая доля энергии отразилась от того или иного участка поверхности объекта и достаточно грубо позволяет определить рельеф поверхности - насколько далеко, или близко этот участок располагается. Так же существует метод исследования микронеоднородностей на основе интерференции прошедших через поверхность вещества световых пучков и миновавших ее. Этот метод носит

название интерференционная микроскопия. В этом случае, существует возможность исследования структуры различных, биологических объектов, и возможность измерения их сухой массы, толщины и показателя преломления, производятся интерференционные измерения интегральных и локальных параметров фазовых микрообъектов. Фазовые микрообъекты, прозрачные для излучения видимого оптического диапазона, широко распространены как в промышленности, так и в биологии и медицине. К ним относятся различные полимерные пленки, кристаллы, оптические микродетали, оптоволоконные изделия и, наконец, биологические микрообъекты – клетки и др. Показатель преломления связан с поляризуемостью белковых структур клетки, следовательно, фазовое изображение несет ценную диагностическую информацию о состоянии биологического микрообъекта. Поэтому с помощью интерференционного микроскопа можно вести мониторинг состояния, как отдельной клетки, так и целой популяции клеток [8]. Это может быть использовано, например, для диагностики состояния системы крови. Количественные исследования характеристик фазовых микрообъектов можно проводить только с помощью интерференционных микроскопов. Одной из тенденций современной интерференционной микроскопии является создание самостоятельных оптических узлов с микрообъективами, реализующих тот или иной вид интерференционной схемы (микрообъектив-интерферометр). Известны такие схемы, реализованные для интерферометров Физо, Миро, Майкельсона и Линника [9,10]. Традиционно расшифровка интерферограмм, полученных на таких микроскопах, производилась вручную. Только в последние десятилетия были предложены и освоены алгоритмы автоматической расшифровки интерферограмм, которые впоследствии были применены и в интерференционных микроскопах. Этому способствовало появлением быстрых ПЭВМ, систем захвата и обработки изображений, высокочувствительных ПЗС-камер [10].

Идея, положенная в основу интерференционного микроскопа, заключается в том, чтобы при помощи светового микроскопа не только получить увеличенное изображение поверхности объекта, но и восстановить рельеф этой поверхности. Иными словами необходимо обеспечить в микроскопе регистрацию не только амплитуды отраженной от объекта световой волны, но и ее фазы. Однако, проводя анализ клеток, мы имеем не полную информацию об их структуре и внутренних свойств. Метод интерференционной микроскопии является распространенным и доступным инструментом для исследования оптических свойств и микроструктуры слоистых объектов. В методе интерференционной микроскопии на поле микроскопического изображения объекта накладывается когерентное ему, отражённое от опорного зеркала опорное световое поле. Между предметным световым полем и опорным возникает интерференция. Вид интерференционной картины зависит как от характера рельефа поверхности прозрачного объекта, так и от его внутренней структуры. Интерферировать с опорным полем может не только волна, отражённая от поверхности объекта, но и волна, отражённая от любой оптической неоднородности внутри самого объекта. Если объект представляет собой однородную структуру с незначительным изменением рельефа поверхности, то толщина этой плёнки может быть измерена по цветовой окраске интерференционных полос равной толщины при использовании источника белого света в отсутствие опорного пучка. Однако если объект имеет неоднородную структуру и изменение его оптической толщины превышает половину продольной длины когерентности используемого источника белого света, измерение его геометрических характеристик в такой схеме становится невозможным без использования опорного пучка света.

Голография это особый, специфический метод записи оптической волны и последующего ее восстановления. Специфика голографической

записи состоит в том, что на фоточувствительную среду записывают не изображение, а интерференционную картину от двух волн.

Одна из этих волн исходит от объекта. Объектом может быть любой предмет, в частности это может быть частично прозрачная плоская картина. Эту волну обычно называют объектной, или предметной, или сигнальной волной. Она содержит оптический сигнал и образуется в результате взаимодействия когерентной волны с объектом. Вторая волна – опорная. Она формируется из излучения того же когерентного источника, который освещает объект. С этой целью при проведении записи голограммы пучок излучения лазера разделяют на два оптических пучка, один из которых будет опорным, а второй после взаимодействия с объектом будет сигнальным [12]. В качестве опорной волны часто используют волну с плоским волновым фронтом или сферическую волну. Простая форма волнового фронта в значительной степени упрощает процесс последующего восстановления изображения. Для записи оптической голограммы волнового поля, рассеянного объектом, необходимо использовать опорную волну, взаимно когерентную объектному полю, для формирования картины интерференции этих двух волн [5]. Эта интерференционная картина содержит всю информацию об амплитудном и фазовом пространственных распределениях волнового поля, достаточную для его последующего восстановления. Одна из возможных схем записи голограммы представлена на рис. 6. Лазерный пучок света делится с помощью делителя BS на два пучка, один из которых с помощью зеркала M1 направляется на объект S, а второй пучок – опорный, с помощью зеркала M2 и направляется непосредственно на фоторегистрирующую среду PD, например, фотопластинку в обычной аналоговой голографии, или матричный фотоприемник в цифровой голографии. Рассеянное (отраженное) объектом волновое поле также попадает на фоторегистратор и интерферирует с опорной волной.

Цифровая голография сохраняет главное преимущество классической голографии - возможность восстановления комплексной амплитуды объектного поля, что позволяет осуществлять интерференционные исследования контролируемого фазового объекта. Для восстановления комплексной амплитуды был использован разработанный автором работы алгоритм реализации численных процедур восстановления комплексной амплитуды объектного поля, который выполнялся при помощи программного обеспечения LabVIEW с использованием библиотеки IMAQ Vision. **LabVIEW** (англ. **L**aboratory **V**irtual **I**nstrumentation **E**ngineering **W**orkbench) — это среда разработки и платформа для выполнения программ, созданных на графическом языке программирования «G» фирмы National Instrument (США) [19]. Программа LabVIEW называется и является виртуальным прибором (англ. Virtual Instrument) и состоит из двух частей:

- блочной диаграммы, описывающей логику работы виртуального прибора;
- лицевой панели, описывающей внешний интерфейс виртуального прибора.

Разработанное программное обеспечение позволяет реализовать процедуры численного восстановления комплексной амплитуды и интенсивности объектного поля в плоскости его изображения, с записанной цифровой голограммы, а также последующий многоэкспозиционный интерференционный анализ динамики изменения изучаемого фазового объекта.

Информация о фазе восстановленной предметной волны позволяет осуществлять интерференционное сравнение предметных волн, соответствующим разным моментам времени. В таком случае формируется изображение - интерферограмма, позволяющая численно оценить изменение размера и формы эритроцитов. Интерференционное сравнение проведено не было, поскольку не удалось фиксировать пространственное положение

живого эритроцита во время эксперимента. Решить эту задачу планируется в будущем.

Заключение

Голографический интерференционный микроскоп как прибор, позволяющий получать изображения-интерферограммы микрообъектов, может быть использован для исследования морфологии эритроцитов крови человека. Сочетание в одном устройстве голографического интерферометра с видеосистемой считывания информации и системой компьютерной обработки позволит получать информацию о динамике изменения микрообъектов и микропроцессов. Морфология эритроцитов претерпевает изменения не только при гематологических заболеваниях, но и при патологии различного генеза и отражает состояние всего организма.

При выполнении данной дипломной работы:

- апробирована методика цифровой голографической микроскопии для контроля изменения состояния мембраны, размера и формы эритроцитов в ходе их темнового взаимодействия с суспензией гидрофилизированных наночастиц фуллероидного типа;
- разработано программное обеспечение для численной реконструкции комплексной амплитуды объектного поля;
- показано, что происходят увеличение размера клеток суспензии и перераспределение связанных с мембраной наночастиц, приводящие к возрастанию оптической плотности суспензии;
- проведено исследование определения рельефа поверхности при помощи интерференционного микроскопа Линника.

При сравнении интерферограмм реальных объектов можно выявить ряд общих черт в картине распределения интерференционных цветов по поверхности исследуемого объекта, положения и характера искривления центральной полосы, контраста интерференционных полос. Разработанное программное обеспечение позволяет производить качественную и количественную оценку цифровых голограмм. Исследование трехмерной

морфологии эритроцитов может стать частью общего гематологического анализа. Относительная простота и доступность (а самое главное – высокая точность измерений) голографических интерференционных методов, реализуемых в одном устройстве микроскопа, делает его оперативным прибором различных медицинских исследований. Определение формы клеток крови и их изменения при различных заболеваниях представляет не только научный интерес, но и может явиться методом оперативной диагностики, дополняющим уже известные методы клинических исследований.