

DIJAGNOSTIKA ANSAMBLA ČESTICA ILI TKIVA NA OSNOVU EFEKATA RASEJANJA

Jelena Ilić, *Mašinski fakultet, Beograd,*
Slavica Ristić, *VSCG, Beograd,*
Stanko Ostojić, *Tehnološko metalurški fakultet, Beograd,*
Saša Milić, *Institut Nikola Tesla, Beograd,*
Radovan Radovanović, *Policajska Akademija, Beograd*

Sadržaj – Od dijagnostičkih tehnika zasnovanih na rasejanju svetlosti, koje se već uveliko koriste u tehničkim sistemima, da bi se koristile i kod bioloških sistema, zahtevaju se određena specifična prilagođenja. Sa tim ciljem, u ovom radu su razmatrani dvojna fazna Dopler anemometrija i rasejanje svetlosti na tkivima. Iznete analize navode na zaključak da su moguća prilagođenja te tehnike pre svega kod ispitivanja manje kompaktnih bioloških sistema, kao što je na primer krv.

1. UVOD

Grupe čestica, koji su konglomerati ili čvrsto vezani u strukturu kakvo je tkivo su obično ansambli većih dimenzija i nepravilne forme. Fazna laser Doppler anemometrija (PDA) je tehnika, koja se koristi za detekciju dimenzija i oblika sfernih čestica na bazi efekata rasejanja svetlosti.

U ovom radu se najpre razmatraju mogućnosti primene fazne Dopler anemometrije (PDA) u ispitivanju bioloških sistema čestica i tkiva. Drugi odeljak ukratko objašnjava princip PDA i to njene poboljšane verzije – dvojne PDA. U trećem odeljku okrećemo se teorijama rasejanja dok četvrti peti razmatraju specifičnosti rasejanja na tkivima i posebno krvi, tim redom.

2. OSNOVNI PRINCIPI DVOJNOG PDA MERENJA ČESTICA VELIKIH DIMENZIJA

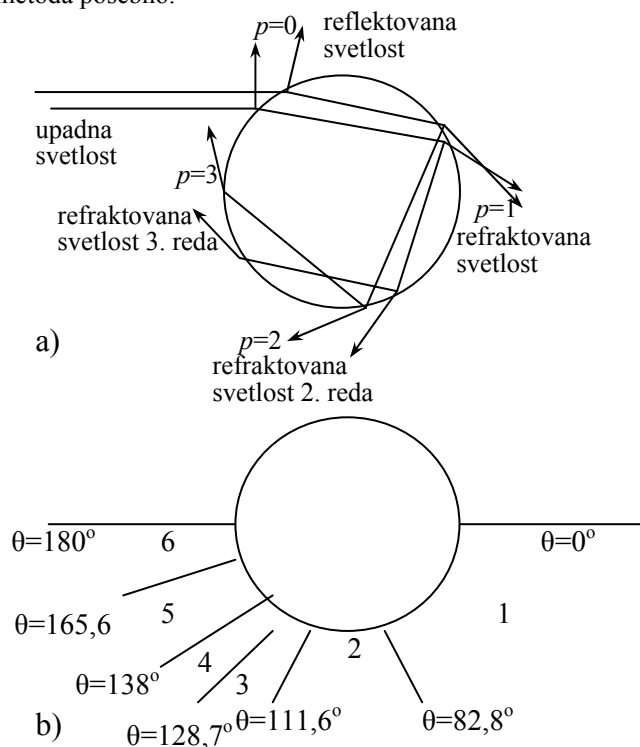
U procesu rasejanja, za različite dimenzije, oblik i indeks prelamanja čestica, kao i za različite uslove osvetljavanja i detekciju svetlosti mogu da budu dominantni svi ili samo neki od postojećih modova rasejanja, prikazanih na slici 1. U konvencionalnoj PDA osnovni mod rada je sa refraktovanom svetlošću. Za veće čestice (ili grupacije), koji imaju nepravilan oblik postoji više efekata koji mogu da unesu određenu nesigurnost, odnosno greške u merenjima. Većim se smatraju one čestice ili grupe, čiji prečnik dostiže više od jedne tečine prečnika merne zapremine PDA sistema.

Najznačajniji negativni efekti kod klasične PDA, koji daju grešku jesu 2π neodređenost, efekat trajektorije (ili Gausov efekat) i efekat procepa. Zbog neuniformne raspodele intenziteta svetlosti u laserskom snopu, veće čestice ili konglomerati mogu da se nađu u poziciji da reflektuju upadnu svetlost, koja će se obraditi zajedno sa refraktovanom svetlošću i dovešće do pogrešnog rezultata. I drugi efekat ima istu osnovu, reflektovana svetlost od većih čestica (za određene pozicije u mernoj zapremini) zbog svog intenziteta zamenjuje refraktovanu, koja ustvari treba da se obradi jer je taj mod rasejanja u osnovi klasične PDA.

Da bi se prevazišli ovi problemi, zadnjih godina se razvija novi metod, dvojni PDA [1]. U nastavku su u kratkim crtama date osnove novog metoda koji ima veliku primenu za tačno merenje dimenzija većih čestica ili grupa čestica, na bazi efekata rasejanja svetlosti, posebno za čestice koje su transparentne u transparentnoj sredini .

Osnovni koncept dvojnog PDA je nezavisno merenje dimenzija čestica koristeći za jedno merenje konvencionalni PDA, a za drugo ravanski PDA. Svaki sistem bi dao iste rezultate, ako se radi o sfernoj geometriji (čestici), a različite ako čestica nema sferni oblik. Kombinacija dva detektora konvencionalne PDA (CPDA) i ravanski PDA (PPDA) s dva detektora, u jedan prijemni optički modul je prikazan na sl. 2.

Signal, koji se prima pomoću optičkog modula dualnog PDA se dalje obrađuje. Na slici 4 je prikazan tipičan dijagram zavisnosti faze i dijametra za dualni PDA, gde se vidi da postoje signali karakteristični za svaku od ovih metoda posebno.

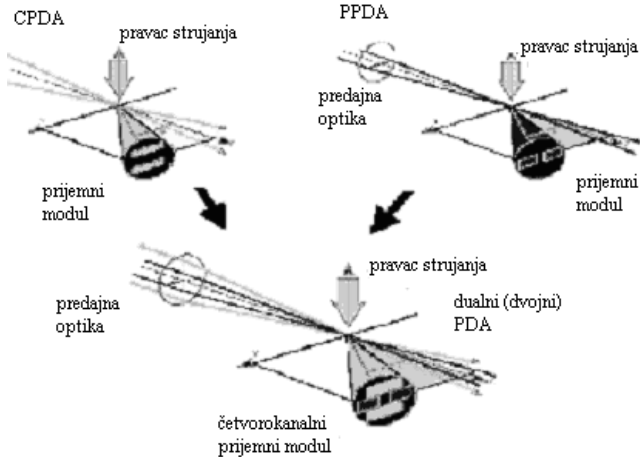


Slika 1. (a) Definicija modova rasejanja svetlosti na sfernim česticama i (b) raspored područja za kap vode u vazduhu: 1: odbijanje, prelamanje i prelamanje 3. reda; 2 i 3: odbijanje i prelamanje 3. reda; 4: samo odbijanje; 5 i 6: odbijanje i prelamanje 2. reda.

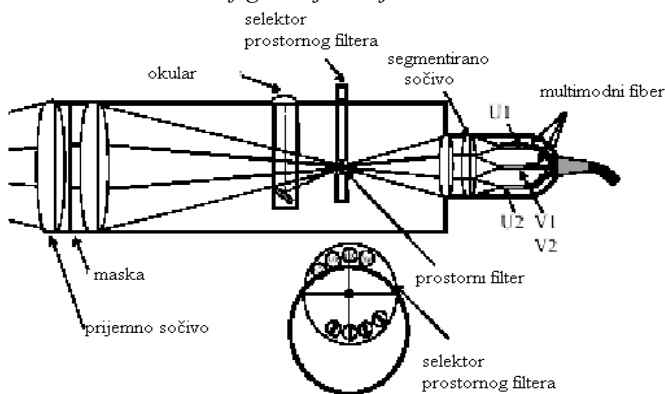
Na sl. 3 je prikazana konstrukcija prijemnog optičkog modula za dvojni PDA sistem. Radi se sa četiri detektora U1, U2 i V1, V2, koji su u parovima postavljeni u uzajamno normalne ravni, a segmentirano sočivo je sastavljeno od četiri dela. Sistemi se mogu koristiti za precizno merenje velikih čestica nepravilnog oblika kao što je primer parče kože. Kao izvor svetlosti se koristi najčešće Ar^+ -jon laser. Od njegovog bogatog spektra najčešće se koristi na talasnim dužinama $\lambda = 514,5$ nm i $\lambda = 488$ nm. Sistem radi kao

dvokanalni, odnosno meri istovremeno dve komponente brzine čestice.

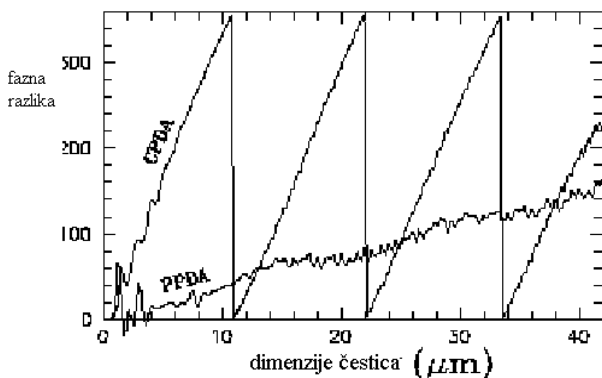
Analiza ovih signala je komparacija dimenzija izmerenih sa CPDA i PPDA. U suštini, glavna merenja se oslanjaju na faznu razliku izmerenu sa CPDA, a rezultati dobijeni sa PPDA se koriste za eliminisanje greške, koja može da se javi bilo kao rezultat efekta trajektorije ili efekta procepa.



Slika 2. Konfiguracija dvojnih PDA sistema



Slika 3. Savremena prijemna sonda za dvojni PDA sistem



Slika 4. Tipični izgled signala u dvojnjoj PDA

Na ovaj način se dobijaju merenja, koja su jednoznačna do granice određene PPDA signalom, tj. do dimenzija desetak puta većih od maksimalnih, koje se mere konvencionalnom PDA (slika 4).

3. RASEJANJE SVETLOSTI NA POJEDINAČNIM SFERNIM ČESTICAMA

Zbog relativne jednostavnosti matematičkih izvođenja, najrazvijenije teorije rasejanja svetlosti su, upravo, za sferni

oblik centra rasejanja. Postoji više teorija i prilaza rasejanju svetlosti na sfernim česticama (Rayleigh, Gans, Debye, Kerker, Van de Hulst). Na njima je uradjeno i najviše eksperimenata, koji sa ubacivanjem matricnih zapisa, Stokesovih i drugih parametara celovitije opisuju odstupanje od idealnosti. Smatra se da je od svih njih kompletnija Mie-ova teorija rasejanja [2]. Ona daje kompleksne amplitude normalne (S_{\perp}) i paralelne (S_{\parallel}) komponente rasejanja svetlosti preko funkcija a_n i b_n , koje su izražene pomoću Rikati-Beselovih funkcija, i njihove vrednosti zavise samo od veličine i materijala sfere. Kompleksne amplitude su tada date izrazima (1), gde su π i τ Ležandrove π i τ funkcije, čije vrednosti, ovde, zavise samo od pravca rasejanja.

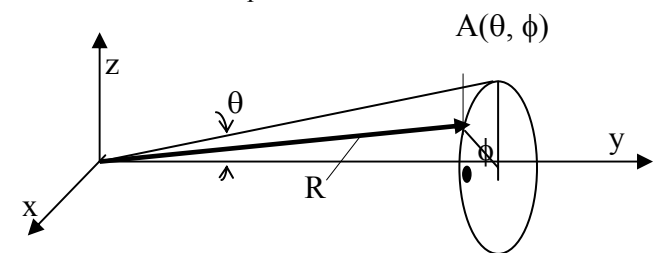
$$S_{\perp}(\theta) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} (a_n \pi_n(\cos \theta) + b_n \tau_n(\cos \theta)) \quad (1)$$

$$S_{\parallel}(\theta) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} (b_n \pi_n(\cos \theta) + a_n \tau_n(\cos \theta))$$

Ukupna kompleksna amplituda rasejane svetlosti je prikazana jednačinom (2)

$$S(\theta, \phi) = S_{\perp} \sin \phi + S_{\parallel} \cos \phi \quad (2)$$

za koordinatni sistem prikazan na sl. 5.



Slika 5. Opis koordinata korišćenih u izrazu za kompleksnu amplitudu rasejane svetlosti

Uproščavanjem izraza (1) dobija se da je amplituda rasejane svetlosti obrnuto proporcionalna kvadratu talasne dužine svetlosti, odnosno da je intenzitet rasejane svetlosti obrnuto proporcionalan četvrtom stepenu talasne dužine, što je jedna od najtipičnijih karakteristika Rayleighovog rasejanja.

4. SPECIFIČNOSTI PROSTIRANJA SVETLOSTI KROZ TKIVA

Pojave do kojih dolazi prilikom prolaska svetlosti kroz tkiva, grubo se mogu razvrstati na rasejanje i apsorpciju svetlosti, koji su okarakterisani odgovarajućim koeficijentima $\mu_s(\lambda)$ i $\mu_a(\lambda)$ – oba zavise od talasne dužine primenjene svetlosti.

Biološka tkiva uopšte, ponašaju se kao izraziti rasejavači svetlosti: koeficijent rasejanja μ_s je mnogo veći od koeficijenta apsorpcije μ_a . Osim od optičkih svojstava same supstance tkiva, rasejanje svetlosti na tkivu zavisi i od rasporeda njegovih strukturnih komponenti odnosno rastojanja između centara rasejanja. Red veličine tih rastojanja je $100 \mu\text{m}$ [3]. Najznačajniji parametri kojima se opisuje rasejanje svetlosti na tkivu su indeks prelamanja n , koeficijent rasejanja μ_s , koji je probabilističke prirode i srednja vrednost kosinusa ugla između pravca prostiranja upadnog i rasejanog fotona, koji se naziva i faktorom anizotropije g . Pošto su za proces rasejanja svetlosti na tkivu približno jednako značajni i koeficijenta rasejanja μ_s i faktor

anizotropije g , za njih se često definiše redukovani koeficijent rasejanja $\mu'_s = \mu_s(1-g)$ [4].

Pošto je većina živog tkiva prožeta krvnim sudovima, apsorpcija svetlosti u tkivu je pretežno određena sadržajem hemoglobina (koji se nalazi u eritrocitima), melanina i vode u njemu. Koncentracija crvenih krvnih zrnaca u umereno prokrvljenom tkivu je 0,5-4% zapremine, a u čistoj krvi je mnogo veća i iznosi 40% zapremine.

Dakle, poznavanje optičkih karakteristika tkiva doprinosi proceni i strukturnog rasporeda u tkivu i hemijskog sastava. Oba svojstva mogu da budu pokazatelji patološkog tkiva, što se može koristiti u dijagnostici [5].

Na česticama veličine eritrocita, svetlost se rasejava izrazito unapred (srednji ugao rasejanja je $5,4^\circ$). Zbog toga u povratnoj svetlosti se nalaze uglavnom fotoni, koji su bar jednom rasejani na nepokretnim tkivima pre ili posle rasejanja na eritrocitu. Vrlo mali broj fotona u povratnoj svetlosti ($<0,1\%$) je rasejan samo na pokretnom crvenom krvnom zrcu [3]. Osim toga moguća su i dva (ili više) uzastopna rasejanja na pokrtenim eritrocitima, što se dešava u većim krvnim sudovima (prečnika većeg od $50\mu\text{m}$). Sve ove pojave uslođavaju analizu verovatnoće određene vrednosti Doppler – ovog frekventnog pomeraja.

U donjoj tabeli su date izmerene vrednosti redukovano koeficijenta rasejanja, za različita tkiva. U poslednjoj koloni vide se izračunate vrednosti eksponenta k odnosa talasnih dužina. Poređenja radi, kao što je već rečeno, prema uprošćenom izrazu za intenzitet rasejene svetlosti prema Mie-ovoj (Rayleighova aproksimacija) teoriji, ovaj eksponent je 4.

Tabela 1

Autori	Tkivo	Vrsta	λ (nm)	μ'_s (cm^{-1})	Rastojanje izvor- detektor(cm)	k
Kurt <i>et al</i> (1995)	glava	Prase	670, 830	3,5, 3,3	3	3,64
Fantini <i>et al</i> (1999)	glava	Prase	758, 830	4,0, 3,6	1,5 – 3,0	0,86
Hueber <i>et al</i> (2001)	glava	Prase	758, 830	3,0, 2,6	1,5 – 3,0	0,63
Doornbos <i>et al</i> (1999)	čelo	Čovek	633, 700	7,3, 6,7	0,18 – 1,68	1,17
	ruka	Čovek	633, 700	4,3, 3,5	0,18 – 1,68	0,75
	taban	Čovek	633, 700	4,9, 4,1	0,18 – 1,68	0,56
Cubeddu <i>et al</i> (1999)	ruka	Čovek	672, 818	4,8, 3,9	2	0,95
Arnfield <i>et al</i> (1992)	salo	Svinja	630, 789	6,7, 5,9		1,77
	mišić	pile	630, 789	3,9, 3,3		1,53

Detaljno razmatranje situacije je moguće samo sa uzimanjem u obzir i koeficijenta apsorpcije. U Tab.2 su dati neki od koeficijenta materijala biološkog porekla.

Kako se vidi postoje velike promene sa promenom talasnih dužina i za po nekoliko redova veličine zavisno od tkiva.

Pored toga, postoje i veliki platoi pri apsorpciji svetlosti kao što je slučaj za krv (620/805nm)

Tabela 2

Biotkivo	λ, nm	$^\circ\alpha, \text{cm}^{-1}$
Krv, zasićena sa O_2	620,805	6,2
Krv nezasićena kiseonikom	620,805	18,2 6,2
Beli epiderm	400, 500,600	2,8 1,2, 0,3
Potkožna mast	400, 500,600	0,7 0,4 0,2
Epitel	633, 1060	821 ,120
Tkivo arterijskog zida	193-532* 308-532*	10^4 -30 180-30
Tkivo artirijskog zida(patologija)	308-532*	108-37
Arterosklerotičan sloj	249-2940 10600	650-5000 500
Jetra pacovs	1064	15,2

* Verovatno II harmonik Nd YAG lasera(1060nm)

5. KARAKTERISTIKE SASTOJAKA KRVI

Krv i plazma su komplikovani koloidni rastvori. Time procesi rasejanja ulaze u teoriju koloida koji se nalaze u lancu ćelija-makromolekul-micela-koloid. U krvnoj plazmi su dispergovane slobodne ćelije krvi. Vuiskozna je međućelijska tečnost žučkaste boje. ($n_0=1,345$ [6] za svetlost HeNe lasera.) Citometrija raznih tipova, na osnovu čistog rasejanja, LDA metoda ili uz primene metoda sa eksitacijom fluorescencije sa izabranim tipovima lasera može da da dosta podataka o odnosu slobodne ćelije krvi (– eritrociti i leukociti, i citoplazmatični fragmenti – krvne pločice.) U normalnom hematokritu (odnos zapremine tečnosti i slobodnih ćelija) 35-50% zapremine krvi zauzimaju najviše eritrociti 42-47%, zatim 1% leukociti i vrlo malo pločice [6]. Klasičnije metode merenja, ali zato jednostavnijim pripadaju merenja pomoću efekata sa centrifugalnim metodama..

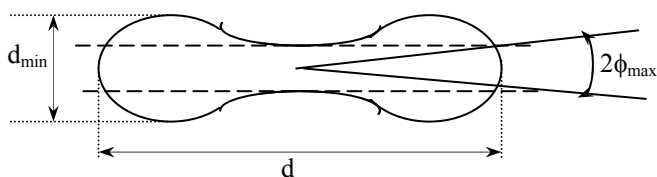
Normalni eritrociti (crvena krvna zrnca) pločice u obliku bikonkavnog sočiva imaju $\langle d \rangle = 7,7\mu\text{m}$ (6,5-8 μm). (Sl.6) Debljina na širem delu im je $2\mu\text{m}$, a najužem delu u sredini $1\mu\text{m}$. $\langle V \rangle = 83\mu\text{m}^3$. Međutim prolazerči kroz kapilare oni menjaju oblik. Praktično se mogu zamisliti kao Bezoblične vreće koje se mogu prilagodjavati drugim oblicima u procesima i interakcijama u organizmu in vivo. Zato su laserske metode, kao optičke nezamenljive u smislu neunošenja distuirbansi u sistem. Membrana je velika u odnosu na sadržaj ćelije i smatra se da 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 ($n_{\text{eritrocita}} = 1,045$).

Leukociti (bela krvna zrnca) postoje kao granulociti i agranulociti. Kod granulocita su najbrojniji neutrofilni (55-70%, $d=7-9\mu\text{m}$), eozinofili (2-4%, $d=9-10\mu\text{m}$), bazofili (0,5-1%, $d=7-8\mu\text{m}$) i štapičaste ćelije (3-5%). U agranulocite spadaju monociti (4-6% $d=10-12\mu\text{m}$) i limfociti (20-40%, $d=6-8\mu\text{m}$ i tzv. veliki, $d=10-12\mu\text{m}$).

Granulociti su bliski sfernoj geometriji, pa za njih važe teorije PDA. U drugoj aproksimaciji se traži nesigurnost zbog odstupanja od idealnosti. I dalje važi stav da je moguće koristiti reflektovanu lasersku svetlost za ocene njihovih karakteristika. PDA je i dalje preporučena za tehniku merenja[1]. Od interesa je poznavanje angularne raspodele da bi se pravilno postavili detektori. Iako bi se našlo mnogo različitih mogućnosti za podatke o centri rasejanja, prava merenje pokazuju da postoji dosta oblasti preklapanja pri

uzimanju krvi kao uzorak (preklapanja opsega veličina sastojaka krvi traži dodatna merenja koja bi razlikovala čestice). Zato je potrebno uključiti i metode prepoznavanja oblika. Zato je i potrebno uraditi detaljno merenja indeksa prelamanja za datu talasnu dužinu lasera koji se koristi a ne koristiti samo podatke za NaD svetlost. 1. sa odbijenom svetlošću, tj. rasejane unazad (da bi se odredila veličina) i 2. sa svetlošću, koja je pretpela prelamanje prvog reda – oštri uglovi rasejanja, da bi se na osnovu poznate veličine odredio indeks prelamanja ćelije i vrsta. Zbog značajne apsorpcije, moguće je da refleksijski mod ometa merenje u refrakcionom modu.

Rasejavajuća svojstva eritrocita su mnogo više proučavana, jer su oni i glavni centri rasejanja. LDA se inače i dalje koristi u merenjima tokova krvi u tkivima [7] [8], samo sa sofisticiranijim tehnikama od onih pre nekoliko desetina godina. Primenljivost Lorenz-Mie-ove teorije, u ovim istraživanjima, nije očigledna, jer su eritrociti bikonkavni diskovi a ne sfere. Neki proračuni koeficijenta apsorpcije i koeficijenta rasejanja kao i fazne funkcije (faktora anizotropije g) na osnovu te teorije su dali zadovoljavajuće rezultate potvrđene merenjima [9]. Polistiren (kao etalonska čestica različitih veličina) se i dalje koristi za simulaciju [9]. 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. Zato se mnogo radi na dobijanju eksplicitnih modela sa tretiranjem rasejanja na pojedinačnom eritrocitu. U modele su uključene Maksvelove jednačina za oblike slične obliku eritrocita [10], pa se mogu smatrati da imaju dobru fundamentalnu podlogu. Glavna razlika razvijenih modela je stepen i oblik aproksimacije. Kako je $d_{\text{eritrocita}} \approx 10\lambda$ (vidljiv opseg) na njih nije primenljiva, ni Rayleigh – eva teorija. U ref. [10] je, radi utvrđivanja uticaja oblika ćelije na rasejanje, korišćen formalizam T-matrice. To je metod rešavanja Maksvelovih 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 gurtina određuje rasejanje unapred. Pri merenju je neophodno da su ćelije na dovoljno velikom rastojanju ($>$ dva maksimalna prečnika) da bi mogle da se smatraju kao nezavisni centri rasejanja. Dijagrami rasejanja su potrebni za optimalno posetavljanje fotodetektoa.



Slika 6. Eritrocit vidjen od strane detektora kao „sfera

Frekvencija svetlosti rasejane na čestici brzine v je
$$v_r = v_0 \left(1 + \frac{\vec{D} \cdot (\vec{k}_u - \vec{k}_r)}{ck} \right)$$
 gde v_0 frekvencija upadnog fotona, a k_u i k_r talasni vektori upadnog i rasejanog fotona.. Doppler – ov frekventni pomeraj [11]

$$\Delta v = \frac{v \cdot \sin \frac{\theta}{2} \cos \varphi}{\lambda}$$

gde je λ talasna dužina svetlosti, θ je ugao rasejanja (ugao između vektora k_i i k_r), a φ ugao između $v_{\text{eritrocita}}$ i Δk . I θ i φ su veličine stohastičke prirode, a u određenoj meri je takva i vrednost brzine v .

6. ZAKLJUČAK

U radu su predstavljena dvojna fazna Doppler anemometrija, kao potvrđeno sredstvo u tehničkoj dijagnostici. Razmatranjem rasejanja svetlosti u tkivima, u svetlu uslova DPDA sistema, zaključuje se da pod određenim uslovima ona može da posluži u ispitivanju slobodnijih sistema bioloških čestica, kakvi se sreću kod krvi, dok su za ispitivanja kompaktnijih tkiva pogodnije reflektometrijske tehnike.

LITERATURA

- [1] a) BSA User guide Dantec 2004 b) <http://int3.dem.ist.utl.pt/lx.laser2000/ptf.03.2.pdf>
- [2] Durst E., Melling A., Whithlaw J.H., *Principles and Practice of Laser Doppler Anemometry*, Academic press, New York, 1976
- [3] R.Bonner, R.Nossal, "Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue", *Appl. Opt.* vol. 20, pp. 2097-2107, 1981.
- [4] M.Larsson, H.Nilsson, T.Stoemberg, "In vivo determination of local skin optical properties and photon path length by use of spatially resolved diffuse reflectance with applications in laser Doppler flowmetry", *Appl. Opt.* vol. 42, pp. 124-134, 2003.
- [5] M.S.Patterson, J.D.Moulton, B.C.Wilson, K.W. Berndt, J.R.Lakowicz, "Frequency-domain reflectance for the determination of the scattering and absorption properties of tissue", *Appl. Opt.* vol. 30, pp. 4474-4476, 1991.
- [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, et al., Advantages and Limitations of Laser Doppler Flowmeters, Lawrenz Bibliography, 1998.
- [9] A. Kienle, et al., "Determination of the scattering coefficient and the anisotropy factor from laser Doppler spectra of liquids including blood", *Appl. Opt.* 35, str. 3404-3412, 1996.
- [10] A.M.K. Nilsson, et al., "T-matrix computations of light scattering by red blood cells", *Appl. Opt.* 37, str. 2735-2747, 1998.
- [11] Ilić J., Ristić S., Družijanić D., "Ispitivanja hemodinamike pomoću laserskih tehnika", Zbornik radova, XLVII ETRAN, tom 3, str. 277-280, 2003.

Abstract –In order to be applied in bio-system diagnostics, light scattering techniques have to be subject to certain adaptations. Thus, this paper considers dual phase Doppler anemometry and light scattering on biological tissues. The analyses presented here lead to a conclusion that adaptations of the technique are possible particularly in the case of less compact tissues such as blood.

THE DIAGNOSTICS OF PARTICLE ANSAMBLAS AND TISUES ON THE BASE OF SCATTERING EFFECTS

J. Ilić, S. Ristić, S. Ostojić,
S. Milić, R. Radovanović