

УДК 53.08, 535.4

## **РЕШЕНИЕ ЧЕТЫРЕХПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ ЗАДАЧИ ЛАЗЕРНОЙ ДИФРАКТОМЕТРИИ В РАМКАХ МОДЕЛИ ДВУХ ДЛИН ВОЛН**

Г.П. САРКИСЯН\*, А.Г. САРКИСЯН, А.М. ДАНИЕЛЯН

Институт Химической Физики им. А.Б. Налбандяна НАН Армении, Ереван, Армения

\*e-mail: hrachya\_sargsyan@mail.ru

(Поступила в редакцию 28 февраля 2019 г.)

Предложен метод для решения одной из важных прикладных задач гематологической науки – разработке автоматизированного и недорогостоящего способа установления кривой распределения эритроцитов по размерам. В рамках модели двух длин волн предложен новый способ обработки экспериментальных данных лазерной дифрактометрии, который позволяет различить анизотропии с разной степенью асимметрии. Обсуждаются преимущества разработанного математического подхода.

### **1. Введение**

Эритроцитометрия как направление в гематологической науке появилась довольно давно. Единой точки зрения о величине среднего диаметра эритроцитов, проценте микроцитов, макроцитов и нормоцитов у здоровых людей не существует. Существуют три основных метода определения диаметра эритроцитов.

Первый – это метод измерения диаметра эритроцитов в сухом мазке крови под микроскопом с помощью окулярных микрометров, точность у которых зависит от градуировки объект-микрометра и может оказаться разной у разных авторов [1–4].

Второй – это кондуктометрический метод измерения объема частиц, принцип действия которого заключается в том, что взвесь эритроцитов пропускается через капиллярное отверстие, включенное в электрическую цепь. Степень точности результатов зависит от различных артефактов, связанных с недостаточным разрешением электронных схем, или изменения формы эритроцитов под действием градиента давления [5–8].

Третий – это метод обработки микроизображений, в основе действия которого лежит сканирование поля препарата с последующей обработкой сигналов на ЭВМ [9–11].

Для оценки размера эритроцитов применялся также бесконтактный оптический метод, основанный на явлении дифракции световых лучей на краях эритроцитов в монослое. Впервые метод был использован Пайпером в 1919 г. [12]. Для определения размеров эритроцитов методом дифракции света в связи с проблемой биологического действия ионизирующей радиации авторы работы [13] сконструировали дифрактометр. Основным недостатком галометрии является невозможность выяснения степени асимметрии.

Для решения этой проблемы, ранее нами разработана теория описания дифракции монохроматического излучения лазера на монослое эритроцитов – дисков с толщиной, много меньшей ее поперечного размера (модель мазка крови) [14]. Были рассмотрены разные функции распределения [15–17] и предложено четырехпараметрическое решение задачи эритроцитометрии путем цифровой обработки экспериментальных дифрактограмм [18].

## **2. Четырехпараметрическое описание дисперсности микрообъектов по размерам**

В данной работе мы воспользуемся обобщенным математическим подходом описания дисперсности системы микрообъектов по размерам с помощью функции распределения, основанного на нормальном распределении Гаусса в приближении ряда Эджворта [17]. В этом приближении функция асимметричного распределения записывается в следующем виде

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} \left[ 1 - \frac{\gamma_1}{3!} x(3 - x^2) + \frac{\gamma_2}{4!} (3 - 6x^2 + x^4) \right], \quad (1)$$

где  $x = (a - a_0) / \sigma$  – нормированная величина. Заметим, что наряду с параметрами нормального распределения Гаусса средний радиус  $a_0$  и дисперсия по размерам  $\sigma$ , в исходную модель (1) закладываются также коэффициент асимметрии  $\gamma_1$  и коэффициент эксцесса  $\gamma_2$ . Для описания одновершинных кривых достаточно выбрать первые четыре момента функции распределения. Первый момент – среднее значение, второй момент – дисперсия по размерам, третий момент – коэффициент асимметрии, четвертый момент – коэффициент эксцесса. Они имеют следующий геометрический смысл: среднее значение равняется математическому ожиданию случайной величины и показывает относительное расположение распределения на числовой прямой. Дисперсия по размерам показывает разброс распределения вокруг среднего значения; коэффициент асимметрии характеризует направление и величину сдвига главной моды распределения (наиболее часто встречающегося размера) от его среднего значения, т. е. является числовой характеристикой симметрии распределения. Коэффициент эксцесса дает информацию о случайном характере и степени однородности основной

массы эритроцитов по изучаемому признаку. Другими словами, коэффициент эксцесса дает информацию о форме кривой распределения и ее высоте вблизи главной моды. Коэффициенты асимметрии и эксцесса могут принимать положительные и отрицательные значения. Отрицательное значение коэффициента асимметрии свидетельствует о смещении главной моды в сторону больших размеров по сравнению с распределением Гаусса. Положительное значение коэффициента асимметрии свидетельствует об обратном. Отрицательное значение коэффициента эксцесса указывает на более низкий и более пологий характер вершины по сравнению с распределением Гаусса. Положительное значение коэффициента эксцесса указывает, что кривая плотности в окрестности главной моды имеет более высокую и более острую вершину, чем кривая нормального распределения Гаусса. Для распределения (1)  $a_{\text{mod}}$  может оказаться больше или меньше  $a_0$  в зависимости от знака  $\gamma_1$ . Здесь под модой понимается значение  $a$ , при котором  $f(a)$  принимает максимальное значение. Введем обозначение:  $x_0 = (a_{\text{mod}} - a_0) / \sigma$ . Так как в точке  $x_0$  функция  $f(x)$  имеет максимум, то первая производная правой части (1) в этой точке должна равняться нулю. Тогда справедливо условие

$$x_0 + \frac{\gamma_1}{6}(3 - 6x_0^2 + x_0^4) + \frac{\gamma_2}{24}(15x_0 - 10x_0^3 + x_0^5) = 0. \quad (2)$$

Левая часть равенства (2) – это многочлен пятой степени относительно переменной  $x_0$ , свободный член которого равен  $\gamma_1 / 2$ . Обозначим левую часть (2) через  $\psi(x_0)$ . Согласно теореме Безу, при делении любого многочлена  $\psi(x_0)$  на  $(x_0 - c)$ , где  $c$  его свободный член, получаемый остаток всегда равен  $\psi(c)$ . Выполнимость условия  $\psi(c) = 0$  означает, что  $x_0 = c$  будет решением (2). Когда функция распределения  $f(x)$  принимает максимальное значение при  $x_0 = -\gamma_1 / 2$ , это совпадает с характеристикой асимметрии Шарлье. Из (2) легко записать условие применимости приближения Шарлье для асимметричного распределения (1)

$$\gamma_2 = \frac{8\gamma_1^4 - 192\gamma_1^2}{\gamma_1^4 - 40\gamma_1^2 + 240}. \quad (3)$$

Из введенного выше обозначение для  $x_0$  будем иметь:

$$\frac{a_{\text{mod}} - a_0}{\sigma} = -\frac{1}{2}\gamma_1, \quad (4)$$

или

$$d_{\text{mod}} = d_0 - \gamma_1 \sigma, \quad (5)$$

где  $d_0$  – средний диаметр:  $d_0 = 2a_0$ ,  $d_{\text{mod}}$  – главная мода распределения по

диаметрам:  $d_{\text{mod}} = 2a_{\text{mod}}$ . Выражение (5) устанавливает связь между главной модой  $d_{\text{mod}}$  одновершинного распределения и его тремя параметрами  $d_0$ ,  $\sigma$ ,  $\gamma_1$ . Из (5) следует, что при  $\gamma_1 > 0$   $d_0$  лежит правее главной моды по оси размеров и, наоборот, при  $\gamma_1 < 0$  главная мода распределения по размерам всегда больше его среднего значения. Это полностью согласуется с физическим смыслом коэффициента асимметрии и тем самым подтверждает «правильность» соотношения (5).

### 3. Моделирование дифракции лазерного излучения на двумерном экране микрообъектов

При решении четырехпараметрической задачи эритроцитометрии мы основывались на теоретическом описании дифракции монохроматического излучения лазера на монослое эритроцитов-дисков в рамках приближенной теории Кирхгофа и интегральной теоремы Гельмгольца-Кирхгофа [14–17]. Согласно нашему подходу, мазок крови рассмотрен как случайный пуассоновский фазовый экран, каждая точка которого соответствует отдельному эритроциту некоторого размера и круглой формы, а регистрация дифрагированных на краях эритроцитов-дисков световых волн монохроматического лазерного источника происходит в зоне дифракции Фраунгофера:

$$d \ll \sqrt{z\lambda}, \quad (6)$$

где  $d$  – размер эритроцита на сухом мазке,  $z$  – расстояние от центра дифракции до экрана наблюдения,  $\lambda$  – длина волны лазерного излучения. При выполнении условия (6) и расположения экрана наблюдения на плоскости  $z$  принято считать, что все параллельные вторичные лучи собираются в одной точке без собирающей линзы. В этом приближении естественно принять, что положение экстремумов в картине дифракции дает информацию о величине главной моды, а не среднего размера эритроцитов, как считали авторы [14, 15]. Исключение составляет случай нормального распределения Гаусса, когда средний размер совпадает с главной модой (число клеток со средним размером больше числа клеток любого другого размера  $a \neq a_0$ ).

В общем случае, когда система микрообъектов имеет несимметричное распределение по размерам, для интенсивности дифракционной картины в некоторой точке экрана наблюдения записывается выражение

$$I(w, P) = N \int_0^{\infty} f(a, P) I_1(a, w) da, \quad (7)$$

где  $f(a, P) = f(a, a_0, \sigma, \gamma_1, \gamma_2)$  – функция распределения по размерам с четырьмя параметрами:  $a_0$ ,  $\sigma$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ , а  $I_1(a, w)$  – интенсивность картины дифракции света на отдельной клетке размером  $a$  в точке  $w = \sin \alpha$ .

В точках экстремума (максимума или минимума) дифракционной картины первая производная функции  $I(w, P)$ , (обозначим ее через  $I_\alpha(w, P)$ ), удовлетворяет условию

$$I_\alpha(w, P)|_{\alpha=\alpha_n} = 0, \quad (8)$$

где  $\alpha_n$  – углы дифракции в точках экстремумов (минимумов или максимумов) дифрактограммы.

Используя выражение для  $I_1(a, w)$  из [16], с учетом (7) условие (8) можно записать так:

$$\int_0^\infty f(a, P) \frac{2}{kw_n a} \operatorname{tg} \alpha_n J_1(kw_n a) J_2(kw_n a) da = 0, \quad (9)$$

где  $w_n = \sin \alpha_n$  ( $n=1,2,3,4$ ),  $J_1$  и  $J_2$  – функции Бесселя первого рода, первого и второго порядка соответственно. При вычислении (9) учитывалась независимость переменного интегрирования в (7) от угла дифракции, а также известное рекуррентное соотношение для функции Бесселя первого рода и их производных. Мы получили ряд однородных интегральных уравнений, которые различаются по  $\alpha_n$ . В каждое из этих уравнений в качестве неизвестных входят четыре параметра функции распределения по размерам  $f(a, P)$ , т.е.  $a_0$ ,  $\sigma$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ . Если рассмотреть первые четыре уравнения этого ряда, соответствующие углам  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  и  $\alpha_4$ , как систему из четырех уравнений с четырьмя неизвестными, то при наличии значений этих углов возможно нахождение неизвестных параметров распределения по размерам путем численного решения этой системы уравнений на ЭВМ. В случае асимметричного распределения в приближении ряда Эджворта с учетом выражения для  $I(w, P)$

$$I(w) = NC' \left[ \frac{2J_1(kwa_0)}{kwa_0} \right]^2 \left( 1 + \frac{\gamma_2}{32} \right) + NC' \frac{\gamma_1 \sigma}{6a_0} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-1)^m [(2m+2)!]^2 (kwa_0/2)^{2m+2}}{m!(m+2)![(m+1)!]^2 2(2m)!}, \quad (10)$$

из условия (8) получим систему четырех уравнений с четырьмя неизвестными:

$$\sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-1)^m (m+2)! (kw_n)^{2m-1} k \cos \alpha_n}{m!(m+2)![(m+2)!]^2 (2m+2)! 2^{2m}} \left\{ 2ma_0^{2m} \left( 1 + \frac{\gamma_2}{32} \right) + \left( \frac{kw_n \sigma}{2a_0} \right)^2 (2m+1)(2m+2)^2 a_0^{2m+2} \left[ 1 - \frac{\gamma_1}{6} \left( \frac{a_0}{\sigma(2m+1)} + \frac{2m\sigma}{a_0} \right) + \frac{\gamma}{64} \right] \right\} = 0, \quad (11)$$

где  $n=1,2,3,4$ ,  $w_1 = \sin \alpha_{\min I}$ ,  $w_2 = \sin \alpha_{\max I}$ ,  $w_3 = \sin \alpha_{\min II}$ ,  $w_4 = \sin \alpha_{\max II}$ ,

$\cos \alpha_1 = \cos \alpha_{\min I}$ ,  $\cos \alpha_2 = \cos \alpha_{\max I}$ ,  $\cos \alpha_3 = \cos \alpha_{\min II}$ ,  $\cos \alpha_4 = \cos \alpha_{\max II}$ . В выражениях (10) или (11)  $k = 2\pi / \lambda$ ,  $w = \sin \alpha$ ,  $\alpha$  – угол дифракции на экране наблюдения,  $\lambda$  – длина волны лазерного излучения.

#### 4. Результаты и обсуждение

Таким образом, если получить из эксперимента дифрактограмму и установить значения  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ , то путем численного решения системы (11) на компьютере для соответствующих значений углов экстремумов, возможно приближенно найти параметры  $a_0$ ,  $\sigma$ ,  $\gamma_1$  и  $\gamma_2$ .

Заметим, что точность данной методики существенно зависит от точности установления значений  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  из эксперимента автоматизированным способом.

Из (10) следует, что в любой точке картины дифракции значение  $I(w)$  зависит от величины и знака коэффициентов асимметрии и эксцесса. Следовательно, каждая точка дифракционной картины содержит информацию о четырех параметрах функции распределения:  $a_0$ ,  $\sigma$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ . Вместе с тем, учитывая (6), правильнее ожидать, что точки первого минимума и первого максимума дифрактограммы в большей степени несут информацию о главной моде, чем о среднем размере популяции эритроцитов. С другой стороны, практика показывает, что положение второго минимума и второго максимума в дифракционной картине всегда имеют меньшую четкость. Именно с целью решения этой технической проблемы и повышения точности метода лазерной дифрактометрии мы предложили способ расшифровки дифрактограмм в рамках модели двух длин волн. Согласно этому подходу, в качестве источника монохроматического излучения выбирается лазер с двумя разными длинами волн и регистрируются две отдельные дифрактограммы от разных пучков на том же участке сухого мазка крови. Для решения обратной задачи дифракции в общем случае асимметричного распределения использованы две пары экспериментальных данных о положении первого минимума и первого максимума дифракционной картины.

В рамках известной галометрической схемы легко оценивается главная мода распределения эритроцитов по размерам

$$d_{\text{mod}} \sin \alpha_{\max I(\min I)}^i = \mu_{\max I(\min I)} \lambda_i, \quad (12)$$

где  $d_{\text{mod}}$  – главная мода,  $\alpha_{\max I(\min I)}^i$  – углы дифракции в точках первого максимума (минимума) для двух разных длин волн,  $\mu_{\max I}$  и  $\mu_{\min I}$  – параметры функции Бесселя первого рода первого порядка ( $\mu_{\max I} = 1,635$ ,  $\mu_{\min I} = 1,22$ ),  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  – две разные длины волн лазерного излучения. В предлагаемом подходе рассматривается пошаговая регистрация дифрактограммы для двух длин волн лазерного излучателя. Из соотношения (12) очевидно, что для конкретной величины

модального размера при разных длинах волн лазерного излучения на экране наблюдения положению первого максимума (а также первого минимума) дифрактограммы будут соответствовать различные точки. Соответственно, для изучаемого участка сухого мазка крови можно более точно регистрировать 4 точки экстремума и численно решить обратную четырехпараметрическую задачу в рамках схемы (9), где входные параметры будут соответствовать  $n=1,2,3,4$ ,  $w_1 = \sin \alpha_{\min}^1$ ,  $w_2 = \sin \alpha_{\max}^1$ ,  $w_3 = \sin \alpha_{\min}^2$ ,  $w_4 = \sin \alpha_{\max}^2$ ,  $\cos \alpha_1 = \cos \alpha_{\min}^1$ ,  $\cos \alpha_2 = \cos \alpha_{\max}^1$ ,  $\cos \alpha_3 = \cos \alpha_{\min}^2$ ,  $\cos \alpha_4 = \cos \alpha_{\max}^2$ .

## 5. Заключение

Таким образом, полученные выше результаты показывают, что при использовании теоретических схем по описанию дифракции лазерного излучения на мазке крови с учетом асимметричности распределения эритроцитов по размерам, возможна более точная и адекватная интерпретация экспериментально полученных дифрактограмм. Одновременно можно констатировать, что метод лазерной дифрактометрии популяции эритроцитов в рамках модели двух длин волн позволяет повысить точность решения четырехпараметрической задачи эритроцитометрии для оценки всех четырех параметров  $a_0, \sigma, \gamma_1, \gamma_2$  функции распределения  $f(a, P) = f(a, a_0, \sigma, \gamma_1, \gamma_2)$ .

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Д.И. Гольдберг, Г.Д. Левина.** Диаметр эритроцитов в норме и патологии. Томск, Изд-во ТГУ, 1969.
2. **Г.Д. Левина.** В кн.: Вопросы теоретической и клинической гематологии. Томск, Изд-во ТГУ, 118 (1967).
3. **В.Г. Леонова.** Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека. Новосибирск, Наука, 1987.
4. **С.Т. Наджимитдинов.** Основные лабораторные методы исследования морфологии клеток крови. Ташкент, Медицина, 1970.
5. **Ф.М. Рабинович.** Кондуктометрические счетчики частиц и их применение в медицине, М., Медицина, 1972.
6. **R.W. de Blois, C.P. Bean.** Rev. Sci. Instr., **41**, 909 (1970).
7. **N.B. Gorver, J. Naaman, S. Ben-Sasson, Poljanski.** Biophys J., **9**, 1398 (1969).
8. **H.C. Mel, J.P. Yee.** Blood Cells, **1**, 391 (1975).
9. **R. Inre, T. Petro, E. Vermes.** Z. Versuchstierk, **82**, 230 (1980).
10. **В.П. Косых, В.Г. Леонова, А.И. Пустовских.** Изв. СО АН СССР, Сер. Биол. **3(5)**, 158 (1981).
11. **Г.И. Козинец, В.М. Котельников, В.М. Погорелов.** Автоматизация цитологических исследований. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 51 (1985).
12. **A. Pijper, J. Lab.** Clin. Med., **32**, 857 (1947).

13. **Б.К. Лемажихин, Г.М. Франк.** Пушино, Труды ИБФ АН СССР, 276 (1955).
14. **Г.П. Саркисян, А.Г. Саркисян, А.М. Даниелян.** XIX Всероссийский семинар «Моделирование неравновесных систем – 2016», Красноярск, 89 (2016).
15. **Р.Г. Мкртчян, Ф.А. Мкоян, Г.П. Саркисян.** Биофизика, **33**, 634 (1988).
16. **Р.Г. Мкртчян, Ф.А. Мкоян, Г.П. Саркисян, Р.Г. Хлебопрос.** Биолог. ж. Армении, **41**, 332 (1988).
17. **Г.П. Саркисян.** «Альманах современной науки и образования», **10(100)**, 122 (2015).
18. **Г.П. Саркисян, Ф.А. Мкоян, А.Г. Карапетян.** В сб. научн. трудов: Современные аспекты радиационной медицины. Ереван, 13 (1995).

ԼԱԶԵՐԱՅԻՆ ԴԻՖՐԱԿՏՈՄԵՏՐԻԱՅԻ ՉՈՐՍ ՊԱՐԱՄԵՏՐԱՆԻ ԽՆԴԻՒ  
ԼՈՒՇՈՒՄԸ ԵՐԿՈՒ ԱԼԻՔՆԵՐԻ ՄՈԴԵԼԻ ՇՐՋԱՆԱԿՈՒՄ

Հ.Պ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Ա.Հ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Ա.Մ. ԴԱՆԻԵԼՅԱՆ

Առաջարկված է տեսական և փորձարարական մեթոդ՝ հեմատոլոգիայի առաջնային խնդիրներից մեկի՝ էրիթրոցիտների չափային բաշխման կորի ստացման ավտոմատացված և մատչելի եղանակի մշակման համար: Երկու ալիքների մոդելի շրջանակում առաջարկված է լազերային դիֆրակտոմետրիայի փորձագիտական տվյալների մշակման նոր մեթոդ, ինչը թույլ է տալիս տարբերակել տարբեր աստիճանի ասիմետրիա ունեցող անիզոցիտոզները: Քննարկվում է մշակված մաթեմատիկական մոտեցման առավելությունները:

SOLUTION OF FOUR-PARAMETRIC PROBLEM IN LASER  
DIFFRACTOMETRY IN THE FRAMEWORK OF TWO-WAVELENGTH MODEL

H.P. SARGSYAN, A.H. SARGSYAN, A.M. DANIELYAN

A theoretical and experimental method for solving one of the important applied objectives in hematology is proposed for development of an automated and inexpensive way to establish the dimensional distribution curve of erythrocytes. In the scope of two-wavelength model a new method for experimental data processing of laser diffractometry was suggested, allowing to distinguish the anisocytosis with different degrees of asymmetry. The advantages of the developed mathematical approach are discussed.