

АНАЛІЗ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ОПТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК БІООб'ЄКТІВ БЕЗ ПОПЕРЕДНЬОЇ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ

Мунтян В. О., Лисенко О. В., Адамова С. В.

Таврійський державний агротехнологічний університет

Розглянуто біофізичні основи застосування оптичних досліджень біологічних об'єктів та можливості основних методів, за допомогою яких можна реалізувати аналіз їх життєздатності.

Постановка проблеми. Ефективним методом відновлення поголів'я з високим племінним рівнем є трансплантація ембріонів. Широке впровадження штучного осіменіння, трансплантації ембріонів, цілеспрямованого отримання двійнят, регулювання статі, клонування, рання діагностика вагітності, управління процесом пологів стримується практично повною відсутністю засобів автоматизації цих процесів.

У багатьох країнах ведуться роботи по створенню засобів контролю якості ембріонів, які могли б доповнити або повністю замінити морфологічну оцінку. Розробка систем оцінки якості біоматеріалу на базі сучасних інформаційних технологій, може в значній мірі виправити існуючу ситуацію.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. В даний час існує велика кількість робіт [1], яка стосується тих чи інших питань створення нових і модифікації існуючих методів і технічних засобів неруйнівного контролю якості мікрооб'єктів. Аналіз висвітлених у літературі підходів до реалізації методів неруйнівного контролю мікрооб'єктів дозволяє класифікувати найбільш часто вживані способи.

Найбільшого поширення набули методи візуалізації ембріонів за допомогою: оптичних мікроскопів, телевізійних мікрометрів, лазерних фотоелектричних мікрометрів, електронно–променевих і растрових електронних мікрометрів, реконструктивної комп'ютерної томографії, візуалізація термограм, застосування термоіндикаторів [4]. Великого поширення набули методи сканування: скануюча акустична мікроскопія, оптико–електронне сканування, фотоакустична скануюча мікроскопія, голографічна інтерферометрія та інші. Томографічні та акустичні методи можуть мати шкідливий вплив на ембріон [5]. Тому, ці методи ми надалі не розглядаємо. Люмінесцентні методи вимагають застосування короткохвильового оптичного випромінювання, що також може призводити до пошкодження ембріонів. Найбільшими перспективами володіють оптико–електронні методи візуалізації з адаптацією до об'єкта дослідження.

Мета статті – з метою оцінки життєздатності ембріонів, як один з етапів технологічного процесу трансплантації, визначитись з методами здійснення без порушення їх якості.

Встановити тільки способи та технічні засоби, які не впливають негативно на ембріон, що не знижують його життєздатність. Враховуючи, що основою більшості методик є дослідження оптичних характеристик ембріона, проаналізувати можливості оптичного випромінювання для створення систем об'єктивного контролю.

Основні матеріали дослідження. При впливі оптичного випромінювання на біологічний об'єкт виникає велике число фізико–хімічних явищ. До них відносяться: зменшення інтенсивності, зміна фази, просторової орієнтації, спектрального складу, поляризації і т.п. У складних полідисперсних гетерогенних розчинах, таких як живильне середовище і ембріон ці зміни для різних компонентів різні.

Слід зазначити, що при подачі оптичного випромінювання на біооб'єкт різні види впливу можуть відбуватися одночасно.

Тому, при проведенні оптичних досліджень слід враховувати ряд специфічних особливостей об'єкта дослідження:

– Випромінювання, падаюче на біологічний об'єкт, впливає на процеси, що відбуваються в ньому (температура, швидкість біохімічних реакцій і ін.). При цьому необхідно враховувати не тільки інтенсивність, але і спектральний склад випромінювання, так як при різних спектрах однакової потужності можуть відбуватися різні ефекти;

– Ефект впливу залежить від загального потоку енергії випромінювання падаючого на біологічний об'єкт з різних напрямків як від спрямованого на біологічний об'єкт світлового потоку, так і від випромінювань інших джерел (фонове засвітлення від розташованих поруч приладів та ін.);

– При дослідженні полідисперсних рідин необхідно враховувати відміну оптичних властивостей різних дисперсних фаз, які можуть розташовуватися на шляху поширення світла і змінювати спектр випромінювання, що падає на досліджуваний шар або об'єкт;

– У разі, коли при вимірюваннях можуть проявлятися фотобіологічні або фотоадсорбційні процеси необхідно застосовувати спеціальні методичні прийоми;

– При оптичних дослідженнях біологічного об'єкта не доцільно використовувати світлотехнічні одиниці, як ті, що не враховують специфічні особливості поглинання випромінювання біологічним об'єктом, більш прийнятні енергетичні одиниці.

Розглянемо біофізичні основи застосування оптичних досліджень біологічних об'єктів. Найбільшого поширення оптичні методи отримали при дослідженні крові. Оптичні методи дослідження, традиційно використовувалися в біології, не обмежуються мікроскопією. Зокрема, накопичений значний досвід дослідження методами світлового розсіювання розмірів, форми і кількісного складу різних компонентів крові. Прикладом цього може служити дослідження відхилення від

норми розмірів і форми еритроцитів, білків крові [3]. Відомо, що склад білків плазми крові також відображає наявність патології [2] і може служити способом оцінки ступеня інтоксикації. В роботах показано зв'язок фракційного складу білків плазми крові з певним типом хвороби серця, що відкриває нові підходи до використання оптичних методів діагностики в медицині та ветеринарії. Щодо дослідження плазми крові оптичним методом, ефективною може стати спектроскопія світлового розсіювання. Метод спектроскопії світлового розсіювання заснований на вимірюванні динамічних характеристик поступального і броунівського руху мікрочастинок, в даному випадку білкових частинок. Напівширина лінії розсіяного випромінювання, зонduючого розчин, що містить монодисперсними фракцією мікрочастинок, пов'язана з їх розміром і фізичними характеристиками розчинника співвідношенням:

$$\gamma = Dq^2, \quad (1)$$

де q – модуль хвильового вектора розсіювання;

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R} \text{ – коефіцієнт дифузії;}$$

η – коефіцієнт в'язкості;

T – температура;

K – коефіцієнт розширення;

R – гідродинамічний радіус частинок.

Розглянемо можливості основних оптичних методів, за допомогою яких можна реалізувати аналіз життєздатності окремих клітин. Враховуючи той факт, що клітини ембріонів знаходяться в рідині, розглянемо ефекти впливу світла на полідисперсну рідину.

Найбільш поширена група оптичних методів дослідження біологічних середовищ заснована на реєстрації інтегрально або вибірково поглиненого випромінювання. У неї входять: абсорбційна фотометрія, абсорбційна спектроскопія та фотокolorиметрія – методи оцінки ступеня ослаблення потоку випромінювання, що пройшов шар поглинаючої речовини. До цієї групи близькі методи реєстрації інтенсивності відбитого (денситометрія) і розсіяного випромінювання (нефелометрія і турбідиметрія).

Ослаблення потоку монохроматичного випромінювання, що пройшов шар речовини товщиною, описується законом Бугера–Ламберта–Бера:

$$\Phi = \Phi_0 e^{-K_\lambda l}, \quad (2)$$

де Φ_0 – інтенсивність падаючого світлового потоку;

K_λ – спектральний коефіцієнт втрат;

l – довжина кювети з досліджуванним середовищем.

З урахуванням відображення випромінювання на межах шару, який поглинає, отримаємо:

$$\Phi = (1 - \rho)^2 \Phi_0 e^{-K_\lambda l}, \quad (3)$$

де ρ – коефіцієнт відбиття.

Для практичних розрахунків закон Бугера можна записати у вигляді:

$$\ln\left(\frac{\Phi_0}{\Phi}\right) = K_\lambda l \text{ або } \ln\left(\frac{\Phi_0}{\Phi}\right) = K'_\lambda l, \quad (4)$$

де $K'_\lambda = \frac{K_\lambda}{2,303}$ – коефіцієнт втрат, який пропор-

ційний концентрації поглинаючої речовини C :

$$K'_\lambda = cm_\lambda$$

де m_λ – молярний коефіцієнт екстинції, що залежить від властивостей окремих молекул досліджуваної речовини.

Для практичних розрахунків в фотометрії використовують рівняння:

$$\ln\left(\frac{\Phi_0}{\Phi}\right) = cm_\lambda l = D_\lambda, \quad (5)$$

де D_λ – оптична щільність.

Цей закон виконується з високим ступенем точності для більшості речовин, при зміні їх освітленості в 10^{20} разів, але при наявності люмінесценції досліджуваної середовища він порушується. Крім оптичної щільності використовують параметр $\tau\lambda = \Phi/\Phi_0$, званий коефіцієнтом пропускання, причому $D\lambda = \ln(1/\tau\lambda)$. Важливою властивістю фотометрії є адитивність величини. Якщо мається суміш n речовин, які хімічно не взаємодіють, то:

$$D_\lambda = \lg\left(\frac{\Phi_0}{\Phi}\right) = \sum_{i=1}^n \lg\left(\frac{\Phi_0}{\Phi_i}\right) = \sum_{i=1}^n D_{\lambda,i}, \quad (6)$$

де Φ_i – інтенсивність променистого потоку, що пройшов через розчин i -го компонента;

$D_{\lambda,i}$ – величина оптичної щільності i -го компонента.

При впливі на речовину поліхроматичним випромінюванням, в діапазоні довжин хвиль від λ_1 до λ_2 падаючий променистий потік буде визначатися як:

$$\Phi_0 = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Phi_0(\lambda) d\lambda, \quad (7)$$

де $\Phi_0(\lambda)$ – спектральна характеристика випромінювання джерела.

Відповідно, інтенсивність потоку, що пройшов шар речовини:

$$\Phi = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Phi_0(\lambda) \tau(\lambda) d\lambda, \quad (8)$$

а інтегральний коефіцієнт пропускання:

$$\tau = \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Phi_0(\lambda) \tau(\lambda) d\lambda}{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Phi_0(\lambda) d\lambda} \quad (9)$$

Аналогічні вирази можна записати для коефіцієнтів розсіювання ρ_p , відбиття ρ_a і поглинання ρ_n . Так як для різних рідин коефіцієнти $\tau(\lambda)$, $\rho_p(\lambda)$, $\rho_a(\lambda)$ і $\rho_n(\lambda)$ різні, то при стабільній спектральній характеристиці випромінювання розрізняються $\Phi_0(\lambda)$ і інтегральні коефіцієнти.

Для дослідження розчинів, що містять ембріони можна скористатися також методом абсорбційної фотометрії, коли реєструють інтегрально по спектру, або деякій області спектра, потік променевої енергії поглиненої рідиною. Стінки кювет також поглинають і розсіюють випромінювання. Тому застосовують двопробні схеми, коли потік випромінювання після кювети з досліджуваної рідиною порівнюється з потоком, який пройшов еталонний розчин.

В нашому випадку середя являє собою рідину, що містить окремі клітини, оптичні властивості якої залежать від наявності процесів ділення.

Метод фотометрії може бути використаний для контролю процесів ділення у випадку дослідження обсягу рідини, що містить одну клітину. Однак, для реалізації цього методу необхідно мати більш точні відомості про оптичні властивості клітини на різних етапах поділу. Враховуючи відсутність таких відомостей, слід розглядати можливості інших оптичних методів контролю життєздатності клітини.

Аналіз універсальних коефіцієнтів не завжди буває достатнім для аналізу складу і концентрації речовин складної структури, якими є біополімери. Ширші можливості для такого аналізу має метод абсорбційної спектрофотометрії.

При цьому для досліджень придатні не тільки сполуки, які мають характерний спектр поглинання, але і речовини, які в результаті реакцій з іншими дають з'єднання зі специфічними спектрами поглинання.

Висновки. На основі теоретичних досліджень встановлено, що

– існуючі методи контролю ембріонів, засновані на суб'єктивній оцінці оператором їх стану;

– створення систем об'єктивного контролю життєдіяльності ембріонів є актуальним завданням, вирішення якої сприятиме підвищенню ефективності тваринництва;

– попередній контроль стану ембріона і процесів його ділення можна робити шляхом дослідження випромінювання, яке пройшло і розсіяне ембріоном;

– реалізація методів об'єктивної оцінки життєздатності ембріона, заснованих на оптичній візуалізації, можлива тільки при розробці алгоритмів обробки його зображень і формуванні еталонів для різних стадій поділу.

Список використаних джерел

1. Пуятин В. П., Левкин А. В., Левкина Р. В. Компьютерная биометрия в животноводстве // Межд. конф. "Теория и техника передачи, приема и обработки информации" (18–21 сентября, 1995 г., г. Туапсе). – Харьков: ХГТУРЭ. –1995. – 213 с.

2. Пуятин Е. П. Обработка изображений в робототехнике / Е. П. Пуятин, С. И. Аверин – М.: Машиностроение, 1990. – 320 с.

3. Ключев В.В., Легкобыт А.К., Колотовой Н.А. Автоматизация и механизация на предприятиях с дискретным характером производства на основе системы технического зрения // Зрительные системы. – Вильнюс, 1987. – С. 238–257.

4. Верескун О.В. Фотометрический контроль жизнеспособности эмбриона животных // Сб. науч. тр. 7-го Международного молодежного форума "Радиоэлектроника и молодежь в XXI веке". – Харьков: ХНУРЕ. – 2003.– 234 с.

5. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота: Руководство для работы по пересадке эмбрионов / П. Кауффольд и др. – М.: Агропромиздат., 1990.–56 с.

Аннотация

АНАЛИЗ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ОПТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК БИОБЪЕКТОВ БЕЗ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Мунтян В. А., Лысенко О. В., Адамова С. В.

Рассмотрены биофизические основы применения оптических исследований биологических объектов и возможности основных методов, с помощью которых можно реализовать анализ их жизнеспособности.

Abstract

BIOLOGICAL OBJECTS OPTICAL CHARACTERISTICS RESEARCH METHODS ANALYSIS WITHOUT PRE-VISUALIZATION

V. Muntian, O. Lysenko, S. Adamova

The biophysical basis of optical research of biological objects was considered. The possibility of basic optical methods implementation for biological objects viability analysis was shown.