

ФИБРООПТИЧНА СИСТЕМА ЗА БРОЕНЕ НА СОМАТИЧНИ КЛЕТКИ

Ангел Манев¹, Веселин Ташев¹, Диньо Динев²

¹Институт за космически изследвания и технологии – Българска академия на науките

²МИЛКОТРОНИК ООД – гр.Стара Загора

e-mail: amanev@abv.bg

Ключови думи: *фиброоптика, мляко, соматични, клетки*

Резюме: *Предлага се нова иновативна система за броене на соматични клетки в млечни проби с въграждане на фиброоптичен блок като така се избягва използването на лещови оптични системи. Изложени са принципите при моделирането на системата чрез използване на програмната система ZEMAX. Разгледани са особености на конструктивното моделиране и са дадени практически указания за реализацията.*

FIBRE OPTICS COUNTING OF SOMATIC CELLS

Angel Manev¹, Veselin Tashev¹, Dinio Dinev¹

¹Space Research and Technology Institute – Bulgarian Academy of Sciences

²MILKOTRONIK – Stara Zagora

e-mail: amanev@abv.bg

Keywords: *fiber optics, milk, somatic cells*

Abstract: *A new innovative system for counting of somatic cells in milk samples with installation of fiber-optic block avoids the use of optical lens systems. The principles set forth in the modeling of the system by using the software ZEMAX. Examines the characteristics of constructive modeling and gives practical guidelines for implementation.*

Въведение

Принципите на които се изграждат системите за броене на соматични клетки в млечни среди са приложими и в други области, където се налага да се контролира наличието на поплътни, обособени обекти, с микронни размери в течни среди. Създадените системи за броене на соматични клетки могат да се използват в медицината, екологията, хранително-вкусовата промишленост. Голяма част от съществуващите системи са изградени на принципите на физичната оптика с използването на лещови оптични трактове хи понякога сложни механични системи за сканиране на пробите. Предлагатната система решава редица от конструктивните затруднения при реализацията на системи за контрол на микро обекти за които не се изисква изследване на морфологията им.

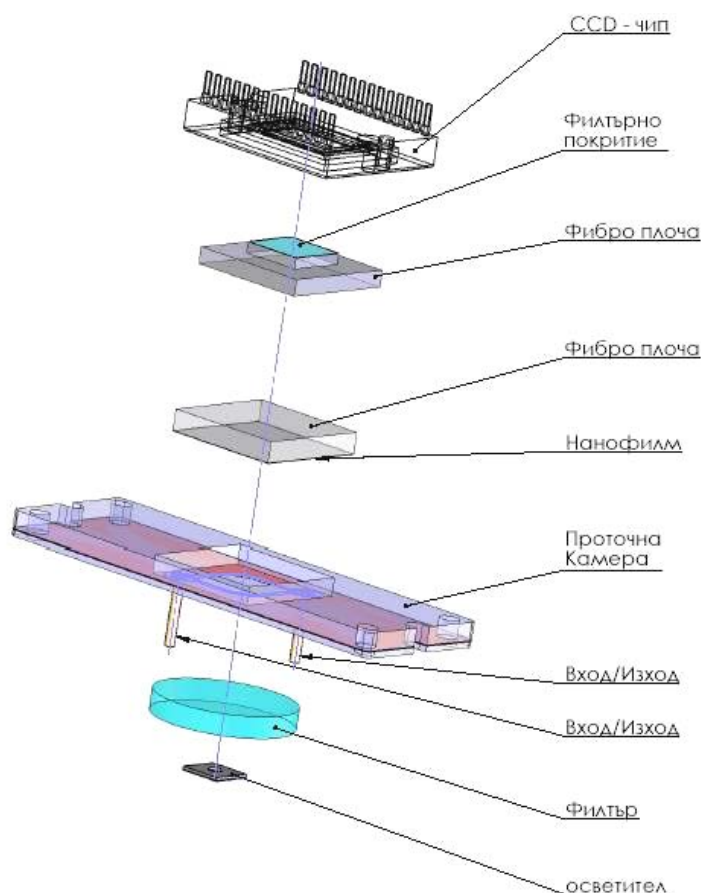
В литературата има описани два типа оптични системи за броене на соматични клетки. Системите от Първи тип са конструирани на базата на оптични елементи, които формират мащабирано изображение посредством комбинация от оптични лещи[1], [2]. Вторият тип са системите, които проектират изображението на обема в микро флуидната камера чрез използването на влакнесто оптични пластини. И при двата типа системи съществуват общи конструктивни характеристики. Детектиращият елемент е CCD матрица, оцветителят в пробата се „напомпва” с лъчение с дължина на вълната 365 мкм, използват се едни и същи алгоритми и програми за „броенето” на клетките. Различията са в начините по които се проектира пробата върху плоскостта на детектора. В процеса на моделиране и на двата типа системи се използваха методите на 3D симулации за пресмятане на оптичните и конструктивни параметри на анализиранията система.

Изследваните обекти – соматичните клетки, имат определени оптични и геометрични характеристики. По литературни данни и според наши изследвания размерът на такава клетка е от порядъка на 9-10 мкм. Плътноста на клетките в пробата от мляко и такава, че минималното разстояние между две клетки на едно и също разстояние от измервателната система много рядко е по-малко от 20 мкм. При тези характеристики е ясно, че изискванията към оптиката ще бъдат не да се анализира морфология на пробата а да се регистрират светещи обекти с определени размери. Това поставя специфични изисквания към особеностите на оптичния тракт – в някои отношения опростяване на изображението а в други засилване на изискванията. По-силни са изискванията за качество на изображението при системите от I тип. С оглед отношението сигнал/шум системите от II тип са по-чувствителни и от тук и с по-високи изисквания към геометрията на трансформирането на изображението.

В процесите на моделиране на оптичните системи се изследва само оптичната система за формиране на изображение без да са включени осветителната и детектиращата система. Характеристиките на осветителната и регистриращи системи играят ролята на гранични условия за оптичния тракт. Оптичният тракт, след като е оптимизиран, задава само коефициент на трансформиране на енергията за доуточняване на характеристиките на осветителя и CCD матрицата.

Проектиране и реаризация на системат

След проучване на съществуващият световен опит в аналогични апаратури и след изследвани на редица технологични проблеми се стигна до конструирането на следната система, показана на фигура 1. При тази схема единственият начин на осветяване на пробата е отдолу чрез фото диод монтиран непосредствено под пробата.



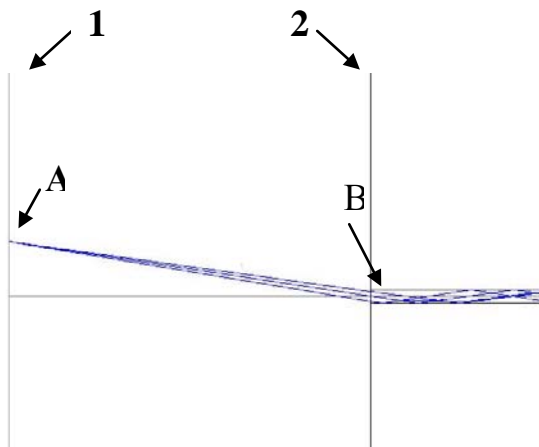
Фиг. 1. Обща схема на системата

От оптична гледна точка системата не е сложна и няма проблемни оптични елементи. Особеностите на конструкцията се състоят в началните условия, поставено пред конструктора. Изискванията са няколко:

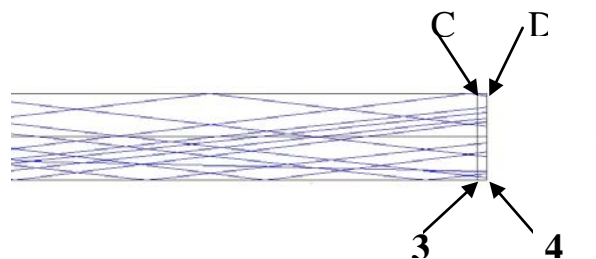
1. На повърхността на детектора CCD матрицата да се изгради изображение на пробата в Поточната камера с достатъчна разделителна способност. Условието е да се наблюдават разделено обекти с размери 9 – 10 мкм като разстоянието между тях не е по-малко от 20 мкм.
2. Да се постигне максимална енергийна пропускливост на системата за да се гарантира стабилно отношение сигнал/шум на входа на детектора.
3. Да се гарантира възможността да се регистрират обекти на дълбочина в Проточната камера до 200 мкм.

Проектно избраната фиброоптична плоча е ИКЮШ 755757.041 с размери на оптичната част 20X20 мм, диаметър на оптичното влакно 6 мкм и дебелина 5 мм (съответно дължина на оптичното влакно). Сърцевината на влакното е изготвена от стъкло ТВФ10 с коефициент на пречупване $n_e = 1.82057$ и коефициент на дисперсия $v_e = 33.17$. Материалът на безцветната плакираща обвивка на влакното е от оптическо стъкло В050 с коефициент на пречупване $n_e = 1.4838$. Тъмната, поглъщащата обвивка е от стъкло ВТ073 с $n_e = 1.90$. Регистриращият елемент е отново CCD матрицата KAF 402.

Оптичното изследването на конструираната фиброоптична система се проведе с помощта на програмната система за оптично моделиране ZEMAX 9.0 12.10.2009 [3]. Съпоставки се правеха и с аналогичните пакети ОПАЛ и ОСЛО. На този етап от изследването моделирахме хода на светлинните лъчи попадащи на само едно от влакната на фиброоптичната плоча. Анализиранията система е показана частично на фигури 23 и фигура 24. На фигура 2 е увеличена „входната част на системата. Показана е симулативна точка А от соматичната клетка, чието фосфоресциращо лъчение попада в началото на фибро оптичното влакно – точка В. След многократно отражение вътре във влакното лъчите излизат от края му и формират изображението на точка А върху равнината на детектора – точка D.



Фиг. 2



Фиг. 3

На челната страна на фиброоптичната пластина, равнина 2, е нанесен защитен слой от SiO_2 , диаманто подобен въглерод с дебелина от порядъка на 110 нм и коефициент на пречупване $n_e = 1.54$. Целта а това покритие е съхраняването на целостта на фибро оптичните бракна при миене и почистване. Този слой се заложи при по-нататъшното моделиране. Влиянието на този слой върху оптичните параметри е незначително поради малката дебелина на слоя, но въпреки това този слой участвава в процесите на моделиране с програмния пакет ZEMAX. На задната стена на фиброоптичната плоча, равнина 3, е нанесен тънкослоен режещ филтър който „режи“ късовълновата компонента ($\lambda < 420 \text{ nm}$) и пропуска лъчение при $\lambda > 420 \text{ nm}$. За получаване на бариерен филтър с горните свойства е използван метода за нанасяне в сандвичова структура на тънки слоеве от SiO_2 ($n_{546\text{nm}} = 1,54$) и TiO_2 ($n_{546\text{nm}} = 2,65$).

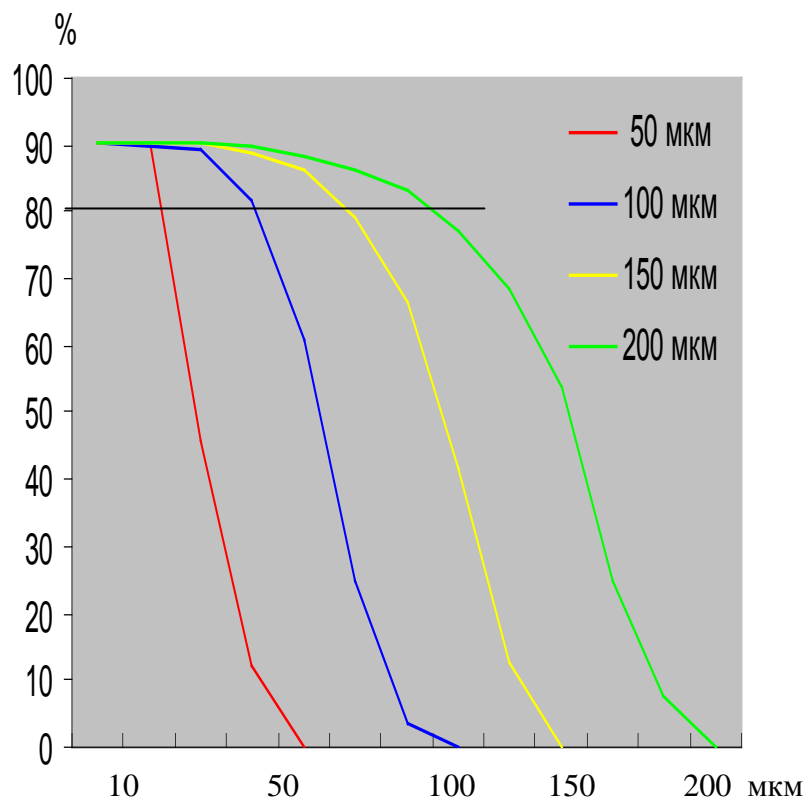
Технологично е прието детекторът – CCD матрицата да се залепи с лепило от типа на Епоксида Opti-Тес5001 за задната страна на фиброоптичната пластина. Показателят на пречупване на лепилото е $n_e = 1.56$. Дебелината на лепилния слой по принцип влияе на качеството на получаваното изображение. Колкото той е по-дебел толкова по „мътно“ е изображението. Проведах се множество симулативни изследвания на зависимостта на

изображението на излъчващата точка А от дебелината на лепилния слой. Изводът да който се достигна бе, че в границата на от 4 до 50 мкм не се наблюдава значимо изменение на параметрите на излизаният от фибро влакното светлинен сноп. Следователно няма оптически ограничения за дебелината на лепилото в тези граници. Единствените съображения остават технологичните и икономически показатели за начина на нанасянето на лепилото, неговата хомогенност и минималния разход на материалите.

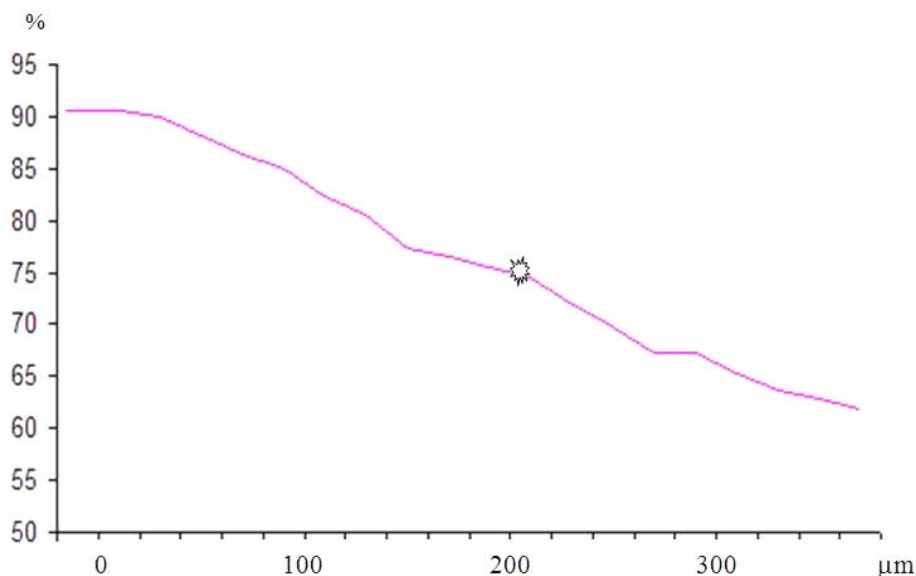
Способността фибропластината да трансформира излъчването на луминисцираща соматична клетка бе изследвано като се проведе моделиране на предаването на лъчението през едно от влакната на фиброоплоката. В програмния пакет ZEMAX бяха заложени следните изходни условия : фиксирани параметри на оптичната система :

- дебелина и коефициент на пречупване на диамантеното покритие;
- дължина, диаметър и показател на пречупване на фибровлакното;
- дебелина и показател на пречупване на режещия филтър;
- дебелина и показател на пречупване на лепилния слой.

Оптичната ос на системата се фиксира през центъра на челната стена на фибровлакното. Разгледахме как енергията от един светлинен източник ще влияе върху детектора, намиращ се в равнината след лепилния слой. За целта Регистрирахме пропускливостта на системата като разполагахме последователно източника в четири, перпендикулярни на оптичната ос, равнини отстоящи от стената на фибровлакното на разстояния 50, 100, 150 и 200 мкм. Във всяка от тези равнини източника бе поставян на различни разстояния от оптичната ос. На фигура 25 са показани резултатите от проведеното моделиране. Последвалите стъпки показаха, че при отдалечаване на източника на повече от 200мкм тенденцията на съответните криви се запазва както тази за кривите до 200мкм. Приемаме, че значимо е пропускане от повече от 80 %. Вижда се от графиката за равнина 50 мкм, че такова пропускане се гарантира само за точки, които се намират на не повече от 3 мкм. За източник в равнина 100 мкм – не повече от 7.5 мкм, а за равнина 150 мкм – 12.5 мкм. Граничен е случаят с равнина 200 мкм. Ако излъчващата точка е в тази равнина и е в границите на до 15 мкм нейното излъчване ще влияе значимо върху изображението, формирано от точки по-близо до оптичната ос. При равнини на по-голямо от 200 мкм разстояние не си струва да се разсъждава защото при тях влиянието на източниците е значимо и при по-големи отстояния от оптичната ос.



Фиг. 4



Фиг. 5

От направеното изследване следва изводът, че дебелината на слоя мляко в проточната камера не трябва да надвишава 200 мкм защото при по-големи дебелини ще се получава освен размазване на изображението на светещите източници, и припокриване на две светещи клетки, които се намират на разстояния по-малки от 30 мкм. А такива обикновено са най-малките разстояния между соматичните клетки, които трябва да се изброяват.

Интересни са резултатите при изменение на оптичната схема и замяната на проточната камера с микрофлуидна, сменяема камера. Приема се, че излъчващият обект е на постоянно разстояние от долната повърхност на стената на камерата -100мкм. Всички параметри остават постоянни а се променя само дебелината на стената на камерата. Резултатите са показани на фигура 4. Изводът, който може да се направи е че при дебелина на стената по-малка от 200 мкм коефициентът на трансформация е по-голям от 75% и това е приемливата граница за дебелината на стената на камерата. По този начин са определени и конструктивните параметри на евентуално използваната сменяема камера за изследваната течност.

Заклучение

В процеса на изследването се демонстрират възможностите на програмната система ZEMAX за моделиране на реални оптични системи с използване на фиброоптични елементи. Предлаганата система за броене на соматични клетки е реализуема и създаването и не крие непреодолими технологични условия. В ИКИТ БАН съществуват условия за конструктивното моделиране на иновативни оптични системи.

Литература:

1. <http://www.chemometec.com/en-GB/global/p87.aspx>
2. <http://www.delaval.com/>
3. <http://www.radiantzemax.com/en/design/>