

Misura del diametro dei globuli rossi per diffrazione

Lorenzo Calandra Buonauro, Andrea Turci

Aprile - Maggio 2022

1 Abstract

In questa esperienza si è analizzata la figura di diffrazione di un globulo rosso quando illuminato da luce monocromatica, per poterne determinare il diametro. In particolare, sono stati prelevati campioni di sangue provenienti da due soggetti in età adulta di cui uno sano con un Mean Corpuscular Volume di 89.6 fL (solitamente è compreso fra 80 fL e 99 fL), mentre l'altro presenta una leggera anomalia riguardo la dimensione media dei globuli rossi, certificata da esami del sangue, per cui essi risultano avere un MCV di 119.3 fL. È stato possibile verificare sperimentalmente che la figura di diffrazione del globulo rosso è da fenditura circolare, compatibilmente con quanto atteso. Inoltre, l'analisi dei dati raccolti ha fornito un valore di $(7.48 \pm 0.35)\mu\text{m}$ per il soggetto sano, e di $(8.89 \pm 0.46)\mu\text{m}$ per il soggetto con l'anomalia, risultati compatibili con quelli attesi, e indipendenti dalla diluizione con cui sono stati realizzati i vetrini.

2 Introduzione

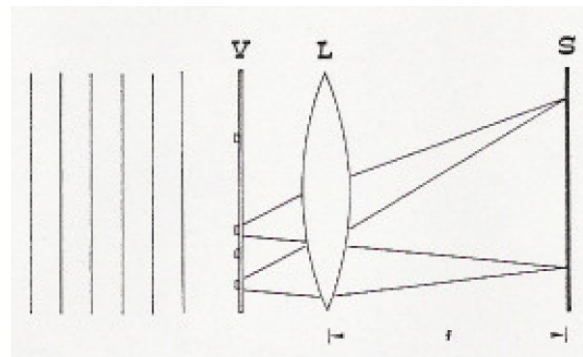
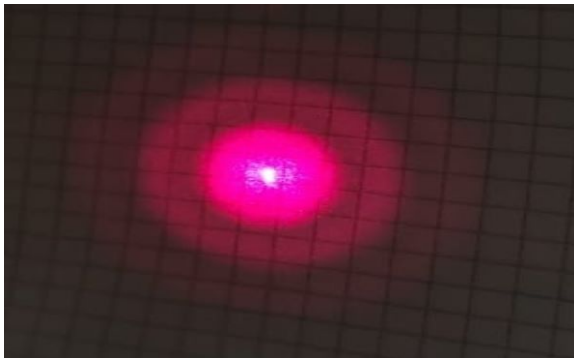


Figura 1: *Figura di diffrazione data dal vetrino*, Figura 2: *Effetto della lente convergente sulla separazione dei raggi ad angoli diversi.*

Il volume corpuscolare medio (MCV) dei globuli rossi è un parametro molto importante a livello clinico, perché permette di conoscere la loro “qualità”; in particolare, un suo valore anomalo suggerisce una inefficienza nella produzione di globuli rossi. I valori considerati normali per una persona adulta sono compresi fra 80 fL e 99 fL, che corrispondono a un valore del diametro compreso fra $7.3\mu\text{m}$ e $8.5\mu\text{m}$. Nonostante la forma del globulo rosso non sia sferica ma sia una sorta di disco schiacciato al centro, per la misura del diametro del globulo rosso abbiamo utilizzato un modello, giustificabile a posteriori, secondo cui il globulo rosso può essere considerato un ostacolo circolare; pertanto, per il principio di Babinet (secondo il quale la figura di diffrazione che si ottiene investendo l'ostacolo con un fascio luminoso monocromatico è la stessa che viene generata da una fenditura circolare con diametro confrontabile con la lunghezza d'onda della luce utilizzata), la figura di diffrazione generata risulta essere un disco centrale circondato da una serie di corone circolari (Fig. 1).

L'intensità luminosa decresce molto rapidamente allontanandosi dal centro della figura di diffrazione e l'andamento è determinato dalla seguente formula:

$$I = I_0 \left(\frac{2J_1(\gamma)}{\gamma} \right)^2 \quad (1)$$

in cui J_1 è la funzione di Bessel del primo tipo e del primo ordine (vedi Appendice 6.1) e in cui γ dipende linearmente dalla posizione rispetto al centro della figura di diffrazione.

L'intensità si annulla nei minimi di diffrazione e nel caso di una fenditura circolare con diametro d , distante L dallo schermo, e un'onda elettromagnetica con lunghezza d'onda λ , si dimostra che il primo minimo di intensità si trova all'angolo θ tale che:

$$\sin\theta = 1.22 \frac{\lambda}{d} \quad (2)$$

Inoltre, se ci troviamo in regime di Fraunhofer, ossia se la distanza fra fenditura e schermo è molto più grande della distanza fra i massimi della figura di diffrazione, possiamo approssimare $\sin\theta$ con $\tan\theta$ e quindi la (2) diventa:

$$\tan\theta = 1.22 \frac{\lambda}{d} = \frac{x}{L} \quad (3)$$

in cui x è la distanza fra il centro della figura di diffrazione e la posizione del primo minimo. In questo modo possiamo ricavare la formula per il diametro della fenditura circolare, che risulta essere:

$$d = 1.22 \frac{\lambda L}{x} \quad (4)$$

Si deve però anche considerare che data la dimensione ridotta del globulo rosso, il fascio luminoso non ne investe uno singolo, ma diverse migliaia, perciò la figura di diffrazione osservata potrebbe in realtà essere quella di un reticolo di globuli rossi. Per eliminare questo dubbio si può utilizzare una lente convergente, che fa in modo che la luce diffratta dai vari globuli rossi allo stesso angolo venga focalizzata sulla lente nello stesso punto del piano focale (Fig. 2), ottenendo così una figura di diffrazione come nel caso di un singolo centro diffusore.

3 Apparato sperimentale e svolgimento

L'apparato sperimentale si compone di varie parti; in primis è presente un laser che emette una luce monocromatica ad una lunghezza d'onda di 632.8 nm (luce rossa). L'intensità luminosa è poi rilevata da un fotodiodo al silicio; questo genera una tensione direttamente proporzionale all'intensità luminosa rilevata e presenta la possibilità di modificare il “*gain*” (1, 10 o 100), ossia di amplificare il segnale per mettere in evidenza i massimi secondari delle figure di diffrazione. Il fotodiodo è montato su un micro-posizionatore mobile, che può essere spostato utilizzando un programma LabView; è inoltre possibile selezionare la fenditura di ingresso del fotodiodo per regolare l'intensità luminosa rilevata e migliorare l'acquisizione. Inserendo a questo punto una fenditura o un oggetto fra il laser e il fotodiodo si può osservare la figura di diffrazione (o interferenza) che si crea sullo schermo e che viene rilevata dal sensore.

I vetrini utilizzati per l'esperimento sono stati realizzati effettuando il cosiddetto “striscio”, con sangue prelevato da un soggetto adulto sano e da un soggetto adulto che presenta un'anomalia nella dimensione dei globuli rossi (macrocitemia); per entrambi sono stati confrontati un vetrino senza diluizione e uno con diluizione 1/20.

Per prima cosa abbiamo misurato il fondo ambientale dovuto alla luce del laboratorio e all'eventuale presenza di altre fonti luminose, per verificare se fosse presente un offset significativo di cui tenere conto nell'analisi dati. Inoltre abbiamo effettuato una serie di misure ripetute con fotodiodo fermo per valutare il rumore elettronico del sensore, inizialmente senza la presenza di

ostacoli e poi inserendo un vetrino vuoto, in modo da verificare che la presenza del solo vetro non desse origine a fenomeni non previsti.

Abbiamo utilizzato la fenditura di 0.1 mm del fotodiodo, l'unica che permette di mettere in evidenza i massimi secondari, e, dal momento che il diametro dei globuli rossi è nell'ordine dei micrometri, abbiamo scelto una distanza L tra il vetrino e il sensore pari a qualche centimetro, per vedere al meglio la figura di diffrazione. Successivamente abbiamo analizzato prima i vetrini a diluizione diversa del soggetto senza anomalie e poi i vetrini del soggetto che presenta anomalie, utilizzando gain diversi al fine di evidenziare sia il massimo centrale sia i minimi secondari. Infine abbiamo esaminato alcuni vetrini posizionando una lente convergente con distanza focale pari a 25.40 mm appena dopo di essi.

4 Risultati e discussione

4.1 Fondo, rumore e vetrino vuoto

Per quanto riguarda il fondo ambientale un'analisi ripetuta con gain fissato a 100 ha fornito un valore di intensità di (13 ± 1) u.a., che risulta essere trascurabile.

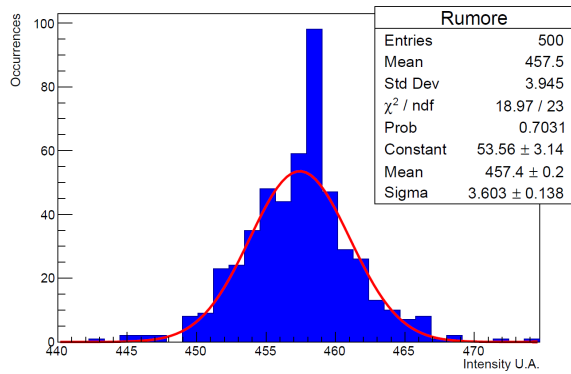


Figura 3: *Grafico del rumore elettronico.*

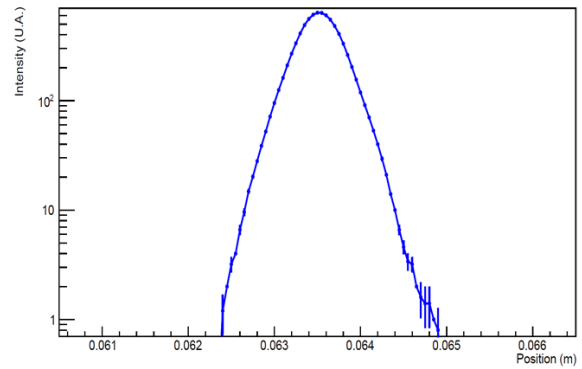


Figura 4: *Grafico ottenuto con vetrino vuoto.*

Come è possibile vedere in Fig. 3, l'analisi di ripetute misure del rumore elettronico del fotodiodo fornisce attraverso un fit gaussiano un valore di intensità medio pari a (457.4 ± 3.6) u.a: possiamo quindi concludere che il rumore può essere trascurato, perchè non si osserva una variazione significativa di intensità quando si effettua un'acquisizione statica. Infine abbiamo verificato che puntando il laser su un vetrino vuoto non si ha una figura di diffrazione (Fig. 4, in scala logaritmica).

4.2 Vetrino soggetto sano

In Fig. 5 è riportato il grafico dei dati raccolti con gain 100 del vetrino del soggetto sano senza diluizione, che come aspettato fuoriesce dal range di acquisizione del fotodiodo. Il fit è stato realizzato utilizzando la Eq. (1) e fornisce come risultati i seguenti valori: $x_{\text{medio}} = (64.7 \pm 0.2)\text{mm}$, $d = (7.40 \pm 0.01)\mu\text{m}$, $L = (6.43 \pm 0.01)\text{cm}$, $I_0 = (2810 \pm 20)$ u.a.. In Fig. 6 è invece possibile osservare l'intera figura di diffrazione, ottenuta unendo i dati raccolti con gain 1, gain 10 e gain 100, messa in scala logaritmica sull'asse y, al fine di evidenziare la posizione dei minimi. La distanza fra il primo minimo e il centro della figura di diffrazione è uguale alla metà della distanza fra i due minimi e risulta pari a $X = (6.5 \pm 0.1)\text{mm}$, mentre la distanza fra il vetrino e lo schermo è stata misurata con il calibro e risulta essere $L = (6.3 \pm 0.2)\text{cm}$, in cui come errore è stata usata la semidispersione massima ottenuta da misure ripetute. Utilizzando la Eq. (4) si ottiene un valore del diametro dei globuli rossi pari a $d = (7.48 \pm 0.35)\mu\text{m}$, in cui l'errore è stato propagato linearmente (si veda Appendice 6.3). L'intervallo di valori ottenuto mediante

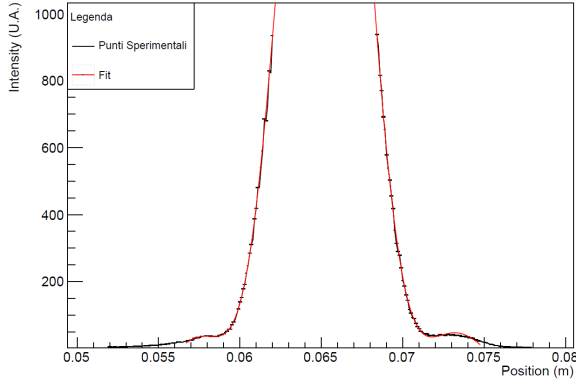


Figura 5: *Grafico dei dati ottenuti dal vetrino del soggetto sano senza diluizione a gain 100, con fit.*

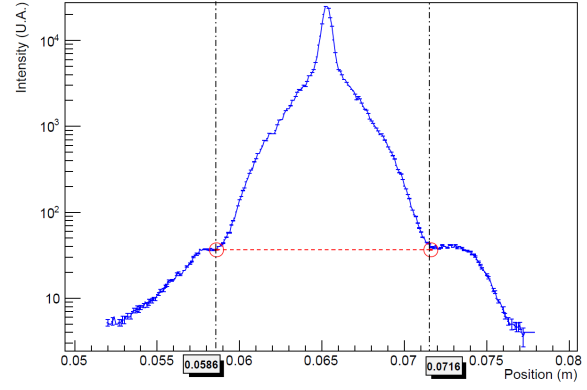


Figura 6: *Grafico in scala logaritmica del vetrino del soggetto sano senza diluizione, con posizione dei primi minimi evidenziata.*

la formula e quello fornito dal fit si intersecano, quindi possiamo affermare che le due diverse misurazioni sono compatibili tra loro.

Inoltre, analizzando la figura di diffrazione di un vetrino del medesimo soggetto con diluizione $1/20$, si ottiene $X = (6.8 \pm 0.1)\text{mm}$, mentre la distanza è sempre $L = (6.3 \pm 0.2)\text{cm}$. Di conseguenza si ottiene un valore del diametro dei globuli rossi pari a $d = (7.15 \pm 0.33)\mu\text{m}$. Confrontando i risultati ottenuti dai vetrini con e senza diluizione, si ottiene che questi sono compatibili tra loro.

A questo punto avendo ottenuto un valore del diametro possiamo calcolare il volume medio del globulo rosso, utilizzando l'Eq. (6), discussa in Appendice 6.2; utilizzando $d = (7.48 \pm 0.35)\mu\text{m}$, il volume risulta essere $V = (91 \pm 13)\mu\text{m}^3 = (91 \pm 13)\text{fL}$, in cui l'errore è stato calcolato propagando linearmente le incertezze.

4.3 Vetrino soggetto con anomalia

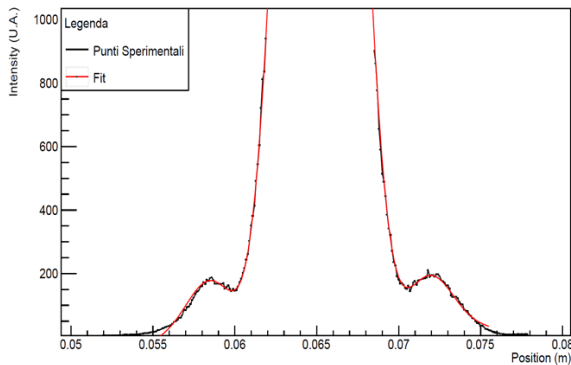


Figura 7: *Grafico dei dati ottenuti dal vetrino del soggetto con anomalia senza diluizione a gain 100, con fit.*

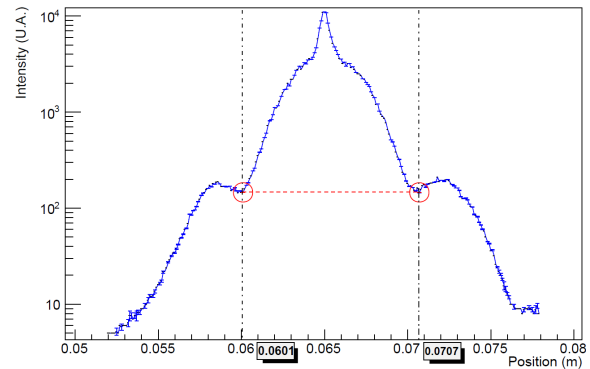


Figura 8: *Grafico in scala logaritmica del vetrino del soggetto con anomalia, con posizione dei primi minimi evidenziata.*

In Fig. 7 è riportato il grafico dei dati raccolti con gain 100 del vetrino del soggetto con anomalia senza diluizione. Il fit fornisce come risultati i seguenti valori: $x_{\text{medio}} = (65.2 \pm 0.1)\text{mm}$, $d = (9.00 \pm 0.01)\mu\text{m}$, $L = (6.10 \pm 0.01)\text{cm}$, $I_0 = (4176 \pm 4)\text{u.a.}$. In Fig. 8 è invece possibile osservare l'intera figura di diffrazione in scala logaritmica sull'asse y, da cui ricaviamo $X = (5.3 \pm 0.1)\text{mm}$, mentre in questo caso $L = (6.1 \pm 0.2)\text{cm}$. Utilizzando l'Eq. (4) si ottiene un valore del diametro dei globuli rossi pari a $d = (8.89 \pm 0.46)\mu\text{m}$. L'intervallo di valori ottenuto

mediante la formula e quello fornito dal fit si intersecano, quindi possiamo affermare che le due diverse misurazioni sono compatibili tra loro. Inoltre, analizzando la figura di diffrazione di un vetrino del medesimo soggetto con diluizione 1/20, si ottiene un valore di diametro del globulo rosso di $d = (8.69 \pm 0.51) \mu\text{m}$, compatibile con i risultati precedenti.

Infine si può anche in questo caso procedere al calcolo del volume utilizzando l'Eq (6); se $d = (8.89 \pm 0.46) \mu\text{m}$, si ottiene un volume $V = (153.2 \pm 23.8) \mu\text{m}^3 = (153.2 \pm 23.8) \text{fL}$.

4.4 Lente convergente

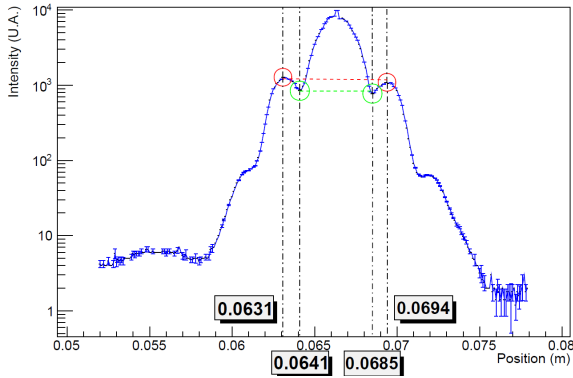


Figura 9: *Figura di diffrazione del vetrino del soggetto sano, con lente convergente.*

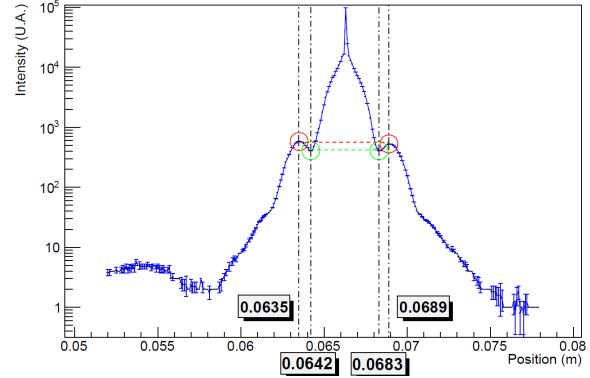


Figura 10: *Figura di diffrazione del vetrino del soggetto con anomalia, con lente convergente.*

L'ingrandimento della lente risulta essere pari a $M = (1.54 \pm 0.14)$ quando la distanza fra lente e schermo è pari alla distanza focale ($f = 25.40 \text{ mm}$) e la distanza fra vetrino e lente è pari a $x = (8.9 \pm 0.5) \text{ mm}$. In Fig. 9 possiamo osservare il grafico in scala logaritmica della figura di diffrazione prodotta dal vetrino del soggetto sano utilizzando la lente convergente: notiamo subito che la posizione dei massimi e dei minimi secondari risulta essere molto più evidente, come aspettato, e combacia con quella data da una fenditura circolare. Se si utilizza il primo massimo secondario nel calcolo del diametro del globulo rosso occorre modificare la formula (4) con il coefficiente 1.635 al posto di 1.22, mentre se si utilizza il secondo minimo occorre usare 2.233. A questo punto come valori di diametro otteniamo: $d = (7.81 \pm 0.73) \mu\text{m}$, utilizzando la posizione del primo minimo, $d = (7.31 \pm 0.59) \mu\text{m}$, utilizzando la posizione del primo massimo secondario e $d = (6.10 \pm 0.42) \mu\text{m}$, utilizzando la posizione del secondo minimo.

Analogamente in Fig. 10 si può osservare il rispettivo grafico per il soggetto con anomalia; in questo caso otteniamo come valori del diametro: $d = (8.19 \pm 0.79) \mu\text{m}$, utilizzando la posizione del primo minimo, $d = (8.53 \pm 0.73) \mu\text{m}$, utilizzando la posizione del primo massimo secondario e $d = (6.83 \pm 0.48) \mu\text{m}$, utilizzando la posizione del secondo minimo.

5 Conclusioni

L'esperienza in primo luogo ha confermato sia che la figura di diffrazione originata dai globuli rossi è compatibile con quella di una fenditura circolare, come ipotizzato, sia che è indipendente dalla diluizione con cui sono stati realizzati i vetrini. Per quanto riguarda il soggetto sano il valori del diametro ottenuto tramite il fit, ossia $d = (7.40 \pm 0.01) \mu\text{m}$, e quello ottenuto tramite l'Eq. (4), ossia $d = (7.48 \pm 0.35) \mu\text{m}$, risultano essere compatibili fra loro e anche con il valore considerato normale, compreso fra $7 \mu\text{m}$ e $8.5 \mu\text{m}$. Analogamente per il soggetto con anomalia sono stati ottenuti i valori $d = (9.00 \pm 0.01) \mu\text{m}$ e $d = (8.89 \pm 0.46) \mu\text{m}$; anche in questo caso i risultati sono compatibili fra loro e il diametro risulta essere più grande del valore considerato normale, come atteso. Il calcolo del volume secondo il modello illustrato ha portato ad un

valore $V = (91.3 \pm 12.8)\text{fL}$ per il soggetto sano, compatibile con il valore atteso, pari a 89.6 fL, mentre di $V = (153.2 \pm 23.8)\text{fL}$ per il soggetto con anomalia, che risulta invece non essere compatibile con il valore di atteso, pari a 119.3fL. Questa discrepanza può essere legata al fatto che aumentando il diametro la forma del globulo rosso si modifica risultando più schiacciata e quindi l'approssimazione fatta non può più essere considerata trascurabile. Infine l'utilizzo della lente convergente ha permesso di studiare anche la posizione del primo massimo secondario e del secondo minimo: i valori ottenuti, sia per il soggetto sano sia per il soggetto con anomalia, sono compatibili per quanto riguarda il primo massimo secondario, mentre per quanto riguarda il secondo minimo non risultano essere compatibili con quanto atteso. Una possibile spiegazione può essere data dal fatto che il laser non sia perfettamente collineare e quindi si aggiungono fenomeni di diffusione che impediscono di localizzare correttamente la posizione del secondo minimo.

6 Appendice

6.1 Funzione di Bessel

La funzione di Bessel J_1 del primo tipo e del primo ordine è definita analiticamente come:

$$J_1(x) = \left(\frac{x}{2}\right) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n \left(\frac{x}{2}\right)^{2n}}{n! \Gamma(x+2)} \quad (5)$$

in cui Γ è la funzione gamma di Eulero.

6.2 Modello matematico del volume di un globulo rosso

La forma dei globuli rossi non è un esatta sfera, ma è più simile a un disco schiacciato al centro. Come evidenziato in numerosi studi ([1], [2]), la curva analitica che meglio ne approssima la forma è detta *ovale di Cassini* di rotazione; per poterla rappresentare in questo modo è però necessario conoscere due dimensioni della cellula, ossia il diametro e lo spessore. Dal momento che quello che noi misuriamo è il diametro, una possibile approssimazione è quella di considerare l'ovale di Cassini in una sua forma particolare, detta *lemniscata di Poisson*; in questo caso la formula per il volume dipende soltanto dal diametro del globulo e risulta essere:

$$V(d) = \frac{\pi^2}{32\sqrt{2}} d^3 \approx 0.218 d^3 \quad (6)$$

6.3 Calcolo dell'errore

L'errore sul calcolo della distanza secondo la formula (4) è stato ottenuto propagando linearmente le incertezze, poichè essendo λ nota risulta essere una semplice divisione fra grandezza di cui conosciamo l'errore assoluto:

$$\frac{\Delta d}{d} = \frac{\Delta L}{L} + \frac{\Delta x}{x} \quad (7)$$

Per quanto riguarda invece l'errore sul calcolo del volume secondo la formula 6, anche in questo caso le incertezze possono essere propagate linearmente e si ottiene:

$$\frac{\Delta V}{V} = 3 \frac{\Delta d}{d} \quad (8)$$

7 Bibliografia

- [1] *Contributions on the shapes of red blood corpuscle* - Hiroshi Funaki.
- [2] *On the geometry of red blood cell* - Borislav Angelov e Ivailo M. Mladenov.