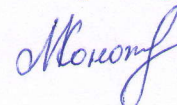


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И ГОРЕНИЯ ИМ. В.В. ВОЕВОДСКОГО  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Конохова Анастасия Игоревна

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ПОЛИДИСПЕРСНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ, СОДЕРЖАЩИХ  
РАЗНОРОДНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК И ЧАСТИЦ, С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕЙ  
ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Специальность 03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук.

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук, профессор  
Мальцев В.П.

Новосибирск – 2017

# Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	9
1.1. Биологические дисперсные системы и методы их исследования.....	9
1.1.1. Бактериальные суспензии.....	9
1.1.2. Молоко как эмульсия жира в плазме.....	14
1.1.3. Субмикронные частицы в плазме крови.....	17
1.2. Проточная цитометрия.....	27
1.3. Характеризация одиночных частиц по светорассеянию: прямая и обратная задача светорассеяния.....	30
Глава 2. Экспериментальная основа метода.....	34
2.1. Сканирующий проточный цитометр.....	34
2.2. Оценка углов сбора сигналов FSC и SSC.....	36
2.3. Оценка чувствительности СПЦ.....	39
Глава 3. Характеризация и идентификация сферических и несферических частиц по светорассеянию.....	42
3.1. Прямая задача светорассеяния.....	42
3.1.1. Оптические модели.....	42
3.1.2. Методы расчета.....	43
3.2. Обратная задача светорассеяния.....	44
3.2.1. Характеризация сферических частиц по двум сигналам рассеяния в заданных угловых диапазонах.....	44
3.2.2. Характеризация сферических и несферических частиц по индикатрисе светорассеяния.....	45
3.2.3. Оценка погрешности.....	47
3.2.4. Анализ регрессионных остатков.....	48
3.3. Методы повышения точности решения обратной задачи светорассеяния.....	49
3.3.1. Влияние отклонения траектории пролета частицы на индикатрису светорассеяния и точность оценки параметров частицы.....	50
3.3.2. Характеристики светорассеяния, инвариантные к отклонению траектории частицы от оптической оси СПЦ.....	52
3.3.3. Обобщенный метод наименьших квадратов.....	54
3.3.4. Проверка методов на экспериментальных данных.....	55
3.4. Идентификация и классификация частиц по светорассеянию.....	65
3.4.1. EM-кластеризация.....	66
3.4.2. Сравнение вложенных и невложенных моделей.....	66
3.4.3. Классификация с помощью автоматического обучения.....	68
3.4.4. Оценка точности классификации.....	69
3.5. Заключение главы.....	70
Глава 4. Характеризация жировых частиц молока.....	72
4.1. Оптическая модель.....	72
4.1.1. Светорассеяние малых гомогенизированных ЖЧМ.....	73
4.2. Обратная задача светорассеяния.....	74
4.3. Эксперимент.....	75
4.3.1. Образцы молока.....	75

4.3.2. Измерения на сканирующем проточном цитометре .....	75
4.4. Результаты и обсуждение .....	75
4.4.1. Характеризация одиночных жировых частиц молока по светорассеянию .....	75
4.4.2. Характеризация молока по распределениям жировых частиц .....	79
4.5. Заключение главы .....	83
Глава 5. Характеризация шаровидных и палочковидных бактерий .....	85
5.1. Моделирование светорассеяния палочковидных и простых форм шаровидных бактерий .....	85
5.1.1. Светорассеяние парных и делящихся клеток палочковидных бактерий .....	86
5.2. Обратная задача светорассеяния .....	87
5.3. Эксперимент .....	88
5.3.1. Культуры клеток бактерий .....	88
5.3.2. Измерения на сканирующем проточном цитометре .....	89
5.3.3. Измерения на оптическом микроскопе .....	89
5.4. Статическая характеристика шаровидных и палочковидных бактерий .....	90
5.5. Исследование возможности идентификации бактерий в составе смешанных популяций .....	96
5.5.1. Штаммовая (внутривидовая) классификация бактерий .....	96
5.5.2. Видовая и родовая классификация бактерий .....	98
5.5.3. Классификация бактерий по светорассеянию с использованием автоматического обучения .....	102
5.6. Динамическая характеристика палочковидных бактерий на примере роста культуры <i>Escherichia coli</i> .....	108
5.6.1. Схема эксперимента .....	108
5.6.2. Результаты и обсуждение .....	109
5.7. Заключение главы .....	111
Глава 6. Характеризация микрочастиц в плазме крови .....	114
6.1. Оптические модели частиц плазмы .....	114
6.2. Эксперимент .....	116
6.2.1. Подготовка образцов плазмы крови .....	116
6.2.2. Схема экспериментов .....	116
6.2.3. Измерения на сканирующем проточном цитометре .....	117
6.3. Идентификация тромбоцитов и субмикронных частиц в плазме крови .....	118
6.4. Результаты и обсуждение .....	123
6.4.1. Характеризация субмикронных частиц в плазме крови .....	123
6.4.2. Влияние центрифугирования на характеристики субмикронных частиц плазмы .....	124
6.4.3. Характеризация субмикронных частиц в плазме, активированной с помощью коллагена и АДФ .....	125
6.4.4. Постпрандиальная динамическая характеристика хиломикронов в плазме крови .....	128
6.4.5. Сравнительный анализ субмикронных частиц плазмы в норме и при риске атеросклероза .....	130
6.5. Заключение главы .....	132
Заключение .....	134
Выводы .....	139
Список литературы .....	142

## **Введение**

Среды, содержащие разнородные популяции частиц биологического происхождения, относятся к классу биологических дисперсных систем и являются широко распространенным объектом исследования в медицине, биотехнологии, биофизике и других областях науки. Примерами таких систем являются биологические жидкости человека (кровь, плазма), природные среды, содержащие разнородные клеточные популяции, различные суспензии (культуры бактерий) и эмульсии (взвесь жировых частиц в молоке). Актуальность разработки методов характеристики подобных систем, определяется широким спектром связанных с их изучением задач, в основе решения которых зачастую лежит необходимость детальной характеристики морфологии имеющихся в среде объектов с целью их классификации (идентификация отдельных субпопуляций клеток и частиц, детекция примесей), изучения динамики изменений их характеристик (количественные биофизические исследования) и анализа отклонений характеристик от нормы (клиническая диагностика).

Существует множество методов анализа дисперсных систем, особое место среди которых занимают оптические неинвазивные методы. В их основе лежат два принципиально разных подхода, согласно которым измерения проводятся либо на ансамбле частиц, либо на одиночных частицах в режиме поштучного анализа. И только последние применимы для характеристики полидисперсных и сложных сред, содержащих разнородные популяции клеток и частиц, имеющих вариабельность не только по форме, но и по размеру (в данной работе мы ограничиваемся рассмотрением диапазона от сотен нанометров до нескольких микрон). При этом, для получения статистически достоверных результатов анализа зачастую требуется проведение измерений с большим накоплением данных ввиду большого разнообразия характеристик биологических объектов даже в пределах отдельного класса, а также при наличии редких субпопуляций, составляющих лишь небольшую долю от всех клеток и частиц. В настоящее время решение данной задачи в основном достигается за счет использования автоматических анализаторов одиночных частиц, в основе работы которых лежит принцип проточной цитометрии. Однако лишь единичные технологии из существующих совмещают в себе необходимые качества для классификации, идентификации, статической и динамической характеристики отдельных субпопуляций клеток и частиц в многокомпонентных средах.

Методы, позволяющие проводить морфологический анализ объектов в результате их прямого наблюдения (различные виды микроскопии и проточная цитометрия с визуализацией частиц в потоке) или на основании измерения большого объема информации (оптическая голография), как правило не обладают достаточным разрешением или скоростью анализа, и область их применимости также не затрагивает объекты в субмикронном диапазоне размеров.

Методы, сочетающие в себе высокую скорость измерений (обычная проточная цитометрия) и чувствительность (tunable resistive pulse sensing, tRPS; анализ траекторий наночастиц), дают лишь некоторую оценку размеров частиц (объем или гидродинамический радиус), но ничего не говорят об их морфологии, что затрудняет дифференциацию различных субпопуляций. Их идентификация и классификация, как правило, осуществляется с использованием флуоресцентных меток (многоцветная проточная цитометрия), но их применение имеет ряд недостатков и ограничений: во-первых, оно также не предоставляет никакой информации о морфологии частиц и, тем более, о возможных ее изменениях; во-вторых, процедуру окрашивания нельзя считать полностью неинвазивной, что ограничивает ее применимость для проведения кинетических исследований динамики различных процессов в живых системах, и, в-третьих, нельзя не отметить высокую стоимость флуоресцентного анализа. Помимо этого, использование флуоресцентных меток затруднено для анализа частиц субмикронных размеров, не имеющих достаточное количество сайтов связывания, а также для дифференциации субпопуляций, для которых невозможно подобрать специфические метки.

Технология сканирующей проточной цитометрии (СПЦ), основанная на измерении угловой зависимости интенсивности рассеянного излучения (индикатрису) для одиночных частиц, обеспечивает не только статистическую точность анализа благодаря высокой скорости измерений (порядка  $10^2$  частиц в секунду), но также позволяет детально характеризовать морфологию (размер, форму и показатель преломления) частиц благодаря большому объему измеряемой информации, содержащейся в каждой индикатресе, и применению передовых методов решения прямой и обратной задачи светорассеяния.

Данные методы уже успешно применялись для характеристики как относительно простых сферических и более сложных несферических биологических клеток, включая лимфоциты, тромбоциты и эритроциты. Таким образом, потенциал технологии был продемонстрирован только для характеристики однокомпонентных сред, содержащих достаточно крупные (порядка нескольких длин волн) биологические объекты, форма которых может быть описана некоторой общей оптической моделью, описываемой несколькими параметрами.

Целью диссертационной работы является развитие технологии сканирующей проточной цитометрии для характеристики широкого класса объектов различных форм и размеров, включая биологические частицы в субмикронном диапазоне размеров, в составе сложных биологических полидисперсных систем, содержащих разнородные популяции клеток и частиц.

Задачами данной работы являются:

1. Разработать метод определения угловых диапазонов сбора интегральных сигналов рассеяния вперед и бокового светорассеяния, регистрируемых триггерной системой СПЦ, и

оценить границу чувствительности прибора для детекции одиночных сферических субмикронных частиц в параметрах размера и показателя преломления частиц.

2. Исследовать единственность и точность решения обратной задачи светорассеяния, заключающейся в определении размера и показателя преломления сферических субмикронных частиц по двум интегральным сигналам светорассеяния, измеренным в фиксированных телесных углах (рассеяние вперед и боковое рассеяние).

3. Исследовать влияние искажений, возникающих при измерении индикатрис светорассеяния в связи с отклонением траектории пролета частиц от оптической оси СПЦ, на точность решения обратной задачи светорассеяния. Предложить возможные подходы для повышения точности оценки характеристик частиц при наличии неслучайных ошибок измерений и экспериментально проверить их эффективность, в т.ч. в сравнении с результатами, полученными с помощью других методов (оптическая и электронная микроскопия).

4. Разработать метод характеристики жировых частиц в молоке, учитывающий возможное отклонение формы частиц от сферической модели, для прецизионного измерения характеристик жировых частиц (форма, размер, показатель преломления), имеющих значение для контроля качества молока и молочных продуктов.

5. Разработать методы характеристики простых форм шаровидных (кокки, диплококки) и палочковидных бактерий и экспериментально проверить их в сравнении с микроскопическими измерениями. Исследовать возможность идентификации и классификации разнородных субпопуляций бактерий в смешанных культурах на основании характеристики одиночных клеток и на основании только измеренных индикатрис с помощью машинного обучения. Экспериментально проверить возможность динамической характеристики культур бактерий.

6. Разработать метод безфлуоресцентной идентификации сферических субмикронных частиц в плазме крови и их метод их характеристики по размеру и показателю преломления. Изучить возможность дифференциации субпопуляций клеточных микровезикул и хиломикронов по показателю преломления. Оценить диагностический потенциал метода.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые технология сканирующей проточной цитометрии применена для характеристики сложных полидисперсных систем, содержащих разнородные популяции клеток и частиц, включая биологические частицы, размер которых сравним с длиной волны. Достижение высокой точности в определении морфологических характеристик одиночных частиц позволяет идентифицировать их отдельные субпопуляции в составе сложных систем (молоко, бактериальные суспензии, плазма крови) на основе формы, размеров и показателей преломления частиц, а также на основе исследования динамики их изменений при различных процессах.

Теоретическая ценность работы связана с развитием метода решения обратной задачи светорассеяния для сферических и несферических частиц по индикатрисе светорассеяния. Предложенные в работе способы усовершенствования процедуры нелинейной регрессии позволяют повысить точность характеристики частиц различных форм в широком диапазоне размеров, достигая субдифракционного разрешения в измерении их пространственных характеристик. В результате исследования разрешимости обратной задачи светорассеяния, заключающейся в определении размера и показателя преломления субмикронных частиц по переднему и боковому рассеянию в рамках теории Ми, было показано, что единственность решения гарантируется в ограниченном диапазоне характеристик частиц, что является дополнительным обоснованием необходимости измерения большого объема оптической информации для характеристики морфологии частиц по светорассеянию.

Практическая ценность работы связана с расширением потенциала СПЦ для анализа сложных полидисперсных сред, содержащих разнородные популяции клеток и частиц. Предлагаемые в работе способы идентификации и классификации различных субпопуляций клеток и частиц потенциально применимы для анализа любых смесей частиц на СПЦ, форма которых может быть представлена реалистичными моделями, описываемыми несколькими параметрами. В частности, разработанные в данной работе методы характеристики жировых частиц молока, бактерий и субмикронных частиц плазмы, и результаты, полученные при анализе данных объектов, могут найти применение для решения различных биофизических, биотехнологических и клинико-диагностических задач, связанных с исследованием как рассмотренных в работе, так и других биологических полидисперсных систем.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Обратная задача светорассеяния, заключающаяся в определении размера  $d$  и показателя преломления  $n$  сферических субмикронных частиц ( $d \in [0.1, 1.5]$  мкм и  $n \in [1.35, 1.7]$ ) по двум интегральным сигналам рассеяния, измеряемым в фиксированных телесных углах, имеет единственное решение в ограниченном диапазоне параметров частиц.
2. Использование положения спектрального максимума индикатрисы светорассеяния и амплитуд сигналов рассеяния вперед и бокового рассеяния в качестве дополнительной информации при решении обратной задачи светорассеяния позволяет повысить точность характеристики сферических и сфероидальных частиц с небольшим отношением полуосей ( $<1.4$ ) при наличии неслучайных искажений в измерении индикатрис светорассеяния.
3. Предложенные в работе методы характеристики сферических и сфероидальных клеток и частиц биологического происхождения по светорассеянию, измеряемому с помощью

СПЦ, позволяют определять их размер с точностью до 70 нм и измерять показатель преломления с точностью 0.003–0.02 (приведен разброс медианных погрешностей).

4. Показатель преломления субмикронных частиц в плазме крови, сданной через 3 часа после приема пищи, имеет в среднем более высокое значение (1.486–1.518) по сравнению с показателем преломления микрочастиц в плазме, сданной натощак (1.443–1.461) (приведен разброс для трех доноров).

Содержание диссертации докладывалось на конгрессах международного общества развития цитометрии ISAC в 2012 (Германия), 2013 (США) и 2015 г. (Великобритания), международной конференции «Electromagnetic and Light Scattering - XV» в 2015 г. (Германия), научной школе-конференции «Теория и численные методы решения обратных и некорректных задач» в 2012 г. (Новосибирск, Россия), международной конференции «Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology» в 2014 г. (Россия), а также на научных студенческих конференциях «Студент и научно-технический прогресс» в 2011 и 2013 гг. (Новосибирск, Россия), на научных семинарах в Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН и в Ягеллонском университете г. Кракова (Польша).

По результатам работы опубликованы 33 печатных работы, из них 8 статей в российских и международных журналах из списка ВАК; 25 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 289 наименований. Диссертация изложена на 154 страницах, включает 14 таблиц и 59 рисунков. Работа выполнена в Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН и поддержана в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», грантами РФФИ и РНФ.



# Глава 1. Обзор литературы

## 1.1. Биологические дисперсные системы и методы их исследования

По определению к биологическим дисперсным системам относят класс объектов, для которых дисперсионной средой является вода или растворы электролитов, а дисперсионной фазой – различные частицы биологического происхождения. Примерами таких систем являются различные эмульсии (молоко), биологические жидкости человека (кровь, плазма), суспензионные культуры, природные среды, включающие разнородные клеточные популяции. Именно широкая распространенность биологических дисперсных систем и определяет актуальность проблем их исследований.

Реальные биологические системы, как правило, являются полидисперсными и многокомпонентными, т.е. включают несколько классов биологических объектов, различающихся по форме, размерам, составу и происхождению. Задача детальной характеристики подобных систем является частью многих фундаментальных и научно-прикладных исследований, в том числе в области биомедицины и биотехнологии, и требует применения точных и высокоинформативных методов анализа.

В данной диссертации рассматриваются три примера дисперсных систем, содержащих биологические клетки и частицы: суспензионные культуры, содержащие клетки бактерий, молоко, как эмульсия жировых частиц, и плазма крови с различными субпопуляциями микрочастиц в ней. Обзору литературы по основным задачам и методам исследования данных объектов посвящаются следующие три подраздела настоящей главы.

### 1.1.1. Бактериальные суспензии

#### 1.1.1.1. Клетки бактерий

Бактерии являются важным для изучения объектом прежде всего потому, что жизнь и деятельность человека неразрывно связана с ними. Многие бактерии являются возбудителями различных опасных инфекций. Другие бактерии наоборот находятся в симбиотических отношениях с организмом человека и играют важную роль в регуляции многих физиологических процессов, включая метаболические и иммунные реакции. Также бактерии широко используются в различных отраслях промышленности. Например, молочнокислые бактерии *Lactobacillales* являются незаменимыми в пищевой, а бактерии *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* – в фармацевтической отрасли. Кроме того, благодаря простоте своего строения, быстрому росту и размножению бактерии служат хорошими модельными объектами для изучения разнообразных биохимических процессов.

Бактерии относятся к микроорганизмам, имеющим прокариотический тип организации клетки (не имеют ядра). В большинстве своем они являются одноклеточными, за исключением актиномицетов и цианобактерий. Размеры бактерий, как правило, оставляют от 0.5 до 10 мкм. Формы клеток бактерий не отличаются большим многообразием: чаще всего это палочки разной длины (бациллы) и сферические клетки (кокки), реже встречаются извитые формы – вибрионы и спириллы, а также звездчатые, тетраэдрические и кубические формы [1]. Клетки бактерий могут образовывать устойчивые сочетания – пары палочек и кокков (диплобациллы и диплококки), различные по длине цепочки, тетрады и пакеты из 4, 8 и более кокковидных клеток и другие скопления.

Бактерии характеризуются сравнительно простой внутриклеточной организацией и не содержат автономных органелл, а основной объем клетки занимает цитоплазма, состоящая из растворимых белков, что позволяет считать клетку в достаточной степени однородной. Однако некоторые виды бактерий при неблагоприятных условиях существования формируют споры, форма и расположение которых являются видовым свойством бактерий, позволяющим отличать их друг от друга. Цитоплазма клетки окружена цитоплазматической мембраной (ЦПМ), которая состоит из простых фосфолипидов, образующих мембранный бислой, куда погружены многочисленные белки. Она является естественным барьером проницаемости и регулирует обмен веществами с окружающей средой. Важным структурным элементом бактериальных клеток является клеточная стенка, окружающая ЦПМ, состав и строение которой является важным систематическим признаком, по которому бактерии подразделяются на грамположительные и грамотрицательные. Клеточная стенка грамположительных бактерий представляет собой гомогенный пептидогликановый слой толщиной 20 – 80 нм в котором имеются поры диаметром 1 – 6 нм, делающие ее проницаемой для ряда молекул. У грамотрицательных бактерий этот слой неплотно прилегает к ЦПМ и имеет толщину лишь 2 – 3 нм, но снаружи он окружен дополнительной внешней мембраной, представленной ассиметричным липидным бислоем (внутренний слой – фосфолипиды, внешний – липополисахариды). Пространство между ЦПМ, пептидогликановым слоем и внешней мембраной, называемое периплазматическим, заполнено раствором, включающим в себя транспортные белки и ферменты. Наличие дополнительного барьера проницаемости в виде внешней мембраны делает грамотрицательные бактерии более устойчивыми к многим внешним негативным воздействиям, в т.ч. к действию антибиотиков [2,3].

Большинство бактерий не имеют полового процесса и размножаются посредством равновеликого бинарного поперечного деления, приводящего к образованию двух одинаковых дочерних клеток.

### *1.1.1.2. Задачи и методы исследования бактерий*

Задача идентификации и характеристики бактерий в составе сложных полидисперсных систем является первостепенной для многих областей и затрагивает широкий спектр решаемых в них вопросов, включая:

- медицинскую диагностику инфекционных заболеваний человека и животных;
- исследование антибиотикорезистентности бактериальных штаммов для проверки существующих и разработки новых лекарственных препаратов;
- проведение фундаментальных научных исследований;
- стандартизацию микробиологических коллекций на основе быстрого сравнения и классификации штаммов из различных изолятов;
- проведение бактериологического анализа различных смывов и пищевых продуктов на предмет микробиологического загрязнения патогенными и условно-патогенными микроорганизмами на разных стадиях производства в пищевой промышленности.

Классическими методами микробиологического анализа являются культуральные методы, основанные на посевах исследуемого биологического материала на селективных питательных средах, которые направлены на получение чистых культур в виде отдельных колоний микроорганизмов с целью их последующей идентификации на основе морфологических, биохимических и серологических критериев. Уже более 100 лет культуральные методы служат «золотым стандартом» микробиологического анализа, и до сих пор считаются наиболее надежными и востребованными для многочисленных применений [4,5]. Но несмотря на высокую точность и специфичность, они не лишены существенных недостатков, среди которых основными являются длительность исследования (от 48 до 96 ч) и высокие требования к забору материала. И именно время, отводимое на микробиологический анализ, является наиболее критичным, особенно в медицинской диагностике, при выявлении возбудителя инфекции и его исследовании на устойчивость к антибиотикам, когда с каждым часом откладываемое лечение угрожает жизни пациента.

В качестве альтернативных методов микробиологического анализа широкое развитие получили следующие три основных направления: 1) методы биохимического анализа и детекции, 2) молекулярные методы идентификации микроорганизмов, включающие главным образом генетический анализ с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) [6,7], и 3) спектральные методы протеомного и метаболомного анализа, включающие методы газовой хроматографии, масс-спектрометрии, Фурье-спектроскопии в инфракрасной области [8] и матрично-активированную лазерную десорбцию/ионизацию в комплексе с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF) [9].

Спектральные методы, такие как MALDI-TOF, считаются одним из наиболее перспективных экспресс-решений задачи идентификации бактерий. Они обладают высокой специфичностью и требуют всего несколько часов на анализ. При этом точность идентификации микроорганизмов на уровне семейств, родов, отдельных видов и подвидов достигает практически 97% [10]. Анализ основывается на получении масс-спектра высоко консервативных и видоспецифичных рибосомальных белков исследуемого объекта, и его сравнении с масс-спектрами, содержащимися в базе данных. Как правило, для исследования используется материал чистой культуры, выращенный на твердой питательной среде, но также возможна идентификация микроорганизмов в жидких питательных средах и биологических жидкостях [11,12]. Главным ограничением метода является его неприменимость для анализа сред, потенциально содержащих несколько видов бактерий, из-за невозможности разделения перекрывающихся спектров.

Молекулярно-генетические методы, основанные на ПЦР (полимеразная цепная реакция), также обладают высокой специфичностью и позволяют сократить время, необходимое на проведение микробиологического анализа: весь процесс, от поступления биологического материала до получения конечного результата, обычно занимает не более дня. Но несмотря на высокую скорость и производительность ПЦР, достоинством и, вместе с тем, главным недостатком метода является крайне высокая чувствительность [13]. С одной стороны, это позволяет детектировать наличие даже одного микроорганизма в образце, когда стандартные серологические и бактериологические исследования не дают положительного результата вследствие недостаточной для обнаружения концентрации клеток (например, при контроле инфекционной безопасности донорской крови). С другой стороны, экстремальная чувствительность метода может приводить к ложно-положительным результатам вследствие даже небольшого загрязнения исследуемого материала [14]. Более того, положительные результаты не обязательно свидетельствуют о наличии в образце живых микроорганизмов, подтверждая лишь наличие их нуклеиновых кислот, которые могут быть дериватами погибших клеток [15].

Несмотря на высокую специфичность и скорость анализа, существенным ограничением рассмотренных методов является, во-первых, значительная потеря в точности анализа при изучении полидисперсных систем, содержащих неизвестный вид микроорганизмов, или систем, включающих несколько культур клеток. Во-вторых, их применимость ограничивается достаточно узким спектром задач, куда не входит проведение исследований, подразумевающих определение жизнеспособности клеток или отслеживание некоторой динамики их роста, например, при изучении резистентности микроорганизмов к противомикробным препаратам [16–18], оценке эффективности и стабильности процессов производственной ферментации

[19,20], или при идентификации или селекции микроорганизмов, обладающих определенными характеристиками, например, лучшими показателями роста при заданных условиях [21,22].

Отдельного внимания заслуживают оптические неинвазивные методы, включающие, помимо упоминавшейся выше Фурье-спектроскопии в инфракрасном диапазоне, измерения светорассеяния, флуоресцентный анализ, комбинационное рассеяние света и флуоресцентную спектроскопию [23,24]. Условно все эти оптические методы можно разделить на методы, анализирующие (1) колонии бактерий [25–27], (2) суспензии микроорганизмов [28–30] и (3) отдельные клетки [31–35]. При этом все большее значение отводится методам, позволяющим проводить исследования популяции бактерий на уровне одиночных клеток. Основным преимуществом данного подхода к анализу бактериальных культур является повышение эффективности анализа за счет уменьшения эффекта усреднения наблюдений при изучении культуры как одного целого, и повышения чувствительности за счет возможности детекции изменений, происходящих на уровне одной клетки [36,37]. Помимо этого, только с помощью такого подхода можно надежно решать задачи детекции и идентификации бактерий, особенно в малых примесях. Методы анализа сложных дисперсных систем в одночастичном режиме основаны главным образом на принципах проточной цитометрии, и в настоящее время представляют реальную альтернативу стандартным микробиологическим тестам [38,39]. В литературе неоднократно предполагалось и обосновывалось, что в комбинации с измерением пространственного распределения характеристик рассеянного света, включая его интенсивность и поляризацию, которые содержат в себе полную информацию о морфологии объекта, эти методы несут в себе большой потенциал для решения задач идентификации и характеристики бактерий [28,40–46]. К сожалению, проточные цитометры стандартной конфигурации не позволяют измерять светорассеяние с пространственным разрешением, достаточным для характеристики морфологии одиночных клеток [47]. Для измерения большого объема оптической информации существует несколько других подходов [35,48], в том числе применяемая в данной работе технология сканирующей проточной цитометрии [49].

Возможность дифференциации четырех видов бактерий по светорассеянию была продемонстрирована в работах [31] и [32], где авторы модифицировали проточный цитометр для измерения светорассеяния в четырех разных кольцевых диапазонах телесного угла. В работе [35] дифференциация четырех типов бактерий была осуществлена на основании измерения углового распределения интенсивности рассеянного света, восстановленного с помощью преобразования Фурье фазовых изображений одиночных клеток бактерий. Индикатрисы светорассеяния одиночных бактерий *E. coli* в логарифмической и стационарной фазах роста были впервые измерены в широком угловом диапазоне на сканирующем проточном цитометре в работе [50]. Авторы показали качественные отличия в индикатрисах бактерий этих

двух фаз. Так же были приведены примеры моделирования светорассеяния одиночными клетками, но из-за большой вычислительной сложности осуществить их характеристику по индикатрисе в то время оказалось невозможным.

Полной реализации потенциала данных измерений посвящена Глава 5 данной диссертации, в которой представлены методы статической характеристики палочковидных и шаровидных бактерий, а также возможность их применения для динамической характеристики бактериальных культур. Помимо этого, продемонстрирована возможность идентификации и классификации отдельных субпопуляций бактерий в смешанных культурах на основании измерения индикатрис светорассеяния одиночных клеток и решения обратной задачи светорассеяния, а также в результате применения алгоритмов машинного обучения.

## **1.1.2. Молоко как эмульсия жира в плазме**

### ***1.1.2.1. Жировые частицы молока***

Молоко является классическим примером биологической многокомпонентной полидисперсной среды, основные компоненты которой, включая жир, казеин и молочный сахар находятся в различных коллоидных состояниях. Энергетическая и биологическая ценность молока во многом зависит от его жировой составляющей. Жир в молоке образует эмульсию или суспензию и распределен в виде жировых капель более или менее правильной формы, окруженных липопротеидными и гидратными оболочками, которые обеспечивают их устойчивость [51,52]. Нахождение жира в молоке в диспергированном виде оказывает влияние на его усвоение и играет важную роль при технологической обработке [53–55].

Естественный размер и количество жировых частиц в коровьем молоке зависят от множества факторов, включая породы животных, стадии лактации и кормовые факторы [56,57]. Как правило, диаметр частиц варьирует в широком диапазоне: от 1 до 15 мкм, при этом до 85% жировых частиц молока (ЖЧМ) имеет размер от 1 до 6 мкм, 50% ЖЧМ составляют глобулы диаметром 2 – 4 мкм [58], а объемно-взвешенный средний диаметр ЖЧМ составляет около 4 мкм [59]. Триглицериды являются основным компонентом ЖЧМ (94-98%) и образуют их ядро. До 2-6% массы ЖЧМ приходится на их мембрану. В настоящее время установлено, что оболочка жировых шариков состоит из основных структурных компонентов: липидов и белков, имеет толщину от 10 до 50 нм [60], а также включает в свой состав ферменты, жирорастворимые витамины и минеральные элементы [61,62]. Наиболее важной функцией мембраны ЖЧМ является обеспечение устойчивости жировой эмульсии молока в плазме. Как структурно-механический барьер на границе раздела двух фаз, оболочка ЖЧМ препятствует контакту и последующему слиянию триглицеридных ядер друг с другом. Внешний слой оболочки, образованный большей частью фосфолипидами и гликопротеидами, обладает отрицательным

зарядом за счет полярных групп этих компонентов, образует двойной электрический слой и гидратную оболочку и оказывает дополнительное стабилизирующее действие. Помимо этого, не менее важными функциями оболочки ЖЧМ является защита жира от ферментативного воздействия и перенос биологически активных молекул плазмы молока, адсорбирующихся на ее поверхности [63].

Состав и структура жировых глобул молока и их оболочек могут изменяться в процессе охлаждения, хранения и различных способов обработки молока, включая механическую (перекачка, перемешивание, гомогенизация), термическую (пастеризация, стерилизация) и ферментативную обработку (липолиз). Причем гомогенизация и температурная обработка молока в наибольшей степени влияют на свойства ЖЧМ, их распределение по размеру [64] и состав оболочек [54,65].

Длительное хранение, транспортировка и температурное воздействие на молоко (высокотемпературный нагрев, охлаждение и замораживание) приводят к различной степени нарушения устойчивости дисперсной системы и способствуют флокуляции и коалесценции ее жировой фазы. Флокуляция происходит при сближении частиц жировых частиц на достаточно близкие расстояния с образованием их крупных агрегатов (процесс отстаивания сливок). Однако образующиеся агрегаты непрочны и легко разрушаются при перемешивании, но при этом оболочки ЖЧМ сохраняются. Коалесценция, в отличие от флокуляции, заключается в необратимом слиянии глицеридных ядер жировых частиц при их соприкосновении. Поскольку в практике производства всех жиросодержащих молочных продуктов, за исключением сливочного масла и молочного жира, данные явления агрегирования и коалесценции ЖЧМ нежелательны, для повышения стабилизирующей способности оболочек ЖЧМ применяют правильную тепловую обработку натурального молока и дополнительное диспергирование путем гомогенизации [66]. Гомогенизация приводит к уменьшению среднего диаметра ЖЧМ до 1 мкм [55] и, соответственно, к увеличению их общей площади поверхности (до 4 – 10 раз [67]), в результате чего возрастает и потребность в оболочечных веществах. Новые оболочки лишь частично (на 10-25% [68]) восстанавливаются за счет материала нативных ЖЧМ и дополнительно адсорбируют из плазмы казеиновые мицеллы и денатурированные сывороточные белки [69], вместе с тем увеличивая свою биоёмкость [54]. Из-за увеличения общей поверхности и частичного нарушения нативных оболочек жировые частицы гомогенизированного молока имеют большую площадь поверхности, доступную для липолитических ферментов и становятся более подверженными действию липаз [70], что, с одной стороны, упрощает процесс их усвоения организмом, а, с другой стороны, имеет большое значение в пищевом производстве. Поэтому размер и площадь поверхности ЖЧМ могут считаться наиболее важными их характеристиками, которые не только определяют качество,

энергетическую и биологическую ценность молока, но и имеют большое практическое значение в молочной промышленности, так как определяют степень перехода жира в продукт [55]. Возможность их точного измерения с целью отслеживания свойств ЖЧМ на всех стадиях производственного процесса имеет определенную ценность для проверки качества молока и молочных продуктов, повышения эффективности и проведения стандартизации различных этапов их обработки.

#### ***1.1.2.2. Экспериментальные методы анализа жировых частиц молока***

Физические и коллоидные свойства ЖЧМ исследуются при помощи различных физических методов. История изучения ЖЧМ начинается еще с 1674 г., когда Ван Левенгук получил их первые микроскопические изображения с помощью обычного светового микроскопа. С тех пор различные микроскопические методы, включая оптическую (поляризационную [71], конфокальную [69,72,73]) и электронную микроскопию, широко применялись не только для оценки размеров, но и для изучения распределений, форм и микроструктуры как самих ЖЧМ, так и их оболочек. Однако, как из-за невысокого разрешения оптической микроскопии, ограниченного дифракционным пределом (около 200 нм), так и из-за ограниченного объема наблюдений и набираемой статистики, в качестве альтернативных подходов для измерения распределения размера ЖЧМ в молоке были предложены другие методы [74], включая динамическое рассеяние света [75], методы, основанные на измерении малоуглового рассеяния света [72,73,76], и методы, основанные на принципе Култера [77]. Помимо этого также предлагались методы оценки размеров ЖЧМ на основании ультразвукового [78] и электроакустического анализа [79]. Из перечисленных методов наибольшее распространение в настоящее время получил метод лазерной дифракции, основанный на измерении малоуглового рассеяния на суспензии исследуемого образца. Несмотря на широкий динамический диапазон измерений, существенным ограничением метода является то, что оценка размеров частиц осуществляется по дифракционной картине с помощью теории Ми в приближении сферической модели (размер выражается в виде диаметра сферы эквивалентного объема), для которой необходимо точное значение показателя преломления исследуемого объекта. Естественная дисперсия частиц по составу и, соответственно, по показателю преломления, а также отклонение их морфологии от используемой модели сферы, могут приводить к неконтролируемому смещению получаемых оценок и искажению формы измеряемого распределения. Для точного измерения распределения ЖЧМ по размеру и оценки их площади поверхности необходимы методы, подобные микроскопическим, т.е. основанные на анализе морфологии отдельных частиц популяции, но обладающие более высокой точностью и скоростью анализа. Таким потенциалом обладают методы, совмещающие принцип проточной цитометрии и возможность измерения светорассеяния одиночных частиц. Причем



высокая точность определения размера может быть достигнута только при одновременном определении всех параметров частиц, влияющих на ее рассеивающие свойства, включая как форму, размер и показатель преломления. Возможность одновременного определения размера и показателя преломления одиночных ЖЧМ к настоящему времени была продемонстрирована только с помощью двух методов: голографической микроскопии [80] и сканирующей проточной цитометрии [49,81]. В работе [80] высокая точность определения характеристик отдельных ЖЧМ (до десятков нанометров по размеру и сотых долей по показателю преломления) была достигнута на основании измерения интерференционных изображений частиц с помощью голографической микроскопии и решения обратной задачи в приближении модели гомогенной сферы с использованием теории Ми. Но при этом ограничением метода осталась относительно малая статистика измерений (количество частиц в образце не превышало 100). Развитию метода характеристики ЖЧМ в молоке с помощью сканирующей проточной цитометрии, продемонстрированному в работе [81], посвящена Глава 4 настоящей диссертации, где, показана применимость СПЦ для характеристики ЖЧМ по их размеру, площади поверхности и показателю преломления и получена наилучшая точность определения данных характеристик ЖЧМ среди альтернативных методов за счет большого объема измеряемой информации и строгого подхода к решению обратной задачи светорассеяния с использованием альтернативной оптической модели ЖЧМ в виде сфероида, учитывающей возможное отклонение морфологии жировых глобул от стандартно применяемой модели сферы.

### **1.1.3. Субмикронные частицы в плазме крови**

#### ***1.1.3.1. Состав плазмы крови***

Плазма крови - жидкая часть крови, представляющая собой сложную по составу многокомпонентную полидисперсную среду, в которой во взвешенном состоянии находятся форменные элементы (клетки крови), а также различные белки, органические и неорганические соединения. После осаждения крупных клеток крови, включая эритроциты и лейкоциты, из наиболее крупных объектов в плазме остаются тромбоциты, а помимо них множество частиц субмикронных размеров, включая липопротеиновые частицы и наименее изученные микрочастицы клеточного происхождения, также известные в литературе как внеклеточные везикулы (англ. extracellular vesicles) (Рис. 1).

Исследование отдельных компонент плазмы представляет собой сложную задачу, основная проблема которой связана с выделением и идентификацией отдельных классов частиц, которые не только обладают сходной морфологией и перекрывающимся диапазоном размеров, но и попадают за границу детекции большинства методов, применяемых для анализа дисперсных сред. Объектом исследования настоящей работы были частицы плазмы,

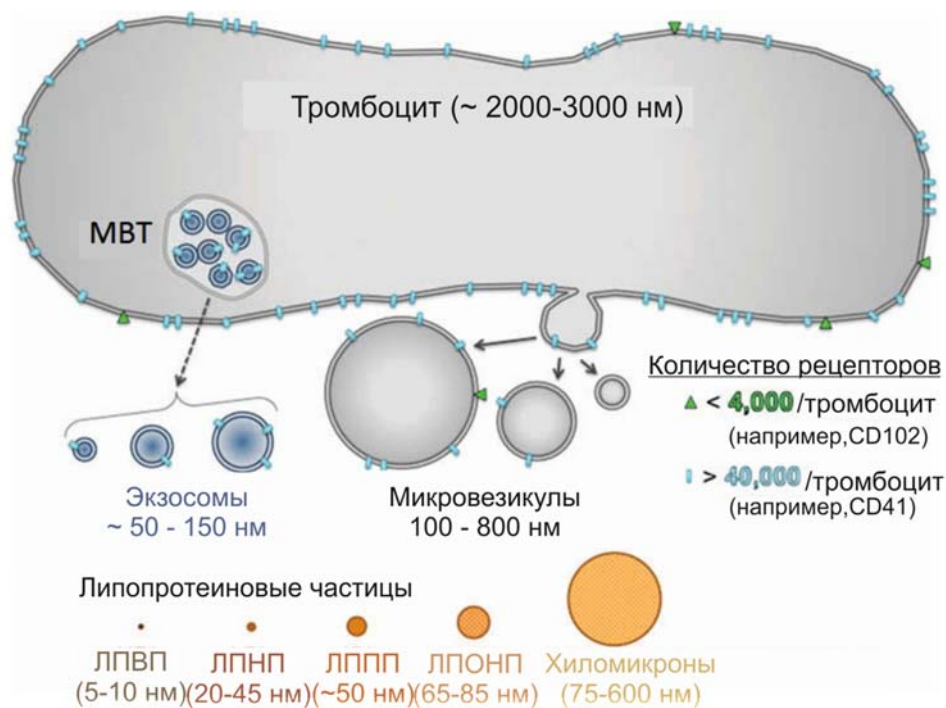


Рис. 1. Основные компоненты (частицы) плазмы: тромбоциты, липопротеиновые частицы и субмикронные частицы клеточного происхождения, включая экзосомы и микровезикулы (адаптировано из [82]).

попадающие в субмикронный диапазон размеров: микровезикулы клеточного происхождения и наиболее крупная фракция липопротеиновых частиц - хиломикроны.

### 1.1.3.2. Хиломикроны

Существенную долю субмикронных частиц в плазме крови составляют липопротеиновые частицы, основная функция которых в организме заключается в транспорте и метаболизме липидов. По своей плотности липопротеины (ЛП) подразделяются на пять классов (Рис. 1): липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП), низкой плотности (ЛНП), промежуточной (средней) плотности ЛПП (ЛСП), высокой плотности (ЛВП) и хиломикроны. Все они имеют сходное строение: гидрофобное липидное ядро, образованное триацилглицеролами и эфирами холестерина, и гидрофильный поверхностный слой, составленный из апобелков, фосфолипидов и холестерина. Некоторые апобелки являются интегральной частью ЛП конкретного типа (например, аполипопротеин apoB-48 входит в состав только хиломикронов [83]), другие могут переноситься между различными классами ЛП. Все классы ЛП образуются в разных тканях, отличаются по размеру и соотношению количества липидов и белков в своем составе и выполняют различные функции [84,85]. В данной работе основное внимание будет сосредоточено на фракции наиболее крупных липопротеинов – хиломикронов.

Хиломикроны (ХМ) практически на 90% состоят из триглицеридов и отвечают за транспорт экзогенных (пищевых) жиров из кишечника в ткани [86]. Размер ХМ варьирует в

диапазоне от 80 до 700 нм [87,88], что, в отличие от других типов ЛП, размер которых не превышает 100 нм, не позволяет им проникать через стенки капилляров. Из клеток кишечника они эвакуируются через лимфатическую систему и попадают в кровеносное русло через грудной лимфатический проток. В крови ХМ подвергаются липолизу под действием липопротеинлипазы – фермента, располагающегося на эндотелиальных клетках кровеносных капилляров. В результате этого действия ХМ теряют до 90% переносимых ими жиров, основная масса которых проникает в ткани, значительно уменьшаются в размерах и остаются в циркуляторном русле в виде остаточных ХМ, или ремнантов ХМ (< 100 нм [89–91]), после чего удаляются из организма клетками печени путем эндоцитоза.

Плазма крови здоровых доноров, сданная натощак, т.е. после 12 и более часов голодания, в норме практически не содержит ХМ. Их количество резко возрастает в абсорбтивный период, особенно после употреблении жирной пищи, и достигает пика через 3-4 часа после еды [92]. При этом скорость метаболизма ХМ в плазме довольно высока - время их полужизни составляет всего около 5 мин [93,94].

Хотя биологическая роль и функции ХМ в организме человека изучены в полной мере и не представляют особого интереса, а в отношении внеклеточных везикул, ХМ и вовсе рассматриваются как контаминирующий объект, затрудняющий их идентификацию из-за сходной формы и перекрывающегося диапазона размеров, как самостоятельный объект исследования они все же имеют определенную ценность при рассмотрении их вовлеченности в развитие и поддержание некоторых патологических процессов. Но если ранее практически все знания о ХМ были получены с помощью электронной микроскопии, то для проведения клинических исследований в настоящее время для них не существует подходящих методов анализа.

Повышенные уровни хиломикрон (гиперхиломикронемия) и триглицеридов (ТГ) в крови (гипертриглицеролемиа) считаются физиологически допустимыми в течение нескольких часов после приёма пищи. Избыточное содержание ТГ через 12 и более часов свидетельствует о патологических нарушениях в организме. Поскольку ТГ входят в состав не только ХМ, но и других типов ЛП, их высокий уровень в крови может быть обусловлен накоплением как отдельных фракций ХМ, их остатков или ЛПОНП, так и их совокупностью, относящимся к разным видам гиперлипопротеидемий [95–97]. Поэтому тип гиперлипопротеидемии не может быть установлен на основании результатов анализа липидного спектра крови.

Непосредственная оценка количества хиломикрон в крови не входит в список стандартных клинических тестов, однако при необходимости проведения такого теста для уточнения диагноза и назначения соответствующего лечения, ввиду отсутствия количественных методов анализа, определение хиломикрон в плазме крови, как правило,

осуществляется качественно, на основании хиломикронного теста (визуальная оценка степени помутнения плазмы или сыворотки крови после ее 12-24 часового хранения при температуре 4°C, англ. «standing plasma test») или по результатам градиентного или электрофоретического разделения липопротеинов [98]. Более точная количественная оценка уровня хиломикронов и их ремнантов в крови может быть определена по уровню аполипопротеина apoB-48, однако данный тест редко применяется в лабораторной диагностике и проводится преимущественно в научных, а не диагностических целях.

Замедленная элиминация ХМ и их остатков также характерна для лиц с метаболическим синдромом, сахарным диабетом и ожирением [99]. Она же может являться следствием таких заболеваний, как семейная гиперхиломикронемия (дефицит липопротеин липазы, синдром Бюргера-Грютца) и синдром аполипопротеина СII (белка, активирующего фермент для переноса жиров в ткань), а также быть вызвана врожденным присутствием ингибитора липопротеинлипазы.

Особый интерес представляет изучение атерогенного потенциала ХМ и их вовлеченности в развитие атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. Не так давно, в отличие от ЛПНП и ЛПНОНП, хиломикроны не относились к атерогенным фракциям ЛП. И лишь недавно появились работы, в которых нарушение метаболизма ХМ и их ремнантных частиц стало рассматриваться в качестве фактора риска атеросклероза [100–102]. О возможном участии данных частиц в патогенезе заболевания дополнительно свидетельствует обнаружение учеными в атеросклеротических бляшках апобелка apoB48, который входит в белковую структуру только ХМ и их ремнантов [103]. Но конкретная роль ХМ в патогенезе заболевания по-прежнему остается нераскрытой, что, вероятно, также связано с отсутствием методов, которые позволяли бы непосредственно анализировать фракцию ХМ в плазме крови.

### ***1.1.3.3. Микровезикулы клеточного происхождения***

В 1967 году, в процессе исследования механизма свертывания крови Вульф впервые обнаружил мембранные структуры, выделяющиеся из тромбоцитов в результате их активации и принимающие участие в процессе коагуляции, которые он назвал «тромбоцитарной пылью» [104]. Дальнейшие исследования показали, что активированными тромбоцитами выделяются два типа везикул, различающихся по размеру и происхождению: экзосомы, диаметр которых варьирует в диапазоне от 40 до 100 нм и которые образуются при экзоцитозе мультивезикулярных телец, и микровезикулы, диаметром от 100 нм до 1 мкм, которые представляют собой окруженные фосфолипидной мембраной участки цитоплазмы клеток, отделившиеся отпочкованием от плазматической мембраны в результате ее деформации [105]. В настоящее время установлено, что микровезикулы, циркулирующие в крови, формируются не только тромбоцитами, но и другими типами клеток крови, а также эндотелиальными клетками

под действием разнообразных стимулов, в т.ч. в результате активации и(или) апоптоза [106]. Несмотря на то, что концентрация эритроцитов в крови значительно превышает количество всех остальных клеток крови, считается, что около 60-80% микровезикул, тем не менее, имеет тромбоцитарное происхождение [107–109].

В течение 40 лет после первого упоминания о микровезикулах, интерес к ним рос в геометрической прогрессии. Внеклеточные везикулы были обнаружены практически во всех биологических жидкостях и межклеточном пространстве. По происхождению и своим размерам они были условно разделены на три основных класса: экзосомы, микровезикулы (микрочастицы) и апоптотические везикулы [110], но исторически, для внеклеточных везикул не было строго установленной номенклатуры, а потому в литературе наряду с термином «микровезикулы», также встречаются термины «микрочастицы» и «эктосомы» [111]. Образование клеточных везикул строго регулируемый процесс, в результате которого образуются частицы со специфическими характеристиками в зависимости от физиологических или патологических условий. Поэтому микровезикулы являются очень гетерогенной популяцией. Они разделяются на фракции не только по происхождению и размеру, но также по плотности, фосфолипидному и белковому составу, и по спектру выполняемых ими биологических функций. В состав микровезикул входят не только клеточно-специфичные маркеры родительских клеток, указывающие на их происхождение, мембранные рецепторы и белковые комплексы, но также цитоплазматические белки и, иногда, фрагментированная ДНК и микро РНК, что позволяет им участвовать в переносе генетической информации [112]. В зависимости от клеточного происхождения микровезикулы несут на своей поверхности комплексы клеточной адгезии, тканевой фактор, различные рецепторы, антигены, медиаторы иммунных реакций, апоптоза и другие биоэффекторы, посредством которых клетки крови и эндотелия взаимодействуют между собой. Осуществляя перенос этих сигнальных белков и молекул между клетками, микровезикулы обеспечивают обмен информацией, межклеточное взаимодействие и коммуникацию и играют важную роль в развитии и поддержании множества физиологических и патофизиологических процессов [106,113–115].

Спектр процессов, в которых задействованы микровезикулы, чрезвычайно обширен и включает поддержание гемостаза, распространение гемокоагуляционного потенциала, активацию клеток, сигнализацию о вегетативных дисфункциях организма, в первую очередь о сердечно-сосудистых нарушениях, воспалительных процессах, развитии опухолей и ангиогенезе, участие в горизонтальном переносе генетического материала, белков и ферментов, эпигенетическом перепрограммировании клеток [112,116]. Помимо того, что микровезикулы выполняют функцию универсального межклеточного мессенджера, широко распространено мнение, что циркулирующие в крови и других жидкостях организма человека субпопуляции

микровезикул отражают состояние различных клеточных популяций, от которых они произошли [117]. Поскольку интенсивность формирования микровезикул зависит главным образом от разновидности и выраженности процессов, приводящих к клеточной активации или гибели, включая гемодинамические нарушения, дисфункцию эндотелия, воспалительные и другие процессы, а также от способности организма элиминировать микровезикулы из периферической крови и других факторов, считается, что любые происходящие в организме процессы, затрагивающие нормальное функционирование клеток, должны отражаться характеристиках микровезикул, циркулирующих в крови, включая их размер, состав, происхождение и др. Это позволяет рассматривать микровезикулы как потенциальные диагностические и прогностические маркеры различных патологических процессов [118].

Явные свидетельства функциональной значимости микрочастиц в организме человека являются причиной неуклонно растущего интереса к их исследованию как со стороны фундаментальной науки, так и для конкретных медицинских приложений.

Несмотря на это, к настоящему моменту основные свойства микровезикул и конкретная роль, выполняемая ими во многих физиологических и патофизиологических процессах организма, по-прежнему остаются мало изученными, а их прогностический и диагностический потенциал, который мог бы быть использован для выявления ранних стадий заболеваний и оценки терапевтической эффективности их лечения, остается по-прежнему нераскрытым.

Все это в немалой степени обусловлено как гетерогенностью самих микровезикул и их малыми размерами, так и отсутствием стандартизованных методик их выделения, что крайне усложняет задачу их детекции и идентификации в биологических жидкостях с помощью стандартных методов анализа дисперсных сред, а также сравнение результатов, полученных с помощью разных методов или в разных лабораториях [119].

#### ***1.1.3.4. Выделение микровезикул в плазме крови***

Важными характеристиками микровезикул являются их концентрация, размер, морфология, состав и происхождение [82]. Одной из главных причин расхождения результатов их определения, полученных в различных лабораториях даже с помощью одних и тех же методов, является отсутствие стандартных протоколов проведения преаналитического этапа исследования. На результаты характеристики микровезикул может оказывать влияние множество различных факторов, связанных с процедурой забора крови, ее транспортировкой, способом выделения плазмы и ее хранения перед измерениями [120–124]. Поскольку повреждение стенок сосуда и активация тромбоцитов при заборе крови и последующих манипуляциях с образцом могут приводить к дополнительному формированию микровезикул, стандартизация всех шагов этого этапа, начиная от взятия крови до измерения готового образца, является одним из наиболее важных вопросов, связанных с их изучением. На

основании многочисленных исследований были составлены общие рекомендации к забору крови и ее обработке, включающие множество параметров, от ширины углы, времени удержания жгута и выбора антикоагулянта до различных внешних факторов, включая температуру, время и условия хранения образца [120–122].

Для большинства методов, включая стандартную проточную цитометрию, исследование субмикронных частиц как в цельной крови, так и в богатой тромбоцитами плазме представляет сложную задачу, из-за невозможности разделить фракции клеточных микровезикул, липопротеиновых частиц (хиломикроны) [125], небольших тромбоцитов [126], белковых комплексов [127], обломков клеток и других частиц плазмы по измеряемым сигналам и их распределениям из-за частично или полностью перекрывающихся диапазонов размеров. Для максимального исключения контаминации липопротеиновыми частицами общей рекомендацией является забор крови строго натощак, оптимально после 12-часового голодания. Удаление более крупных элементов крови, включая тромбоциты, обычно осуществляется с помощью нескольких стадий центрифугирования, для скорости и времени которых также не существует единого протокола. Общей рекомендацией, установленной Комитетом по стандартизации и науке Международного сообщества тромбоза и гемостаза (ISTH), является проведение двух этапов центрифугирования при 2500g в течение 15 минут [128,129]. И хотя необходимость удаления тромбоцитов обосновывается их повышенной чувствительностью к условиям хранения плазмы и их нежелательной активацией, центрифугирование на данных и более высоких скоростях, периодически используемых в различных публикуемых работах, могут приводить не только к высвобождению новых микровезикул в результате активации и разрушения клеток, но также к их агрегации [130] или частичной потере вместе с более крупными объектами [131,132]. Альтернативным способом выделения субмикронных частиц плазмы является гель-хроматография [133], которая сохраняет нативное состояние микровезикул, но не исключает контаминацию образцов липопротеинами и белковыми комплексами [134]. Для того чтобы сохранить естественные характеристики частиц максимально приближенными к их состоянию *in vivo*, наиболее предпочтительным является проведение исследований в цельной крови или богатой-тромбоцитами плазме, полученной естественным осаждением в течение не более двух часов после забора крови и не подвергавшейся никаким дополнительным внешним воздействиям [124], что представляет определенную трудность для большинства методов анализа.

#### ***1.1.3.5. Способы детекции, идентификации и характеристики микровезикул в крови***

Учитывая гетерогенность популяции микровезикул, методами, наиболее подходящими для их исследования, являются методы, основанные на анализе одиночных частиц. Среди них наиболее пригодным для мультипараметрической характеристики микровезикул считается

метод проточной цитометрии [135], с помощью которой проводится до 75% исследований [136]. Но несмотря на все ее достоинства, в т.ч. для проведения рутинных клинических исследований, за все время применения проточной цитометрии для анализа микровезикул было выявлено множество артефактов, связанных с невысокой чувствительностью метода и ограниченным объемом измеряемой информации [82,136–138]. Из-за крайне малых размеров микровезикул и небольшого количества рецепторов на их поверхности, отличающегося на несколько порядков по сравнению с числом рецепторов на родительских клетках [82], сигналы рассеяния (как правило, амплитуды сигналов рассеяния в передние и(или) боковые углы) и флуоресценции микровезикул имеют очень низкую интенсивность. Основными проблемами проводимых анализов являются отделение сигналов детектируемых частиц от шума, от событий, соответствующих пролету нескольких частиц в зоне измерения, а также от сигналов других объектов плазмы, попадающих в тот же диапазон размеров [139,140]. Их решение частично достигается при проведении тщательного анализа чувствительности прибора и корректного определения порога детекции, проведении дополнительных измерений серийных разведений исследуемых образцов и за счет использования специфичных флуоресцентных красителей. При этом вопрос выбора флуоресценции или светорассеяния и соответствующих стратегий для детекции и идентификации микровезикул в плазме крови по-прежнему остается предметом дискуссий [82,141,142].

Основным преимуществом флуоресцентного анализа микровезикул является более высокая чувствительность по сравнению с детекцией по светорассеянию и возможность выделения микровезикул среди других субмикронных частиц плазмы (в т.ч. липопротеинов) [109,142–145]. Однако универсального маркера, позволяющего надежно идентифицировать всю популяцию микровезикул до сих пор не выявлено. Долгое время наличие фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны микровезикул считалось их отличительной чертой, связанной с особенностью их формирования, сопровождающегося деформацией плазматической мембраны клеток и переходом фосфолипида с ее внутренней стороны на внешнюю при активации и апоптозе [146]. Однако позднее было показано, что более половины микровезикул не несет его на своей поверхности [109,147], а потому стандартно используемые для окрашивания микровезикул метки, включая аннексин V, связывающийся с фосфатидилсерином, и антитела, специфичные к рецепторам родительских клеток, как например, CD41 для тромбоцитарных микровезикул или CD235a для микровезикул эритроцитарного происхождения [142], позволяют детектировать только некоторые субпопуляции частиц [148]. В качестве универсальной метки для микровезикул, как мембранных структур, также было предложено использование липофильных красителей, окрашивающих липидные мембраны [149]. Но и они обладают по крайней мере двумя существенными недостатками: во-первых, как и другие красители, они



склонны формировать агрегаты, а также мицеллообразные структуры, которые могут быть ошибочно идентифицированы как микровезикулы, а во-вторых, они также могут связываться с липопротеиновыми частицами, присутствующим в плазме наряду с микровезикулами [134]. Помимо уже упомянутых недостатков, сама процедура флуоресцентного окрашивания сложна и подразумевает использования дорогостоящих материалов. Также необходимым требованием к подготовке проб является удаление свободных антител, что вносит дополнительные действия, способные повлиять на нативное состояние частиц. В совокупности все это в значительной мере усложняет стандартизацию протоколов проводимых измерений, основные успехи для которой были получены в основном при использовании светорассеяния [134,129]. При этом для детекции микровезикул требуется учитывать не только особенности оптических конфигураций различных приборов, их качество настройки и уровень шума, но и использовать специальные наборы референсных частиц (как правило, набора из нескольких видов моодисперсных полистирольных микросфер) для выделения диапазонов интенсивностей, куда потенциально попадают сигналы от микровезикул [103,114,115], с учетом предполагаемых различий их оптических свойств (показателя преломления), игнорирование которых долгое время было основными причинами некорректной интерпретации проводимых измерений и оценки диапазонов размеров детектируемых везикул [134,137]. Благодаря стандартизации преаналитического и аналитического этапов анализа лишь сравнительно недавно удалось повысить воспроизводимость измерений по количеству детектируемых микровезикул с помощью различных проточных цитометров в разных лабораториях до 85% по сравнению с разницей в несколько порядков, отмечавшейся ранее. Однако характеристика микровезикул в относительных единицах интенсивности регистрируемых сигналов по-прежнему остается основным недостатком подходов, применяемых в проточной цитометрии, которые затрудняют как интерпретацию, так и сравнение полученных результатов.

Определенную проблему как для оценки размеров микровезикул, так и для установления предполагаемых диапазонов их детекции по светорассеянию, представляет отсутствие точных знаний об их показателе преломления и сложная зависимость рассеяния от множества других, в т.ч. труднодоступных для измерения параметров, включая угловые диапазоны сбора интенсивности рассеяния, которые вместе с длиной волны, интенсивностью лазера и оптическими параметрами окружающей среды определяют интенсивность измеряемых сигналов [151]. Несмотря на это попытки оценить размеры микровезикул по сигналам рассеяния вперед и вбок предпринимались ранее [139,152,153], но ограниченный объем измеряемой информации не позволяет контролировать точность данных оценок, на которые могут влиять как отклонение формы частиц от предполагаемой модели, так и используемые предположения о показателе преломления микровезикул. При этом точное определение показателя преломления

микровезикул необходимо не только для данных оценок, но и несет большую ценность в качестве одной из немногих характеристик, на основании которой можно решить проблему идентификации микровезикул среди других субмикронных частиц плазмы, включая липопротеиновые частицы, без использования флуоресцентных меток [112].

Помимо проточной цитометрии, множество других, как оптических, так и не оптических методов было предложено для исследования микровезикул [154]. Однако немногие из них позволяют характеризовать микровезикулы на основании анализа одиночных частиц: это различные виды микроскопии (оптическая, атомно-силовая [155], электронная, в т.ч. криоэлектронная [109,156,157]), метод анализа траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA) [158,159] и методы, основанные на принципе Култера (tunable resistive pulse sensing, tRPS) [160,161]. Из них, только электронная микроскопия позволяет надежно идентифицировать липопротеиновые частицы и микровезикулы в плазме по наличию двойной фосфолипидной мембраны. И только с помощью криоэлектронной микроскопии было достоверно показано, что до 95% микровезикул действительно имеет сферическую форму. Однако сложная пробоподготовка и проведение измерений не позволяют рассматривать ее в качестве метода, пригодного для проведения рутинных клинических исследований.

Метод анализа траекторий наночастиц, и метод, основанный на принципе Култера (tRPS), позволяют одновременно измерять концентрацию и распределение микровезикул по размеру на основании определения их гидродинамического радиуса (в результате наблюдения за Броуновским движением одиночных частиц [162]) или объема (по измерению импульса электрического напряжения, возникающего при прохождении частиц через нанопоры [163]). Несмотря на более высокую чувствительность данных методов по сравнению с проточной цитометрией (минимальный размер детектируемых частиц 70-100 нм), основным их недостатком, по-прежнему, остается невозможность проведения анализа микровезикул в богатой тромбоцитами плазме и их неспособность различать микровезикулы, липопротеины и другие субпопуляции субмикронных частиц [134,164]. Потенциально метод анализа траекторий наночастиц позволяет проводить измерения с использованием флуоресцентных меток, идентифицируя некоторые субпопуляции микровезикул, но при этом из-за необходимости долгого отслеживания траекторий движения частиц для более точной оценки их размера возникает проблема фотообесцвечивания красителя. Также при независимом определении размера одиночных частиц из броуновского движения, метод NTA имеет потенциальную возможность оценки их показателя преломления для разделения субпопуляций [165,166], однако точность измерений не позволяет в полной мере реализовать этот потенциал. В работе [167] на примере анализа смеси из трех видов моодисперсных микросфер (220, 330 и 410 нм), было показано, что в отличие от tRPS метод анализа траекторий частиц не позволяет измерять

распределения таких полидисперсных частиц, имеющих мультимодальное распределение, и более применим для анализа монодисперсных частиц. В точности определения концентрации NTA также уступает tRPS (70% против 10%) [153].

Задачу бесфлуоресцентной детекции, идентификации и характеристики клеточных микровезикул и хиломикрон в богатой тромбоцитами плазме можно решить на основании измерения большого объема оптической информации для одиночных частиц (измерение индикатрис светорассеяния с помощью сканирующей проточной цитометрии) и применения различных методов решения обратной задачи светорассеяния для ее обращения с целью получения информации о форме, размерах и показателе преломления частиц. Разработке данного подхода посвящена Глава 6 настоящей диссертации.

## **1.2. Проточная цитометрия**

Как было показано на примере трех рассмотренных биологических дисперсных систем, содержащих разнородные популяции клеток и частиц, для их всестороннего анализа, включая статическую и динамическую характеристику отдельных субпопуляций, наиболее предпочтительными являются методы, основанные не на анализе взвеси частиц как целого, а позволяющие характеризовать всю систему в режиме анализа одиночных частиц [168]. Более того, для получения статистически достоверных результатов анализа таких систем зачастую требуется проведение измерений с большим накоплением данных ввиду большого разнообразия характеристик биологических объектов даже в пределах отдельного класса, а также при наличии редких субпопуляций, составляющих лишь небольшую долю от всех клеток и частиц. В настоящее время решение данной задачи в основном достигается за счет использования автоматических анализаторов одиночных частиц, в основе работы которых лежит принцип проточной цитометрии [169,170]. И особое место уделяется оптическим методам исследования, включая методы, основанные на светорассеянии, благодаря неинвазивности и возможности их использования без нарушения целостности образцов.

Обычная проточная цитометрия позволяет исследовать свойства индивидуальных клеток и частиц со скоростью до десятков тысяч частиц в секунду, при этом непосредственно измеряемыми сигналами являются интенсивность светорассеяния в фиксированных телесных углах, как правило, рассеяние вперед и вбок, и флуоресценция в нескольких спектральных интервалах [171,135,172]. Объектами исследования на проточных цитометрах выступают самые различные микрочастицы, начиная от живых клеток и заканчивая различными объектами синтетического происхождения (полимерные микросферы и др.), в широком диапазоне размеров, от 200 нм до 100 мкм. Однако потенциал светорассеяния и флуоресценции используется в проточных цитометрах стандартной конфигурации не в полной мере ввиду

ограниченного объема измеряемой информации, которой зачастую недостаточно для того, чтобы различить сигналы определенных клеток и микрочастиц от «паразитных» сигналов, соответствующих шуму, мертвым или разрушенным клеткам, субклеточным компонентам, агрегатам белков и др.

Долгое время основным направлением развития многопараметрической проточной цитометрии являлся многоцветный флуоресцентный анализ. В настоящее время имеются системы, позволяющие одновременную регистрацию 19 сигналов от одиночных частиц (17 флуоресцентных меток и два сигнала рассеяния) [173], и, несмотря на проблему перекрывающихся спектров и сложности их компенсации, развиваются платформы, позволяющие регистрировать 30 и более сигналов [174]. Усовершенствованием данного подхода в плане разрешения измерений стало создание технологии, позволяющей измерять полные спектры флуоресценции от одиночных частиц [175]. Техника проточной цитометрии, совмещенная с масс-спектрометрией, использующая для мечения клеток и частиц антитела, конъюгированные с металлами, несмотря на меньшую производительность (до 1000 частиц/с), является еще одним альтернативным решением проблемы ограниченного использования флуорохромов [176].

Хотя метки и позволяют разделять различные субпопуляции клеток и частиц и характеризовать их некоторые свойства, их применение имеет ряд недостатков: оно ограничено для анализа частиц субмикронных размеров, не имеющих на поверхности достаточное количество рецепторов; они не несут никакой информации о морфологии частиц; сам метод является весьма дорогостоящим, а процедура окрашивания довольно сложна и может повлиять на нативное состояние живых объектов, что затрудняет проведение кинетических исследований, связанных с отслеживанием изменений их характеристик в течение некоторого процесса.

Пространственное распределение параметров светорассеяния несет в себе полную информацию о морфологии частиц, но стандартно измеряемые на проточных цитометрах сигналы несут лишь ограниченный объем этой информации, и зачастую некорректно интерпретируемый. Так рассеяние, измеряемое в передних углах, связывают с размером частиц, а рассеяния вбок – с неоднородностью их внутренней структуры, что, на самом деле, является очень грубым приближением и справедливо лишь для небольшого числа объектов [177]. Для повышения информативности анализа в последнее время большое распространение получила технология, совмещающая стандартную проточную цитометрию с темнопольной, светлопольной и флуоресцентной микроскопией [178–180]. С одной стороны, визуализация объектов, действительно, повышает надежность дифференциации различных субпопуляций, с другой стороны, невысокое разрешение обычных микроскопических снимков (0.5 – 1 мкм) не

позволяет с высокой точностью характеризовать морфологию клеток и исследовать небольшие клетки и частицы. Отдельного упоминания заслуживают технологии, в основе которых лежат (1) томографическая фазовая микроскопия, позволяющая восстанавливать полную трехмерную структуру одиночных клеток в потоке, при этом скорость анализа составляет до сотни клеток в минуту, а пространственное разрешение 360 нм в латеральной плоскости и 140 нм в аксиальном направлении [181]; (2) цифровая голографическая микроскопия, позволяющая определять размер и показатель преломления одиночных сферических частиц с точностью до нанометров и тысячных долей, соответственно, со скоростью измерения нескольких сотен частиц в минуту, возможности которой были продемонстрированы на синтетических частицах [182] и жировых глобулах молока [80].

Иным путем развития проточной цитометрии является создание возможности измерения угловой зависимости интенсивности рассеянного света, или индикатрис рассеяния. Однако реализация подобных измерений для одиночных частиц в потоке является технически сложно осуществимой. Первые проточные системы, ориентированные на сбор информации о светорассеянии в широком угловом диапазоне, были предложены еще в 1970-х. Они использовали сложные детектирующие системы, состоящие из множества детекторов, (30 детекторов, регистрирующие рассеяние в диапазонах от  $5^\circ$  до  $175^\circ$  и от  $5^\circ$  до  $355^\circ$  в работе [183]) или кольцевые детекторы рассеяния, позволяющие измерять интенсивность рассеянного света в нескольких интервалах передних углов (32 кольца и регистрация индикатрисы в углах от  $1.5^\circ$  до  $22^\circ$  в работах [184,185]). Несмотря на невысокое угловое разрешение при полном диапазоне углов в первом случае и ограниченный угловой диапазон измерений - во втором, в данных работах было продемонстрировано, что индикатриса действительно несет в себе существенный объем информации для дифференциации различных субпопуляций частиц, а также было продемонстрировано качественное согласие измеренных сигналов с теоретическими расчетами для полистирольных микросфер. Более совершенная оптическая система регистрации индикатрисы, использующая только два детектора и сканирующая интенсивность рассеяния от одиночной частицы в углах практически от  $0^\circ$  до  $67^\circ$  с высоким угловым разрешением ( $\approx 0.15^\circ$ ) в процессе ее движения в потоке, впервые была предложена в работе [186]. К сожалению, ни одна из предложенных технологий не получила дальнейшего развития.

В настоящее время развиваются два направления измерения разрешенного по углу рассеяния: технология измерения двумерных индикатрис (распределение интенсивности по полярному и азимутальному углу), основанная на регистрации дифракционных картин рассеяния [187–189], и более динамично развивающаяся и применяемая в данной работе технология сканирующей проточной цитометрии, основанная на сканировании интенсивности

рассеянного света по полярному углу при движении частиц в потоке ([49], см. также раздел 2.1).

### **1.3. Характеризация одиночных частиц по светорассеянию: прямая и обратная задача светорассеяния**

В многочисленных работах было показано, что благодаря сложной зависимости пространственного распределения интенсивности рассеянного света от формы и внутренней структуры рассеивающего объекта и его ориентации относительно падающего излучения, анализ измеренных одномерных или двумерных индикатрис светорассеяния одиночных клеток и частиц позволяет решать задачу их идентификации и классификации в разнородных дисперсных системах [49,185,186,190–192]. Однако для полной реализации потенциала данных измерений необходимо, во-первых, четко понимать как формируется измеряемая картина светорассеяния и как она себя ведет при взаимодействии излучения с различными объектами в той или иной среде (прямая задача светорассеяния), а во-вторых, важно научиться извлекать информацию о реальной морфологии анализируемых объектов из имеющихся для них характеристик рассеянного света (обратная задача светорассеяния).

Методы моделирования рассеяния могут быть разделены на две категории: точные методы, основанные на строгих выводах из уравнений Максвелла, и приближенные теории, работающие в ограниченных областях параметров рассеивающих объектов, включая относительный показатель преломления  $m$ , размерный параметр  $x$  ( $x = \pi d/\lambda$ , где  $d$  – диаметр,  $\lambda$  – длина волны) и фазовый сдвиг  $\rho_0 = 2x(m-1)$ , такие как, например, приближение Релея-Ганса-Дебая (РГД,  $|m - 1| \ll 1$ ,  $|\rho_0| \ll 1$ ), аномальная дифракция (АД) [193] и приближение Вентцеля-Крамерса-Бриллюина (ВКБ,  $x \gg 1$ ,  $|m - 1| \ll 1$ ) [168]. За исключением слабо рассеивающих клеточных микровезикул в плазме крови, попадающих в область РГД, все остальные биологические частицы, являющиеся объектами исследования в данной диссертации, включая жировые глобулы молока, клетки бактерий и хиломикроны, по размерам и показателю преломления только частично попадают в область применимости РГД, АД и ВКБ, и для моделирования их рассеяния требуются более совершенные методы.

Для расчета светорассеяния гомогенными сферическими и сферически-симметричными частицами быстрым и точным методом является теория Ми [194]. Расчет одной индикатрисы по теории Ми на современном компьютере составляет порядка миллисекунды.

Для моделирования светорассеяния частицами несферической формы (сплюснутые жировые частицы молока, тромбоциты, палочковидные бактерии и диплококки) требуются более сложные численные методы, как, например, метод Т-матриц в случае осесимметричных частиц [195,196] или метод дискретных диполей (МДД), применимый для расчетов

светорассеяния частицами любой формы и внутренней структуры [197]. Основным преимуществом метода Т-матриц является скорость расчета, которая однако становится сравнимой с МДД в области небольших показателей преломления частиц, характерных для биологических клеток. Применимость метода Т-матриц также ограничена по размерному параметру и для частиц с существенно несферической геометрией (например, для сфероидов с соотношением полуосей больше 3-4) [198]. В ряде случаев эта проблема может решена с помощью модифицированного метода Т-матриц с дискретными источниками [199]. Скорость вычислений данным методом в области небольших показателей преломления сравнима с МДД, но, как было показано в работе [200] на примере моделирования тромбоцитов, при увеличении объема частиц он значительно уступает МДД по точности вычислений. МДД гарантирует сходимость к точному результату при увеличении числа диполей. Более того, эффективность МДД была проверена в сравнении с другими методами в области размеров и показателей преломления биологических объектов [201], в частности, при моделировании светорассеяния эритроцитами [202]. Однако важно иметь в виду, что скорость расчета одной индикатрисы с помощью МДД, в зависимости от размера объекта и частоты дискретизации, занимает от нескольких секунд до порядка минуты.

Объем измеряемой информации и вычислительная сложность прямых расчетов во многом определяют подход к решению обратной задачи светорассеяния. Полное восстановление трехмерной структуры (томография) рассеивающего объекта возможно только при большом объеме измеренных данных, включая амплитудные и фазовые компоненты рассеянного поля. Для рассматриваемых экспериментальных методов обычно приходится иметь дело с параметрической обратной задачей, когда для исследуемого объекта заранее предполагается некоторая модель формы. Сама задача сводится к определению набора характеристик частиц в рамках используемой для параметризации модели, в качестве которых обычно выступают размерные параметры и показатель преломления частицы, а также некоторые вспомогательные параметры, такие как ориентация относительно излучения.

Существующие подходы к решению параметрической обратной задачи светорассеяния могут быть условно разделены на три класса: нелинейная регрессия (прямая подгонка экспериментальных данных решением прямой задачи для многих наборов параметров модели), параметрический подход (сжатие информации, содержащейся в индикатрисе светорассеяния, до нескольких подобранных параметров, связанных с характеристиками частицы некоторым многомерным отображением) и использование методов автоматического (машинного) обучения.

Параметрический подход наиболее предпочтителен для анализа одиночных частиц в реальном времени, поскольку, в отличие от прямой подгонки экспериментальных индикатрис,

не требует многократного решения прямой задачи. Параметры получаются либо напрямую из измеренного сигнала, например, индикатрисы светорассеяния [203] или времяпролетного сигнала [204], либо из его спектрального разложения [205–208]. К этому же случаю можно отнести подходы, восстанавливающие характеристики объектов в условиях ограниченного объема экспериментальных данных (например, на основании интегральных сигналов рассеяния в двух угловых диапазонах [209,210], см. также подраздел 3.2.1). В большинстве своем данные подходы позволяют определять лишь небольшое количество характеристик частиц, как правило – только размер, причем наиболее распространенной является спектральная оценка диаметра частиц по положению основного пика в Фурье спектре индикатрисы. С помощью дополнительного параметра спектра – амплитуды нулевой частоты – в работе [211] была продемонстрирована возможность одновременного восстановления размера и показателя преломления частиц, но однозначность отображения обеспечивалась только в ограниченном диапазоне характеристик частиц ( $x > 11$ ,  $1.1 < m < 1.25$ ). Помимо повышения скорости решения обратной задачи, преимуществом параметрического подхода является обеспечиваемая сжатием информации устойчивость к шумам и инструментальным искажениям, а в некоторых случаях и к искажениям модели [211–213]. Общим недостатком существующих параметрических методов является неконтролируемая погрешность оценок характеристик частиц и неприменимость к несферическим объектам, а в частности для спектральных подходов – ограничение для характеристики частиц в субмикронном диапазоне размеров, сравнимых с длиной волны, индикатрисы рассеяния которых не имеют особенностей.

Методы решения обратной задачи, предполагающие использование машинного обучения на экспериментальных данных, как и параметрические подходы относятся к приближенным методам. Их основным преимуществом является потенциальная возможность работать с большим количеством параметров как частицы, так и измеряемой картины рассеяния, но эффективность их работы сложно предсказать [214], поскольку данный подход также является частично эмпирическим, и внутренняя настройка параметров осуществляется вручную. Машинное обучение нашло широкое применение для решения задач классификации различных объектов по светорассеянию [31,192,215], в то время как его возможности для решения задачи характеристики были продемонстрированы с использованием нейронных сетей только для полистирольных микросфер [216,217] и сферизованных эритроцитов [218].

Нелинейная регрессия является наиболее методологически простым способом решения обратной параметрической задачи светорассеяния. Характеризация частицы осуществляется в результате прямой подгонки экспериментальной индикатрисы с использованием некоторой нормы невязки между измеренным и моделируемыми сигналами, например, в результате оптимизации с помощью метода наименьших квадратов. Осциллирующая форма индикатрис с



сильной зависимостью от параметров частиц приводит к тому, что поверхность целевой функции имеет множество локальных минимумов, для обхождения которых необходима глобальная оптимизация. Для гомогенных шаров и многослойных концентрических сфер эта задача была решена с помощью метода глобальной оптимизации DiRect [219–221] и мультистартового метода Левенберга-Марквардта [222]. Но методы, основанные на прямой подгонке и многократном решении прямой задачи, ограничены простыми формами частиц, для которых существуют быстрые методы моделирования. Характеризация несферических частиц методами оптимизации значительно усложняется, поскольку увеличение числа параметров модели и использование численных методов моделирования приводит к сильно возрастающей вычислительной сложности [223]. Наиболее простым решением этой проблемы является предварительный (однократный) расчет большой базы данных теоретических индикатрис и решение обратной задачи путем их сравнения с экспериментальными измерениями [224–226]. В работе [200] был разработан общий метод и математический аппарат для характеристики одиночных частиц по измеряемым индикатрисам светорассеяния с использованием базы данных предварительно рассчитанных модельных индикатрис, включая оценку минимального объема базы и определение точности определяемых характеристик. При анализе несферических частиц в настоящей диссертации данный подход был взят за основу. Поскольку решение обратной задачи методом наименьших квадратов подразумевает использование всего измеренного сигнала, оно, в отличие от параметрического подхода, менее устойчиво к шумам, инструментальным искажениям и искажениями модели. Исследованию влияния инструментальных искажений в измерении индикатрис светорассеяния на точность нахождения решения обратной задачи и на состоятельность получаемых оценок характеристик частиц, а также поиску подходов для повышения точности характеристики сферических и несферических частиц при наличии неслучайных ошибок измерений посвящен раздел 3.3 настоящей диссертации.

## Глава 2. Экспериментальная основа метода

Экспериментальные исследования в настоящей диссертации выполнялись преимущественно на сканирующем проточном цитометре (СПЦ) (Рис. 2). В отличие от проточных цитометров стандартной конфигурации, детектирующих рассеяние в определенных направлениях (как правило, рассеяние вперед и вбок), в основе данного прибора заложена уникальная оптическая система, которая позволяет «сканировать» пространственное распределение интенсивности света, рассеиваемого одиночной частицей, во время ее движения в потоке и измерять так называемую индикатрису светорассеяния.

В первой части данной главы приведено описание оптической схемы прибора и даются определения для измеряемых сигналов рассеяния. Во второй части главы описывается метод определения угловых диапазонов сбора сигналов рассеяния вперед и вбок, необходимых для оценки границы чувствительности прибора и расчета амплитуд данных сигналов при измерении и характеристике частиц субмикронных размеров.

### 2.1. Сканирующий проточный цитометр

На Рис. 2 представлены схемы оптической системы и сканирующей оптической кюветы СПЦ. Поток, образованный гидрофокусирующей головкой, направляется в капилляр оптической кюветы (диаметр капилляра 0.254 мм, показатель преломления 1.458) (Рис. 2b). При пересечении частицей триггерного луча (Лазер 2 на Рис. 2a и 0 на Рис. 2b) система измерения активируется по сигналу триггерного ФЭУ. В качестве триггерного сигнала используется либо боковое рассеяние (side scatter, SSC), собираемое Объективом 3 и регистрируемое на ФЭУ 2, либо боковое рассеяние (side scatter, SSC), собираемое Объективом 3 и регистрируемое на ФЭУ 2,

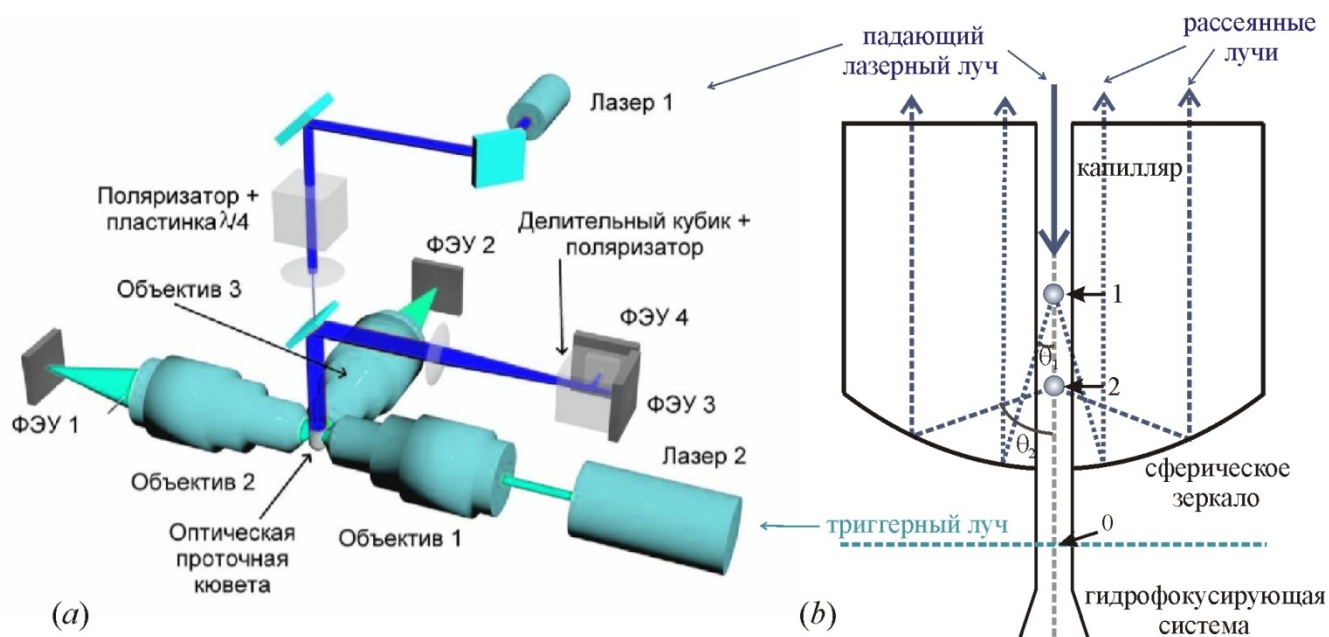


Рис. 2. (а) Схема оптической системы сканирующего проточного цитометра. (б) Схема оптической кюветы СПЦ. Рассеянные и отраженные лучи для двух различных положений частицы, показаны штриховыми линиями.

либо рассеяние в переднем угловом диапазоне (forward scatter, FSC), собираемое Объективом 2 и регистрируемое ФЭУ 1. Помимо измерения сигналов рассеяния, триггерный канал также может использоваться для измерений сигналов флуоресценции, используя для возбуждения либо тот же лазер, либо лазер индикатрисного канала. В этом отношении, оптическая часть СПЦ, представленная Лазером 2, Объективами 1, 2, 3 и ФЭУ 1 и 2, представляет собой схему обычного проточного цитометра. В триггерном канале установлен лазер длиной волны 488 нм. В индикатрисном канале имеется возможность измерения на двух длинах волн: 405 и 660 нм.

Измерение пространственного распределения интенсивности света, рассеиваемого одиночной частицей, осуществляется при ее движении по капилляру оптической кюветы. Каждому положению частицы в измерительной зоне соответствует конкретный угол рассеяния  $\theta$ , для которого лучи отражаются сферическим зеркалом параллельно оси капилляра (например, углы  $\theta_1$  и  $\theta_2$  для положений частицы 1 и 2 на Рис. 2b). Далее этот световой цилиндр, покинув оптическую кювету, отражается от поверхности 45-градусного зеркала и фокусируется линзой в диафрагму ФЭУ 3. Интенсивность рассеяния, регистрируемая оптической системой, как функция от времени, при постоянной скорости движения частицы и интенсивности освещения легко преобразуется в индикатрису светорассеяния [49,168], которая описывается следующим выражением:

$$I(\theta) = k_{LSP} \int_0^{2\pi} [S_{11}(\theta, \varphi) + S_{14}(\theta, \varphi)] d\varphi, \quad (1)$$

где  $S$  – матрица Мюллера [194],  $\theta$  и  $\varphi$  – полярный и азимутальный углы рассеяния,  $k_{LSP}$  – коэффициент, который зависит от аппаратной функции СПЦ, чувствительности ФЭУ 3 и усиления электронной схемы СПЦ. Рабочий угловой диапазон СПЦ и масштабирующий коэффициент  $k_{LSP}$  определяется из анализа индикатрис полистирольных микросфер [221]. В настоящее время, СПЦ может измерять индикатрисы одиночных частиц со скоростью до нескольких сотен частиц в секунду в диапазоне углов  $\theta$  от  $5^\circ$  до  $70^\circ$ . Для дальнейшего анализа измерений индикатриса модифицируется умножением на весовую функцию, которая является аппроксимацией аппаратной функцией СПЦ [223] и имеет вид:

$$w(\theta) = \frac{1^\circ}{\theta} \exp(-2 \ln^2(\theta/54^\circ)). \quad (2)$$

Фактически весовая функция обеспечивает преобразование амплитуды экспериментального шума в зависимости от угла рассеяния в рабочем диапазоне углов для корректного сравнения измеряемых сигналов с результатами теоретического моделирования.

Помимо этого в триггерном канале измеряются сигналы рассеяния в боковые и передние углы, интенсивность которых выражаются согласно [227]:

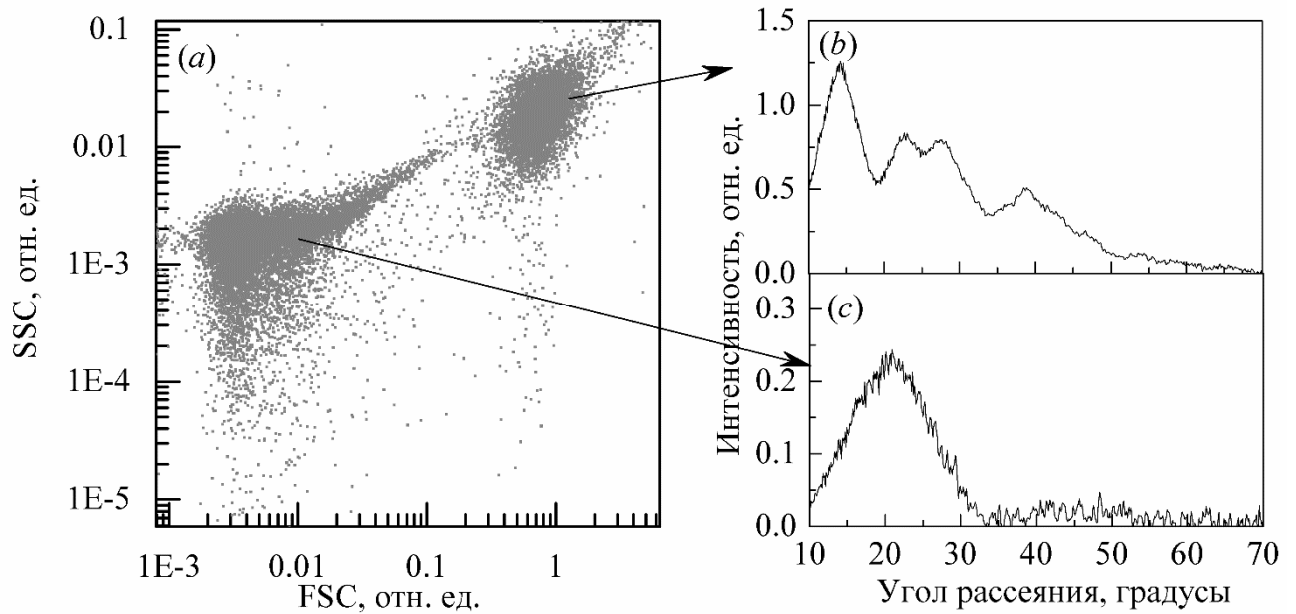


Рис. 3. Представление результатов измерений на СПЦ на примере плазмы крови: (a) стандартная карта рассеяния в параметрах рассеяния вперед FSC и вбок SSC и типичные индикатрисы светорассеяния для одиночных частиц: тромбоцит (b) и микровезикула (c). Индикатрисы умножены на весовую функцию (2).

$$I^{\text{SSC/FSC}} = k_{\text{SSC/FSC}} \iint_{\Omega_{\text{SSC/FSC}}} d\theta d\varphi \sin\theta [S_{11}(\theta, \varphi) - S_{12}(\theta, \varphi) \cos(2\varphi) - S_{13}(\theta, \varphi) \sin(2\varphi)], \quad (3)$$

где  $\Omega_{\text{FSC/SSC}}$  - телесный угол соответствующей апертуры объектива,  $k_{\text{FSC/SSC}}$  – коэффициенты, которые зависят от чувствительности ФЭУ 1 и 2, соответственно, и усиления электронной схемы СПЦ. Метод оценки углов сбора  $\Omega_{\text{FSC/SSC}}$  и масштабирующих коэффициентов  $k_{\text{FSC/SSC}}$  описан в разделе 2.2.

Характерное представление результатов измерений представлено на Рис. 3, где на примере измерений плазмы крови приведена стандартная карта светорассеяния в параметрах SSC и FSC, каждой точке на которой соответствует одна измеренная частица (Рис. 3a), и показаны характерные взвешенные индикатрисы светорассеяния, измеренные для одиночного тромбоцита (Рис. 3b) и микровезикулы (Рис. 3c).

## 2.2. Оценка углов сбора сигналов FSC и SSC

Выбор одного из сигналов рассеяния, FSC (рассеяние вперед) или SSC (рассеяние вбок), в качестве триггерного сигнала является важным параметром при измерении частиц субмикронного размера. Для того, чтобы определить границу чувствительности СПЦ в том или ином случае, необходимо оценить интенсивность сигналов, которые регистрируются на соответствующих ФЭУ. Но для расчета амплитуды сигналов FSC/SSC, согласно формуле (3), необходимо знать угловые диапазоны, в которых интегрируется рассеянное в этих направлениях излучение.

Оценка углов сбора рассеяния вперед и вбок осуществлялась на основании измерений смеси полистирольных микросфер (0.4, 0.7, 1, 1.87 и 3 мкм) с известным размером и показателем преломления. Расчет амплитуд сигналов рассеяния FSC и SSC, представленных формулой (3), осуществлялся с помощью теории Ми. Интегрирование света, рассеянного каждой частицей, проводилось в соответствии с геометрией апертуры каждого фотоприемника. Для ФЭУ, детектирующего рассеяние в переднем угловом диапазоне (ФЭУ 1 на Рис. 2а), нерассеянное лазерное излучение блокируется круглой маской (пространственный фильтр), установленной на линзе Объектива 2, которая собирает свет, рассеянный частицей в диапазоне  $\theta^{FSC}$  and  $\theta^{FSC} + \Delta\theta^{FSC}$  по полярному углу и интегрирует его по азимутальному от  $0^\circ$  до  $180^\circ$ . Линза Объектива 3 собирает боковое рассеяние в коническом телесном угле  $\Omega_{SSC}$ , ось которого перпендикулярна потоку частиц и направлению распространения триггерного луча, а угол раствора составляет  $2\Delta\theta^{SSC}$ .

Учитывая описанную пространственную геометрию сбора сигналов FSC и SSC, а также тот факт, что для сферически симметричных частиц элементы матрицы Мюллера  $S_{14} = S_{13} = 0$ , выражение (3) для амплитуды сигналов переписывается в следующем виде:

$$I^{SSC} = k_{SSC} \iint_{\Omega_{SSC}} d\theta d\varphi \sin\theta [S_{11}(\theta, \varphi) - S_{12}(\theta, \varphi) \cos(2\varphi)], \quad (4)$$

$$I^{FSC} = 2\pi k_{FSC} \int_{\theta_1^{FSC}}^{\theta_2^{FSC}} S_{11}(\theta, \varphi) \sin\theta d\theta d\varphi, \quad (5)$$

При известных параметрах частиц, задача определения углов сбора сигналов сводится к нелинейной регрессии измеренных амплитуд сигналов при варьировании диапазонов углов сбора светорассеяния. Диаметр частиц каждого типа (среднее значение и дисперсия) определялся по результатам электронного микроскопирования (Таблица 1). Характерные микрофотографии приведены на Рис. 4. Показатель преломления полагался равным 1.605, исходя из оценки полученной по дисперсионному соотношению для полистирола на длине волны  $\lambda = 488$  нм [228]. Показатель преломления среды (0.9% водный раствор хлорида натрия) полагался равным 1.339, согласно дисперсионному соотношению, приведенному в [228]. В данной постановке решение задачи стандартно ищется путем сопоставления средних диаметров измеряемых частиц каждого типа со средним значением интенсивности света, рассеянного в определенном направлении [153]. В данной работе для более точной и надежной оценки углов рассматривались не только средние значения, но также учитывалась дисперсия частиц по размеру. Для этого экспериментальная выборка составлялась из набора 150 случайных измеренных амплитуд сигналов FSC/SSC микросфер каждого типа. Аналогичная выборка моделировалась с помощью теории Ми. Диаметр частиц из модельной выборки генерировался случайным образом, согласно параметрам их распределений, определенным по данным

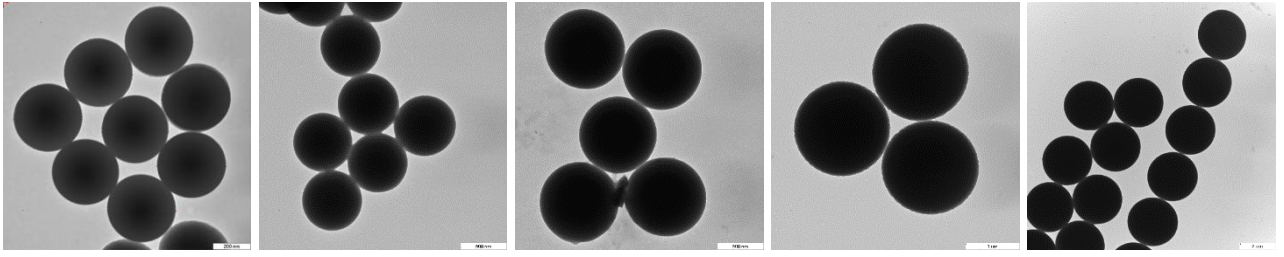


Рис. 4. Микрофотографии полистирольных микросфер, полученные на просвечивающем электронном микроскопе. По порядку (слева направо): 0.4 мкм (шкала 0.2 мкм), 0.7 и 1 мкм (шкала 0.5 мкм), 1.8 мкм (шкала 1 мкм), 3 мкм (шкала 2 мкм).

Таблица 1. Размер монодисперсных полистирольных микросфер по результатам электронного микроскопирования (ПЭМ).

Тип микросфер	Диаметр микросфер (среднее $\pm$ ошибка среднего)	Стандартное отклонение
0.4	$0.3799 \pm 0.0009$	0.0064
0.7	$0.6975 \pm 0.0019$	0.0133
1	$0.908 \pm 0.003$	0.019
1.8	$1.781 \pm 0.002$	0.018
3	$2.756 \pm 0.003$	0.034

электронного микрокопирования. Для корректного сопоставления экспериментальных данных (Рис. 5) и результатов моделирования, соответствующие наборы амплитуд сигналов были упорядочены по возрастанию, в результате чего задача свелась к стандартной минимизации невязки между двумя выборками методом наименьших квадратов, используя в качестве целевой функции:

$$S^{\text{FSC/SSC}}(\mathbf{P}) = \sum_{i=1}^k [I_{\text{exp},i}^{\text{FSC/SSC}} - I_{\text{th},i}^{\text{FSC/SSC}}(\mathbf{P})]^2, \quad (6)$$

где  $\mathbf{P}$  вектор варьируемых параметров модели ( $\{\theta^{\text{FSC}}, \Delta\theta^{\text{FSC}}, k_{\text{FSC}}\}$  для FSC и  $\{\theta^{\text{SSC}}, k_{\text{SSC}}\}$  для SSC),  $I_{\text{exp},i}^{\text{FSC/SSC}}$  и  $I_{\text{th},i}^{\text{FSC/SSC}}$   $i$ -ые значения интенсивности сигналов рассеяния FSC и SSC в упорядоченном наборе экспериментальных и рассчитанных амплитуд сигналов. Нахождение глобального минимума функции  $S^{\text{FSC/SSC}}(\mathbf{P})$  с набором параметров модели, который позволяет наилучшим образом описать результаты измерений, а также оценка погрешности определения этих параметров осуществлялась с помощью алгоритма глобальной оптимизации DiRect и Байесовского подхода (см. подраздел 3.2.2).

Результаты регрессии и полученные значения параметров интегрирования рассеяния FSC и SSC приведены на Рис. 6 вместе со схематичным изображением геометрии соответствующих апертур фотоприемников. Точность определения угловых диапазонов сбора сигналов рассеяния с помощью предложенного подхода составила  $0.1 - 1^\circ$ .

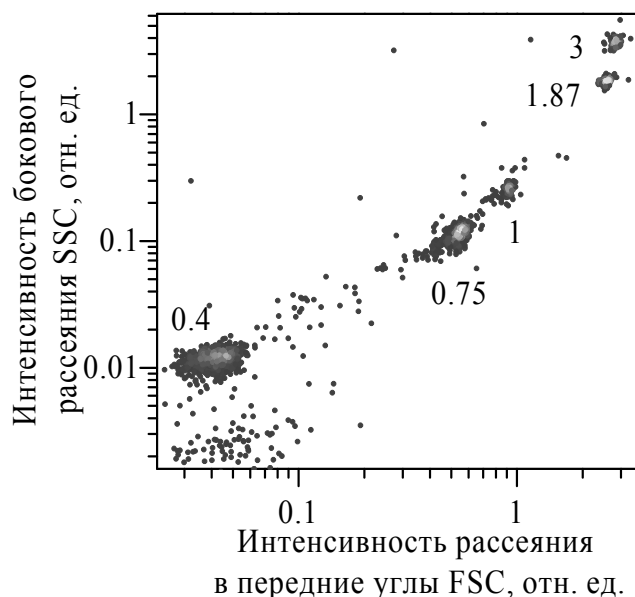


Рис. 5. Карта рассеяния FSC×SSC для смеси полистирольных микросфер (0.4, 0.7, 1, 1.87 и 3 мкм).

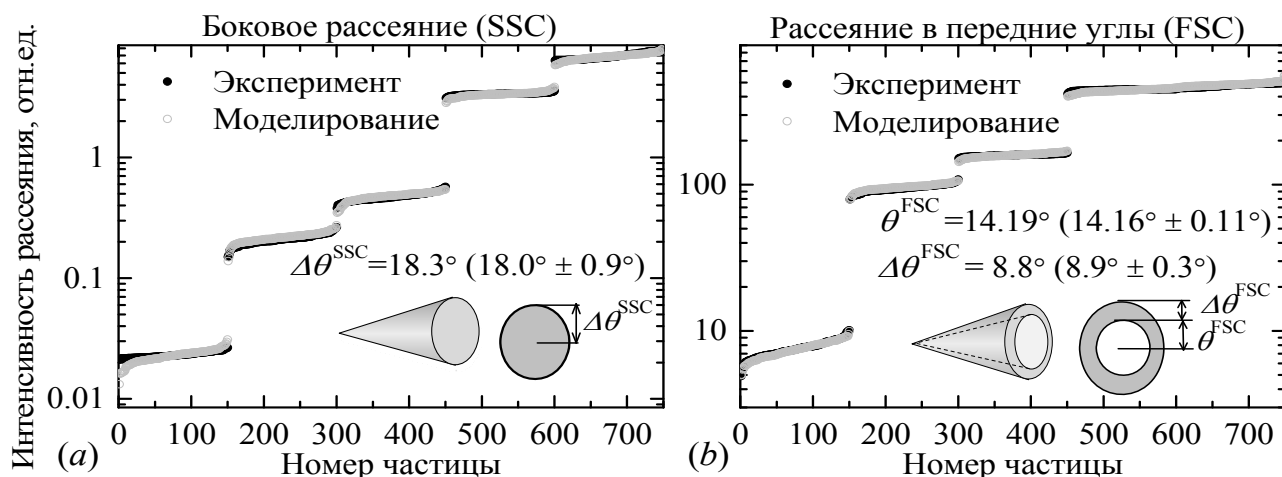


Рис. 6. Оценка углов сбора бокового рассеяния (a) и рассеяния вперед (b) на СПЦ. Для параметров угловых диапазонов приведена наилучшая оценка (математическое ожидание ± стандартное отклонение).

### 2.3. Оценка чувствительности СПЦ

Для того, чтобы оценить чувствительность СПЦ и определить диапазон параметров детектируемых частиц в триггерном канале, с помощью данных оценок были рассчитаны амплитуды сигналов FSC/SSC для сферических частиц субмикронных размеров (0.2 – 1.2 мкм) в широком диапазоне показателей преломления (1.35 – 1.6). Уровень детекции устанавливался равным удвоенному стандартному отклонению шума в каждом из каналов. Также была оценена граница чувствительности по индикатрисному каналу в предположении, что отношение сигнал/шум для детектируемых частиц должен превышать 2 для достоверного извлечения информации о параметрах частиц из индикатрисы.

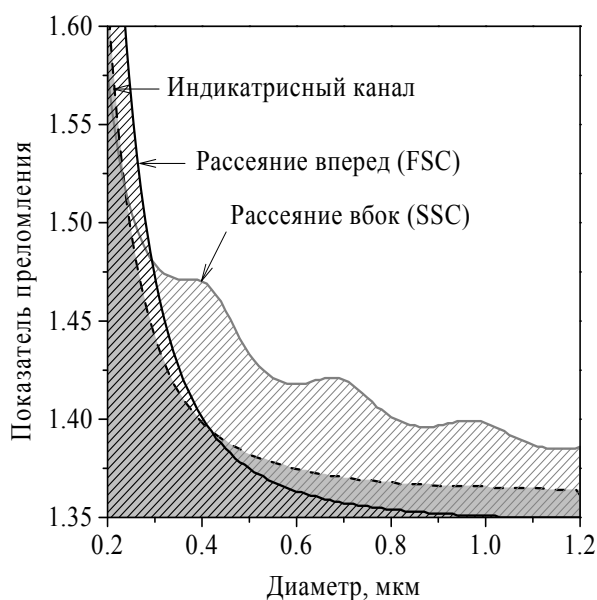


Рис. 7. Граница чувствительности СПЦ для частиц субмикронных размеров. Черная и серая сплошные линии соответствуют границам детекции по рассеянию вперед и вбок, черная пунктирная линия – ограничение, вносимое индикатрисным каналом.

Результаты представлены на Рис. 7. Линии, соответствующие границам детекции в индикатрисном и триггерных каналах, ограничивают снизу область параметров детектируемых частиц. В то время как для рассеяния вбок минимальный размер детектируемых частиц составляет около 300 нм, область детекции по рассеянию вперед имеет более широкий диапазон по показателю преломления, характерный для биологических клеток. Наличие шума в индикатрисном канале накладывает дополнительные ограничения по показателю преломления, минимальное значение которого составляет 1.37. Это позволяет не только надежно детектировать бактерии, но и предоставляет возможность для анализа фракции крупных микровезикул в плазме крови, значения показателей преломления для которых потенциально лежат вблизи данных значений.

\* \* \*

В данном разделе представлен метод определения телесных углов сбора интегральных сигналов светорассеяния в передние и боковые углы триггерной системы СПЦ. Метод основан на нелинейной регрессии упорядоченного набора сигналов рассеяния, измеренного для смеси монодисперсных сферических частиц с известными размерами и показателем преломления, и моделируемого с помощью теории Ми с учетом дисперсии размера частиц каждого типа. С его помощью были оценены телесные углы сбора интенсивности рассеяния вперед и бокового светорассеяния с точностью долей градуса. Предлагаемый подход применим для оценки угловых диапазонов измерений сигналов FSC и SSC проточных цитометров любой оптической конфигурации с известной геометрией апертуры фотоприемника.



Точная оценка углов сбора FSC и SSC позволяет рассчитывать амплитуду данных сигналов для любых частиц и определить порог чувствительности прибора в пространстве параметров рассматриваемых объектов. Согласно оценке, проведенной для сферических частиц, было показано, что, в частности, для СПЦ использование рассеяния вперед в качестве триггерного сигнала позволяет детектировать субмикронные частицы в более широком диапазоне размеров и показателей преломления по сравнению с боковым рассеянием. Определенная область детекции полностью покрывает диапазон характеристик жировых частиц и бактерий, исследованию которых посвящены Глава 4 и Глава 5, и частично захватывают диапазон размеров и показателей преломления субмикронных частиц плазмы, рассматриваемых в Главе 6.

## **Глава 3. Характеризация и идентификация сферических и несферических частиц по светорассеянию\***

Для определения характеристик одиночных частиц по светорассеянию необходимо решить ряд сложных задач, которые объединяются в так называемые прямую и обратную задачи светорассеяния. Восстановления информации об объекте методом СПЦ в общем случае сводится к решению параметрической обратной задачи, которое достигается путем сравнения экспериментально измеренной картины светорассеяния с результатами моделирования. При этом для получения точных и надежных результатов анализа важную роль играют не только объем и качество измеряемой оптической информации, но и различные используемые предположения и методы, применяемые для ее обращения.

В данной главе рассматриваются основные вопросы, связанные с решением прямой и обратной задач светорассеяния и характеристикой сферических и несферических частиц методом СПЦ, а именно:

- оптические модели исследуемых в работе объектов и их параметризация;
- методы моделирования светорассеяния одиночными частицами;
- методы решения обратной задачи светорассеяния для частиц сферической и несферической формы.

Особое внимание уделяется вопросу точности определения формы и характеристик объектов, который играет первоочередную роль при анализе многокомпонентных сред, содержащих популяции частиц, различные по статическим или динамическим характеристикам. В связи с этим на передний план выходит задача поиска путей повышения точности и надежности решения обратной задачи светорассеяния, особенно в условиях ограниченного объема измеряемой оптической информации.

### **3.1. Прямая задача светорассеяния**

#### **3.1.1. Оптические модели**

Наиболее простая сферическая модель, описываемая двумя параметрами, включая диаметр и показатель преломления, использовалась для описания трех классов объектов в широком диапазоне размеров:

- микрочастицы и хиломикроны в плазме крови (0.1 – 1.2 мкм);

---

\*Данные этого раздела были частично опубликованы в работах:

(1) Konokhova A.I. et al. High-precision characterization of individual E. coli cell morphology by scanning flow cytometry // Cytometry Part A. 2013. Vol. 83A, № 6. P. 568–575

(2) Moskalensky A.E. et al. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering // J Biomed Opt. 2013. Vol. 18, № 1. P. 17001.

(3) Konokhova A.I. et al. Light-scattering gating and characterization of plasma microparticles // J. Biomed. Opt. 2016. Vol. 21, № 11. P. 115003.

- шаровидные бактерии в виде микрококков (0.5 – 1.5 мкм);
- жировые частицы в молоке (0.5 – 6 мкм).

Также в работе использовались более сложные несферические модели, описывающиеся четырьмя параметрами, включая два размерных, показатель преломления и вспомогательный угол ориентации частицы в потоке, среди которых:

- сфероиды с небольшим отношением полуосей (жировые частицы молока);
- цилиндры с полусферическими концами (палочковидные бактерии);
- димеры, состоящие из двух идентичных сфер (шаровидные бактерии в форме диплококков);
- сплюснутые сфероиды (тромбоциты в плазме крови).

Обоснование выбора данных моделей для указанных биологических объектов, детальное описание их параметров и диапазонов их варьирования обсуждаются в соответствующих разделах глав, посвященных характеристике жировых частиц молока, бактерий и частиц в плазме крови.

### 3.1.2. Методы расчета

Расчет светорассеяния клетками и частицами сферической формы осуществлялся с помощью теории Ми [194].

Метод Т-матриц использовался для моделирования рассеяния на сфероидах с небольшим отклонением от сферичности (модель жировых частиц молока), а также для однократных расчетов светорассеяния на других формах (димеры шаров) при проверке различных предположений.

При построении баз данных для многократных расчетов теоретических индикатрис несферических объектов (сфероиды, цилиндры с полусферическими концами, димеры шаров), моделирование осуществлялось с помощью МДД, используя программу с открытым исходным кодом ADDA v.1.0 [229]. Вычисления производились на вычислительном кластере Суперкомпьютерного центра Новосибирского Государственного Университета [230].

Индикатрисы рассчитывались для углов рассеяния  $\theta$  от  $5^\circ$  до  $70^\circ$  с шагом  $0.5^\circ$ , используя стандартную дискретизацию 12 диполей на длину волны, с интегрированием по азимутальному углу  $\varphi$  от  $0^\circ$  to  $360^\circ$  по 64 точкам. При расчетах на различных длинах волн, значение для показателя преломления окружающей среды  $n_0$  (0.9% водный раствор хлорида натрия) устанавливалось согласно дисперсионному соотношению, приведенному в [228]. В частности, для длин волн 660, 488 и 405 нм его значение составило 1.333, 1.339 и 1.345, соответственно.

При построении баз данных значения параметров модели выбирались случайным образом в диапазонах, покрывающих биологическую вариабельность характеристик

исследуемых объектов. Исключение составила база данных сфероидов для характеристики жировых частиц молока, параметры которой имеют распределение в виде регулярной решетки (подраздел 3.4.3).

## 3.2. Обратная задача светорассеяния

### 3.2.1. Характеризация сферических частиц по двум сигналам рассеяния в заданных угловых диапазонах

Измерение интенсивности светорассеяния как минимум в двух различных угловых диапазонах (например, сигналы рассеяния вперед и вбок) потенциально позволяет восстановить характеристики частиц сферической формы [209,210,231], решив систему из двух уравнений для двух неизвестных (размер  $d$  и показатель преломления  $n$ ):

$$I_{\text{FSC}}^{\text{exp}} = I_{\text{FSC}}^{\text{th}}(d, n), \quad (7)$$

$$I_{\text{SSC}}^{\text{exp}} = I_{\text{SSC}}^{\text{th}}(d, n), \quad (8)$$

где  $I_{\text{FSC}}$  и  $I_{\text{SSC}}$  – амплитуды сигналов рассеяния вперед и вбок, а верхние индексы “exp” и “th” соответствуют экспериментально измеренным и рассчитанным значениям. Исследование поведения данной системы в диапазоне параметров частиц  $d \in [0.1, 1.5]$  мкм и  $n \in [1.35, 1.7]$  показало, что несмотря на то, что существование решения обеспечивается на всем диапазоне параметров частиц, его единственность при этом гарантируется только для ограниченной области, выделенной на Рис. 8а более светлым цветом, большая часть которой находится за пределом детекции СПЦ.

На Рис. 8(d-f) показаны характерные случаи нахождения 1, 2 и 4 решений системы (7)-(8) на примере 0.4, 0.7 и 0.9 мкм полистирольных микросфер с показателем преломления 1.628 и для потенциальной микровезикулы с размером 0.7 мкм и показателем преломления 1.45.

Точность определения характеристик частиц оценивалась, исходя из погрешности определения амплитуды сигналов рассеяния, учитывая шум в триггерных каналах (Рис. 8b и c). Определение размера и показателя преломления с точностью, не превышающей 10%, обеспечивается преимущественно в области высоких показателей преломления, не характерных для биологических объектов. Для  $n < 1.5$  погрешность превышает 30% и растет с уменьшением размера и показателя преломления частиц с одной стороны из-за падающего отношения сигнал/шум для сигналов рассеяния FSC и SSC, с другой стороны из-за приближения к Рэлеевскому пределу.

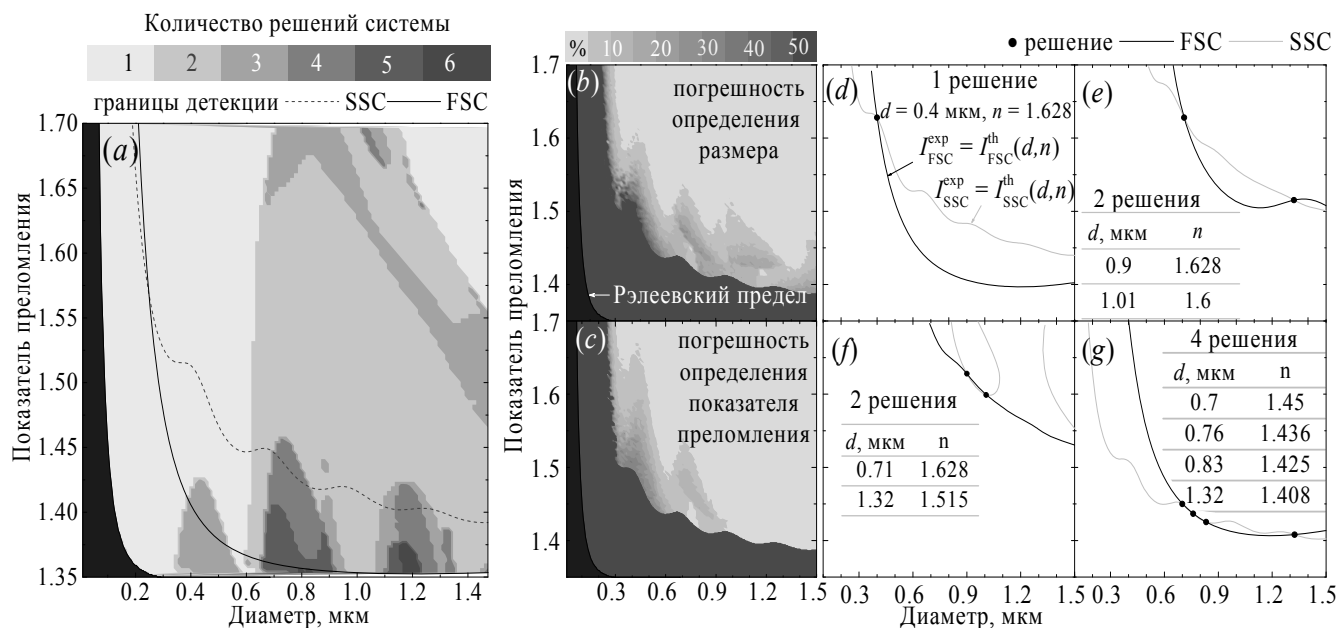


Рис. 8. (a) Области неоднозначности решения обратной задачи для сферических частиц и точности определения их размера (b) и показателя преломления (c) по измерению бокового рассеяния (SSC) и рассеяния вперед (FSC). (d-g) Характерные случаи нахождения 1, 2 и 4 решений при характеристике сферических частиц по боковому рассеянию и рассеянию вперед. Найденные решения обозначены пересечениями линий постоянной интенсивности FSC и SSC.

Для Рэлеевских сферических частиц, очень малых по сравнению с длиной волны, их оптические свойства определяются единственной характеристикой – поляризуемостью  $\alpha = 0.5\pi d^3(m^2 - 1)/(m^2 + 1)$ , где  $m = n/n_0$  относительный показатель преломления ( $n_0$  – показатель преломления среды), которая, связывая размер и показатель преломления частицы, делает невозможной их независимую оценку по светорассеянию. Условно данная граница обозначена на Рис. 8(a-c) черной областью. Также, важно отметить, что проведенная оценка точности определения характеристик частиц не учитывала погрешность, вносимую неточной оценкой угловых диапазонов сбора сигналов FSC и SSC (Раздел 2.2), и также неконтролируемую погрешность, связанную с отклонением формы частицы от сферической модели.

### 3.2.2. Характеризация сферических и несферических частиц по индикатрисе светорассеяния

По сравнению с измерением рассеяния в двух угловых диапазонах, используемом в стандартной проточной цитометрии, измерение индикатрисы светорассеяния с помощью СПЦ, содержащей большой объем оптической информации, позволяет более строго подойти к решению обратной задачи.

В данной работе главным образом использовались идеи и методы, которые были изначально описаны в [232] для характеристики сферических частиц, а затем развиты в работе [200] в общий метод решения обратной задачи светорассеяния для несферических частиц, описываемых несколькими параметрами.

Согласно им, задача определения характеристик частиц по индикатрисам светорассеяния, измеренным на СПЦ, решается методом наименьших квадратов, т.е. сводится к минимизации взвешенной суммы квадратов отклонений (СКО) между теоретическим и экспериментальным сигналами:

$$S(\mathbf{Q}) = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i^2, \quad \varepsilon_i = w(\theta_i)(I_{th}(\theta_i, \mathbf{Q}) - I_{exp}(\theta_i)), \quad (9)$$

где  $\mathbf{Q}$  – вектор параметров модели,  $I(\mathbf{Q})$  и  $I_{exp}$  – теоретическая и экспериментальная индикатрисы, соответственно,  $N$  – количество точек в индикатрисе,  $w(\theta)$  – весовая функция (2). Решением задачи является нахождение набора параметров  $\mathbf{Q}_0$ , для которого в рамках предполагаемой оптической модели обеспечивается наилучшее согласие между экспериментальной индикатрисой и результатом решения прямой задачи светорассеяния. Наличие множества локальных минимумов на поверхности  $S(\mathbf{Q})$ , связанное с осциллирующей структурой индикатрис и сильной зависимостью от параметров частиц, затрудняет применение прямых (локальных) алгоритмов оптимизации для минимизации целевой функции (9), и требует более подробного описания ее поверхности во всем пространстве параметров для нахождения глобального минимума  $S(\mathbf{Q}_0)$ .

Так, в [232] для решения этой проблемы для сферических частиц было предложено использование алгоритма глобальной оптимизации DiRect [219]. Суть его заключается в том, что исследуемое пространство параметров  $\mathbf{Q}$  делится рекурсивно, начиная с некоторого гиперкуба  $B$ . Каждый последующий шаг деления выбирается с учетом значения целевой функции и текущего размера разбиения. Таким образом, более плотным разбиение является в локальных минимумах функции, среди которых находится глобальный минимум. Применение данного алгоритма предполагает многократное решение прямой задачи светорассеяния (до нескольких тысяч вычислений), что требует существенного количества расчетного времени. Практическое применение данного алгоритма реализуемо для подгонки сигналов светорассеяния сферических частиц с использованием теории Ми, для которых расчет одного теоретического сигнала на современном компьютере занимает всего несколько миллисекунд, и сильно усложняется для несферических частиц, время моделирования одного сигнала для которых возрастает до нескольких минут.

Наиболее простой подход ускорения состоит в использовании больших баз данных теоретических индикатрис, предварительно насчитанных в диапазоне параметров исследуемых объектов, и решении обратной задачи светорассеяния интерполяцией с помощью ближайшего соседа. Другими словами, обработка экспериментальных сигналов одиночных частиц сводится к их сравнению со всеми индикатрисами из рассчитанной базы данных и нахождению ближайшей индикатрисы, используя расстояние, определенное формулой (9).

### 3.2.3. Оценка погрешности

Основным преимуществом данных подходов является то, что в дополнение к приближительному нахождению глобального минимума  $S(\mathbf{Q}_0)$ , они также дают примерное описание всей поверхности  $S(\mathbf{Q})$  некоторым набором значений  $\{S(\mathbf{Q}_i)\}$ .

На основании этой информации, используя Баейсовский подход, можно рассчитать распределение плотности вероятности  $P(\mathbf{Q})$  на всем пространстве параметров:

$$P(\mathbf{Q}) = \kappa S(\mathbf{Q})^{-k_{\text{eff}}/2}, \quad \kappa = \left( \int_{\mathbf{B}} S(\mathbf{Q})^{-k_{\text{eff}}/2} d\mathbf{Q} \right)^{-1}, \quad (10)$$

где  $\mathbf{B}$  – область в пространстве параметров, занятая базой данных, или область, в пределах которой осуществляется глобальная оптимизация алгоритмом DiRect.  $k_{\text{eff}} < N$ , или эффективное число степеней свободы, используется для приближенного описания зависимости шума в соседних точках экспериментальной индикатрисы. Оно определяется структурой невязки  $I_{\text{exp}} - I(\mathbf{Q}_0)$  и оценивается по автокорреляционной функции  $\rho_k$ , вернее по её оценке  $\hat{\rho}_k$  [232]:

$$k_{\text{eff}} = \frac{N^2}{N + 2 \sum_{k=1}^{N-1} (N-k) \rho_k^2}, \quad (11)$$

$$\hat{\rho}_k = \frac{\sum_{i=1}^{N-k} \hat{\varepsilon}_i \hat{\varepsilon}_{i+k}}{\sum_{i=1}^N \hat{\varepsilon}_i^2}. \quad (12)$$

Функция  $P(\mathbf{Q})$  дает полное описание информации, которая может быть извлечена из экспериментальной индикатрисы. В частности, можно рассчитать математическое ожидание любой функции  $f(\mathbf{Q})$ :

$$\langle f(\mathbf{Q}) \rangle = \int_{\mathbf{B}} f(\mathbf{Q}) P(\mathbf{Q}) d\mathbf{Q} \quad (13)$$

При использовании алгоритма DiRect пространство параметров разбивается на  $M$  ( $\sim 10^4$ ) частей, для каждой из которых известны объем  $V_i$ , центр  $\mathbf{Q}_i$  и значение  $S_i = S(\mathbf{Q}_i)$ , причем в силу особенности работы алгоритма для меньших значений  $S(\mathbf{Q})$  имеется более детальное разбиение, для больших значение оно является более грубым. Благодаря этому интегрирование в (13) может быть приближенно заменено суммированием [232]:

$$\langle f(\mathbf{Q}) \rangle = \kappa \int_{\mathbf{B}} f(\mathbf{Q}) [S(\mathbf{Q})]^{-n/2} d\mathbf{Q} = \kappa \sum_{i=1}^M f(\mathbf{Q}_i) S_i^{-n/2} V_i, \quad \kappa = \left( \sum_{i=1}^M S_i^{-n/2} V_i \right)^{-1} \quad (14)$$

Аналогичным суммированием заменяется интеграл при построении  $S(\mathbf{Q})$  с использованием базы данных, с той лишь разницей, что  $V_i = p_i$ , где  $M$  – число элементов базы

данных,  $p_i$  – относительные вероятности (веса) элементов базы данных, определяемые структурой базы данных и нормированные так, что  $\sum_{i=1}^M p_i = 1$ . В случае случайного распределения параметров  $p_i = 1/M$  [200].

По формуле (13) рассчитываются математическое ожидание параметров  $\mu = \langle Q \rangle$  (в общем случае отличающееся от  $Q_0$ ) и стандартное отклонение  $\sigma_j^2 = \langle (Q_j - \mu_j)^2 \rangle$  ( $j$  – номер параметра). Также, зная вероятности  $P(Q_i)$ , легко получить доверительные области, определяемые как  $R(P_0) = \{Q | P(Q) > P_0\}$ . Здесь  $P_0$  – переменный порог, который определяется уровнем достоверности  $\alpha$ :

$$\alpha = \int_{R(P_0)} P(Q) dQ \approx \kappa \sum_{Q_i \in R(P_0)} p_i S(Q)^{-k_{\text{эф}}/2} \quad (15)$$

Эти и другие оценки погрешности определения характеристик частиц, включая ширины доверительных интервалов, используются для контроля качества проводимых измерений. Большие погрешности могут быть вызваны наличием искажений в измеренных индикатрисах, которые в свою очередь могут возникать в результате неидеальной настройки СПЦ или соответствовать сильному отклонению реальной формы измеренной частицы от используемой оптической модели. Поэтому, на основании анализа погрешностей можно как контролировать качество настройки прибора, так и идентифицировать и исключать из рассмотрения деформированные клетки и частицы, посторонние объекты, частицы, случайным образом отклонившиеся от центра гидродинамического потока СПЦ и другие события, которые могут внести искажения в результаты характеристики исследуемой популяции.

### 3.2.4. Анализ регрессионных остатков

В дополнение к оценке погрешности индивидуальных измерений, определенную информацию об адекватности моделей и подходов, используемых при решении обратной задачи, дает исследование регрессионных остатков, заключающееся в проверке ряда гипотез, описывающих их поведение, с помощью различных статистических критериев.

К стандартным условиям, которым должны удовлетворять свойства регрессионных остатков и экспериментальных погрешностей, относят случайность, независимость, принадлежность к нормальному распределению с нулевым средним значением, и отсутствие тренда в значениях. Для проверки их выполнимости существует ряд критериев. В данной работе в качестве критерия проверки нормальности отклонений использовался тест Шапиро-Вилка [233]. Анализ отклонений на зависимость осуществлялся с помощью критерия серий Вальда-Вольфовитца [234]. В данном критерии используется количество серий отклонений  $k$  – наборов последовательных отклонений  $\varepsilon_i$  одного знака или, грубо говоря, количество



пересечений между экспериментальной и теоретической кривой. Для независимых отклонений  $k$  является случайной величиной с математическим ожиданием  $\mu \approx N/2$  и дисперсией  $\sigma^2 \approx N/4$ .

В качестве дополнительного критерия проверки независимости отклонений можно так же использовать эффективное число степеней свободы  $k_{\text{eff}}$  (11). В работе [232] предполагалось, что для независимых отклонений  $k_{\text{eff}} = N$ . Это утверждение выполнимо при условии, что нам заранее известна автокорреляционная функция остатков. Но при определении  $k_{\text{eff}}$  мы используем не точное значение  $\rho_k$ , а его оценку  $\hat{\rho}_k$ . Предполагая, что  $\sum_{i=1}^N \hat{\varepsilon}_i^2 \sim \sigma^2 N$ , и отклонения  $\varepsilon_i$  независимы между собой, получим:

$$\langle \hat{\rho}_k^2 \rangle = \frac{1}{(\sigma^2 N)^2} \left\langle \sum_{i,j=1}^{N-k} \varepsilon_i \varepsilon_{i+k} \varepsilon_j \varepsilon_{j+k} \right\rangle = \frac{1}{(\sigma^2 N)^2} \left\langle \sum_{i=1}^{N-k} \varepsilon_i^2 \varepsilon_{i+k}^2 \right\rangle = \frac{N-k}{N^2} \quad (16)$$

Из (16) и (12) следует, что для некоррелированных остатков эффективное число степеней свободы  $k_{\text{eff}}$  будет в среднем стремиться к значению  $3N/5$ :

$$\langle k_{\text{eff}} \rangle = \frac{N^2}{N + 2 \sum_{k=1}^{N-1} (N-k) \langle \hat{\rho}_k^2 \rangle} = \frac{N^2}{N + \frac{2}{N^2} \sum_{k=1}^{N-1} (N-k)^2} \approx \frac{3}{5} N \quad (17)$$

Рассматриваемые в данном разделе оценки независимости и нормальности регрессионных остатков, а именно количество пересечений между экспериментальной и теоретической кривой  $k$ , эффективное число степеней свободы  $k_{\text{eff}}$  и коэффициент автокорреляции  $\rho_i \in [0,1]$ , рассчитываемый согласно (12), можно использовать в качестве количественной меры согласия между экспериментальными и моделируемыми сигналами. Наряду с величиной невязки (9) и погрешностями определения характеристик частиц эти величины могут косвенно отражать адекватность использования конкретной оптической модели для описания реальной формы измеряемых частиц. Применение данных критериев к анализу экспериментальных отклонений для выявления систематических искажений, вносимых неточной настройкой прибора, также является оценкой качества проведенных измерений. Более того, выполнимость предположений о нормальности, случайности, гомоскедастичности и отсутствию автокорреляции регрессионных остатков, которые относятся к предпосылкам метода наименьших квадратов (МНК), гарантирует состоятельность и эффективность полученных с его помощью оценок параметров модели. В случае их невыполнения, вместо МНК рекомендуется использовать обобщенный МНК (см. подраздел 3.3.3).

### 3.3. Методы повышения точности решения обратной задачи светорассеяния

На точность решения обратной задачи светорассеяния оказывают влияние как ошибки модели, так и инструментальные ошибки, связанные с несовершенством оптической системы

СПЦ или его неточной настройкой. В данном разделе рассматривается один из наиболее вероятных источников искажений при измерении индикатрисы светорассеяния – отклонение траектории частицы от оптической оси СПЦ и его влияние на оценку параметров частиц. Помимо этого, рассматриваются подходы, позволяющие компенсировать вносимые искажения, и повысить состоятельность получаемых оценок.

### **3.3.1. Влияние отклонения траектории пролета частицы на индикатрису светорассеяния и точность оценки параметров частицы**

Одним из наиболее вероятных источников экспериментальных искажений, оказывающих влияние на форму и интенсивность индикатрисы светорассеяния, является отклонение траекторий частицы в потоке от оси капилляра оптической кюветы СПЦ (Рис. 2). Величина этого отклонения определяется стабильностью гидрофокусирующей системы (статистический разброс) и тем, с какой точностью выставлен внутренний поток (постоянный сдвиг). Детально вопрос влияния параметров оптической схемы СПЦ на измерение индикатрис светорассеяния при отклонениях от осевой симметрии рассматривался в работе [235]. В общем случае отклонение траектории частицы относительно оптической приводит к общему падению интенсивности сигнала, а в случае измерения более крупных объектов, для которых индикатриса обладает более выраженной осциллирующей структурой, - замыванию ее контраста.

Рассмотрим влияние отклонения траектории пролета частицы на примере характеристики сферических частиц разных размеров. На Рис. 9 показаны индикатрисы светорассеяния, рассчитанные для трех частиц диаметром 0.5, 1 и 4 мкм и с показателем преломления 1.5 в случае пролета по центру капилляра (луч лазера индикатрисы совпадает с осью капилляра) и при отклонении частиц на расстояние 2.5 мкм (соответствует падению интенсивности лазера на 5%). К рассчитанным сигналам был добавлен гауссовский шум, моделирующий случайные экспериментальные отклонения.

Как видно из Рис. 9 (*a,b*), для частиц, сравнимых с длиной волны или не сильно ее превышающих, искажения выражаются преимущественно в падении интенсивности сигнала и компенсируются при подгонке теорией Ми занижением показателя преломления. Размер доверительных областей уровня 95%, и, соответственно, погрешности определения характеристик частиц существенным образом не меняются и определяются экспериментальным шумом, а сами доверительные области не перекрываются.

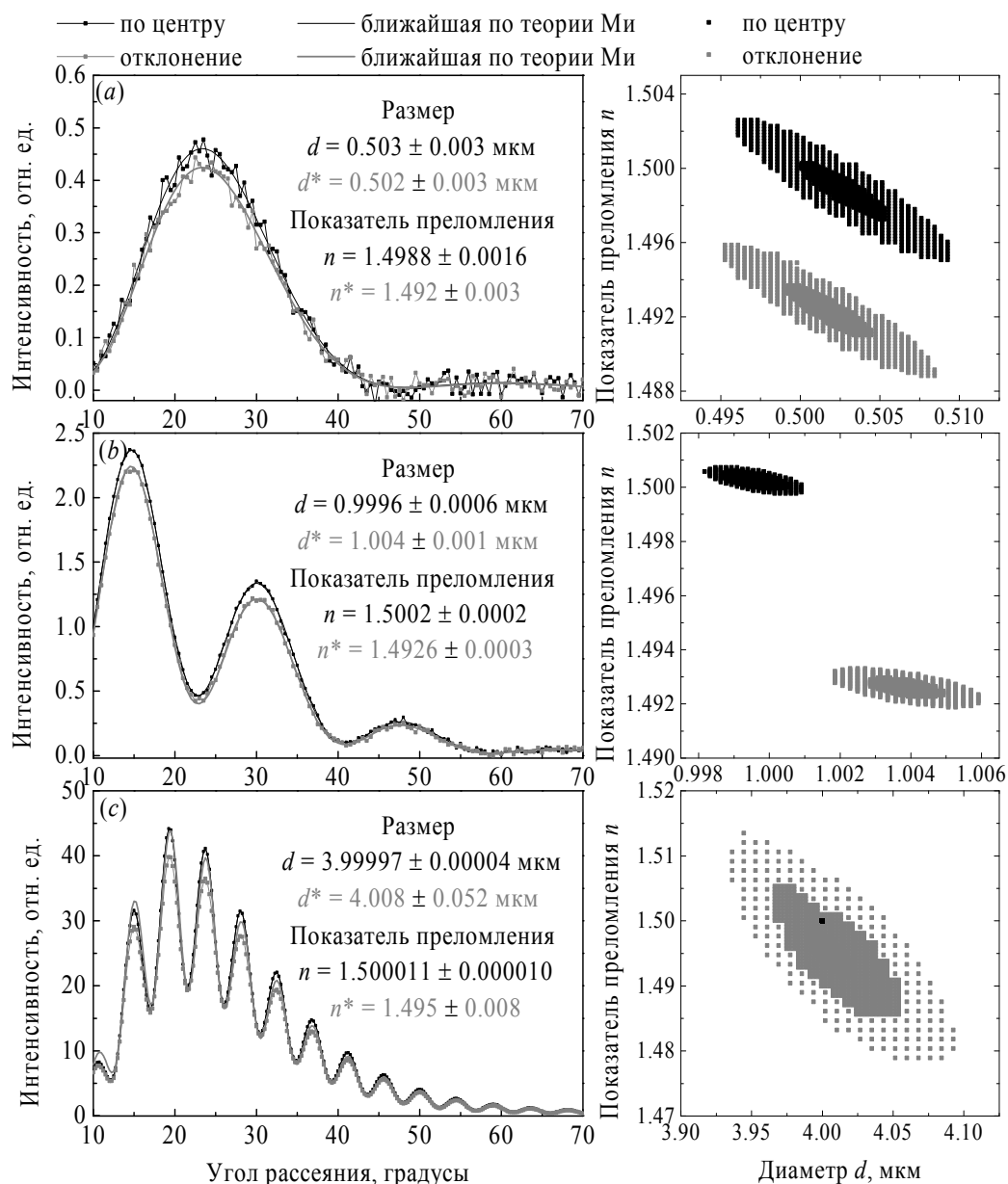


Рис. 9 Влияние отклонения траектории движения частицы от центра капилляра и луча лазера на сигнал индикатрисы светорассеяния и точность решения обратной задачи. На графике представлены индикатрисы светорассеяния, промоделированные для частиц размером 0.5(a), 1(b), и 4 мкм(c) и показателем преломления 1.5, соответствующие центральному пролету частицы (черный цвет) и ее отклонению на 2.5 мкм (серый цвет). Справа от графиков приведены результаты характеристики частиц, включая математические ожидания, стандартные отклонения и 95% доверительные области.

В случае более крупной частицы искажения, вызванные смещением ее в потоке и изменением освещения, по амплитуде превышают случайный шум. Поскольку для больших частиц форма сигнала начинает очень сильно меняться в зависимости от характеристик частицы, эти искажения не могут быть в полной мере скомпенсированы за счет варьирования параметров модели. Более того, сохраняющаяся структура сигнала, несмотря на замывание контраста, позволяет восстановить форму исходной, неискаженной индикатрисы (совпадение результатов подгонки по теории Ми в одном и другом случае), но сильные искажения приводят

к многократному увеличению погрешности определения как размера, так и показателя преломления.

### 3.3.2. Характеристики светорассеяния, инвариантные к отклонению траектории частицы от оптической оси СПЦ

Для повышения состоятельности оценок, получаемых в результате решения обратной задачи светорассеяния в случае отклонения частиц в потоке, необходимо ввести дополнительные измеряемые параметры, более устойчивые к рассматриваемым искажениям.

Из оптических параметров в этой роли наиболее подходящими выступают сигналы рассеяния вперед и вбок, измеряемые в триггерном канале одновременно с индикатрисой светорассеяния. Несмотря на то, что амплитуда сигналов FSC и SSC не зависит от положения частицы относительно центра капилляра (Рис. 10*a,b*), решить обратную задачу светорассеяния на основе только этих измерений затруднительно даже для двухпараметрической модели в случае сферических частиц из-за неоднозначности решения, как было показано в подразделе 3.2.1. Однако их можно использовать в качестве дополнительной оптической информации для повышения точности характеристики по индикатрисе светорассеяния, переопределив целевую функцию (9) следующим образом:

$$S(\mathbf{Q}) = \sum_{i=1}^N [w(\theta_i)]^2 \left[ \frac{I_{LSP}^{\text{exp}}(\theta_i) - \alpha I_{LSP}^{\text{th}}(\theta_i, \mathbf{Q})}{\sigma_{LSP}} \right]^2 + \left[ \frac{I_{SSC}^{\text{exp}} - I_{SSC}^{\text{th}}(\mathbf{Q})}{\sigma_{SSC}} \right]^2 + \left[ \frac{I_{FSC}^{\text{exp}} - I_{FSC}^{\text{th}}(\mathbf{Q})}{\sigma_{FSC}} \right]^2, \quad (18)$$

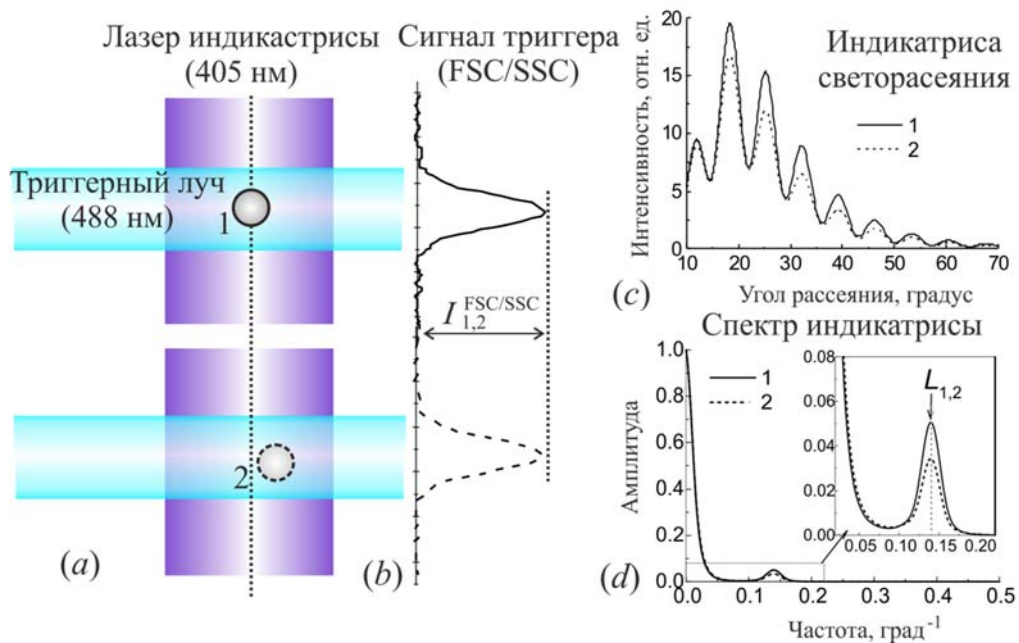


Рис. 10. Параметры измерений, инвариантные к случайному отклонению частиц от центра капилляра и луча индикатрисного лазера. (a) Схематичное изображение пролета частицы: положение 1 – в центре, положение 2 – смещенное. (c) Искажение индикатрисы светорассеяния в результате отклонения частицы. Амплитуда сигналов рассеяния вперед  $I^{FSC}$  и вбок  $I^{SSC}$  (b) и положение пика  $L$  в нормированном спектре индикатрисы (d) при этом не изменяются.

где коэффициент  $\alpha = \frac{(I_{LSP}^{exp}, I_{LSP}^{th})}{(I_{LSP}^{th}, I_{LSP}^{th})}$  - коэффициент, компенсирующий изменение интенсивности

индикатрисы вследствие отклонения траектории частицы.

Важно отметить, что данный подход применим для повышения точности характеристики только сферически симметричных объектов, для которых интенсивность рассеяния в боковые и передние углы зависит только от характеристик частицы и не зависит от ее ориентации. Для несферических частиц амплитуда рассеяния FSC и SSC имеет дополнительную зависимость от угла ориентации по отношению к поляризации лазера триггерного канала, который не учитывается в оптической модели объекта, поскольку индикатриса от него не зависит.

В качестве альтернативы амплитуде сигналов рассеяния вперед и вбок для повышения точности решения обратной задачи можно использовать параметры самой индикатрисы, инвариантные к искажениям, вносимым в нее при отклонении траектории частиц от оптической оси. Поскольку данные искажения преимущественно выражаются в падении интенсивности и изменении его контраста индикатрисы, но практически не затрагивают ее частоту, такими параметрами могут служить спектральные характеристики сигнала (Рис. 10*c,d*). Известно, что положение максимального пика в спектре индикатрисы, полученном в результате применения оконного преобразования Фурье, практически не чувствительно к небольшим отклонениям формы частицы от сферичности и замыванию контраста сигнала [235] и сильно коррелирует с размером сферических и сфероидальных частиц [205,206]. Поэтому, обозначив целевую функцию (9) как  $S_0(\mathbf{Q})$  и переопределив ее в следующем виде:

$$S(\mathbf{Q}) = S_0(\mathbf{Q}) + \gamma [L_{th}(\mathbf{Q}) - L_{exp}]^2, \quad (19)$$

где  $L_{exp}$  и  $L_{th}$  - положения пиков Фурье в спектрах экспериментальной и теоретической индикатрис, соответственно, а  $\gamma$  - весовой коэффициент, значение которого определяется эмпирически, можно ожидать повышения точности определения размера частиц, компенсируя смещение его оценки, вызванное искажениями сигнала. Применимость данного подхода ограничивается формой (сферические и сфероидальные частицы с небольшим отношением полуосей) и размером частиц от, приблизительно, 1.5 мкм (ограничение по возможности детекции пика в спектре сигнала на длине волны 405 нм, форма которого уже практически не имеет особенностей).

Что касается несферических частиц, то из-за невозможности применения к ним рассмотренных инвариантов, одним из наиболее эффективных способов уменьшения влияния систематических искажений индикатрисы на эффективность оценки их характеристик, является модификация процедуры нелинейной регрессии с помощью обобщенного метода наименьших квадратов.

### 3.3.3. Обобщенный метод наименьших квадратов

При невыполнении предположений о нормальности и независимости экспериментальных отклонений стандартной модификацией процедуры регрессии является применение обобщенного метода наименьших квадратов (ОМНК) [236]. Обратная задача при этом сводится к минимизации обобщенной нормы остатков регрессии:

$$S(\mathbf{Q}) = \boldsymbol{\varepsilon}^T \mathbf{V}^{-1} \boldsymbol{\varepsilon}, \boldsymbol{\varepsilon} = \mathbf{w}(\theta)(\mathbf{I}_{th}(\theta, \mathbf{Q}) - \mathbf{I}_{exp}(\theta)) \quad (20)$$

где  $\boldsymbol{\varepsilon}$  – вектор отклонений,  $\mathbf{V}^{-1}$  – симметричная положительно определенная матрица. Классический метод наименьших квадратов (МНК) является частным случаем обобщенного, когда матрица  $\mathbf{V}^{-1}$  пропорциональна единичной, а выражение (20) сводится к (9).

Известно, что симметричную положительно определенную матрицу всегда можно представить в виде произведения некоторой матрицы на ее транспонированную матрицу  $\mathbf{U}^T \mathbf{U}$  [237], известного также как разложение Холецкого, где  $\mathbf{U}$  – невырожденная верхнетреугольная матрица. Тогда обобщенную сумму квадратов отклонений можно свести к обычной сумме квадратов отклонений, преобразованных матрицей  $\mathbf{U}$ :

$$S(\mathbf{Q}) = \boldsymbol{\varepsilon}^T \mathbf{V}^{-1} \boldsymbol{\varepsilon} = \boldsymbol{\varepsilon}^T \mathbf{U}^T \mathbf{U} \boldsymbol{\varepsilon} = (\mathbf{U} \boldsymbol{\varepsilon})^T (\mathbf{U} \boldsymbol{\varepsilon}) \quad (21)$$

Если в качестве  $\mathbf{V}$  используется ковариационная матрица отклонений, преобразование их матрицей  $\mathbf{U}$  приводит к тому, что преобразованная модель удовлетворяет стандартным предположениям о случайности и нормальности. Следовательно, оценки параметров с помощью обычного МНК для преобразованной модели, параметры которой при этом не изменяются, будут наиболее эффективными [236].

Как правило, ковариационная матрица  $\mathbf{V}$  неизвестна, и в качестве таковой используется ее оценка по известным статистическим данным. Стандартной оценкой является выборочная ковариационная матрица, вычисляемая итерационно при наличии повторных измерений по набору векторов отклонений  $\boldsymbol{\varepsilon}^{(j)}$ , определенных для каждого измерения:

$$\mathbf{V} = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m (\boldsymbol{\varepsilon}^{(j)} - \hat{\boldsymbol{\varepsilon}})(\boldsymbol{\varepsilon}^{(j)} - \hat{\boldsymbol{\varepsilon}})^T, \hat{\boldsymbol{\varepsilon}} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \boldsymbol{\varepsilon}^{(j)} \quad (22)$$

где  $m$  – число повторных измерений. Особенностью работы сканирующего проточного цитометра является высокая скорость измерения частиц, поэтому вместо повторных измерений одной частицы можно использовать набор измерений однотипных частиц, осуществленных за короткий промежуток времени, за который предполагается, что условия проведения измерений остаются неизменными.

Общей проблемой подобных эмпирических оценок ковариационной матрицы является их плохая обусловленность. В случае, когда ковариационная матрица близка к вырожденной, может оказаться, что ее оценка из-за вычислительных ошибок не является положительно

определенной матрицей, чего быть не должно. Преодолеть проблему плохой обусловленности матрицы можно выбрав подходящую процедуру регуляризации. В данной работе использовался метод, описанный в [238], основанный на использовании регуляризованных "сжатых" оценок Джеймса-Стена (James-Stein-type shrinkage estimation) и представленный в виде пакета "corpcor" [239] в программной среде R.

При обработке экспериментальных данных оценка матрицы  $\mathbf{V}$  осуществляется итерационно. На первом шаге подгонка выполняется с помощью обычного МНК. По вычисленному набору векторов отклонений оценивается ковариационная матрица отклонений. На каждом следующем шаге подгонка осуществляется ОМНК, а оцененная на предыдущем шаге матрица  $\mathbf{V}$  используется при вычислении обобщенной суммы квадратов отклонений согласно (20).

Критерием сходимости, необходимой для того, чтобы отклонение для соответствующих элементов матриц не превышало точность оценки ковариации, является выполнимость для каждого элемента матрицы условия:

$$|\mathbf{v}_{ij}^l - \mathbf{v}_{ij}^{l-1}| < |\mathbf{v}_{ij}^l| \sqrt{\frac{2}{m-1}}, \quad (23)$$

где  $l$  - номер итерации.

Данный подход применим для повышения точности характеристики частиц любых форм и размеров, однако его недостатком является дополнительное время, требуемое для итерационной оценки ковариационной матрицы ошибок.

### 3.3.4. Проверка методов на экспериментальных данных

#### 3.3.4.1. Использование рассеяния в переднем и боковом угловом диапазоне рассеяния для повышения точности характеристики субмикронных частиц

Эффективность использования амплитуд рассеяния FSC и SSC в качестве дополнительной оптической информации для повышения точности характеристики частиц рассматривалась на примере измерений трех типов монодисперсных полистирольных микросфер размером 0.4, 0.7 и 1 мкм. Размер и показатель преломления частиц оценивались двумя способами: (1) используя стандартный подход, т.е. в результате прямой подгонки измеренных индикатрис светорассеяния с помощью теории Ми, минимизируя целевую функцию (9) (см. подраздел 3.2.2); и (2) в результате решения обратной задачи светорассеяния с использованием модифицированной целевой функции (19), которая содержит в себе дополнительную информацию о рассеянии вперед и вбок.

На Рис. 11 на примере характеристики 0.7 мкм полистирольной частицы продемонстрировано, как использование амплитуды FSC и SSC при решении обратной задачи значительно повышает точность определения размера и показателя преломления, сокращая доверительную область уровня 95%, и смещает оценку параметров к пересечению линий постоянной интенсивности рассеяния вперед и вбок, которая является ничем иным, как решением системы уравнений (7)-(8) из подраздела 3.2.1.

Результаты характеристики для всех частиц представлены на Рис. 12 в виде двумерных распределений по размеру и показателю преломления, где каждой точке соответствуют характеристики одной измеренной частицы. Для оценок, полученных только по индикатрисе светорассеяния (серые точки), характерен широкий разброс и систематический сдвиг, особенно выраженный для показателя преломления (согласно литературным данным, его значение для полистирола составляет 1.628 на длине волны 405 нм [240]), как параметра модели, более чувствительного к изменению интенсивности сигнала для частиц, чьи размеры не превышают нескольких длин волн (подраздел 3.3.1).

Использование амплитуд FSC и SSC, инвариантных к смещению траектории частицы, повышает точность одиночных измерений, уменьшает ширину распределений по всей популяции и систематический сдвиг среднего значения (Рис. 12, Таблица 2).

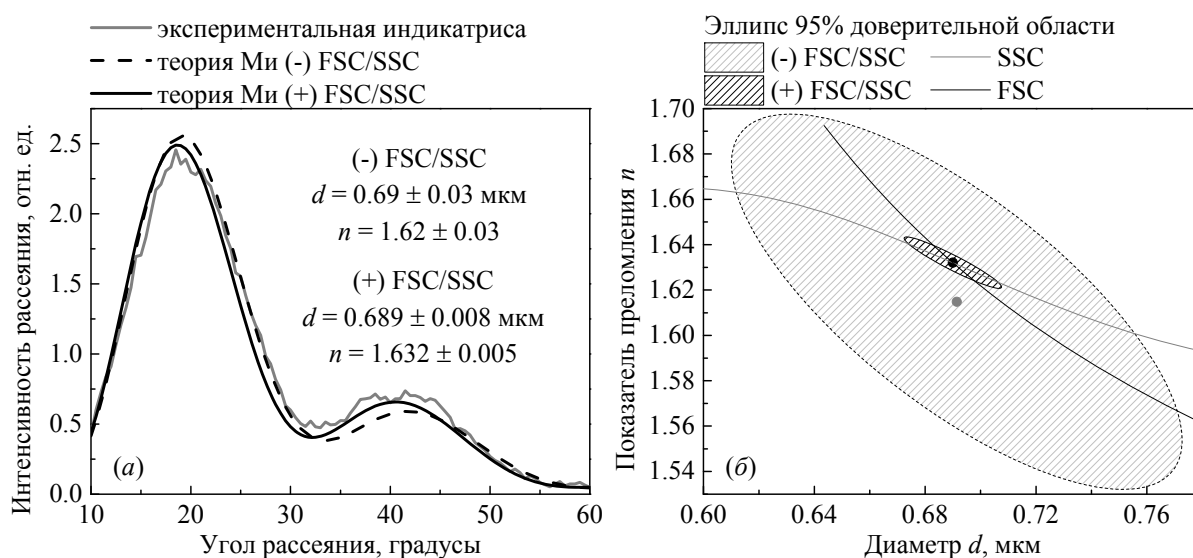


Рис. 11. Экспериментальная индикатриса полистирольной микросферы 0.7 мкм и ближайшие теоретические индикатрисы, полученные в результате решения обратной задачи только по индикатрисе [(-)FSC/SSC] и с дополнительным использованием рассеяния вперед и вбок [(+)FSC/SSC]. На рисунке приведены соответствующие оценки размера и показателя преломления и их погрешность (математическое ожидание  $\pm$  стандартное отклонение) (a), а также построены доверительные области уровня 95% (b). Сплошными линиями изображены линии постоянной интенсивности FSC и SSC.



Важно отметить, что средние значения и дисперсии по диаметру полистирольных частиц, определенные в результате решения обратной задачи с использованием индикатрисы светорассеяния, рассеяния FSC и SSC, очень хорошо согласуются с результатами электронного микрофотографирования, что является убедительным доказательством адекватности результатов, полученных с помощью рассматриваемого метода.

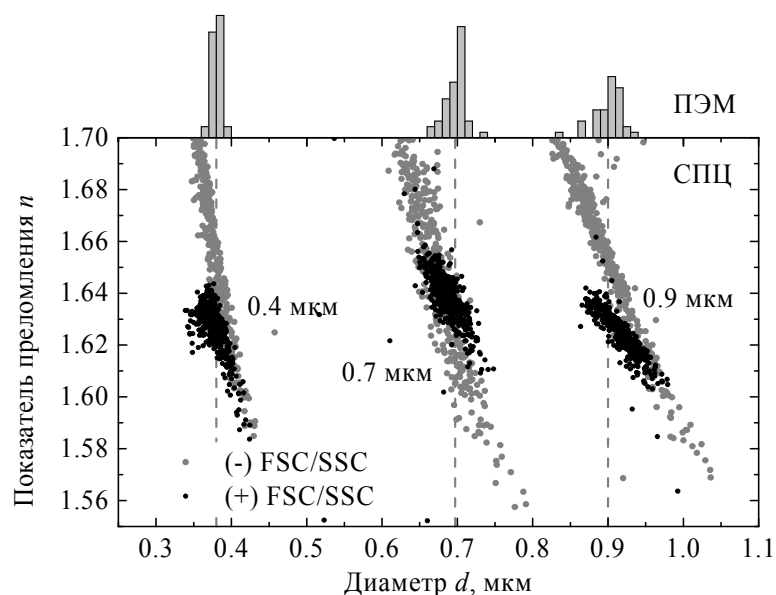


Рис. 12 Распределения полистирольных микросфер 0.4, 0.7 и 0.9 мкм по диаметру и показателю преломления, полученные в результате решения обратной задачи светорассеяния с использованием дополнительной информации о рассеянии FSC/SSC (черные точки) и без нее (серые точки). Для сравнения приведены результаты измерений, полученные на просвечивающем электронном микроскопе (вертикальные пунктирные линии соответствуют средним значениям размера для каждого типа микросфер). Параметры всех представленных распределений частиц объединены в Таблице 2.

Таблица 2

Тип частиц		ПЭМ	Размер (мкм)		Показатель преломления	
			(-) FSC/SSC	(+) FSC/SSC	(-) FSC/SSC	(+) FSC/SSC
0.4	$\mu$	<b>0.3799</b>	0.376	<b>0.379</b>	1.666	1.625
	$\sigma$	<b>0.0064</b>	0.049	<b>0.023</b>	0.038	0.013
	$\delta_{\text{мед}}$		0.006	0.005	0.011	0.008
0.7	$\mu$	<b>0.6975</b>	0.67	<b>0.687</b>	1.65	1.638
	$\sigma$	<b>0.0133</b>	0.03	<b>0.022</b>	0.04	0.011
	$\delta_{\text{мед}}$		0.04	0.012	0.05	0.008
0.9	$\mu$	<b>0.908</b>	0.89	<b>0.915</b>	1.661	1.625
	$\sigma$	<b>0.019</b>	0.05	<b>0.023</b>	0.032	0.008
	$\delta_{\text{мед}}$		0.03	0.018	0.025	0.007

\* $\mu$  – среднее значение,  $\sigma$  – стандартное отклонение,  $\delta_{\text{мед}}$  – медиана погрешности одиночных измерений

### ***3.3.4.2. Использование Фурье-параметров индикатрисы для повышения точности характеристики сферических и сфероидальных частиц (жировые частицы молока)***

Для повышения точности характеристики частиц, размеры которых превышают несколько длин волн, а форма хорошо описывается сферической или сфероидальной моделью (когда использование амплитуд сигналов рассеяния вперед и вбок в решении обратной задачи становится некорректным), было предложено включить в целевую функцию дополнительную информацию о другом инварианте, устойчивом к искажениям индикатрисы, вызванным отклонением траектории частицы от оптической оси (19), а именно, о положении главного пика в спектре Фурье индикатрисы, который помимо прочего связан с размером самой частицы.

Особенностью решения обратной задачи светорассеяния для частиц, по размеру составляющих или несколько длин волн, является появление множества локальных минимумов на поверхности целевой функции. Отклонение формы частицы от сферической модели, неточная настройка цитометра и случайное отклонение частиц от оси капилляра приводят к замыванию контраста индикатрисы, из-за чего глубина близлежащих локальных минимумов целевой функции становится сравнимой по глубине с глобальным, что приводит к смещению оценок параметров частицы из-за нахождения некорректных решений, существенному увеличению погрешности их определения и уширению доверительных интервалов измеряемых характеристик. Поэтому предложение использовать положения главного пика в спектре Фурье индикатрисы, инвариантного к подобным искажениям индикатрисы и связанного с размером самой частицы, в качестве дополнительной информации при решении обратной задачи кажется обоснованным.

Эффективность данного подхода была проверена на измерении жировых частиц молока (ЖЧМ), имеющих небольшое отклонение формы от модели сферы и широкий разброс по размеру, попадающий в рассматриваемый диапазон (подробнее в Главе 4). В частности, в диапазоне характеристик ЖЧМ, положение пика Фурье может быть достоверно определено для частиц размером больше 1.5 мкм (Рис. 13). Это ограничение, вызываемое отсутствием особенностей в форме сигнала для этих частиц, не позволяет использовать рассматриваемый подход для повышения точности их характеристики. С другой стороны, для частиц в данном диапазоне размеров проблема появления дополнительных локальных минимумов на поверхности  $S(\mathbf{Q})$  уступает место проблеме уширения глобального минимума, в связи с уменьшением интенсивности сигнала, большего влияния шумов и других источников погрешности.

Рассмотрим проблему на примере характеристики одной из измеренных жировых частиц. На Рис. 14а изображена поверхность целевой функции, определенная согласно (9) как невязка между измеренной и модельной индикатрисами, а на Рис. 14с показаны

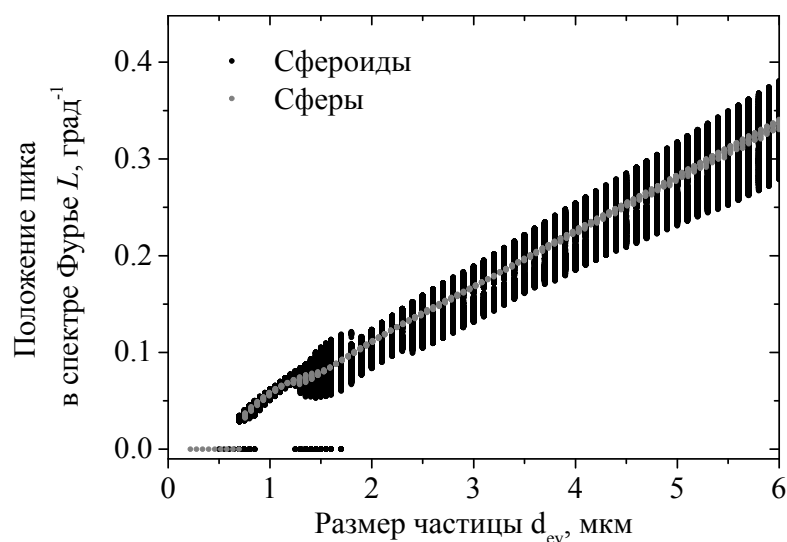


Рис. 13. Зависимость положения пика в спектре Фурье индикатрисы светорассеяния  $L$  от размера сферических и сфероидальных частиц  $d_{ev}$  (в диапазонах параметров, установленных для жировых частиц молока, 4.1).

экспериментальная индикатриса и индикатрисы, рассчитанные для параметров, соответствующих глобальному и локальному минимуму. Некорректность последнего явным образом выражается в несоответствии положения минимумов и максимумов экспериментальных и теоретических сигналов. Более того, решение, соответствующее локальному минимуму, с заниженным размером частицы и завышенным показателем преломления, компенсирующим потерю интенсивности, приводит к сильному смещению оценки математического ожидания характеристик частицы и большой погрешности их определения.

Использование дополнительной информации из Фурье спектра индикатрисы при решении обратной задачи светорассеяния действительно позволяет обойти побочные локальные минимумы и повысить точность характеристики одиночных частиц (Рис. 14*b,d*).

Результаты характеристики всей пробы показали, что использование положения пика Фурье при решении обратной задачи по теории Ми уменьшает медианную погрешность определения размера с 203 нм до 112 нм (для частиц размером более 1.5 мкм), в то время как для показателя преломления, как и следовало ожидать, эффективность повышения точности меньше — с 0.014 до 0.010. При использовании модели сфероидов повышение точности определения размера составило 10% (от 145 до 130 нм) и не привело к повышению точности определения показателя преломления, для которого медиана погрешности одиночного измерения составила 0.015.

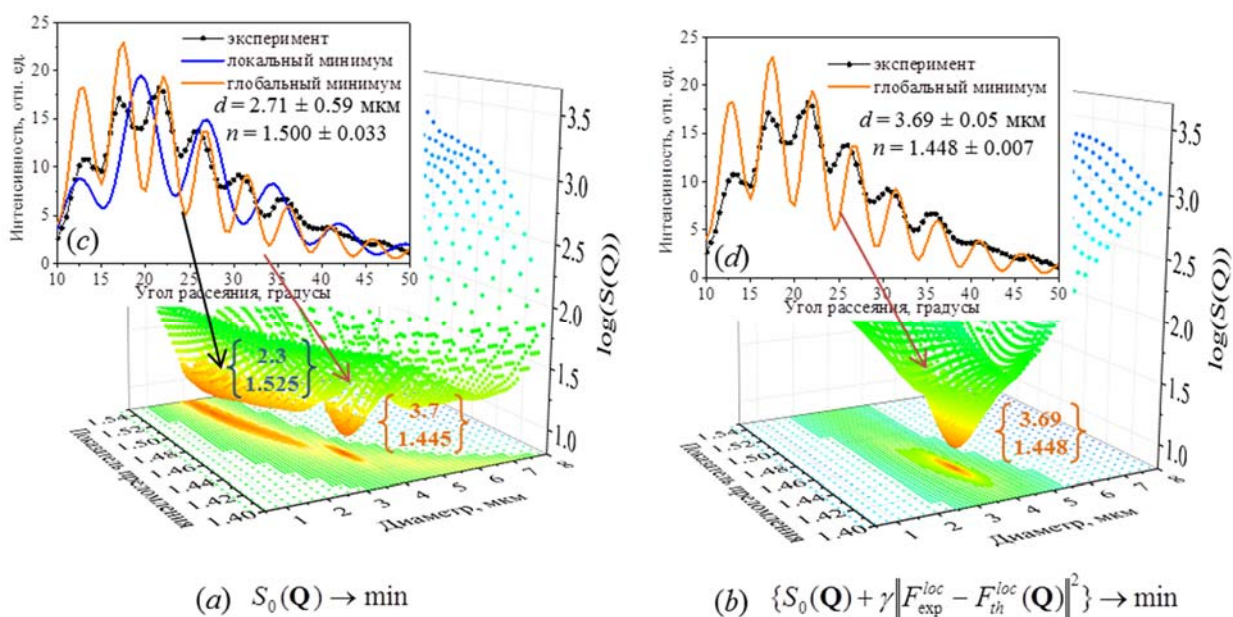


Рис. 14. Поверхности целевой функции  $S(\mathbf{Q})$ , полученные в результате решения обратной задачи светорассеяния с помощью алгоритма глобальной оптимизации DiRect для одиночной ЖЧМ, описываемой моделью сферы по теории Ми. (a) Поверхность стандартной невязки  $S_0(\mathbf{Q})$ , определяемой в соответствии с (9), с двумя локальными минимумами, и (b) поверхность целевой функции, включающей дополнительную информацию о положении пиков в Фурье спектре индикатрисы (19), и одним глобальным минимумом. На (c) и (d) показана экспериментальная индикатриса, и теоретические индикатрисы, соответствующие найденным минимумам (их параметры  $d$  и  $n$  указаны в фигурных скобках). На (c) и (d) также приведены оценки параметров частицы, получаемые в результате характеристики (математическое ожидание  $\pm$  стандартное отклонение).

### 3.3.4.3. Использование обобщенного метода наименьших квадратов для повышения точности характеристики несферических частиц (палочковидные бактерии)

Экспериментальная проверка эффективности применения обобщенного метода наименьших квадратов для повышения точности характеристики несферических частиц, для которых неприменимы подходы с использованием рассеяния вперед и вбок и положения пика Фурье индикатрисы, проводилась на примере измерений палочковидных бактерий. Исследуемыми объектами стали два разных, отличающихся по размеру клеток, штамма клеток *E. coli* XL2-Blue и XL10-GOLD, которые были любезно предоставлены сотрудниками ИЦиГ СО РАН Еленой Уваровой и Вениамином Фишманом. Культуры бактериальных клеток выращивались в термостате с температурой 37°C при энергичном перемешивании. В качестве питательной среды использовалась стандартная среда LB [241] (10.0 г NaCl, 10.0 г триптона, 5.0 г дрожжевого экстракта, pH-7.5, 1 л воды). После приготовления среда подвергалась стерилизации методом автоклавирования при температуре 120°C. Указанные штаммы обладают устойчивостью к антибиотику ампицилин. Для того чтобы избежать возникновения

посторонних культур в пробе в процессе роста он добавлялся в среду в количестве 0.05 г/л. Никакой дополнительной обработки пробы перед экспериментом не проводилось.

В результате проведения эксперимента на СПЦ были измерены индикатрисы бактерий: 2918 клеток *E. coli* XL-2 Blue и 7202 клеток *E. coli* XL-10 GOLD на длине волны 405 нм. Рабочий угловой диапазон измерений был определен по анализу 2 мкм полистирольных микросфер в пределах от 10° до 40°. Дополнительно проводились измерения на оптическом микроскопе с последующей автоматической обработкой полученных микрофотографий для определения длины и диаметра клеток согласно процедуре, описанной в подразделе 5.3.3. В результате с помощью микроскопа было измерено 1258 клеток *E. coli* XL2-Blue и 1175 клеток *E. coli* XL10-GOLD.

Обоснование выбора обобщенного метода наименьших квадратов (ОМНК) (см. подраздел 3.3.3) для проведения процедуры регрессии строилось на основании его сравнения с решением обратной задачи светорассеяния, получаемым с помощью стандартного метода наименьших квадратов (МНК) (см. подраздел 3.2.2). По 500 индикатрисам бактерий каждого из штаммов были рассчитаны ковариационные матрицы  $V$  и матрицы преобразования отклонений  $U$ .

На Рис. 15 приведены примеры отклонений для трех случайных бактерий, полученных при использовании МНК, и соответствующие им преобразованные отклонения, полученные в результате решения обратной задачи ОМНК. Видно, что преобразованные отклонения менее скоррелированы, и, следовательно, должны лучше отвечать предположениям, в рамках которых

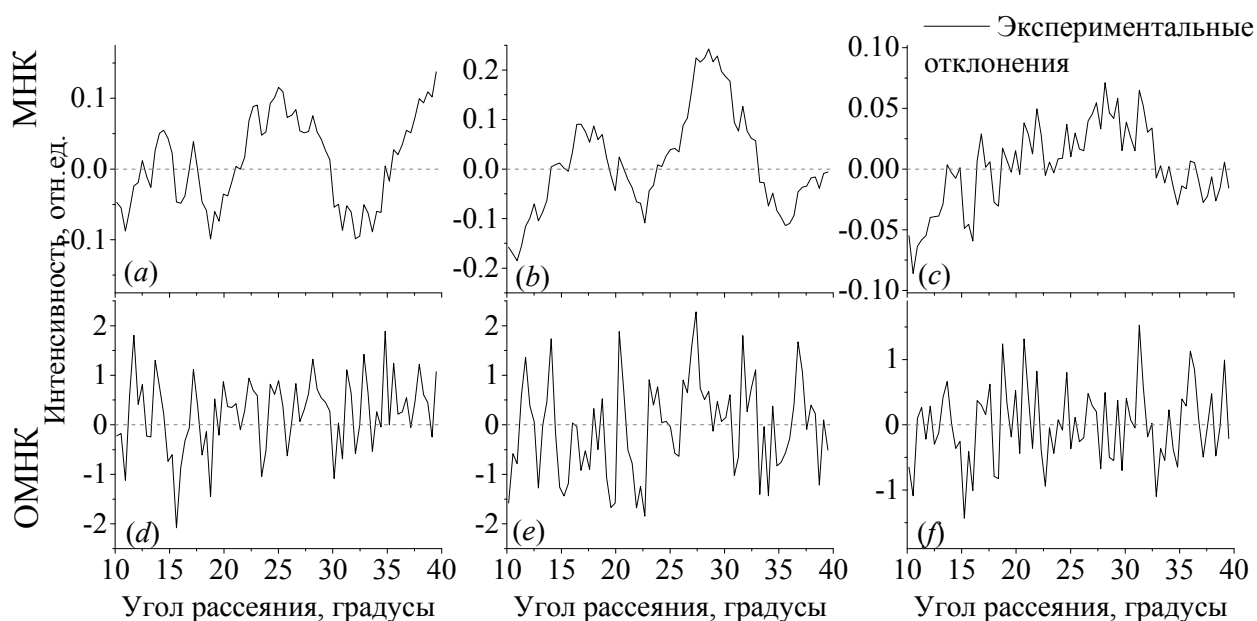


Рис. 15. Экспериментальные отклонения, полученные при подгонке классическим МНК (a,b,c), и соответствующие им отклонения, полученные при подгонке ОМНК и преобразованные матрицей  $U$  (d,e,f).

выполняется задача регрессии. Для строгого математического обоснования этого утверждения, был проведен анализ экспериментальных погрешностей методами, описанными в подразделе 3.2.4.

Для МНК предположение о нормальности отклонений выполнялось по критерию Шапиро-Вилка на уровне достоверности  $p = 0.95$  для 50% измеренных индикатрис штамма XL2-Blue и 42% XL10-GOLD, в то время как для преобразованных в ОМНК отклонений данное предположение было выполнено для 87 и 88 % бактерий штамма XL2-Blue и XL10-GOLD, соответственно.

Проверка независимости отклонений осуществлялась по критерию серий Вальда-Вольфовитца. На Рис. 16 приведены распределения по числу серий  $k$  отклонений, полученных при подгонке МНК и ОМНК, для каждого из штаммов. И, хотя преобразованные в ОМНК отклонения согласно критерию не являются абсолютно независимыми, в сравнении с экспериментальными отклонениями для МНК корреляция для них не такая сильная.

В качестве дополнительного критерия проверки независимости отклонений так же было рассмотрено эффективное число степеней свободы  $k_{\text{eff}}$ , значение которого для некоррелированных остатков должно стремиться к  $3N/5$ , где  $N = 76$  – число точек в индикатрисе. Из распределений  $k_{\text{eff}}$  по каждому из штаммов бактерий XL2-Blue и XL10-GOLD на Рис. 17 видно, что данное условие выполняется для преобразованных отклонений ОМНК и не выполняется для отклонений, полученных при подгонке классическим МНК.

Важно отметить, что выполнимость предположения о независимости экспериментальных отклонений при использовании ОМНК в совокупности с глобальной оптимизацией для описания поверхности  $S(\beta)$  позволяет при расчете  $P(\beta)$  в формуле использовать не оцениваемое  $k_{\text{eff}} < N$ , а полное число точек в индикатрисе  $N$ .

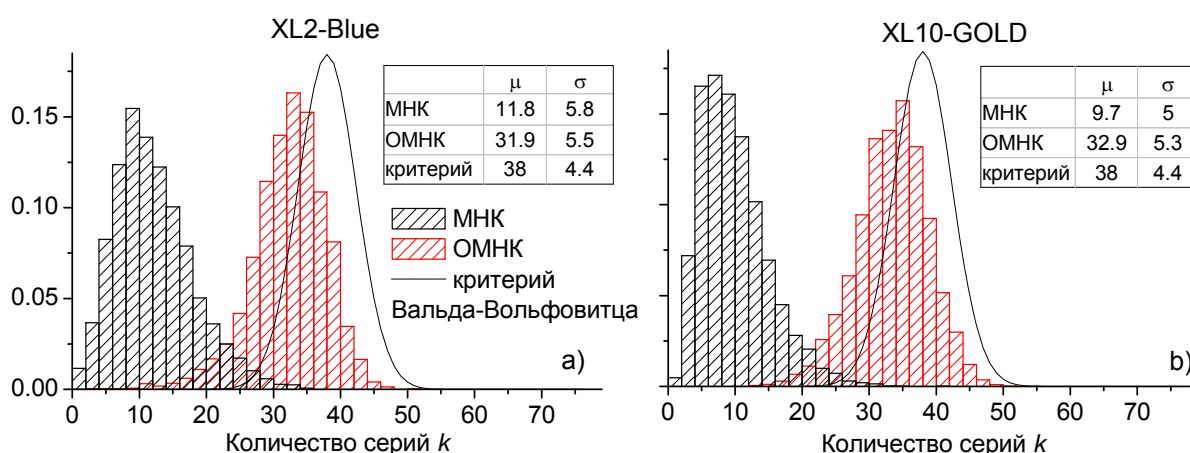


Рис. 16. Распределения по количеству серий  $k$  для экспериментальных погрешностей, полученных при подгонке МНК и ОМНК (заштрихованные гистограммы), и распределение по количеству серий для абсолютно независимых погрешностей согласно критерию Вальда-Вольфовитца (линия).

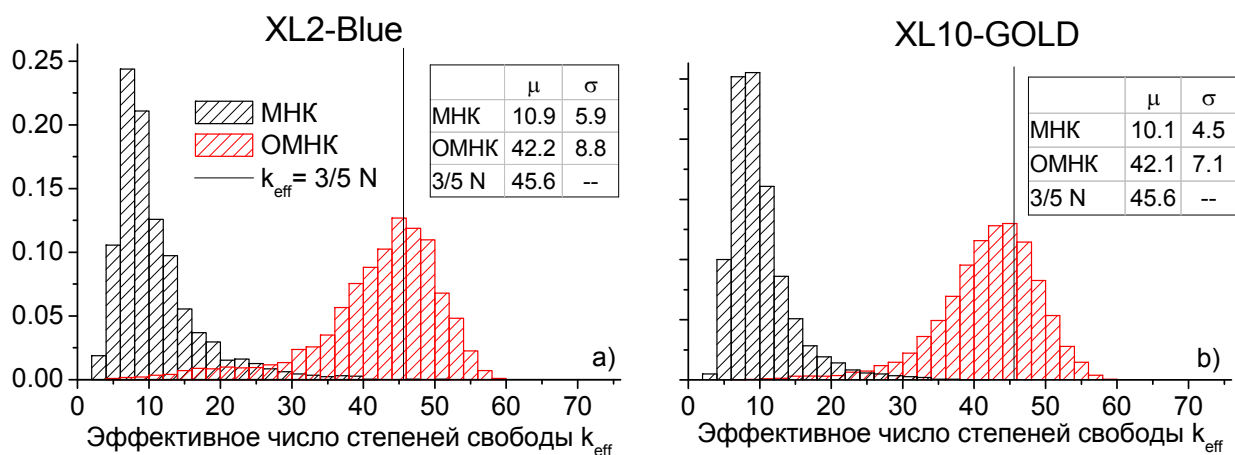


Рис. 17. Распределения по эффективному числу степеней свободы  $k_{\text{eff}}$  для экспериментальных отклонений, полученных при подгонке индикатрис МНК и ОМНК. Линией отмечено значение  $k_{\text{eff}}$  для абсолютно независимых отклонений.

Поскольку распределение плотности вероятности используется нами для оценки математических ожиданий различных величин, то можно предположить, что использование ОМНК делает оценку математических ожиданий и погрешностей определяемых параметров бактерий более адекватной.

Кроме того, сравним распределения по погрешностям всех четырех определяемых параметров бактерий для каждого из штаммов (Рис. 18 для XL2-Blue и Рис. 19 для XL10-GOLD). Погрешности параметров, полученные в результате характеристики с использованием ОМНК, имеют более узкие распределения, и средние значения для них меньше в сравнении с результатами, полученными с применением МНК. Следовательно, использование ОМНК для решения обратной задачи позволяет добиться повышения точности характеристики бактерий.

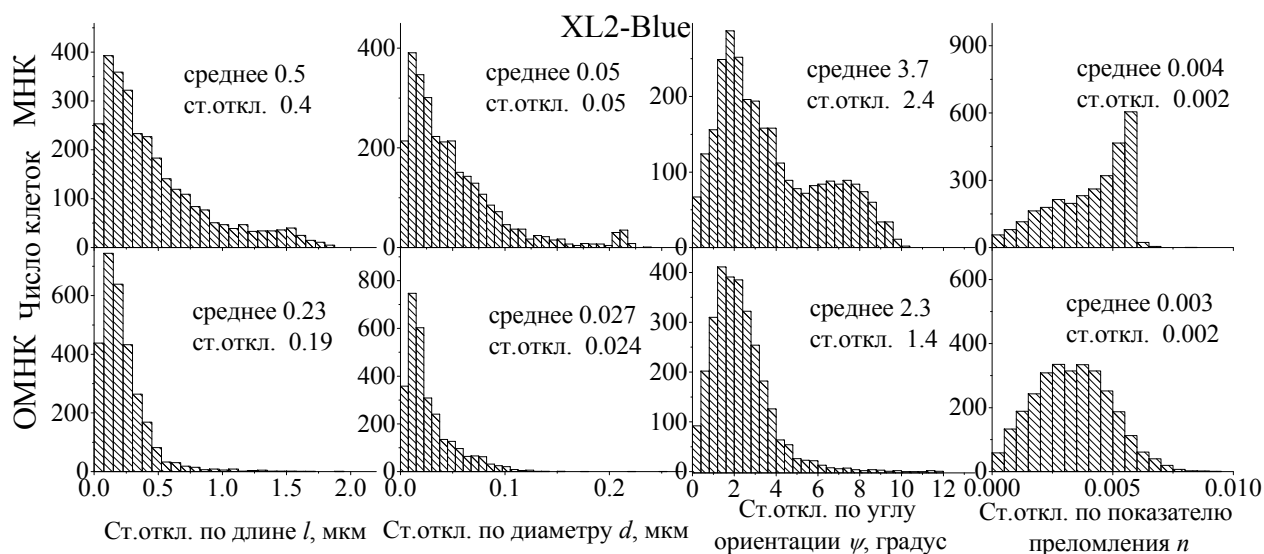


Рис. 18. Распределения по погрешностям параметров характеристики клеток *E. coli* XL2-Blue (слева направо: длина, диаметр, угол ориентации, показатель преломления), определенных в результате решения обратной задачи методами МНК (сверху) и ОМНК (снизу).

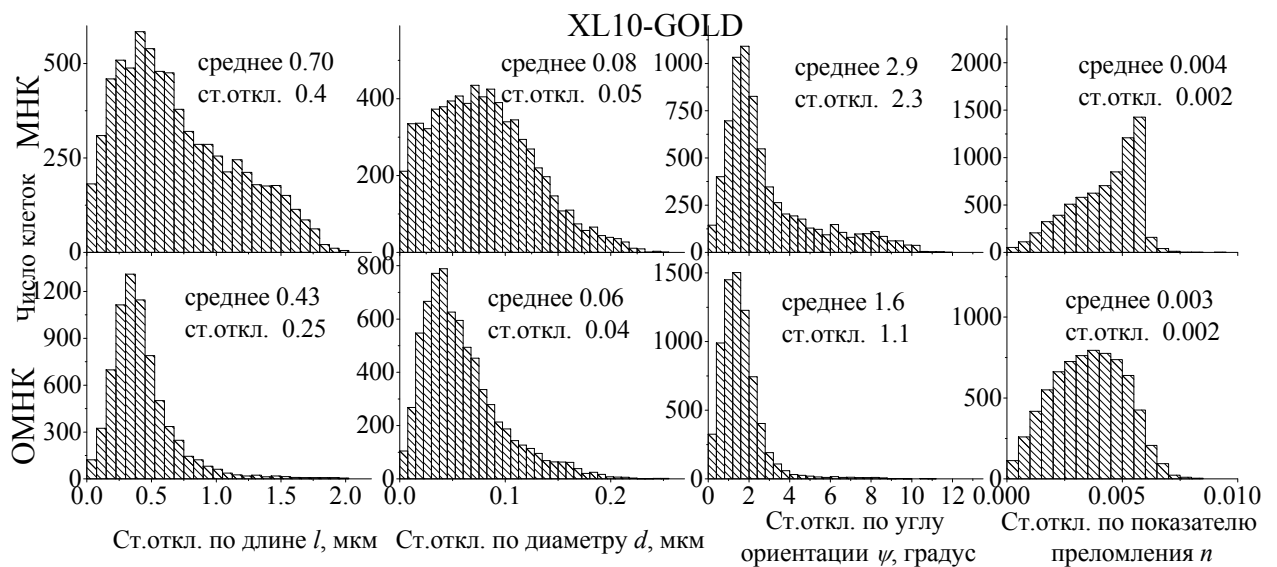


Рис. 19. Распределения по погрешностям параметров характеризации клеток *E. coli* XL10-GOLD (слева направо: длина, диаметр, угол ориентации, показатель преломления), определенных в результате решения обратной задачи методами МНК (сверху) и ОМНК (снизу).

Стоит отметить, что медианная погрешность определения длины и диаметра клеток *E. coli* составила 200 и 25 нм соответственно, что является очень хорошей точностью для оптического метода (для сравнения, точность измерений на оптическом микроскопе составляет около 300 нм).

Дополнительным подтверждением адекватности полученных оценок параметров частиц является хорошее согласие с результатами микроскопических измерений: результаты характеризации популяции клеток *E. coli* каждого из штаммов представлены на Рис. 20(a-d) распределениями по длине и диаметру, полученными из измерений на СПЦ и в результате

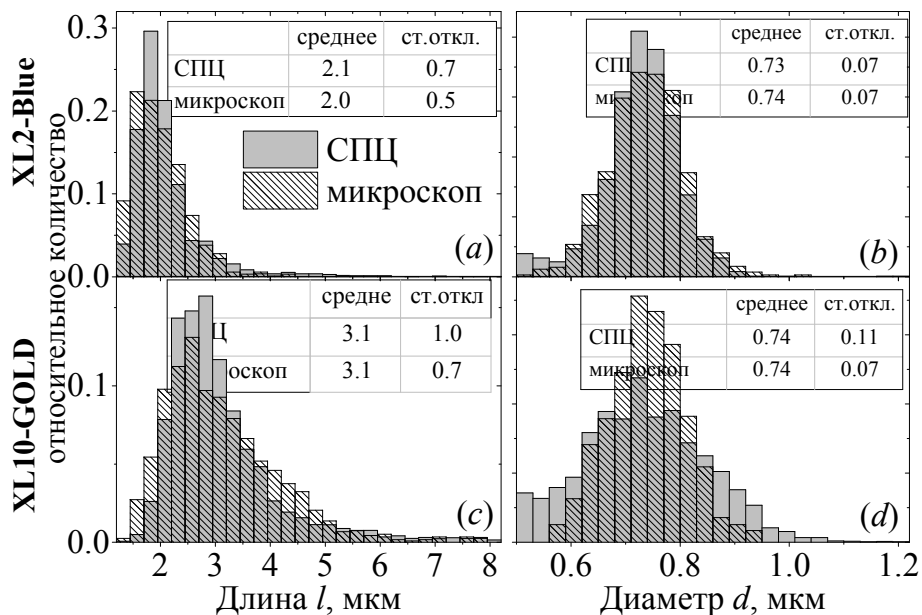


Рис. 20. Результаты характеризации популяций клеток *E. coli*: штамма XL2-Blue (сверху) и XL10-GOLD (снизу) по длине и диаметру в сравнении с микроскопическими измерениями и характерные обработанные микрофотографии клеток.



измерений на оптическом микроскопе (Рис. 20e для *E. coli* XL2-Blue и Рис. 20f для XL10-GOLD, подробнее об измерении и обработке микроскопических изображений см. подраздел 5.3.3).

### **3.4. Идентификация и классификация частиц по светорассеянию**

При анализе сложных биологических дисперсных систем особый интерес представляет задача идентификации и классификации содержащихся в них популяций клеток и частиц. Высокая скорость измерений, обеспечивающая статистическую достоверность анализа, и чувствительность индикатрисы светорассеяния к форме частиц, обеспечивающая высокую точность определения их морфологических характеристик, составляют основной потенциал метода СПЦ для ее решения. При этом может быть предложено несколько подходов.

Одно из возможных решений в неявном виде было предложено в подразделах 3.2.3 и 3.2.4 для идентификации клеток и частиц, обладающих конкретной формой и определенным набором характеристик, которые закладываются в оптическую модель объекта. Так, анализ погрешностей индивидуальных измерений и регрессионный анализ, лежащие в его основе, позволяют откинуть из рассмотрения все измерения, не удовлетворяющие заданным критериям. Последовательное применение данного подхода с использованием различных оптических моделей может использоваться для идентификации и классификации клеток и частиц разных форм в составе разнородных популяций. Альтернативным подходом может быть не последовательное, а одновременное применение нескольких предполагаемых оптических моделей для характеристики морфологии каждой измеренной частицы, и выборе наиболее подходящей модели для каждого конкретного случая с помощью различных статистических критериев, которые рассматриваются подробнее далее в разделе. В данной работе эти подходы применялись для выделения фракции несферических жировых частиц молока, форма которых была более близкой к сфероидальной (Глава 4), при анализе шаровидных бактерий, клетки которых были представлены в форме одиночных микрококков и в виде их пар – диплококков (Глава 5), а так же для идентификации тромбоцитов и сферических субмикронных частиц, с последующим разделением на хиломикроны и микрочастицы клеточного происхождения, в плазме крови (Глава 6).

Третий подход, подразумевающий использование высокой точности индивидуальных измерений, может быть использован для идентификации субпопуляций частиц, обладающих сходной морфологией, но проявляющих при тех или иных условиях различную динамику ее изменения, детектируемую в пределах точности измерений.

Отдельного упоминания заслуживает потенциальная возможность идентификации и классификации частиц без решения обратной задачи светорассеяния, например, с помощью методов автоматического обучения, при анализе составных дисперсных сред, в том числе

содержащих частицы, характеристика которых затруднена сложно параметризуемой формой. В качестве обучающихся выборок могут использоваться базы данных как теоретических индикатрис, рассчитанные с использованием реалистичных форм объектов, так и базы данных экспериментальных сигналов, измеренных на чистых культурах клеток. Использование данных подходов имеет определенную ценность для ускоренного анализа разнородных популяций клеток и частиц, в том числе при его проведении в реальном времени, однако основным недостатком метода является то, что его надежность зависит от качества обучения, а точность получаемого результата сложно проконтролировать.

### **3.4.1. EM-кластеризация**

Ранее в работе в неявном виде был предложен подход для идентификации клеток и частиц определенной формы по результатам решения обратной задачи светорассеяния с помощью различных оценок, отражающие степень согласия экспериментальных измерений с теоретическими расчетами, выполненными в рамках предполагаемой оптической модели (см. подразделы 3.2.3 и 3.2.4) При одновременном использовании двух и более оценок, включая погрешности определения параметров модели и различные критерии анализа регрессионных остатков, для более точного разделения частиц в пространстве параметров этих оценок на частицы, для которых реальная форма хорошо описывается предлагаемой моделью, и те, для описания морфологии которых она неприменима, предлагается использовать алгоритм EM-кластеризации (англ. expectation-maximization (EM) algorithm) [242].

В основе идеи EM-алгоритма лежит предположение, что в данном пространстве параметров исследуемое множество данных может быть смоделировано с помощью линейной комбинации многомерных нормальных распределений. Целью алгоритма является оценка параметров данных распределений и вероятности, с которой данное наблюдение принадлежит к тому или иному кластеру. Несмотря на предположение о нормальности измерений, которое не всегда выполняется, алгоритм обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами кластеризации, включая k-means, а именно линейное увеличение сложности при росте объема данных, устойчивость к шумам, возможность построения желаемого числа кластеров, и возможность эффективного разделения данных в случае перекрытия их распределений [243].

В данной работе использовалась программная реализация алгоритмов в виде пакетов 'mclust'[244] и 'emcluster'[245] в программной среде R.

### **3.4.2. Сравнение вложенных и невложенных моделей**

Стандартным тестом, применяемым для сравнения оптических моделей по результатам регрессии, когда одна из моделей является частным случаем, или подмножеством другой (например, модель сферы является частным случаем модели сфероида при соотношении

полуосей, равным 1), является F-тест, или критерий Фишера [246]. При нулевой гипотезе предпочтение отдается оптической модели, описываемой меньшим количеством параметров. Статистика теста, используемая для проверки, рассчитывается по формуле:

$$F = \frac{(ESS_S - ESS_L) / q}{ESS_L / (n - k_L)}, \quad (24)$$

где  $ESS$  – сумма квадратов остатков модели,  $q = k_L - k_S$  количество ограничений,  $k$  – количество параметров модели, а индексы  $L$  и  $S$  относятся соответственно к модели с большим и меньшим количеством параметров,  $n$  – объем выборки или количество независимых измерений (вместо полного количество точек измеряемой индикатрисы используется оценка эффективного числа степеней свободы  $k_{\text{eff}}$  (11)). Рассматриваемая статистика  $F$  имеет распределение Фишера:  $F \sim F(q, k_{\text{eff}} - k_L)$ . Тест проводится путём сравнения ее значения с критическим значением соответствующего распределения при заданном уровне значимости ( $\alpha = 0.05$ ). Нулевая гипотеза отвергается при условии  $F \geq F_{\alpha}(q, k_{\text{eff}} - k_L)$ .

Другим инструментом для сравнения альтернативных, в том числе невложенных, регрессионных моделей служат так называемые информационные критерии, основанные на оценке некоторой меры относительного качества модели с учетом степени их согласия с данными и корректировкой (штрафом) на используемое количество оцениваемых параметров [247]. В общем виде они представляют собой сумму внутреннего критерия и штрафного слагаемого, наказывающего чрезмерно сложные модели. Данные критерии не позволяют тестировать модели в смысле проверки статистических гипотез, а их абсолютное значение не несет содержательной информации и используется исключительно для сравнения моделей между собой.

Исторически, первым предложенным информационным критерием был критерий Акаике [248], исходная расчетная формула для которого имела вид  $AIC = 2k/n - 2\ln(L)/n$ , где  $L$  – максимизированное значение функции правдоподобия модели,  $k$  – количество ее параметров, а  $n$  – объем выборки. Впоследствии, однако, было предложено множество модификаций этого критерия с более строгими функциями штрафа. В настоящее время наиболее предпочтительным и часто применяемым является байесовский информационный критерий ( $BIC$ ), известный так же как критерий Шварца ( $SC$ ) [249], который при оценке коэффициентов модели методом наименьших квадратов рассчитывается по формуле:

$$BIC = n \ln(ESS/n) + k \ln n, \quad (25)$$

где  $ESS$  – сумма квадратов остатков модели,  $k$  – количество параметров модели, и  $n$  – объем выборки. Среди нескольких альтернативных моделей предпочтение отдается той, у которой значение критерия меньше.

В отличие от информационного критерия Акаике, байесовский критерий не предполагает линейность модели, а его отличительной особенностью является то, что он не только позволяет сравнивать модели между собой, но и даёт оценку апостериорной вероятности каждой модели. Если выбор производился из  $T$  моделей  $M_1, \dots, M_T$ , то вероятность  $p_t$ , что данные были порождены моделью  $M_t$ , даётся формулой Байеса [250,251]:

$$p_t = \frac{\exp\left(-\frac{1}{2} BIC_t\right)}{\sum_{i=1}^T \exp\left(-\frac{1}{2} BIC_i\right)}. \quad (26)$$

### 3.4.3. Классификация с помощью автоматического обучения

Также в работе рассматривалась возможность идентификации и классификации клеток и частиц по измерению индикатрисы светорассеяния с помощью алгоритмов автоматического обучения.

Общая математическая постановка задачи классификации формулируется следующим образом. Пусть  $\mathbf{X}$  – признаковое пространство или множество описаний объектов,  $\mathbf{Y}$  – множество номеров (или наименований) классов. Существует неизвестная целевая зависимость – отображение  $y^*: \mathbf{X} \rightarrow \mathbf{Y}$ , значения которой известны только на объектах конечной обучающей выборки  $\{(x_i, y_i)\}_{i=1}^m$ . Требуется построить алгоритм  $a: \mathbf{X} \rightarrow \mathbf{Y}$ , способный классифицировать произвольный объект  $x \in \mathbf{X}$ . В качестве вектора признаков для каждого объекта (измеряемая частица) будем рассматривать индикатрису светорассеяния, количество точек которой будет соответствовать размерности признакового пространства. Классами объектов будет либо форма частиц (например, сфера, димер и палочка в случае классификации смешанных популяций шаровидных и палочковидных бактерий, или сфера и сфероид при идентификации микровезикул и тромбоцитов в плазме крови) или их принадлежность к определенной субпопуляции (например, в случае штаммовой идентификации бактерий).

В работе использовались два наиболее популярных метода обучения с учителем, стандартно применяющиеся для решения задач классификации и регрессии: метод опорных векторов (англ. SVM, Support Vector Machines) [252] и алгоритм Random Forest (RF) [253].

Решение задачи классификации методом SVM достигается с помощью построения гиперплоскостей в многомерном пространстве. Переводя исходные векторы в пространство более высокой размерности, метод осуществляет в этом пространстве поиск такой гиперплоскости, которая бы максимально эффективно разделяла группы объектов, имеющие различную классовую принадлежность. Хотя изначально алгоритм относится к бинарным классификаторам, в случае нескольких классов на практике зачастую применяется переход от задачи классификации на множества классов к множественной задаче разбиения на два класса,

которые решаются одним из подходов, различающих один класс от остальных (один-против-всех) или один класс от другого (один-против-одного) [254].

Алгоритм Random Forest, решает задачу разделения объектов на два и более классов, на основании построения ансамбля решающих деревьев, получающего результат путем голосования. Каждое дерево из ансамбля строится по выборке, сгенерированной случайным образом из обучающей выборки, а оптимальное число деревьев подбирается так, чтобы свести ошибку классификатора на тестовой выборке к минимальному значению.

Классификация клеток и частиц на основе измеренных индикатрис светорассеяния осуществлялась с помощью данных алгоритмов в среде R, используя их программную реализацию в виде пакетов 'e1071'[255] и 'randomForest'[256].

#### 3.4.4. Оценка точности классификации

Оценка качества работы алгоритмов классификации, как правило, осуществляется на тестовых выборках с заведомо известным правильным решением, на основании которого строится ряд численных оценок [257].

Простейшей метрикой качества классификатора является доля объектов, корректно отнесенных к своему классу:  $A(\text{accuracy})=P/N$ , где  $P$  - количество объектов, по которым классификатор принял правильное решение, а  $N$  - размер выборки. Однако в случае, когда распределение объектов в обучающей или тестовой выборке сильно смещено в сторону одного или нескольких классов, данная оценка также будет смещаться и нести информацию преимущественно по этим классам. Так, например, при общей доле 90% правильных решений, в рамках какого-то одного класса алгоритм может давать предсказание с ошибкой более 50%. Поэтому при оценке работы алгоритмов чаще пользуются метриками точности  $P$  (*Precision*) и полноты  $R$  (*Recall*).

Точность алгоритма  $P_i$  в пределах одного  $i$ -го класса определяется как доля объектов, действительно принадлежащих данному классу, относительно всех объектов, которые были к нему отнесены классификатором:

$$P_i = \frac{TP}{TP + FP}, \quad (27)$$

а полнота  $R_i$  – как доля объектов, отнесенных классификатором к данному классу, относительно полного действительного количества объектов этого класса:

$$R_i = \frac{TP}{TP + FN}, \quad (28)$$

где  $TP$  – число истинно-положительных решений (корректно отнесенных к данному классу),  $TN$  - число истинно-отрицательных решений (корректно отнесенных к другим классам),  $FP$  - число ложно-положительных решений (некорректно отнесенных к данному классу),

		Предсказание классификатора				
		1	2	3	...	N
Реальный класс	1	$m_{11}$	$m_{12}$	$m_{13}$	...	$m_{1N}$
	2	$m_{21}$	$m_{22}$	$m_{23}$	...	$m_{2N}$
	3	$m_{31}$	$m_{32}$	$m_{33}$	...	$m_{3N}$
	...	...	...	...	...	...
	N	$m_{N1}$	$m_{N2}$	$m_{N3}$	...	$m_{NN}$

Рис. 21. Матрица неточностей (таблица сопряженности) работы классификатора.

$FN$  - число ложно-отрицательных решений (число объектов данного класса, некорректно отнесенных классификатором к другим классам).

Мера точности характеризует, сколько полученных от классификатора положительных ответов являются правильными, но она не дает представление о том, все ли правильные ответы вернул классификатор. На этот вопрос отвечает мера полноты, которая характеризует способность классификатора «угадывать» как можно большее число положительных ответов из ожидаемых. Обе меры дают довольно исчерпывающую характеристику классификатора, но на практике при сравнении алгоритмов вместо двух критериев удобнее использовать одну меру. Такой метрикой является F-мера, обобщающая информацию о точности и полноте алгоритма и представляющая собой их гармоническое среднее:

$$F = 2 \frac{P \times R}{P + R}, \quad (29)$$

Результирующие оценки качества работы классификатора рассчитываются как средние значения его точности, полноты и F-меры по всем классам.

Для представления результатов классификации в случае мультиклассовых задач также часто используется так называемая матрица неточностей [258], или таблица сопряженности, размерностью  $N \times N$ , где  $N$  – число классов объектов (Рис. 21). Строки матрицы соответствуют реальным классам, а столбцы – решениям классификатора, таким образом, каждому элементу  $m_{ij}$  – соответствует число объектов класса  $i$ , отнесенных классификатором к классу  $j$ , а главная диагональ матрицы содержит информацию обо всех правильных решениях.

### 3.5. Заключение главы

В данном разделе детально были рассмотрены методы решения прямой и обратной задачи светорассеяния, используемые в работе для характеристики исследуемых объектов по индикатрисам светорассеяния, измеряемым на СПЦ, а также рассмотрены методы оценки погрешности определения характеристик частиц и статистические критерии, использовавшиеся для проведения анализа регрессионных остатков с целью проверки корректности используемых предположений и адекватности моделей, выбранных для описания экспериментальных наблюдений.

В результате моделирования было показано, что отклонение траектории пролета частицы от оптической оси СПЦ, как наиболее вероятный источник экспериментальных искажений, может приводить как к систематическому сдвигу оценок характеристик частиц, так и увеличению погрешности их определения, степень которых зависит от размера объекта. Были предложены несколько подходов для повышения точности и состоятельности оценок характеристик частиц при наличии неслучайных ошибок измерений индикатрисы светорассеяния, заключающихся в использовании дополнительной измеряемой информации, инвариантной к источнику данных искажений, и модификации процедуры нелинейной регрессии. В частности, для сферических субмикронных частиц была продемонстрирована эффективность дополнительного использования сигналов рассеяния вперед и бокового рассеяния при решении обратной задачи. Для более крупных сферических частиц и частиц, имеющих небольшое отклонение от модели сферы, точность характеристики была повышена за счет использования Фурье-параметров индикатрисы. Для несферических частиц, применимость данных подходов для которых ограничена, предложена модификация процедуры нелинейной регрессии с использованием обобщенного метода наименьших квадратов, а ее эффективность продемонстрирована на примере характеристики палочковидных бактерий.

## Глава 4. Характеризация жировых частиц молока\*

### 4.1. Оптическая модель

Общее представление о форме исследуемого объекта и соответствующая оптическая модель частицы формируется, как правило, на основе микроскопических исследований. Поэтому, с одной стороны, согласно многочисленным данным, полученным с помощью стандартной световой микроскопии, очевидной оптической моделью для жировых частиц молока, как и для любых жировых капель, диспергированных в водной среде, является модель сферы. И эта модель, действительно, является наиболее подходящей для методов, разрешение которых ограничено дифракционным пределом в 300-400 нм. Для более чувствительных методов анализа, с субдифракционным разрешением до десятков нанометров, необходимо учитывать специфику формы измеряемых частиц. Зрелые жировые частицы молока (ЖЧМ) могут быть представлены двумя типами: округлой или овальной формы и несимметричной формы [259], с выпуклым образованием на одном из полюсов (англ. «cytoplasmic crescents»). Несмотря на то что эти образования обнаруживаются на ЖЧМ разных видов молочных животных и человека, их процентное соотношение к общему количеству ЖЧМ может быть разным, но в коровьем молоке оно не превышает 1% [260]. Что касается первого типа, то небольшое отклонение от сферичности в действительности является спецификой формы ЖЧМ, что можно наблюдать даже с помощью конфокальной микроскопии, разрешение которой составляет около 150 нм. В частности, анализ конфокальных изображений ЖЧМ показал, что степень их несферичности по отношению осей варьирует в диапазоне от 1 до 1.3, что особенно выражено у частиц большего размера [72,73]. Такие же заключения могут быть сделаны по данным электронного микроскопирования [65,259], хотя и с меньшей долей уверенности, принимая во внимание возможные искажения, вносимые самим методом в результате приготовления образцов для наблюдений. Несферичность формы ЖЧМ может являться следствием сложного механизма их секреции [261].

Основываясь на этих данных, а также на данных, полученных в результате измерений на СПЦ, для описания формы ЖЧМ были предложены две модели: сферы и сплюснутого сфероида. С точки зрения светорассеяния, сплюснутый сфероид описывается тремя морфологическими параметрами (диаметр сферы эквивалентного объема  $d_{ev}$ , соотношение осей  $\varepsilon$  и показатель преломления  $n$ ) и одним вспомогательным (углом  $\beta$  между падающим излучением и осью симметрии сфероида) (Рис. 22), в то время как сфера описывается всего двумя: диаметром  $d$  и показателем преломления  $n$ .

---

\* Результаты данного раздела опубликованы в Konokhova A.I. et al. Enhanced characterisation of milk fat globules by their size, shape and refractive index with scanning flow cytometry // International Dairy Journal. 2014. Vol. 39, № 2. P. 316–323.



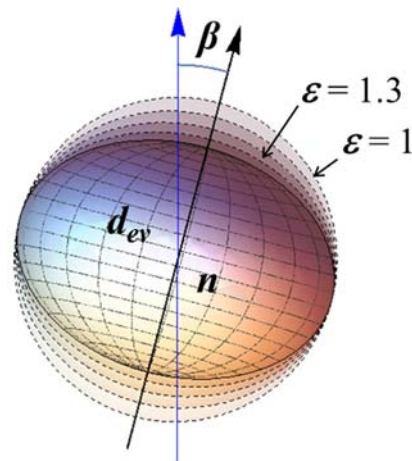


Рис. 22. Оптическая модель жировой частицы молока

В соответствии с предложенными моделями расчет индикатрис светорассеяния осуществлялся методом Т-матриц для сфероидов и с помощью теории Ми для сфер (см. подраздел 3.1.2).

#### 4.1.1. Светорассеяние малых гомогенизированных ЖЧМ

Для выбранных моделей, неявно предполагалось, что жировые частицы молока являются гомогенными частицами, имеющими равномерное распределение показателя преломления. Однако в рамках данного предположения одним из возможных и наиболее вероятных отклонений может послужить наличие белковой оболочки у жировых частиц.

Жировые частицы натурального молока, как правило, имеют тонкую плотную мембрану, толщиной порядка 10-50 нм, характеристики которой хоть и сильно отличаются от молочного жира, но не дают существенного вклада в светорассеяние из-за размеров, много меньших длины волны. В процессе гомогенизации происходит адсорбция белков молочной плазмы на поверхности ЖЧМ и формирование искусственной мембраны частиц, отличающейся от нативной (Рис. 23). Адсорбированный слой состоит главным образом из сывороточных белков и казеиновых мицелл. Радиус казеиновых мицелл может достигать 100-200 нм, в то время как

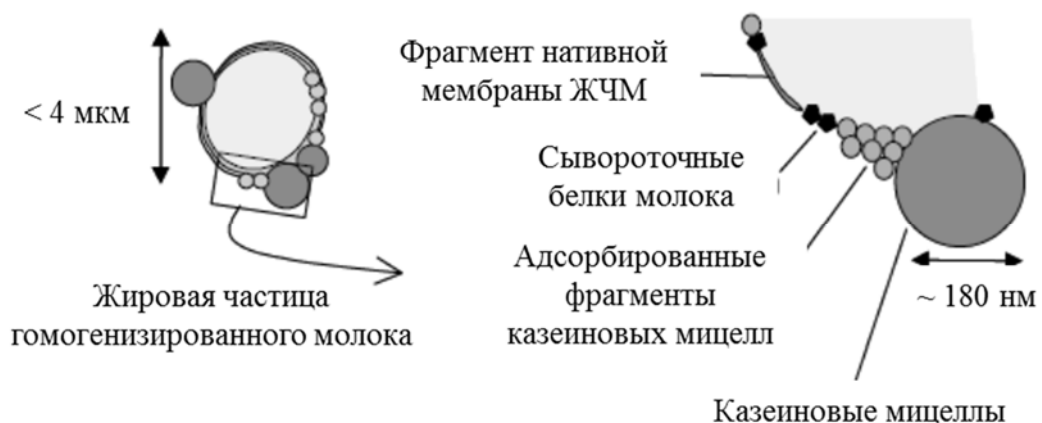


Рис. 23. Оболочка ЖЧМ, образующихся в результате процесса гомогенизации (адаптировано из [54]).

самые малые ЖЧМ могут иметь радиус около 500 нм [262]. Показатель преломления казеиновых мицелл и других белков выше показателя преломления молочного жира и достигает величины порядка 1.6 [263].

Чтобы оценить возможное увеличение показателя преломления были промоделированы ЖЧМ в диапазоне размеров от 0.5 до 1.5 мкм в виде двухслойных сфер с внутренним показателем преломления 1.45 и оболочкой в 50, 100 и 200 нм, имеющей показатель преломления 1.6. На Рис. 24 показано возможное увеличение показателя преломления для ЖЧМ в образцах молока, прошедших процедуру гомогенизации, в зависимости от размера частиц и белкового слоя с некоторой эффективной толщиной. К сожалению, использование двухслойной сферы или сфероида вместо гомогенных моделей для повышения точности определения показателя преломления частиц нецелесообразно, поскольку внесение дополнительных варьируемых параметров при решении обратной задачи скорее приведет к большему разбросу в оценках характеристик частиц. Поэтому, в дальнейшем, при интерпретации результатов характеристики ЖЧМ, особенно частиц малых размеров после гомогенизации молока, этот эффект следует принимать во внимание.

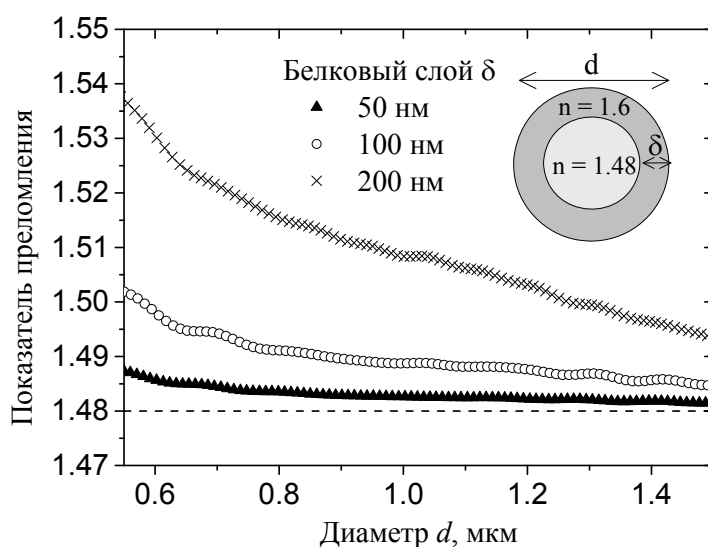


Рис. 24. Оценка увеличения показателя преломления за счет образования слоя адсорбированных белковых частиц на поверхности ЖЧМ. Предполагалось  $n_{\text{ядро}}=1.48$ ,  $n_{\text{мембрана}}=1.6$ , толщина 50, 100 и 200 нм.

## 4.2. Обратная задача светорассеяния

Обратная задача светорассеяния решалась методами, детально описанными в Главе 3. Для сфероидальной модели ЖЧМ была насчитана регулярная база данных индикатрис светорассеяния на длине волны 405 нм в следующих диапазонах:

Таблица 3. Границы базы данных для ЖЧМ.

	<b>Нижняя граница</b>	<b>Верхняя граница</b>	<b>Разбиение</b>
Диаметр сферы эквивалентного объема $d_{ev}$	0.5 мкм	6 мкм	0.1 мкм*
Отношение полуосей $\varepsilon$	1	1.4	0.025
Показатель преломления $n$	1.4	1.52	0.0025
Угол ориентации $\beta$	0°	90°	5°

\*0.1 для  $d \in [1.5, 6]$ , и 0.05 для  $d \in [0.5, 1.5]$

Следует отметить, что по отношению к модели сфероида сферическая модель является частным случаем ( $\varepsilon = 1$ ), или так называемой, вложенной моделью. Это позволяет использовать F-тест (см. подраздел 3.4.2) для сравнения применяемых моделей и, таким образом, разделять частицы на две группы, согласно тому, какая из моделей, сферическая или сфероидальная, является наиболее подходящей при описании морфологии конкретной измеряемой частиц и ее характеристики. В качестве нулевой гипотезы устанавливалась сферическая модель, уровень значимости составлял 5%. “Комбинированный алгоритм” выбирал сфероидальную модель, если сферическая может быть достоверно отвергнута, и сферическую модель – в обратном случае.

### 4.3. Эксперимент

#### 4.3.1. Образцы молока

Сырое молоко, не прошедшее технологической обработки, было приобретено у местного производителя (Новосибирск) и хранилось при температуре 4°C в течение 6 часов до анализа. Также исследовались два других образца молока, полученных от различных коммерческих производителей, которые далее будут именоваться соответственно содержанию жира – 2.5% и 3.2 %. Оба коммерческих образца были произведены согласно ГОСТ Р 52090-2003 “Молоко питьевое. Технические условия”, включающего в себя гомогенизацию, пастеризацию и нормализацию. Перед анализом все образцы были нагреты приблизительно до 20°C и разбавлены в 50 000 раз дистиллированной водой.

#### 4.3.2. Измерения на сканирующем проточном цитометре

Измерения индикатрис светорассеяния одиночных частиц проводились на длине волны 405 нм. Рабочий угловой диапазон измерений был определен по анализу 2 мкм полистирольных микросфер в пределах от 10° до 50°.

### 4.4. Результаты и обсуждение

#### 4.4.1. Характеризация одиночных жировых частиц молока по светорассеянию

В первую очередь, в результате измерений индикатрис одиночных жировых частиц молока, было проверено, насколько полученные в эксперименте сигналы светорассеяния соответствуют предполагаемому отклонению формы частиц от сферы. На Рис. 25 приведены несколько теоретических индикатрис для сплюснутых сфероидов с разным соотношением полуосей (включая сферу с  $\varepsilon = 1$ ). Для качественного сравнения также приведена характерная экспериментальная индикатриса одиночной ЖЧМ, измеренная на СПЦ. Видно, что амплитуда колебаний индикатрис сфероидов уменьшается с увеличением  $\varepsilon$ , особенно в интервале углов от  $30^\circ$  до  $50^\circ$ . Похожая структура сигнала (плоский "хвост") наблюдается как для экспериментальной индикатрисы, приведенной в качестве примера на Рис. 25, так и для существенной части остальных измеренных сигналов (данные не показаны), что качественно подтверждает необходимость использования сфероидальной модели для характеристики, по крайней мере, некоторых ЖЧМ.

В ходе эксперимента было измерено 6600 индикатрис ЖЧМ натурального молока за, приблизительно, 1 минуту. Сигналы всех измеренных частиц были описаны с использованием как сферической, так и сфероидальной модели, в результате чего для каждой ЖЧМ были определены соответствующие наборы характеристик. Типичные результаты обработки одиночных ЖЧМ представлены на Рис. 26, где продемонстрированы наилучшая ( $a,b$ ), нормальная ( $c,d$ ) и средняя степень ( $e,f$ ) согласия между экспериментальным и моделируемым сигналами. Для каждого случая приведены результаты характеристики двух частиц различных размеров.

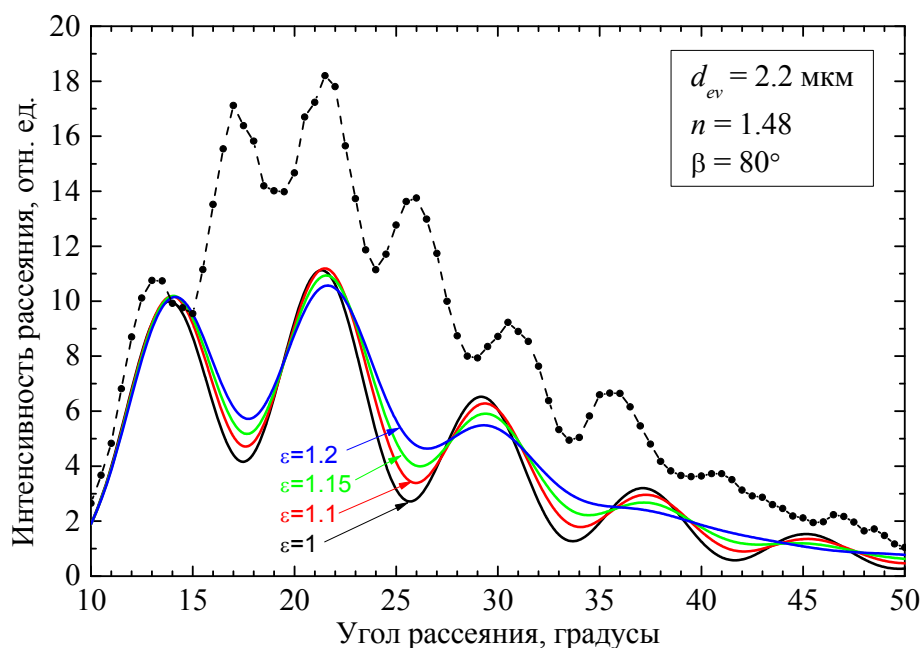


Рис. 25. Теоретические индикатрисы светорассеяния для сферы и сплюснутого сфероида (непрерывные линии) и экспериментальная индикатриса светорассеяния жировой частицы молока, измеренная на сканирующем проточном цитометре (пунктир).

Следует отметить погрешности, с которыми метод позволяет оценить характеристики отдельных ЖЧМ. В целом, точность определения диаметра уменьшается с увеличением размера частиц, и вместе с тем сильно варьирует от частицы к частице. Тем не менее, даже самая высокая погрешность определения диаметра частицы, определенная в результате окончательной характеристики ЖЧМ смешанной моделью (выделена жирным шрифтом на Рис. 26f), составляет 190 нм, что приблизительно соотносится с дифракционным пределом для используемой длины волны. Для большинства измеренных ЖЧМ точность характеристики гораздо выше, в частности, для 50% измеренных ЖЧМ, диаметр частиц был определен с точностью до 74 нм (Таблица 4).

Как уже упоминалось ранее, после характеристики одиночных частиц моделями сферы и сфероида завершающим этапом характеристики является выбор наиболее подходящей модели. Применяемый алгоритм идентификации, основанный на критерии Фишера (F-тест) для

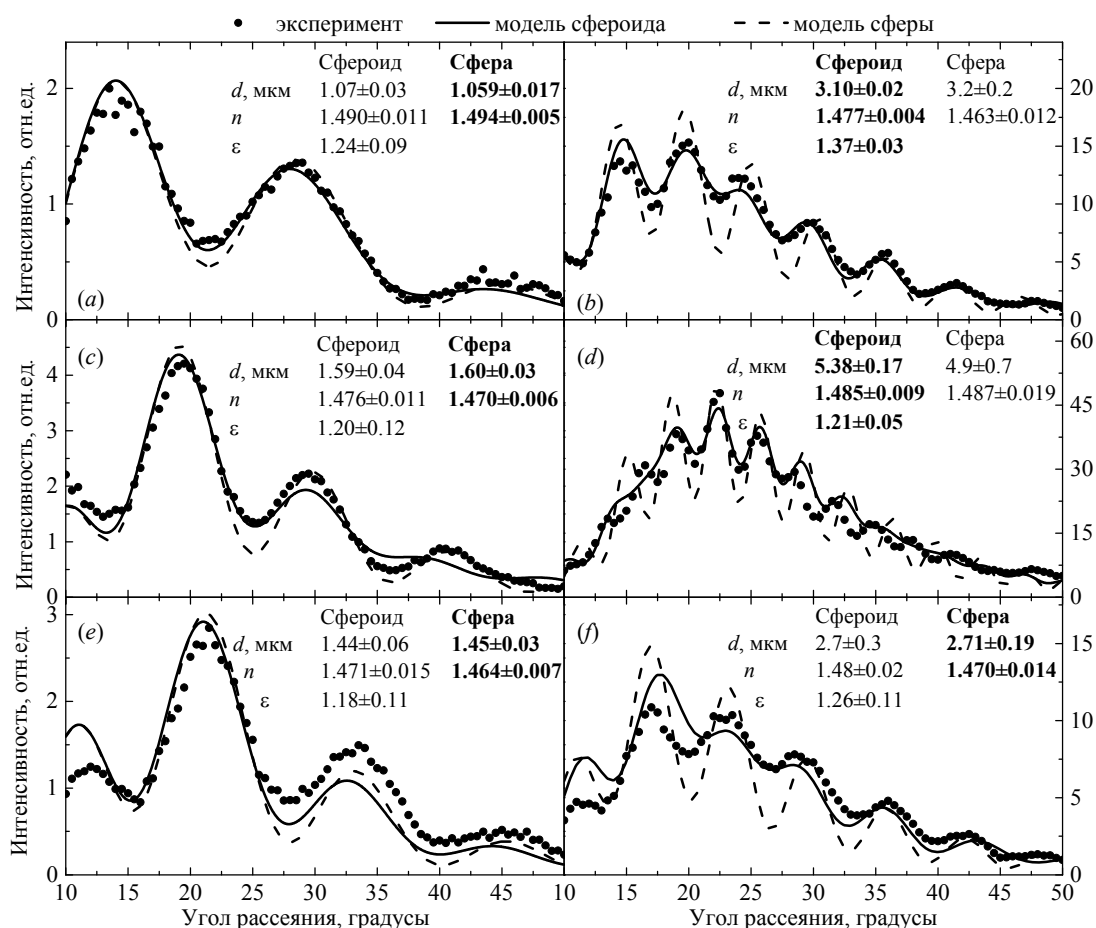


Рис. 26. Результаты решения обратной задачи светорассеяния для отдельных жировых частиц молока. Экспериментальные индикатрисы светорассеяния (точки) приведены вместе с ближайшими индикатрисами из базы данных сфероидов (непрерывная линия) и наилучшей подгонкой, полученной с использованием теории Ми (пунктирная линия). Также приведены характеристики ЖЧМ, полученные в результате их описания соответствующими оптическими моделями (математическое ожидание ± стандартная ошибка). Жирным шрифтом выделены характеристики модели, которая была определена алгоритмом сравнения двух моделей как наиболее подходящая для описания морфологии измеренной частицы.

сравнения вложенных моделей, позволяет разделить ЖЧМ на две фракции: те, что хорошо моделируются сферой, и частицы, для описания которых необходима модель сфероида. Распределение частиц, составляющих данные фракции, по диаметру показано на Рис. 27. Конечно, должно быть приято во внимание, что подобное разделение ЖЧМ по форме сильно зависит от особенностей самого метода их анализа. В частности, ЖЧМ, которые определяются методом, разработанным в данной работе, как частицы, светорассеяние которых хорошо описывается с помощью теории Ми, не обязательно являются сферическими, т.е. не обязательно имеют значение  $\varepsilon$  очень близкое к 1 (в том смысле, как оно могло бы быть определено, например, с помощью электронного микроскопа). Напротив, индикатриса светорассеяния для очень маленьких жировых частиц молока, может быть нечувствительной к вариации параметров модели  $\varepsilon$  и  $\beta$ . Более того, при вариации  $\varepsilon$  изменения в сигнале сравнимы с искажениями, вносимыми экспериментальным шумом. Наличие двух дополнительных, но нечувствительных к форме сигнала параметров сфероидальной модели, является избыточным при решении обратной задачи светорассеяния для небольших частиц, что приводит, в частности, к завышению погрешности определения их диаметра по сравнению с оценками, получаемыми с использованием модели сферы (например, Рис. 26а).

Некорректная идентификация формы частицы происходит и при вероятной характеристизации агрегатов ЖЧМ, которые судя по микроскопическим снимкам [73] могут присутствовать в образцах. Данные события, к которым предположительно можно отнести

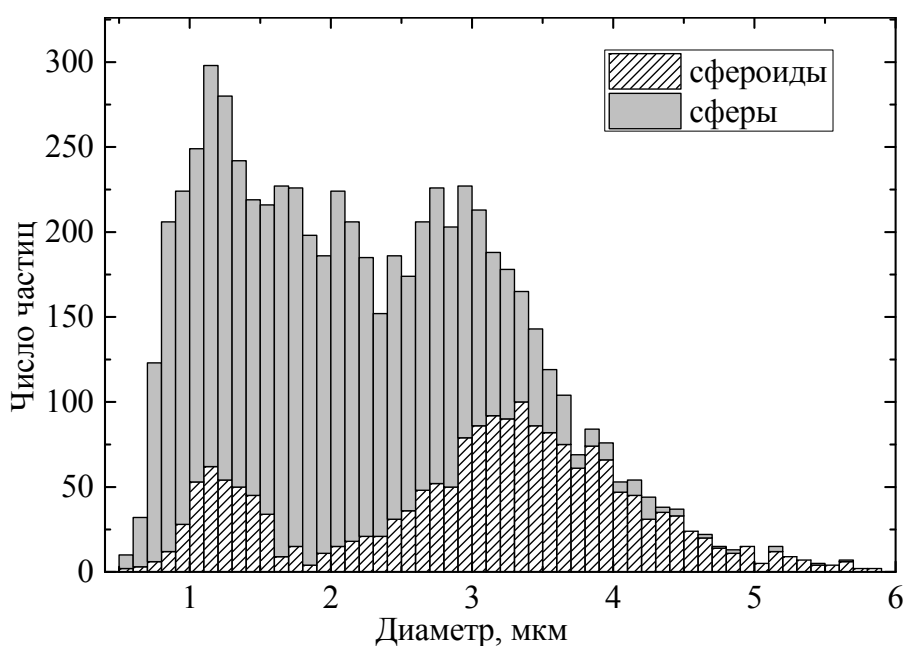


Рис. 27. Распределение (совмещенная гистограмма) жировых частиц молока по диаметру в образце, не прошедшем технологической обработки. Выделенные субпопуляции частиц относятся двум фракциям: (1) частицы, хорошо описываемые моделью сферы (согласно F-тесту) и (2) частицы, для характеризации которых требуется модель сфероида.

примеры частиц с Рис. 26(e,f), не могут быть адекватным образом описаны ни одной из предлагаемых моделей. Однако модель сфероида можно считать более близкой для описания именно агрегатов небольших одиночных ЖЧМ, поскольку искажения вносимые отклонениями от формы, меньшими чем длина волны, не так чувствительны к искажению модели. Этим может быть объяснено наличие небольшой доли частиц маленьких размеров во фракции сфероидов на Рис. 27.

Хотя сферическая модель является более подходящей для описания большей части ЖЧМ, для характеристики существенной доли частиц (29% от всего количества; в основном сосредоточены в области больших значений диаметров Рис. 27) все же необходима сфероидальная модель. Ее использование приводит к десятикратному увеличению точности определения диаметра Рис. 26(b,d). Анализ индикатрис светорассеяния для этих частиц позволят утверждать, что их форма определено не может быть описана сферой, что может приводить к неточности определения характеристик этих частиц другими методами, предполагающими их сферичность, такими как измерение рассеяния в малые углы или голографическая микроскопия. Хотя данный вопрос требует отдельной проверки чувствительности каждого из методов к форме частиц в конкретном диапазоне характеристик ЖЧМ.

Используя критерий Стьюдента была проверена взаимная согласованность погрешностей определения  $d$  и  $n$ , которые оцениваются для каждой измеренной частицы при ее характеристике с помощью модели сферы и сфероида. 99% измеренных ЖЧМ прошли тест с доверительной вероятностью 95%, что является еще подтверждением того, что оба метода дают надежную оценку ошибки параметров даже при наличии ошибки модели (формы).

#### **4.4.2. Характеризация молока по распределениям жировых частиц**

В результате решения обратной задачи для одиночных ЖЧМ, каждый из исследуемых образцов молока может быть охарактеризован распределениями различных характеристик частиц по всей измеренной популяции. Параметры соответствующих распределения могут быть описаны различными статистическими величинами, включая среднее значение, стандартное отклонение, медиану, моду, и т.д. Сначала, сравним параметры распределений для натурального молока, полученные в результате обработки измеренных ЖЧМ с помощью каждой из оптических моделей и полученные в результате окончательной характеристики пробы смешанной моделью (Таблица 4).

Для всех трех методов характеристики большинство параметров практически совпадает. Это значит, что отклонение формы реальных ЖЧМ от используемой оптической модели выражается в квазислучайных смещениях в оценке определяемых параметров, которые впоследствии усредняются при достаточно больших объемах выборки. С другой стороны, как и ожидалось, погрешность определения диаметра частиц намного меньше для результатов характеристики, полученных в результате комбинирования двух оптических моделей, однако использование такой смешанной модели практически не оказывает влияния на распределение по диаметру. Можно отметить небольшое смещение для показателя преломления в зависимости от применяемой для описания модели. Предположительно, оно может быть вызвано наличием добавочного слагаемого в целевой функции  $S(Q)$  (19), которое было введено для повышения

Таблица 4. Результаты характеристики ЖЧМ натурального молока, полученные (1) в результате прямой подгонки с помощью теории Ми, (2) определенные в результате решения обратной задачи светорассеяния с использованием базы данных сфероидов, (3) полученные в результате окончательной характеристики всей популяции смешанной моделью

	<b>Сфера</b>	<b>Сфероид</b>	<b>Смешанная модель</b>
<b>Диаметр, мкм</b>			
Среднее $\pm$ ошибка среднего	2.276 $\pm$ 0.012	2.278 $\pm$ 0.013	2.285 $\pm$ 0.012
Стандартное отклонение	1.004	1.022	1.022
Медиана	2.174	2.163	2.175
<b>Показатель преломления</b>			
Среднее $\pm$ ошибка среднего	1.4733 $\pm$ 0.00015	1.4781 $\pm$ 0.00016	1.4743 $\pm$ 0.00017
Стандартное отклонение	0.012	0.0132	0.0143
<b>Площадь поверхности, мкм<sup>2</sup></b>			
Среднее $\pm$ ошибка среднего	19.4 $\pm$ 0.2	19.7 $\pm$ 0.2	19.8 $\pm$ 0.2
Стандартное отклонение	16.0	17.0	16.9
Медиана	14.9	14.8	14.9
<b>Специфическая биомасса, мкм<sup>-1</sup></b>	<b>1.95</b>	<b>1.93</b>	<b>1.93</b>
Доля частиц, описываемых сферой, %	100	0	71
<b>Погрешность определения диаметра, нм</b>			
Среднее	159	138	119
Стандартное отклонение	167	118.3	122
Медиана	80	104	74
<b>Погрешность определения показателя преломления</b>			
Среднее	0.0114	0.0150	0.0106
Стандартное отклонение	0.0056	0.0041	0.0051
Медиана	0.0098	0.0153	0.0094



характеризации частиц (см. подраздел 3.3.4.2). Однако данное слагаемое, определяемое по спектру Фурье индикатрисы светорассеяния, главным образом зависит от размера частицы и менее чувствительно к показателю преломления или несферичности частицы.

В Таблице 4 представлен новый параметр, введенный для характеристики популяции жировых частиц в различных образцах молока и названный специфической биоемкостью ЖЧМ. Данный параметр является ничем иным, как удельной поверхностью частиц дисперсной фазы дисперсной системы, и определяется как отношение суммарной площади поверхности ЖЧМ к их общему объему. Этот параметр определяет возможность ЖЧМ переносить биоактивные молекулы на своей поверхности, что напрямую связано с производством молочных продуктов и с качествами молока, определяющими его полезные свойства. Для сферической модели биоемкость полностью определяется размером частиц, поэтому для точной ее оценки необходима высокая точность в измерении размера частиц. Поэтому используемый в данной работе способ ее расчета принципиально отличается от методов, описываемых в других источниках. В частности, в [65,264] в качестве оценки используется мода распределения ЖЧМ по размеру, определенному с помощью малоуглового рассеяния. В случае описания частицы сфероидальной моделью, возникает зависимость площади поверхности частицы от  $\epsilon$ , что немного увеличивает специфическую площадь поверхности частиц со сферами (Таблица 4).

Распределения ЖЧМ по диаметру, площади поверхности и показателю преломления для

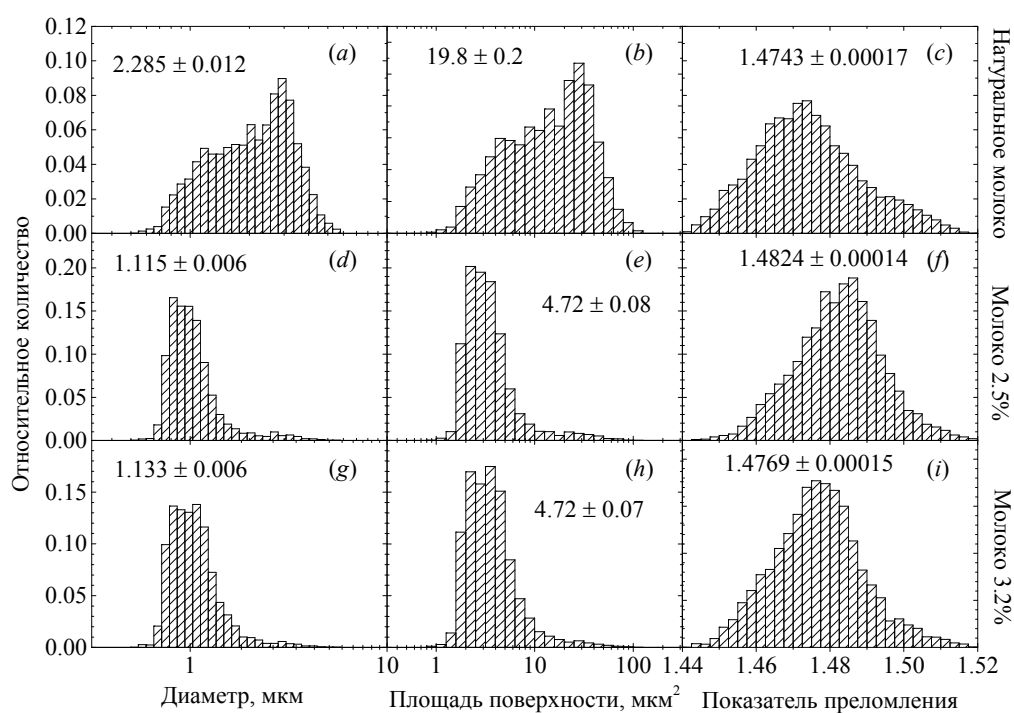


Рис. 28. Распределение жировых частиц молока по диаметру, площади поверхности и показателю преломления для натурального молока (сверху), и двух образцов молока, прошедших технологическую обработку, с жирностью 2.5% (посередине) и 3.2% (снизу). Для всех распределений также приведены среднее и ошибка среднего.

Таблица 5. Параметры распределений жировых частиц молока для различных образцов

	Необработанное молоко	Обработанное молоко	
		2.5% жирности	3.2% жирности
<b>Диаметр, мкм</b>			
Среднее $\pm$ ошибка среднего	2.285 $\pm$ 0.012	1.115 $\pm$ 0.006	1.133 $\pm$ 0.006
Стандартное отклонение	1.022	0.504	0.465
Медиана	2.175	0.989	1.030
<b>Площадь поверхности, мкм<sup>2</sup></b>			
Среднее $\pm$ ошибка среднего	19.8 $\pm$ 0.2	4.72 $\pm$ 0.08	4.72 $\pm$ 0.07
Стандартное отклонение	16.9	6.80	6.20
Медиана	14.9	3.08	3.33
<b>Показатель преломления</b>			
Среднее $\pm$ ошибка среднего	1.4743 $\pm$ 0.00017	1.4824 $\pm$ 0.00014	1.4769 $\pm$ 0.00015
Стандартное отклонение	0.0143	0.0117	0.0123
<b>Специфическая биоемкость, мкм<sup>-1</sup></b>	<b>1.93</b>	<b>3.33</b>	<b>3.52</b>
Для сферических частиц, %	71	87	92
<b>Погрешность определения диаметра, нм</b>			
Среднее	119	44	52
Медиана	74	23	30

трех образцов молока (натуральное, 2.5%, and 3.2%) представлены в виде гистограмм на Рис. 28. Параметры соответствующих распределений объединены в Таблице 5. Распределения ЖЧМ по размеру согласуются с распределениями, опубликованными ранее в многочисленных статьях. Точность определения размера одиночного измерения в среднем гораздо лучше для обработанного молока вследствие меньших размеров. Распределения ЖЧМ по площади поверхности рассчитаны с учетом оптической модели, определяемой для каждой ЖЧМ из решения обратной задачи. Подобных результатов ранее опубликовано не было.

Среднее значение показателя преломления ЖЧМ (на  $\lambda = 405$  нм) согласуются с имеющимися литературными данными. В частности, значения 1.470 и 1.460 были получены на длинах волн 466 нм и 633 нм методом согласования показателей преломления (index-matching method) при исследовании суспензии ЖЧМ [76], значения в том же диапазоне 1.460 - 1.470 были получены на длине волны 633 нм для различных коммерческих образцов молока с помощью голографических измерений одиночных ЖЧМ [80]. Стандартное отклонение для измерений показателя преломления, полученных в [80], составляло от 0.029 до 0.035, что в 2-3 раза больше ширины распределений, полученных в данной работе, и говорит в пользу точности разработанного метода анализа ЖЧМ с помощью СПЦ. Более того, стандартное отклонение распределения показателя преломления сравнимо по величине с погрешностью определения показателя преломления для одиночного измерения (Таблица 4), а значит естественная

вариация показателя преломления для ЖЧМ может быть еще меньше. Образцы натурального и обработанного молока легко различимы по практически любому из параметров распределения, особенно по распределениям частиц по диаметру. Отличия для образцов молока, прошедших технологическую обработку, можно обнаружить при сравнении биоёмкости ЖЧМ, медиан или стандартных отклонений распределения площади поверхности.

На Рис. 29 построены карты распределения показателя преломления от диаметра, где цветом обозначена плотность частиц для всех образцов молока. Как и в случае с параметрами распределений, натуральное молоко заметно отличается от образцов с различных заводов, прошедших технологическую обработку, между которыми также заметна небольшая разница.

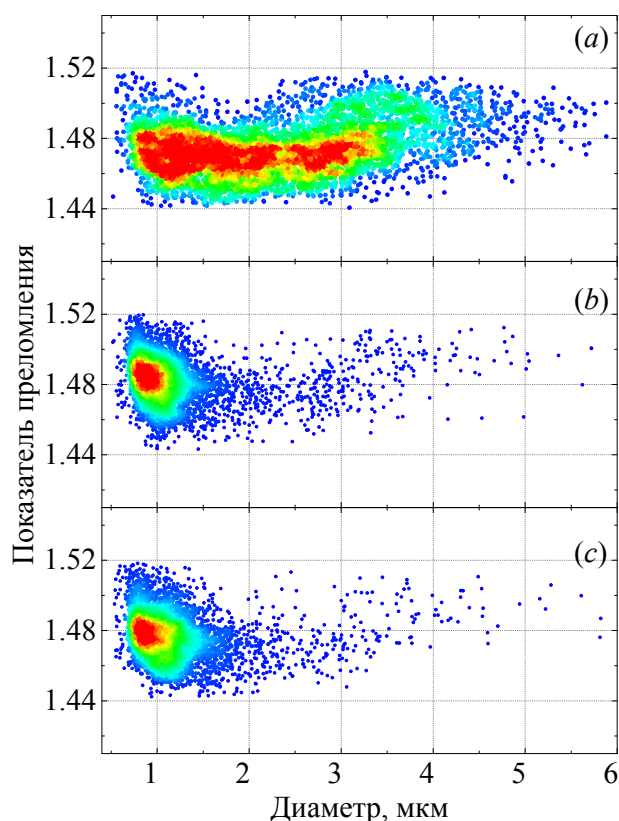


Рис. 29. Распределение ЖЧМ в параметрах диаметра и показателя преломления для необработанного молока (a) и двух образцов от разных коммерческих производителей, с содержанием жира 2.5% (b) и 3.2% (c). Цветом обозначена плотность скопления частиц.

#### 4.5. Заключение главы

В данной главе был представлен метод характеристики молока с помощью распределениям размера, формы и показателя преломления жировых частиц в нем. Характеристики ЖЧМ определялись методом СПЦ в результате решения обратной задачи светорассеяния на основании измерения индикатрис светорассеяния одиночных частиц. Для описания формы частиц были протестированы две оптические модели: сфера и сплюснутый сфероид. Обнаружено, что для некоторых измеренных ЖЧМ модель сфероида является более

адекватной, обеспечивая лучшее совпадение с индикатрисой светорассеяния и повышая точность определения размера частицы. Помимо этого, каждая ЖЧМ характеризовалась показателем преломления и площадью поверхности, с учетом ее асферичности.

Разработанный метод был применен к образцам необработанного молока и молока с двух различных фабрик. Диаметр и показатель преломления отдельных ЖЧМ были определены с медианными ошибками 74 нм и 0.0094 соответственно, что доказало высокую точность метода и тот факт, что в рассеянии, измеряемом с помощью СПЦ, содержится достаточное количество информации о морфологии ЖЧМ для обеспечения нанометровой точности в определении размера одиночных частиц из решения обратной задачи светорассеяния. Распределения жировых частиц по размеру, площади поверхности и показателю преломления, полученные для сырого молока и его промышленных образцов, отражают степень обработки молока. В частности, площадь поверхности ЖЧМ значительно разнится для трех изученных образцов. Помимо средних значений различных характеристик ЖЧМ, проводимый анализ позволяет получать множество других статистических параметров их распределений, которые могут найти применение для более точной количественной характеристики образцов молока.

Обладая высокой точностью и производительностью, СПЦ, адаптированный для анализа ЖЧМ, может стать “золотым стандартом” методов их анализа. В настоящее время этот метод удовлетворяет всем требованиям молочных производств, и может применяться для контроля качества сырья и эффективности технологических процессов, например, гомогенизации, с целью предотвращения потери качества молочных продуктов в процессе обработки.

## Глава 5. Характеризация шаровидных и палочковидных бактерий

Данная глава посвящена исследованию возможности статической и динамической характеристики биологических полидисперсных систем с помощью СПЦ на примере анализа культур палочковидных и шаровидных бактерий в форме одиночных микрококков и их димеров. На основе полученных экспериментальных данных исследовалась возможность идентификации микроорганизмов в составе гетерогенных популяций, включающих как коккообразные, так и палочковидные формы клеток. Возможность перехода от статической к динамической характеристике полидисперсных систем рассматривалась на примерах характеристики роста палочковидных бактерий *Escherichia coli*.

### 5.1. Моделирование светорассеяния палочковидных и простых форм шаровидных бактерий

Для морфологии бактерий характерны три основных формы: сферическая (шаровидная), цилиндрическая (палочковидная) и извитая, причем преобладающее число видов микроорганизмов представлено именно первыми двумя.

Кокки, или сферические бактерии, после деления образуют характерные структуры, в виде различных скоплений одиночных шаровидных клеток, которые по своему взаимному расположению разделяются на так называемые микрококки, диплококки, стрептококки, тетракокки, сарцины и стафилококки. В данной работе клетки исследуемых штаммов бактерий *Micrococcus spp.* были представлены наиболее простыми из перечисленных форм, в виде отдельно расположенных клеток сферической формы – микрококков - и их пар – диплококков. В качестве оптических моделей для их описания соответственно были предложены:

- модель гомогенной сферы, описываемая двумя параметрами: размером  $d$  и показателем преломления  $n$ ;
- димер, состоящий из двух идентичных сфер, описываемый тремя параметрами: размером  $d$  и показателем преломления  $n$  образующих его мономеров и углом ориентации  $\beta$  (угол ориентации клетки в потоке СПЦ).

Варьирование размера и показателя преломления одиночных кокков в составе диплококков было сочтено нецелесообразным и не имеющим биологического смысла, так как в процессе деления бактерий образуются две идентичные дочерние клетки.

Клетки палочковидных бактерий, считающихся самой многочисленной группой прокариот, как правило, имеют осевую симметрию и цилиндрическую форму с округлыми или заостренными концами. Так, например, модель цилиндра с полусферическими концами была ранее предложена в работе [265] для моделирования светорассеяния палочкообразными клетками *Escherichia coli*. Согласно микроскопическим наблюдениям, ее можно использовать для описания формы и других палочковидных бактерий, которые изучались в данной работе, включая *Bacillus subtilis* и *Ochrobastrum sp.* Предлагаемая модель описывается четырьмя параметрами: тремя морфологическими (длина  $l$ , диаметр  $d$  и показатель преломления  $n$ ) и одним вспомогательным (угол ориентации  $\beta$  клетки в потоке СПЦ). При этом наибольший интерес представляют параметры длины и диаметра, с помощью которых можно описать размер клетки, а также проследить за его изменением в процессе роста.

Иллюстрации оптических моделей коккообразных и палочковидных форм бактерий представлены на Рис. 30.

Моделирование светорассеяния для сферических клеток бактерий осуществлялось с помощью теории Ми. Моделирование светорассеяния частицами несферической формы (димеры, цилиндры) производилось с помощью метода дискретных диполей (см. подраздел 3.1.2).

### 5.1.1. Светорассеяние парных и делящихся клеток палочковидных бактерий

Одним из возможных и наиболее вероятных отклонений для выбранной модели палочковидных бактерий может послужить наличие перетяжки у делящихся бактерий, которая образуется, как правило, посередине клетки перед ее делением на дочерние [266], а также присутствует у некоторых форм палочковидных бактерий, клетки которых представлены не одиночными палочками, а их парами (диплобациллы). Отделяя по светорассеянию клетки,

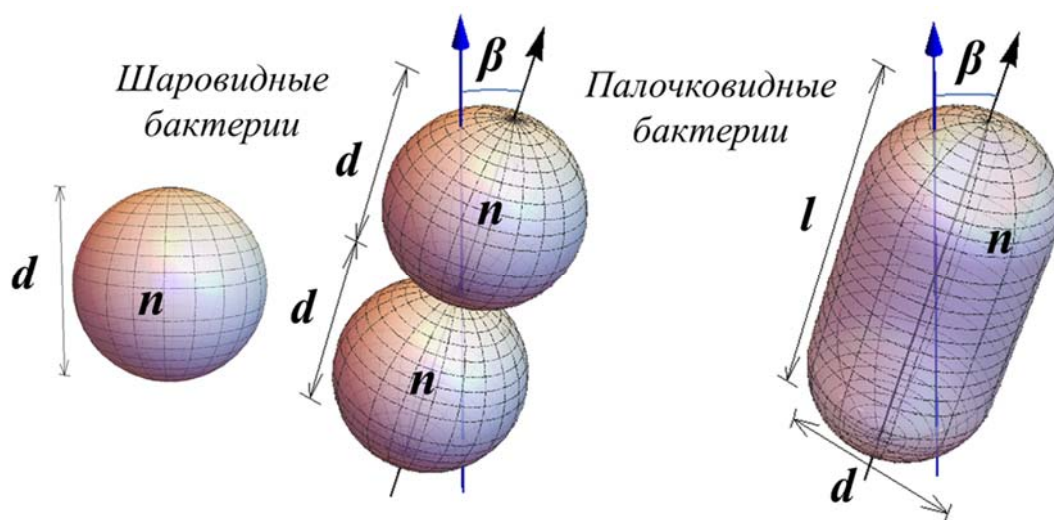


Рис. 30. Оптические модели шаровидных (микрোকки и диплококки) и палочковидных бактерий.

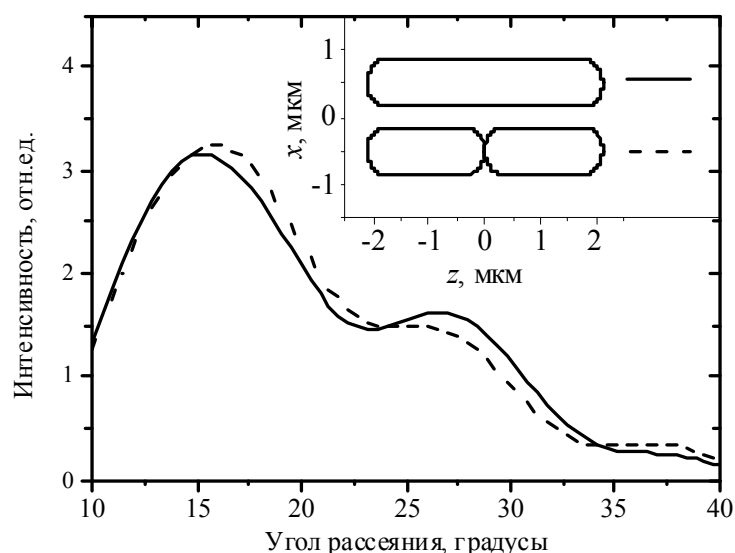


Рис. 31. Пример сравнения теоретических индикатрис палочковидных бактерий с перетяжкой и без нее для клетки с параметрами  $l = 4$  мкм,  $d = 0.7$  мкм,  $n = 1.40$ ,  $\beta = 10^\circ$ .

которые находятся на стадии деления, от других клеток, или идентифицируя морфологию бактерий, принципиально представленную парами клеток, можно было бы получить дополнительную и весьма важную информацию об исследуемой популяции. Поэтому, для оценки влияния формирования перетяжек у бактерий на сигнал светорассеяния, а также для проверки возможности выявления делящихся клеток и диплобацилл по индикатрисам, мы сравнили индикатрисы пяти разных клеток с перетяжкой и без нее.

Типичный результат сравнения индикатрис делящейся/парной и неделящейся/одиночной клетки и соответствующие им модели приведены на Рис. 31. С одной стороны, различия между двумя рассчитанными индикатрисами составляют менее 10%, что при учете имеющегося экспериментального шума не дает нам возможности выявить наличие перетяжки у измеренной бактерии или идентифицировать отдельные виды диплобацилл. С другой стороны, из этого можно сделать вывод, что выбранная нами модель одинаково подходит для характеристики как делящихся (парных), так и не делящихся (одиночных) бактерий. Поэтому, в дальнейшем мы полагаем, что делящиеся и парные клетки характеризуются как одна неделящаяся или одиночная, но с удвоенным объемом.

## 5.2. Обратная задача светорассеяния

Решение обратной задачи светорассеяния осуществлялось методами глобальной оптимизации, детально описанными в подразделе 3.2.2 для сферических и несферических частиц. В частности характеристика бактерий сферической формы (одиночные кокки) осуществлялась с помощью алгоритма DiRect. Параметры клеток варьировались в диапазонах:  $[0.1, 1.5]$  мкм по диаметру  $d$  и  $[1.35, 1.55]$  по показателю преломления  $n$ , заведомо покрывающем биологическую вариабельность кокковых форм бактерий.

Обратная задача светорассеяния для несферических форм бактерий, включая диплококки и палочковидные бактерии, решалась методом глобальной оптимизации с использованием предварительно насчитанных баз данных теоретических индикатрис. Диапазоны, в которых были насчитаны базы данных из 200 000 индикатрис для коккообразных бактерий и 300 000 индикатрис для палочковидных бактерий, приведены в следующих таблицах:

Таблица 6. Границы базы данных для бактерий в форме диплокков.

	Нижняя граница	Верхняя граница
Диаметр мономера в составе димера $d$	0.1 мкм	1.5 мкм
Показатель преломления $n$	1.35	1.55
Угол ориентации $\beta$	0°	90°

Таблица 7. Границы базы данных для палочковидных бактерий.

	Нижняя граница	Верхняя граница
Длина $l$	0.5 мкм	8 мкм
Диаметр $d$	0.3 мкм	2.2 мкм
Показатель преломления $n$	1.39	1.41
Угол ориентации $\beta$	0°	30°

Как уже было сказано выше, границы баз данных были выбраны таким образом, чтобы покрыть все возможные значения параметров изучаемых клеток. Но для показателя преломления палочковидных бактерий мы намеренно выбрали более узкий диапазон [1.39, 1.41] на основании имеющихся в литературе данных [267–270] (которые впоследствии были подтверждены результатами характеристики кокковых форм бактерий, полученными в данной работе). Ограничив таким образом показатель преломления, мы фактически зафиксировали данный параметр, чтобы избежать проблемы компенсации параметров, которая более подробно описана в [200] на примере тромбоцитов. Забегая вперед, стоит отметить, что ограничивая возможность получения дополнительной информации о показателе преломления из эксперимента, мы, тем не менее, значительно улучшаем точность определения других интересующих нас характеристик клеток, особенно длины. Границы диапазона для угла ориентации  $\beta$  палочковидных бактерий были выбраны исходя из соображений об их гидродинамической ориентации в пуазейлевском потоке [49], полагая при этом, что большие значения угла ориентации для более вытянутых клеток физически маловероятны.

## 5.3. Эксперимент

### 5.3.1. Культуры клеток бактерий

В работе использовались грамположительные сферические бактерии *Micrococcus spp.* (штаммы 386, 387, 389, 392) и грамотрицательные палочковидные бактерии, включая небольшие, не образующие спор бактерии *Ochrobactrum sp.* штамм 1326 и более крупные палочки вида *Bacillus subtilis* штамм 1327, из состава музея природных изолятов «Коллекции



бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Готовые для измерений на СПЦ суточные культуры штаммов микроорганизмов были любезно предоставлены Андреевой Ириной Сергеевной в виде суспензий, приготовленных с использованием стерильного 0.9% водного раствора хлорида натрия.

### 5.3.2. Измерения на сканирующем проточном цитометре

Измерения индикатрис светорассеяния одиночных частиц проводились на длине волны 405 нм. Рабочий угловой диапазон измерений был определен по анализу 2 мкм полистирольных микросфер в пределах от 8° до 60°.

### 5.3.3. Измерения на оптическом микроскопе

Микрофотографии клеток бактерий были получены на оптическом микроскопе Carl Zeiss Axio Imager.A1 с использованием иммерсионного объектива с увеличением  $\times 100$  и числовой апертурой  $NA = 1.3$ . Полученные изображения были обработаны с помощью программного

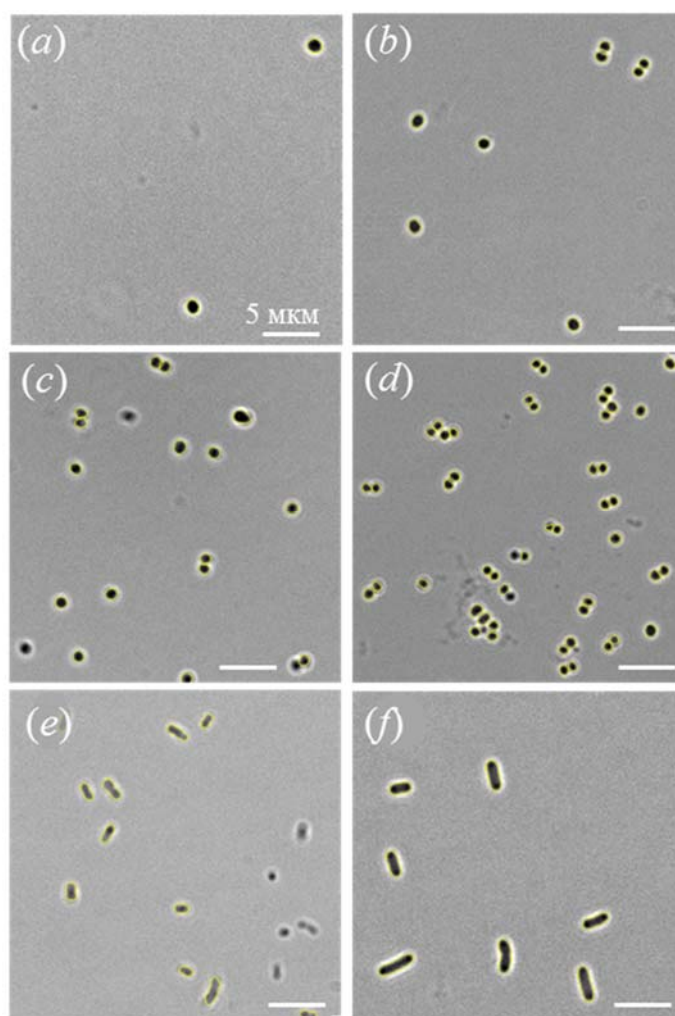


Рис. 32. Характерные микрофотографии шаровидных и палочковидных бактерий, обработанные с помощью MicrobeTracker: (a) *Micrococcus* sp. 386, (b) *Micrococcus* sp. 388, (c) *Micrococcus* sp. 389, (d) *Micrococcus* sp. 392, (e) *Ochrobactrum* sp. 1326, (f) *Bacillus subtilis* 1327.

пакета MicrobeTracker [271], написанного в среде MATLAB и способного автоматически идентифицировать отдельные бактерии в поле зрения микроскопа и определять их границы и размеры с субпиксельной точностью. Для обработки изображений клеток *Micrococcus spp.* использовался алгоритм обработки изображений клеток произвольной формы с набором параметров alg1.set. Микрофотографии клеток *Ochrobactrum sp.* 1326 и *Bacillus subtilis* 1327 были обработаны с использованием алгоритма с набором параметров alg4ecoli.set, оптимизированным для обработки изображений палочковидных бактерий. На Рис. 32(a-d) приведены характерные обработанные микрофотографии кокообразных бактерий *Micrococcus spp.*, представленных преимущественно в форме отдельно лежащих кокков (микрококков) и парных кокков (диплококков). Результаты обработки микрофотографий палочкообразных бактерий *Ochrobactrum sp.* 1326 и *Bacillus subtilis* 1327 продемонстрированы на Рис. 32e и Рис. 32d, соответственно.

#### **5.4. Статическая характеристика шаровидных и палочковидных бактерий**

Характеризация культур шаровидных бактерий *Micrococcus spp.*, клетки которых преимущественно представлены в виде двух форм, одиночных микрококков и диплококков, осуществлялась в несколько этапов. На первом этапе среди всех измеренных частиц на основании решения обратной задачи светорассеяния с использованием теории Ми идентифицировались одиночные частицы, форма которых действительно наилучшим образом описывалась моделью гомогенной сферы.

Поскольку морфология парных кокков и других несферических форм бактерий не может быть описана сферической моделью, использование теории Ми для их характеристики при решении обратной задачи, во-первых, приводит к некорректной оценке характеристик частиц (в частности, к завышению показателя преломления, который компенсирует более высокий уровень интенсивности рассеяния агрегатами сферических частиц по сравнению с одиночными клетками *a*), во-вторых, отражается в высоких погрешностях определения параметров бактерий, таким образом косвенно свидетельствуя о несоответствии применяемой модели для описания их морфологии.

Используя смещение оценок характеристики и точность их определения в качестве критерия применимости сферической модели частицы для описания клеток бактерий, разделение *Micrococcus spp.* на микрококки и диплококки осуществлялось в параметрах показателя преломления и погрешности его определения с использованием теории Ми, в которых субпопуляции соответствующих частиц, как видно из Рис. 33b, хорошо описываются двумерным гауссовыми распределениями, что позволяет применить для их разделения алгоритм EM-кластеризации (см. подраздел 3.4.1). При этом для каждой идентифицируемой

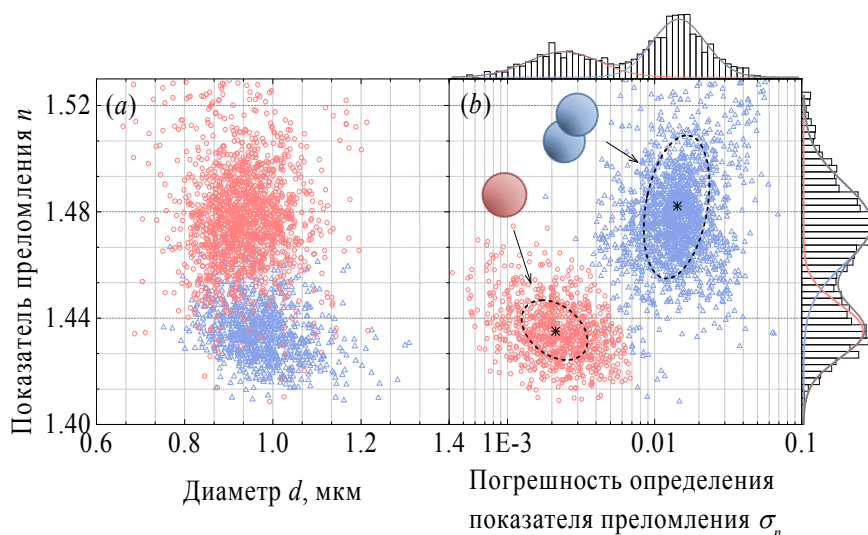


Рис. 33. Идентификация сферических (микрококки) и несферических (диплококки) форм бактерий по результатам решения обратной задачи светорассеяния с использованием теории Ми. В качестве примера приведены результаты характеристики *Micrococcus sp.* 392: (a) распределение частиц по размеру и показателю преломления, (b) распределение частиц по показателю преломления и погрешности его определения. Субпопуляции микрококков и диплококков разделялись в параметрах  $(n \times \sigma_n)$  с помощью EM-алгоритма кластеризации. Идентифицированные субпопуляции обозначены на соответствующих распределениях разными цветами.

частицы рассчитывается вероятность, с которой она может быть отнесена к тому или иному классу, поэтому ее можно рассматривать как некоторую оценку точности разделения бактерий на сферические и несферические частицы. Так, можно отметить, что для четырех штаммов измеренных шаровидных бактерий ее среднее значение составило 95.4%, а медиана 98.4%.

В качестве альтернативы для разделения сферических и несферических клеток, также был рассмотрен подход, основанный на регрессии с использованием двух оптических моделей, сферы и димера, и их сравнении с помощью байесовского информационного критерия (BIC, подраздел 3.4.2). Однако, согласно ему, доля частиц, для описания формы которых модель сферы предпочтительнее модели димера, оказалась существенно ниже по сравнению с результатами, полученными на основании анализа погрешностей решения обратной задачи с помощью теории Ми. Так, например, согласно информационному критерию, культура бактерий *Micrococcus sp.* 388 содержит 14.5% микрококков, в то время как согласно теории Ми, модель сферы применима для описания морфологии 49% клеток, включая идентифицированные по BIC. Сравнив распределения характеристик микрококков и диплококков, идентифицированных с помощью рассматриваемых подходов (Рис. 34), можно предположить, что информационный критерий является менее точным и ошибочно относит долю сферических клеток к субпопуляции несферических частиц. В частности, распределение по показателю преломления диплококков, идентифицированных по BIC (Рис. 34a), имеет бимодальный характер, и часть бактерий в составе димеров характеризуется показателем преломления меньшим, чем у

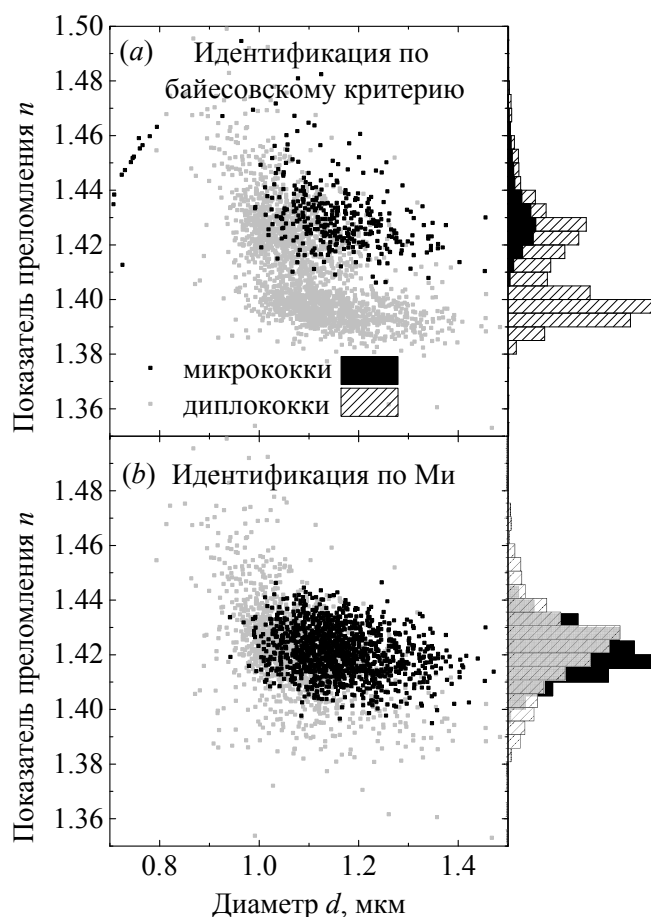


Рис. 34. Характеристики сферических и несферических шаровидных бактерий, идентифицированных (a) по результатам сравнения оптических модели с помощью Байесовского критерия и (b) по точности решения обратной задачи с помощью теории Ми.

одиночных клеток, что скорее является следствием компенсации параметров модели димера при ее некорректном использовании для описания светорассеяния сферических частиц, нежели наличием двух субпопуляций диплококков. В то же время идентичные распределения показатели преломления микрококков и диплококков, идентифицированных по теории Ми (Рис. 34b), напротив, не противоречат биологическому смыслу, если рассматривать все диплококки как две дочерние клетки, образовавшиеся в результате деления микрококков и имеющие соответствующие характеристики. Поэтому в данном конкретном приложении, для разделения сферических и несферических частиц, байесовский информационный критерий является менее точным по сравнению с подходом, основанным на анализе погрешностей решения обратной задачи с использованием модели сферы. Однако он может оказаться единственным критерием, наиболее подходящим для сравнения различных оптических моделей при разделении субпопуляций несферических клеток (например, в случае идентификации диплококков и палочковидных бактерий, который будет рассматриваться в подразделе 5.5).

После идентификации (или подтверждения отсутствия) в популяции сферических клеток с помощью теории Ми, на втором этапе характеризации, клетки бактерий,

идентифицированные как несферические частицы, описывались моделью димера и характеризовались диаметром и показателем преломления входящих в его состав мономеров.

Результаты характеристики популяций бактерий *Micrococcus spp.* (штаммы 386, 388, 389 и 392) приведены на Рис. 35 и Рис. 36 в виде распределений по размеру и показателю преломления, определенными для идентифицированных одиночных кокков и их димеров.

Следует отметить хорошее согласие результатов характеристики кокков в виде одиночных частиц и в составе диплококков, воспроизводящееся для трех измеренных штаммов. Результаты характеристики популяции бактерий *Micrococcus sp.* 386, представленные в виде распределений только для одиночных форм клеток (Рис. 35а и Рис. 36а), говорят о том, что алгоритму идентификации, применяемому для разделения сферических и несферических частиц, не удалось выявить наличие диплококков среди клеток бактерий этого штамма ввиду их полного отсутствия, либо их доля была недостаточно велика для статистически достоверного разделения, что не противоречило микроскопическим наблюдениям (Рис. 32а).

Типичные результаты решения обратной задачи для одиночного микрококка и диплококка приведены на Рис. 37а и Рис. 37б вместе с оценками характеристик клеток. На

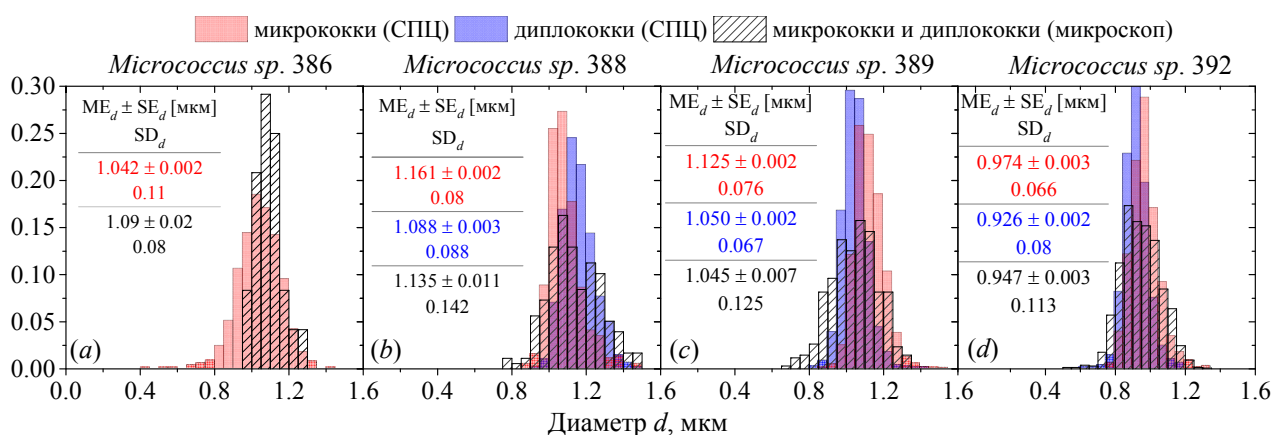


Рис. 35. Результаты характеристики популяций *Micrococcus spp.* (штаммы 386, 388, 389 и 392) по диаметру для одиночных кокков (красный) и кокков в составе диплококков (синий) в сравнении с микроскопическими измерениями (черный).

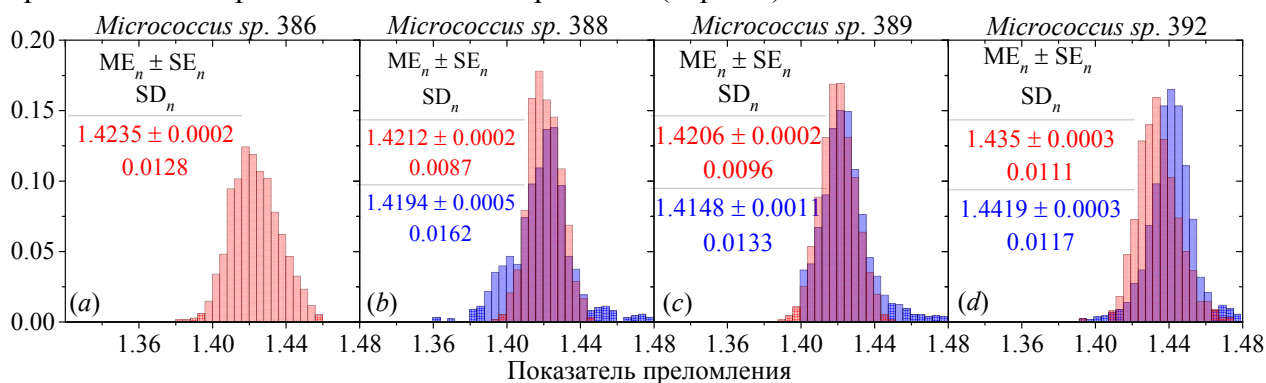


Рис. 36. Результаты характеристики популяций *Micrococcus spp.* (штаммы 386, 388, 389 и 392) по показателю преломления для одиночных кокков (красный) и кокков в составе диплококков (синий).



Рис. 37. Типичные экспериментальные и ближайšie теоретические индикатрисы для (a) микрококка (модель сферы) и (b) диплококка (модель димера) *Micrococcus spp.* 389. Для диплококка также приведена ближайшая теоретическая индикатриса по теории Ми. Также приведены характеристики клеток (ближайшие, математическое ожидание и стандартное отклонение).

Рис. 37b наглядно показано, как в данном конкретном случае несферическая модель более подходит для описания формы клетки по сравнению с теорией Ми, обеспечивая лучшее согласие с экспериментальными данными на всем диапазоне измеряемых углов.

Характеризация культур палочковидных бактерий осуществлялась в результате решения обратной задачи светорассеяния для каждой измеренной клетки с использованием базы данных, предварительно насчитанной для модели в виде цилиндра с полусферическими концами.

Результаты характеристики палочковидных бактерий *Ochrobactrum sp.* 1326 и *Bacillus subtilis* 1327 представлены на Рис. 38 распределениями по длине и диаметру клеток. Для сравнения также приведены распределения, полученные в результате измерений на оптическом микроскопе, во время которых было измерено до 500 клеток бактерий каждого вида. Несовпадение распределения клеток бактерий *Ochrobactrum sp.* 1326 по длине с микроскопическими данными (Рис. 38a), несмотря на хорошее согласие результатов измерений диаметра, вероятнее всего вызвано очень небольшим размером данных клеток и их свободной ориентацией в поле зрения микроскопа, из-за которой вместо длины клетки оценивается ее проекция. Если предположить, что все наблюдаемые клетки ориентированы случайным образом, то данный эффект приводит к занижению оценки длины в среднем в  $\pi/2$  раз. Введение этого коэффициента в виде поправки к оценке длины бактерий по микрофотографиям, компенсирует различия как в средних значениях, так и в распределениях клеток бактерий по длине.

В целом, полученное согласие как в распределениях, так и в средних значениях для обоих видов бактерий по длине и диаметру является убедительным доказательством адекватности применяемого метода.

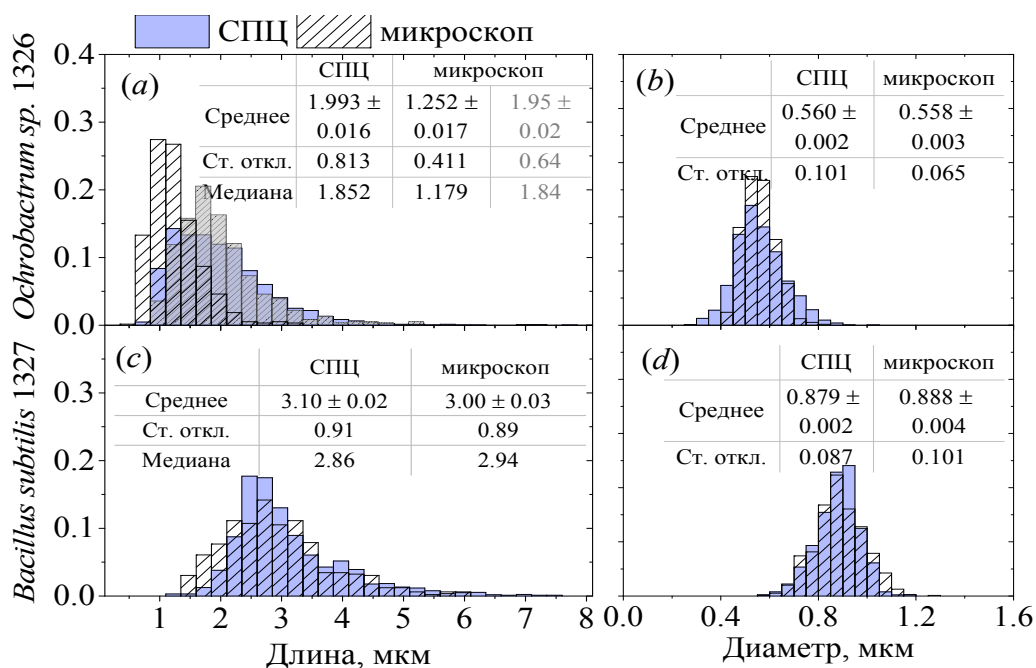


Рис. 38. Результаты характеризации популяций клеток *Ochrobastrum sp. 1326* (сверху) и *Bacillus subtilis 1327* (снизу) по длине и диаметру в сравнении с микроскопическими измерениями. Для характеризации популяции клеток *Ochrobastrum sp. 1326* по длине на основании микроскопических наблюдений приведены как результаты прямых измерений (черный), так и результаты измерений, учитывающих свободную ориентацию клеток в поле зрения микроскопа (серый).

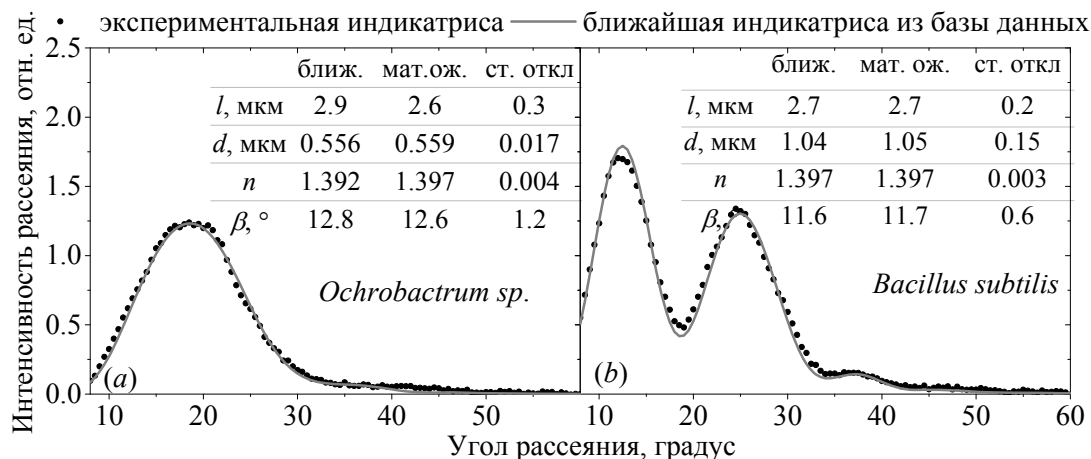


Рис. 39. Типичные экспериментальные и ближайшие теоретические индикатрисы палочковидных бактерий *Ochrobastrum sp. 1326* (a) и *Bacillus subtilis 1327* (b), полученные в результате глобальной оптимизации с использованием базы данных.

Типичные результаты глобальной оптимизации для одиночных клеток каждого из видов продемонстрированы на Рис. 39a и Рис. 39b, соответственно. Для каждой клетки так же приведены результаты характеризации, включая параметры ближайшей индикатрисы из базы данных, а также оценки математического ожидания и стандартного отклонения.

Точность определения морфологических характеристик (медиана распределения погрешности индивидуальных измерений) для сферических и несферических бактерий составили соответственно:

- 20 нм и 0.003 для размера и показателя преломления сферических клеток;
- 55 нм и 0.008 для размера и показателя преломления бактерий в виде димеров;
- 400 и 40 нм для длины и диаметра палочковидных клеток.

## **5.5. Исследование возможности идентификации бактерий в составе смешанных популяций**

Исследование возможности идентификации различных видов бактерий в составе смешанных культур по результатам характеризации одиночных клеток на СПЦ проводилось на основании экспериментальных данных, полученных в предыдущем разделе для шаровидных и палочковидных бактерий *Micrococcus spp.*, *Bacillus subtilis* 1327, *Ochrobactrum sp.* 1325 и в подразделе 3.3.4.3 для палочковидных бактерий *Escherichia coli* XL2-Blue, XL10-GOLD. Для более корректной интерпретации результатов классификации, экспериментальные сигналы для смешанных популяций были получены искусственным путем в результате смешения индикатрис бактерий чистых культур из числа вышеперечисленных. Таким образом, для каждой анализируемой клетки имелась информация о ее принадлежности к тому или иному классу, в соответствии с которой оценивалась точность полученных результатов.

### **5.5.1. Штаммовая (внутривидовая) классификация бактерий**

Возможность внутривидовой классификации смешанных популяций шаровидных и палочковидных бактерий рассматривалась на примере измерений различных штаммов *Micrococcus spp.* и *E. coli*, соответственно.

Морфологическая характеризация клеток смешанной культуры осуществлялась с помощью методов, описанных ранее в подразделе 5.4. Выбор оптической модели и соответствующего подхода к решению обратной задачи основывался на априорной информации о морфологии бактерий (кокки или палочки), которая может быть получена из предварительных микроскопических наблюдений.

Штаммовая классификация бактерий *Micrococcus spp.* осуществлялась в параметрах «размер»×«показатель преломления» клеток, используя алгоритм EM-кластеризации для разделения распределений, соответствующих разным субпопуляциям микрококков и диплококков. В качестве примера на Рис. 40 представлены результаты анализа смеси штаммов *Micrococcus sp.* 388 и *Micrococcus sp.* 392. В результате характеризации всей популяции на первом этапе было идентифицировано 56.8% микрококков и 43.2% бактерий несферической формы, что на 96.5% совпало с исходными данными и по точности сравнимо с точностью идентификации сфер и димеров в чистых культурах.



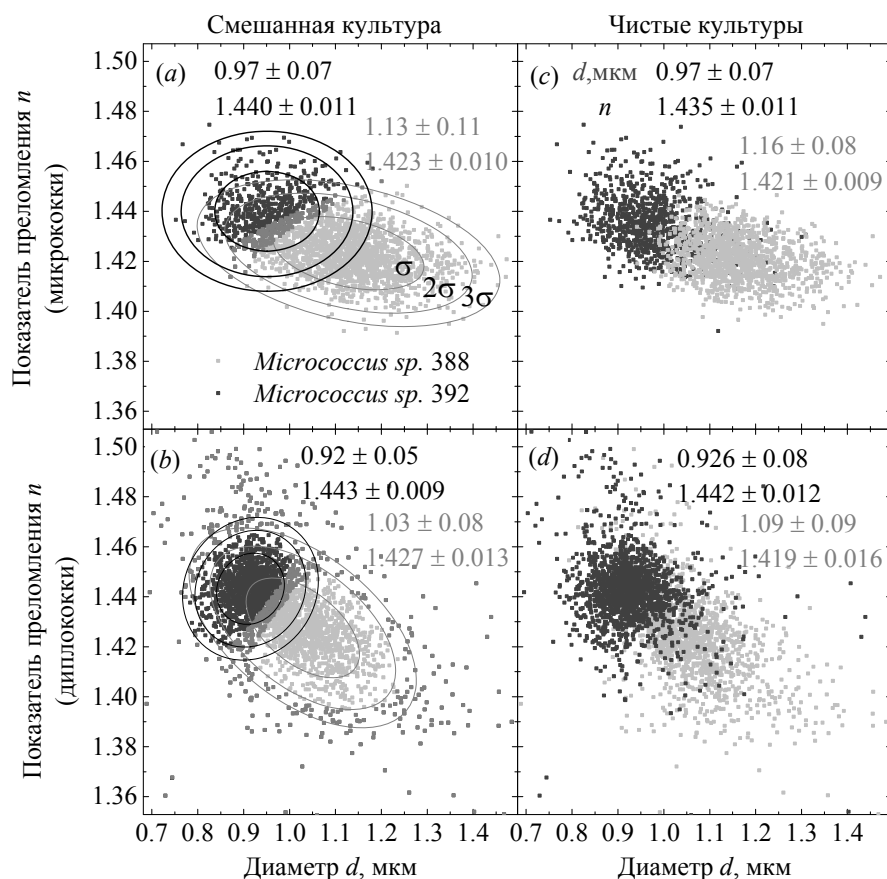


Рис. 40. Идентификация и характеристика внутривидовых штаммов бактерий на примере анализа смешанной культуры клеток *Micrococcus sp. 388* и *Micrococcus sp. 392*. На (a) и (b) представлены распределения по размеру и показателю преломления микрококков и диплококков, идентифицированных в смешанной пробе с помощью алгоритма EM-кластеризации (доверительные области уровня 68, 95 и 99% разделенных гауссиан показаны эллипсами  $\sigma$ ,  $2\sigma$  и  $3\sigma$ ). Для сравнения на (c) и (d) показаны соответствующие распределения, полученные в результате характеристики чистых культур. Для каждой субпопуляции клеток приведены математические ожидания  $\pm$  стандартные отклонения размера и показателя преломления.

Как и следовало ожидать, точность разделения микрококков и диплококков по их принадлежности к различным штаммам оказалась ниже в связи с некоторой долей перекрытия распределений характеристик бактерий *Micrococcus sp. 388* и *Micrococcus sp. 392*. Так, на Рис. 40(b,c) в перекрывающейся области, выделенной серым цветом, вероятность отнесения бактерий к тому или иному штамму составила менее 60%. В итоге, среди бактерий штамма *Micrococcus sp. 388* было корректно идентифицировано 88% клеток. Для *Micrococcus sp. 392* доля верно идентифицированных бактерий составила всего 75%, что, вероятно, связано с более широким распределением размера и показателя преломления клеток для этого штамма. Тем не менее, параметры распределений субпопуляций, включая средние значения и дисперсии размера и показателя преломления, хорошо согласуются с результатами характеристики чистых культур, несмотря на имеющуюся неопределенность в штаммовой идентификации бактерий на уровне одиночных клеток.

Сходная картина наблюдалась при идентификации субпопуляций бактерий в смешанной культуре *Micrococcus sp.* 386 и *Micrococcus sp.* 388, но из-за более сильного перекрытия параметров точность идентификации составила всего 60%. После добавления к данной смеси штамма *Micrococcus sp.* 389, практически идентичного по морфологическим характеристикам штамму *Micrococcus sp.* 388 (*c* и *b* на Рис. 35 и Рис. 36, соответственно), разделить бактерии на три отдельные субпопуляции оказалось невозможным.

При классификации палочковидных бактерий в параметрах длины и диаметра клеток с помощью EM-кластеризации, нарушение условия о нормальности распределения бактерий по длине, ограничивающее применимость алгоритма, было сведено к минимуму переходом к логнормальному распределению. Однако разделить два штамма палочковидных бактерий *E. coli* XL2-Blue и XL10-GOLD в смешанной культуре, несмотря на некоторое различие бактерий по длине (Рис. 20), не удалось. Причиной, как и в случае классификации смешанных субпопуляций бактерий *Micrococcus spp.*, послужило сильное перекрытие распределений морфологических характеристик клеток. В результате кластеризации 95% клеток *E. coli* XL2-Blue были отнесены к субпопуляции бактерий с меньшей длиной, куда также вошли 50% бактерий штамма XL-GOLD меньшего размера. Более крупные клетки штамма XL-GOLD были идентифицированы как отдельный класс.

### **5.5.2. Видовая и родовая классификация бактерий**

Задача видовой классификации бактерий рассматривалась на примере анализа смешанной культуры палочек, содержащей три субпопуляции клеток: *Escherichia coli* XL2-Blue, *Bacillus subtilis* 1327 и *Ochrobactrum sp.* 1325. Как и следовало ожидать, морфологические различия данных видов (среднее значение и стандартное отклонение по длине и диаметру клеток для каждого вида приведены в Таблице 8) позволили выделить отдельные классы бактерий в смешанной культуре более эффективно в сравнении с результатами, полученными для внутривидовой идентификации, причем различие популяций клеток по диаметру сыграло в этом случае определяющую роль. Видовая принадлежность для каждой измеренной бактерии определялась на основании морфологических характеристик субпопуляции, к которой она была отнесена алгоритмом EM-кластеризации (Таблица 8). Долевое соотношение бактерий каждого вида было установлено с точностью 10%. Из общего числа бактерий в смешанной культуре вид был корректно определен для 88% клеток: среди бактерий *Bacillus subtilis* доля верно идентифицированных клеток составила 90%, для бактерий *Ochrobactrum sp.* и *Escherichia coli* - 89% и 84%, соответственно.

Таблица 8. Результаты видовой идентификации и характеристики палочковидных бактерий в смешанной культуре.

Штаммы бактерий	Характеристики субпопуляций			Результаты идентификации		
	доля клеток %	длина, мкм	диаметр, мкм	доля клеток %	длина, мкм	диаметр, мкм
<i>B. subtilis</i> 1327	26	3.1 ± 0.9	0.88 ± 0.09	23	3.12 ± 0.9	0.87 ± 0.07
<i>E. coli</i> XL2-Blue	38	2.1 ± 0.7	0.73 ± 0.07	37	1.9 ± 0.3	0.74 ± 0.05
<i>Ochrobactrum</i> 1325	36	2.0 ± 0.8	0.56 ± 0.10	40	2.2 ± 0.9	0.55 ± 0.09

Возможность родовой классификации бактерий рассматривалась на примере смешанной культуры палочковидных и шаровидных бактерий *Bacillus subtilis* 1327 и *Micrococcus sp.* 392. Анализ проводился в два этапа:

- (1) на первом этапе осуществлялось решение обратной задачи с помощью теории Ми, на основании чего в культуре идентифицировались сферические и несферические клетки, и определялись характеристики микрококков;
- (2) на втором этапе решение обратной задачи осуществлялось с использованием двух оптических моделей, палочки и димера, после чего на основании результатов регрессии, для каждой клетки несферической фракции определялась наиболее подходящая модель и ее морфологические характеристики (диаметр и показатель преломления для диплококков, длина и диаметр для палочек).

Точность идентификации микрококков на первом этапе анализа составила 97%. Результаты классификации несферических клеток на соответствующие субпопуляции оказались менее точными: разделение бактерий на палочки и диплококки с помощью байесовского информационного критерия (см. подраздел 3.4.2) позволило идентифицировать клетки с точностью всего 60%. Примеры корректной и некорректной идентификации бактерий продемонстрированы на Рис. 41. С одной стороны, неточность определения формы клетки может быть связана с искажениями сигнала, вызванными инструментальной ошибкой или отклонением реальной формы клетки от предлагаемых моделей, в результате чего ни одна из моделей не позволяет точно описать экспериментальный сигнал (Рис. 41с). В случае характеристики шаровидных бактерий, выбор в пользу модели палочки может быть так же обусловлен наличием в культуре клеток в виде цепочек кокков (стрептококков), образующихся вследствие деления клеток и сохранения связи между ними в месте деления. С другой стороны, на Рис. 41d проиллюстрирован пример, когда обе модели, палочки и димера, практически в равной мере хорошо описывают экспериментальную индикатрису, и поэтому оценка  $\Delta \text{VIC}$  ( $\Delta \text{VIC} = \text{VIC}_{\text{dim}} - \text{VIC}_{\text{caps}}$ , где  $\text{VIC}_{\text{dim}}$  и  $\text{VIC}_{\text{caps}}$  – информационные критерии для модели димера и

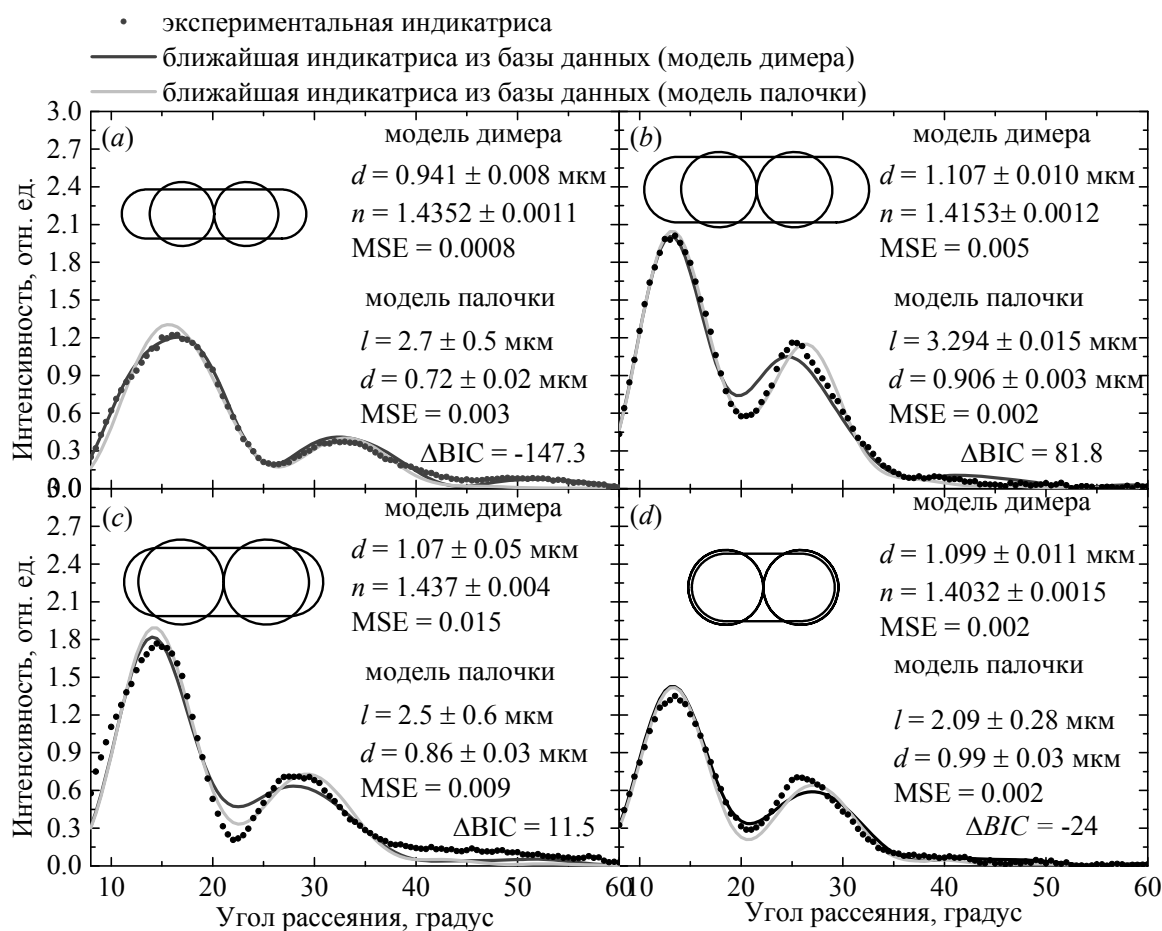


Рис. 41. Примеры корректной (a,b) и некорректной (c,d) идентификации одиночных шаровидных и палочковидных бактерий *Micrococcus sp. 392* (a,c) и *Bacillus subtilis 1327* (b,d) на основании сравнения результатов регрессии с помощью байесовского информационного критерия ( $\Delta BIC > 0$  соответствует модели палочки,  $\Delta BIC < 0$  – модели димера). На каждом графике показаны экспериментальные и ближайшие к ним теоретические индикатрисы бактерий, найденные в базе данных димеров и палочек. Для каждой модели проиллюстрирована соответствующая форма клетки и приведены оценки ее характеристик (математическое ожидание  $\pm$  стандартное отклонение).

палочки, а условие  $\Delta BIC < 0$  соответствует выбору в пользу модели димера, и наоборот), основанная на невязке, не является достаточно надежным критерием для их идентификации.

На Рис. 42a приведено распределение  $\Delta BIC$  для рассматриваемых субпопуляций, которое хорошо демонстрирует, что определение формы бактерий на основании данного критерия не представляется возможным.

Наличие двух субпопуляций бактерий может быть установлено более точно из распределений параметров клеток, полученных в результате решения обратной задачи, которые имеют меньшую степень перекрытия по сравнению с  $\Delta BIC$ , а именно из распределений размера и показателя преломления клеток в случае использования модели димера (Рис. 42b,c), и распределений их длины и диаметра в случае использования модели палочки (Рис. 42d,f). Разделение в параметрах модели димера предпочтительно для идентификации субпопуляции диплококков по согласию их характеристик с размерами и показателями преломления

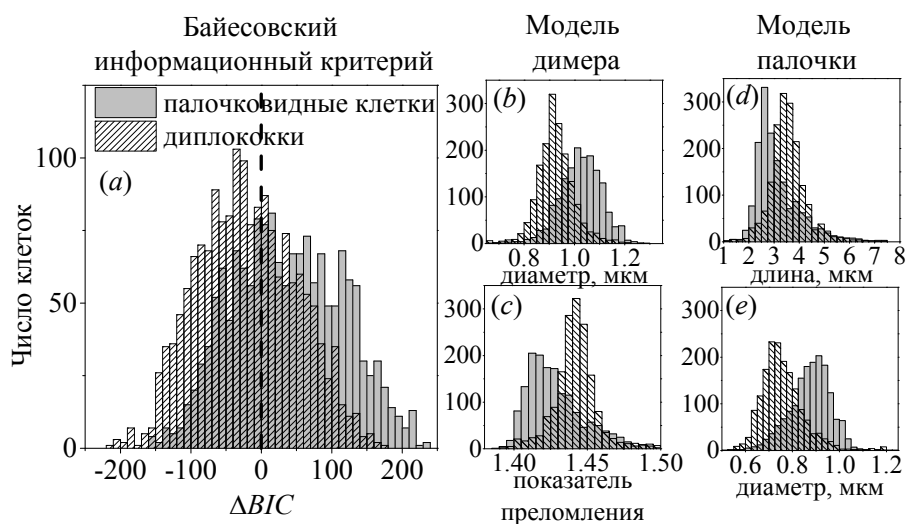


Рис. 42. Разделение бактерий несферической формы (палочковидные клетки и диплококки) по байесовскому информационному критерию (a) и результатам характеристики в параметрах модели димера (b,c) и модели палочковидной клетки (цилиндр с полусферическими концами) (d,e).

микрококков, определенными на первом этапе анализа. Следует отметить, что в отсутствии априорной информации о наличии в исследуемой популяции палочковидных бактерий предложенный алгоритм не позволяет однозначно определить лучшую модель для описания формы второй субпопуляции клеток, существенная доля которых согласно BIC практически в равной мере хорошо описываются обеими моделями, из-за чего субпопуляция палочковидных клеток может быть ошибочно отнесена к субпопуляции диплококков другого вида или штамма.

В результате, применив алгоритм кластеризации для разделения бактерий в параметрах  $d$  и  $n$  (модель димера) удалось повысить точность классификации несферических клеток до 80%. Несмотря на то, что для 20% погрешность в определении формы бактерий, параметры распределений субпопуляций, идентифицированных в смешанной культуре клеток, находятся в хорошем согласии с параметрами исходных чистых культур (Таблица 9).

Таблица 9. Результаты идентификации и характеристики бактерий в смешанной культуре клеток *Bacillus subtilis* 1327 и *Micrococcus sp.* 392.

Штаммы бактерий	Характеристики субпопуляций		Результаты идентификации	
	доля клеток %	Характеристики популяции	доля клеток %	Характеристики популяции
<i>Micrococcus sp.</i> 392	21*	$0.97 \pm 0.07$ $1.435 \pm 0.011$	22	$0.98 \pm 0.08$ $1.435 \pm 0.010$
	39**	$0.93 \pm 0.08$ $1.442 \pm 0.012$	39	$0.93 \pm 0.06$ $1.440 \pm 0.009$
<i>Bacillus subtilis</i> 1327	40	$3.1 \pm 0.9$ $0.88 \pm 0.09$	39	$3.3 \pm 1.1$ $0.88 \pm 0.10$

\* микрококки \*\* диплококки

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что задача идентификации бактерий в составе смешанных культур по результатам характеристики одиночных клеток по светорассеянию является весьма нетривиальной. Точность отнесения бактерий к той или иной субпопуляции как при анализе однородных по форме культур клеток, так и в случае анализа гетерогенных популяций, содержащих бактерии различных форм, зависит от точности определения характеристик одиночных бактерий и от принципиальной возможности разделения их субпопуляций в пространстве параметров используемых оптических моделей. Причем для получения более надежных результатов требуется априорная информация о форме бактерий (для точности характеристики) и количестве предполагаемых субпопуляций (для точности разделения соответствующих распределений методом кластеризации). Однако, даже на примере характеристики смешанной культуры палочковидных бактерий и бактерий в форме диплококков, было показано, что использование подходящих оптических моделей и высокая точность определения морфологических характеристик клеток не гарантирует точное определение их формы и отнесение к соответствующему классу.

С одной стороны, решением проблемы идентификации и классификации бактерий, неразличимых по результатам статической характеристики, может послужить переход к динамической характеристике популяции, например, при помещении смешанной культуры в определенные условия роста (селективные питательные среды, добавление антибиотика и др.), при условии, что характеристики отдельных субпопуляций клеток будут претерпевать изменения, различимые на уровне всей популяции. С другой стороны, для того, чтобы исключить погрешность, вносимую ошибкой модели, разделение бактерий в гетерогенной культуре на различные субпопуляции может быть осуществлено, на основании самих индикатрис светорассеяния одиночных клеток, которые сами по себе несут достаточно большой объем информации, например, с помощью алгоритмов автоматического обучения. Исследованию принципиальной возможности данного подхода посвящен следующий раздел.

### **5.5.3. Классификация бактерий по светорассеянию с использованием автоматического обучения**

При проверке возможности использования автоматического обучения для классификации бактерий в составе сложных полидисперсных сред, содержащих различные популяции микроорганизмов, по индикатрисам светорассеяния, рассматривались два подхода: (1) используя в качестве обучающих выборок теоретические индикатрисы из баз данных димеров и палочек (Таблица 6, Таблица 7) для разделения субпопуляций бактерий по их форме, и (2) используя для обучения выборку, составленную из экспериментальных индикатрис, измеренных для различных штаммов клеток. В частности, задача классификации также, как и в предыдущем разделе, заключалась в разделении субпопуляций шаровидных и палочковидных

бактерий *Micrococcus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Ochrobactrum sp.* и *Escherichia coli*. Для ее решения использовались два алгоритма машинного обучения с учителем: метод опорных векторов (support-vector machine, SVM) и алгоритм случайного леса (Random Forest, RF) (см. подраздел 3.4.3). Тестовая и обучающая выборки содержали неперекрывающиеся подмножества индикатрис.

Прежде чем перейти к классификации экспериментальных данных, алгоритмы были проверены на тестовой выборке, содержащей теоретические индикатрисы бактерий, насчитанные для трех форм клеток (сферы, димеры и палочки). В частности, тестовая выборка содержала 2000 индикатрис шаровидных бактерий (включая 1000 микрококков и 1000 диплококков) и 2000 индикатрис палочковидных клеток. Обучающие выборки содержали индикатрисы шаров, димеров и палочек в соответствующей пропорции (1:1:2). Модели сферической клетки и клетки в виде димера были объединены в один класс шаровидных бактерий. В качестве метрики качества работы алгоритма использовалась простая оценка доли правильных ответов (см. подраздел 3.4.4). На Рис. 43 представлена зависимость точности предсказания алгоритмов от размера обучающей выборки. И для метода опорных векторов, и для алгоритма Random Forest оптимальный размер выборки составил около 10000 индикатрис: дальнейшее увеличение выборки не приводило к существенному повышению точности предсказания. При этом на модельных данных точность классификации с помощью алгоритма случайного леса была выше по сравнению с методом опорных векторов и составила 98% против 92%, соответственно. Оба алгоритма показали хорошую устойчивость к варьированию

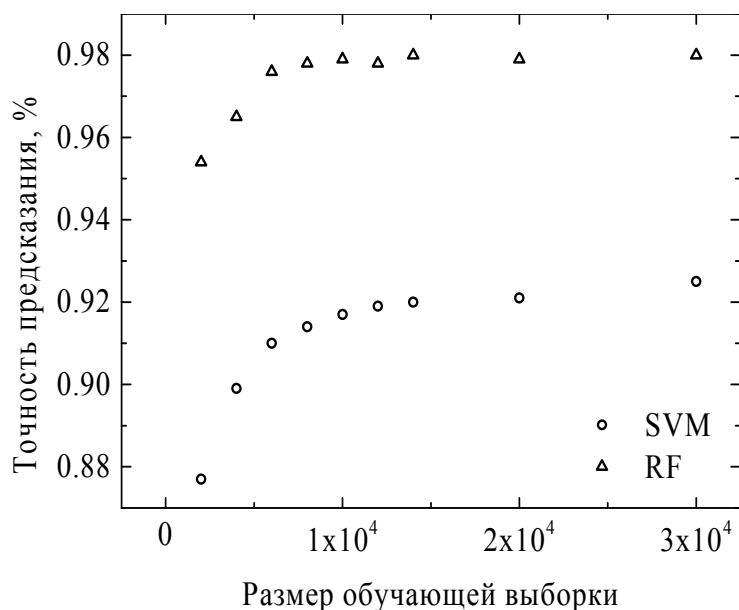


Рис. 43. Изменение точности предсказания формы бактерий на основе автоматического обучения методом опорных векторов (SVM) и с помощью алгоритма Random Forest (RF) с увеличением обучающей выборки. Обучение и тестирование проводилось на теоретических индикатрисах, насчитанных для трех моделей клеток: сферы, димера и палочки.

амплитуды случайного шума в пределах экспериментальных отклонений: смещение оценки точности составляло при этом не более 1%. Однако, при разделении реальных экспериментальных индикатрис палочковидных и шаровидных бактерий точность работы алгоритмов, обученных на теоретических индикатрисах, в лучшем случае составила 80%, причем точность работы метода опорных векторов оказалась, наоборот, выше по сравнению с алгоритмом случайного леса. Так, например, при анализе чистых культур шаровидных бактерий *Micrococcus sp.* 386, 388, 389 и 392 к классу клеток, имеющих форму сферы и димера, было отнесено соответственно 91, 78, 85 и 73% клеток (указана точность SVM). Остальные бактерии были определены к палочковидным, что может быть связано с сильными искажениями сигнала, связанными с инструментальной ошибкой (отклонение частицы в потоке) или с отклонением формы клеток от рассматриваемых моделей (возможное наличие не до конца поделившихся бактерий в виде цепочек из одиночных кокков – стрептококков). В случае анализа чистых культур палочковидных бактерий *Bacillus subtilis* 1327, *Ochrobactrum sp.* 1325 и *Escherichia coli* XL2-Blue и XL10-GOLD в соответствии с классом было соотнесено соответственно всего 41, 13, 9 и 15%. Причина столь низкой точности осталась до конца невыясненной.

Как и следовало ожидать, обучение алгоритмов на выборке из экспериментальных сигналов повысило точность идентификации клеток, и позволило разделить субпопуляции не только по форме, но и по принадлежности к соответствующему штамму. Тестовая выборка содержала по 1000 экспериментальных индикатрис всех рассмотренных ранее культур шаровидных и палочковидных бактерий. Результаты классификации смешанной популяции методом опорных векторов и алгоритмом случайного леса в сопоставлении с реальным распределением клеток в культуре представлены в виде соответствующих таблиц сопряженности (Таблица 10 и Таблица 11). Для более удобного представления данных вместо абсолютного числа клеток, отнесенных к тому или иному классу, в соответствующих элементах таблицы приведены их доли относительно числа бактерий в классах (1000). Диагональные элементы обеих таблиц явно выражены практически для всех классов, что говорит о том, что большая доля клеток была отнесена алгоритмами к соответствующей субпопуляции.. Исключение составил штамм *Micrococcus sp.* 388, который был отнесен классификаторами к морфологически идентичному (Рис. 35) и не отличимому по индикатрисам светорассеяния штамму *Micrococcus sp.* 389. В дальнейшем, чтобы исключить влияние погрешности разделения клеток бактерий этих культур (Таблица 12) на результирующую оценку работы алгоритмов классификации, штаммы *Micrococcus sp.* 388 и *Micrococcus sp.* 389 были объединены в один класс.



Таблица 10. Таблица сопряженности результатов классификации бактерий методом опорных векторов.

Точный класс \ Предсказание		<i>Micrococcus</i> sp. 386	<i>Micrococcus</i> sp. 388	<i>Micrococcus</i> sp. 389	<i>Micrococcus</i> sp. 392	<i>Ochrobactrum</i> sp. 1325	<i>Bacillus subtilis</i> 1327	<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue	<i>Escherichia coli</i> XL10-GOLD
<i>Micrococcus</i> sp. 386		0.43	0.02	0.02	0.04	0.03	0.03	0	0
<i>Micrococcus</i> sp. 388		0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus</i> sp. 389		0.47	0.96	0.93	0.24	0	0.12	0	0.01
<i>Micrococcus</i> sp. 392		0.06	0.01	0.03	0.69	0.01	0.09	0.01	0
<i>Ochrobactrum</i> sp. 1325		0.03	0	0	0.02	0.92	0	0.03	0.01
<i>Bacillus subtilis</i> 1327		0	0	0	0.01	0	0.7	0	0
<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue		0	0	0	0	0.03	0.01	0.6	0.06
<i>Escherichia coli</i> XL10-GOLD		0	0	0.01	0.01	0.01	0.06	0.35	0.92

Таблица 11. Таблица сопряженности результатов классификации бактерий алгоритмом Random Forest.

Точный класс \ Предсказание		<i>Micrococcus</i> sp. 386	<i>Micrococcus</i> sp. 388	<i>Micrococcus</i> sp. 389	<i>Micrococcus</i> sp. 392	<i>Ochrobactrum</i> sp. 1325	<i>Bacillus subtilis</i> 1327	<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue	<i>Escherichia coli</i> XL10-GOLD
<i>Micrococcus</i> sp. 386		0.7	0.04	0.02	0.04	0.02	0.03	0	0
<i>Micrococcus</i> sp. 388		0.01	0.07	0.02	0	0	0.01	0	0
<i>Micrococcus</i> sp. 389		0.22	0.87	0.9	0.17	0	0.06	0	0
<i>Micrococcus</i> sp. 392		0.04	0.01	0.04	0.74	0.02	0.05	0	0
<i>Ochrobactrum</i> sp. 1325		0.03	0	0	0.01	0.92	0.01	0.01	0
<i>Bacillus subtilis</i> 1327		0	0	0.01	0.01	0	0.76	0	0
<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue		0	0	0	0.01	0.03	0	0.81	0.03
<i>Escherichia coli</i> XL10-GOLD		0	0.01	0.02	0.02	0.01	0.08	0.17	0.96

Можно отметить, что неточность классификации оказалась более выраженной внутри одного класса формы клеток, и, более того, внутри одного вида: наибольшая погрешность наблюдается при разделении четырех штаммов *Micrococcus spp.* и двух штаммов *Escherichia coli*, соответственно. Алгоритм Random Forest оказался более точным по сравнению с методом опорных векторов. Результирующие оценки работы алгоритмов, включая точность (27),

полноту (28) и F-меру (29) составили 0.65, 0.78 и 0.62 для метода опорных векторов, и 0.73, 0.78 и 0.71 для алгоритма Random Forest.

Сравнение результатов идентификации субпопуляций бактерий с помощью алгоритмов автоматического обучения с результатами классификации, полученными ранее в подразделах 5.5.1 и 5.5.2 на основании морфологической характеристики клеток на примере нескольких смешанных культур, представлены в Таблице 12. Оценка точности методов представлена тремя метриками: точности, полноты и F-мерой. Для задач внутривидовой (штаммовой) классификации алгоритм Random Forest продемонстрировал более высокую точность по сравнению с методом опорных векторов, в остальных случаях их точность оказалась сравнимой. В целом, точность классификации различных штаммов бактерий внутри как внутри одного класса формы, так и при разделении смеси клеток, имеющих различную морфологию, с помощью автоматического обучения (Random Forest) оказалась в среднем на 15% выше по

Таблица 12. Результаты классификации шаровидных и палочковидных бактерий в разнородных культурах с использованием алгоритмов автоматического обучения (SVM, RF) и на основе характеристики одиночных клеток (EM)

Форма клеток	Штаммы бактерий	Доля %	Точность (P), %			Полнота (R), %			F-мера, %		
			SVM	RF	EM	SVM	RF	EM	SVM	RF	EM
●	<i>Micrococcus sp.</i> 386	48.2	67	70	40	66	95	77	67	80	52
	<i>Micrococcus sp.</i> 388	51.8	34	85	89	75	79	61	47	82	73
			<b>51</b>	<b>77</b>	<b>64</b>	<b>71</b>	<b>87</b>	<b>69</b>	<b>57</b>	<b>81</b>	<b>62</b>
●	<i>Micrococcus sp.</i> 388	50	49	8		64	76		55	15	
	<i>Micrococcus sp.</i> 389	50	57	92		59	52		58	66	
			<b>53</b>	<b>50</b>		<b>62</b>	<b>64</b>		<b>57</b>	<b>40</b>	
●	<i>Micrococcus sp.</i> 388	50	84	83	88	90	90	77	87	86	82
	<i>Micrococcus sp.</i> 392	50	80	82	74	95	94	86	87	88	80
			<b>82</b>	<b>83</b>	<b>81</b>	<b>93</b>	<b>92</b>	<b>82</b>	<b>87</b>	<b>87</b>	<b>81</b>
●	<i>Micrococcus sp.</i> 388	20.1	30	8	59	29	51	81	29	14	30
	<i>Micrococcus sp.</i> 389	68	20	91	19	76	76	70	32	83	30
	<i>Micrococcus sp.</i> 392	11.5	15	73	76	64	82	39	25	77	51
			<b>22</b>	<b>57</b>	<b>51</b>	<b>56</b>	<b>70</b>	<b>43</b>	<b>29</b>	<b>58</b>	<b>37</b>
●	<i>E. coli</i> XL2-Blue	32.5	82	82	95	69	93	48	75	87	64
	<i>E. coli</i> XL10-GOLD	67.5	78	96	50	93	93	95	85	94	66
			<b>80</b>	<b>88</b>	<b>72</b>	<b>81</b>	<b>93</b>	<b>72</b>	<b>80</b>	<b>91</b>	<b>65</b>
●	<i>Bacillus subtilis</i> 1327	25.6	95	84	82	98	99	85	97	96	83
	<i>Ochrobactrum sp.</i> 1325	36.3	96	94	90	95	98	82	95	91	86
	<i>E. coli</i> XL2-Blue	37.9	95	97	88	95	96	97	95	96	93
			<b>95</b>	<b>91</b>	<b>87</b>	<b>96</b>	<b>97</b>	<b>88</b>	<b>96</b>	<b>94</b>	<b>87</b>
●	<i>Micrococcus sp.</i> 392	60	79	82	85	94	94	84	86	88	84
	<i>Bacillus subtilis</i> 1327	40	84	84	75	98	97	77	90	90	76
			<b>81</b>	<b>83</b>	<b>80</b>	<b>96</b>	<b>95</b>	<b>80</b>	<b>88</b>	<b>89</b>	<b>80</b>

\*SVM (Support Vector Machines, метод опорных векторов), RF (Random Forest) – алгоритмы автоматического обучения. Для каждого класса указаны соответствующие оценки точности работы классификатора, включая P (precision, точность), R (recall, полнота) и F-меру (см. подробнее в 3.4.4). Результирующие оценки, рассчитанные как среднее по всем классам, приведены в отдельных строках.

сравнению с результатами, полученными методом EM-кластеризации.

Важно отметить, что автоматическое обучение оказалось более эффективным при разделении смешанных культур, содержащих более трех классов частиц.

Помимо этого, для различных субпопуляций бактерий была оценена доля неперекрывающихся сигналов, а именно индикатрис, для которых среднее квадратичное отклонение превышало два стандартных отклонения экспериментального шума. Было отмечено, что простейшая метрика точности классификатора, вычисляемая как доля правильных решений, имеет линейную корреляцию с долей похожих сигналов (Рис. 44). Таким образом, точность решения задачи классификации бактерий по светорассеянию с помощью машинного обучения, как и следовало ожидать, зависит от принципиальной возможности различить индикатрисы клеток, относящихся к разным популяциям.

Высокая чувствительность пространственного распределения характеристик светорассеяния к форме рассеивающих объектов и высокое разрешение СПЦ, позволяющее измерять индикатрисы светорассеяния в широком угловом диапазоне, открывают широкие возможности не только для характеристики морфологии одиночных клеток. На основании полученных результатов, можно сделать вывод, что измеряемый на СПЦ сигнал содержит достаточно большой объем информации, которую можно использовать для решения задач классификации бактерий в смешанных культурах, содержащих разнородные популяции клеток, без решения обратной задачи светорассеяния, а на основании только измеряемых индикатрис, используя алгоритмы машинного обучения. Однако эффективность данного подхода была

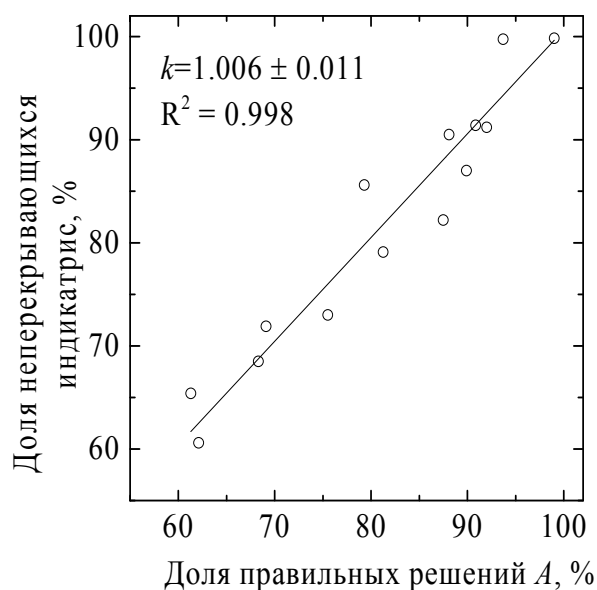


Рис. 44 Линейная корреляция между долей правильных решений, полученных в результате классификации бактерий в смешанных культурах (алгоритмом Random Forest), и долей сигналов, различие которых в терминах среднее квадратичное отклонение превысило уровень экспериментального шума.

продемонстрирована только при обучении на экспериментальных сигналах чистых культур клеток, поэтому его использование в будущем требует накопления больших баз данных сигналов, измеренных для различных культур микроорганизмов. Но и это не гарантирует верную идентификацию клеток, например, находящихся в разных фазах роста, поскольку их форма и сигналы могут отличаться от индикатрис, содержащихся в обучающей выборке. Однако при наличии некоей априорной информации о составе анализируемых сред, данный подход имеет явное преимущество, как в точности, так и по скорости нахождения различных субпопуляций клеток, более точная информация о которых может быть получена при дальнейшем анализе идентифицированных клеток в результате решения обратной задачи.

## **5.6. Динамическая характеристика палочковидных бактерий на примере роста культуры *Escherichia coli***

### **5.6.1. Схема эксперимента**

В работе был использован грамотрицательный, не образующий эндоспоры штамм *E. coli* В, депонированный в «Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» под коллекционным номером В-79. Готовая для работы культура клеток была любезно предоставлена Андреевой Ириной Сергеевной. Подготовка культуры производилась в несколько этапов. Клетки высевались на полную питательную среду рыбно-пептонный агар (ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ) и инкубировались в термостате при температуре 37°C в течение 18–24 часов. Затем клетки выросшей агаровой культуры *E. coli* В переносились в жидкую питательную среду LB (Difco, США) и инкубировались на термостатированной качалке при скорости 170 об/мин и температуре 37°C в течение 18 часов для получения так называемой «ночной культуры» клеток. Для получения клеток в логарифмической стадии роста, более выровненных по размеру, 1–5% «ночной культуры» вносили в новую емкость со свежей средой LB и инкубировали в аналогичных условиях в течение 3–4 часов. Далее производилась синхронизация клеток при температуре 4–6°C в течение 30 мин, после чего синхронная культура пересеивалась в свежую питательную среду LB и инкубировалась на термостатированной качалке при скорости 170 об/мин и температуре 37°C.

Кинетика роста этой культуры исследовалась экспериментально в течение 2.5 ч с момента посева. Для этого с момента посева каждые 10 мин на фотометре (405 нм) измерялась оптическая плотность суспензии с исследуемой культурой клеток, а через 30 мин после посева одновременно с измерением оптической плотности с тем же интервалом проводились измерения клеток *E. coli* на сканирующем проточном цитометре (см. 2.1.2). Для дополнительного контроля за ростом культуры клеток, между измерениями на СПЦ проводились микроскопические наблюдения на оптическом микроскопе (см. 2.1.3).

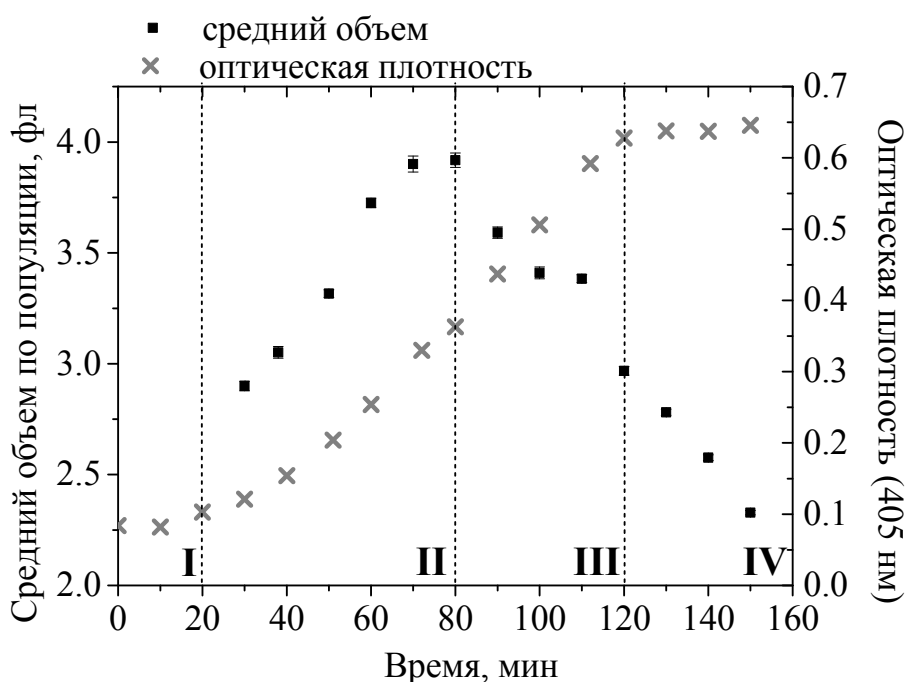


Рис. 45. Изменение оптической плотности и среднего объема клеток по популяции со временем.

### 5.6.2. Результаты и обсуждение

Характеризация бактерий по измеренным индикатрисам светорассеяния осуществлялась методом, разработанным и проверенным нами ранее на клетках бактерий *E. coli* XL2-Blue и *E. coli* XL10-Gold (подраздел 3.3.4.3), *Bacillus subtilis* и *Ochrobactrum sp.* (раздел 5.4). На Рис. 45 представлено изменение во времени оптической плотности суспензии и среднего объема клеток. Кривая оптической плотности имеет характерный S-образный вид [272]. На ней условно могут быть выделены четыре фазы роста клеточной популяции, по мере прохождения которых меняется не только количество клеток, но и, как можно видеть, их средний размер.

После пересева на новую питательную среду, бактерии некоторое время адаптируются к новым условиям и находятся в так называемой lag-фазе I. Фазы II и III обычно объединяют в одну логарифмическую или log-фазу, во время которой клетки делятся с максимальной скоростью, а их средний размер достигает своего наибольшего значения. Во время фазы II, или фазы ускоренного роста, клетки выходят из lag-фазы, начинают расти и активно делиться. В ходе интенсивного роста и размножения возрастает негативное влияние лимитирующих факторов (нехватка питательных субстратов, накопление токсических продуктов метаболизма, избыток клеточной массы на единицу объема). В результате скорость роста бактерий уменьшается, и наступает фаза замедленного роста III, которая затем сменяется стационарной фазой IV, когда устанавливается равновесие между клеточным ростом и делением и процессом отмирания клеток. Когда колония бактерий достигает стационарной фазы, размер клеток существенно падает по сравнению с их размером в логарифмической фазе. Так, например, во

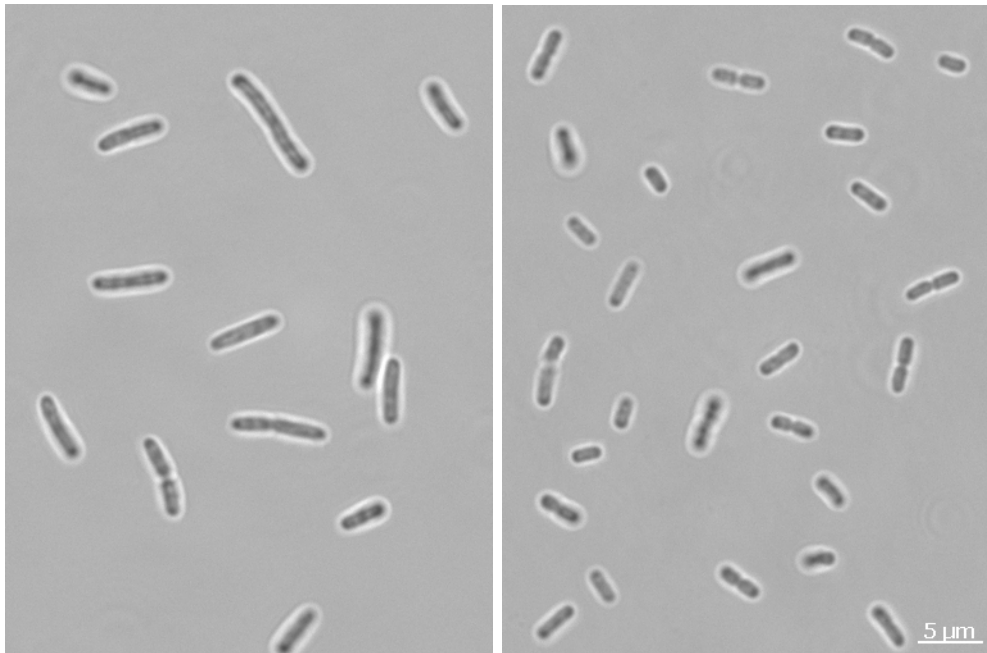


Рис. 46. Микрофотографии клеток *E. coli* В в логарифмической (слева) и стационарной (справа) фазе роста.

время log фазы средняя длина бактерий *E. coli* K12lambda составляет 6 мкм, а средний диаметр 1.2 мкм. Во время стационарной фазы средняя длина 2 мкм, а средний диаметр 1 мкм [273]. Данные характеристики могут существенно отличаться у разных штаммов. В нашем эксперименте для *E. coli* В во время log фазы (80 мин) средняя длина бактерии составила 4.21 мкм, а диаметр – 1.15 мкм. При достижении стационарной фазы (150 мин) средняя длина клеток популяции уменьшилась до 3.04 мкм, диаметр – до 1.06 мкм, а средний объем – на 45%. Уменьшение размера клеток при переходе из логарифмической в стационарную фазу роста также наблюдалось при оптической микроскопии (Рис. 46).

Однако для исследования кинетики роста правильнее было бы рассматривать не динамику изменения среднего объема, а как меняется со временем само распределение культуры клеток по объему.

На Рис. 47 приведены распределения клеток по объему, характеризующие рост культуры в разные моменты времени. Исходя из них, можно предположить, что изначально в исследуемой синхронизованной культуре есть две субпопуляции бактерий с разной длительностью lag-фазы. Первая субпопуляция начинает выходить в фазу ускоренного роста приблизительно через 30 минут после пересева культуры в новую питательную среду, в то время как вторая остается в lag-фазе до 50 минут, о чем свидетельствует наличие двух пиков в распределении.

После того, как и вторая субпопуляция переходит в логарифмическую фазу роста, распределение по объему выравнивается и сдвигается в сторону больших значений, что говорит об интенсивном росте бактерий, и достигает наибольших значений через 80 минут. В

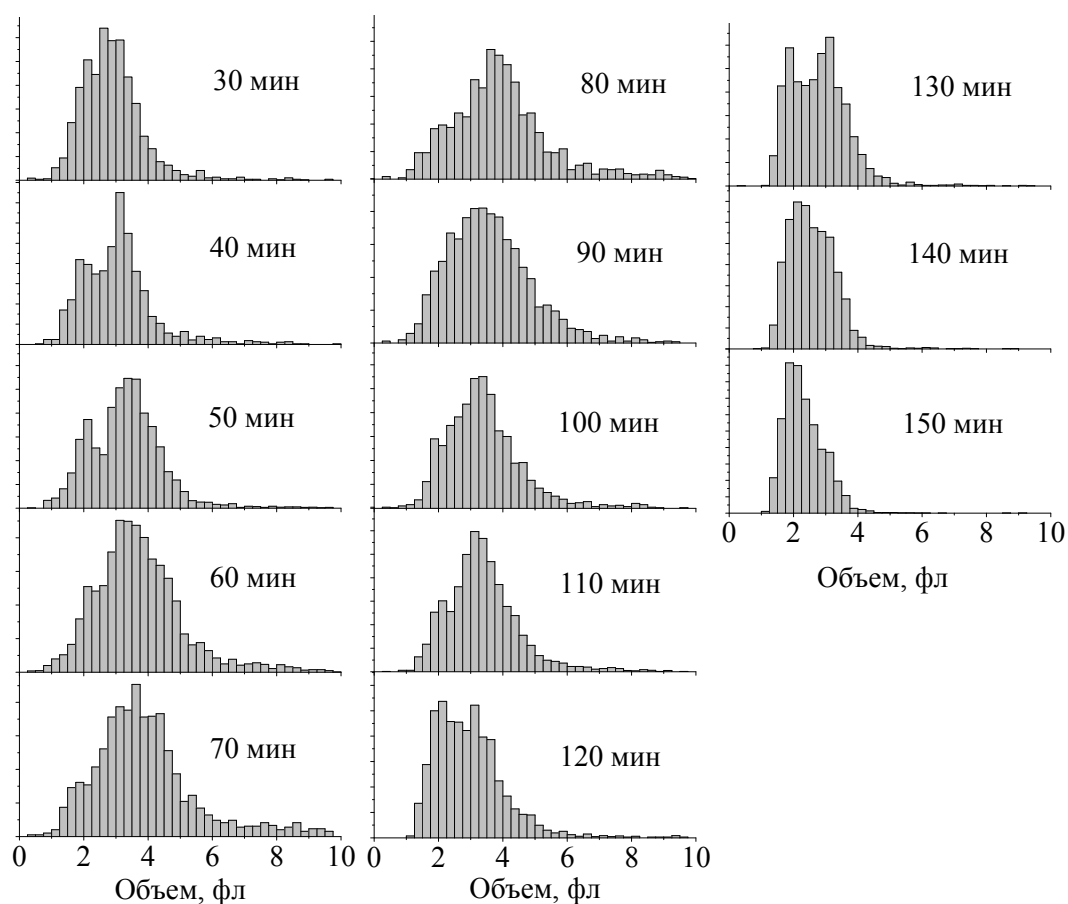


Рис. 47. Динамика изменения объема клеток синхронизированной культуры *E. coli* В.

результате интенсивного роста и деления клеток на рост культуры начинают оказывать влияние лимитирующие факторы, и объем клеток начинает постепенно уменьшаться.

Переход в стационарную фазу роста, как и выход из lag-фазы происходит у клеток не синхронно. Через 100-110 минут в распределении можно наблюдать появление небольшого пика в области 2 фл, который, вероятно, характеризует бактерии, поделившиеся в последний раз перед уходом в стационар. Переходя в стационарную фазу, клетки, ограниченные нехваткой субстрата и свободного объема, значительно замедляют свой рост и скорость деления. В период времени со 110 до 150 минут можно наблюдать, как все большая часть популяции бактерий постепенно вступает в стационарную фазу роста.

## 5.7. Заключение главы

В данной главе были разработаны алгоритмы характеристики простых форм шаровидных (кокки, диплококки) и палочковидных бактерий по индикатрисам светорассеяния, измеряемым на СПЦ, с использованием предварительно насчитанных баз данных теоретических индикатрис для несферических форм клеток (палочки, димеры шаров). Экспериментальная проверка работы алгоритмов проводилась на 4 штаммах шаровидных бактерий *Micrococcus spp.* и двух штаммах палочковидных бактерий *Bacillus subtilis* 1327 и *Ochrobactrum sp.* 1325 с одновременными измерениями на оптическом микроскопе. Было

получено хорошее согласие между распределениями клеток по размерам (диаметр для шаровидных бактерий, диаметр и длина для палочковидных бактерий), построенными по результатам характеристики и по микроскопическим измерениям. Распределения по диаметру и показателю преломления шаровидных клеток в виде одиночных кокков и в составе диплокков также продемонстрировали хорошее согласие, подтверждая надежность методов характеристики, используемых как для сферических, так и для несферических объектов. При этом медианная погрешность измерения морфологических характеристик клеток составила соответственно: 20 нм и 0.003 для размера и показателя преломления одиночных кокков; 55 нм и 0.008 для размера и показателя преломления диплококков; 400 и 40 нм для длины и диаметра палочковидных бактерий.

Высокая точность характеристики отдельных клеток, а также высокая скорость измерений позволяют использовать разработанные методы не только для статической, но и для динамической характеристики бактериальных культур. В частности, первые результаты по применению метода для исследования роста бактерий были получены на культуре клеток *E. coli B*. Эти результаты показали, что средний объём бактерий является чувствительным индикатором фазы роста культуры, кроме того, динамика изменения функции распределения по объёму показала наличие двух субпопуляций в исследуемой пробе.

Впервые была рассмотрена возможность идентификации и классификации бактерий в смешанных культурах, содержащих как сходные, так и различающиеся по морфологии субпопуляции клеток, на основании измерений индикатрис одиночных клеток. При этом было рассмотрено два принципиально разных подхода: классификация частиц на основании решения обратной задачи светорассеяния с использованием нескольких оптических моделей формы клеток и классификация частиц по измеренным индикатрисам светорассеяния с помощью методов автоматического обучения.

Для классификации бактерий по результатам решения обратной задачи светорассеяния было предложено использовать метод кластеризации распределений морфологических характеристик клеток для выявления отдельных субпопуляций бактерий, различающихся по размеру и показателю преломления, или определять форму бактерий и их принадлежность к той или иной субпопуляции на основании сравнения предложенных для их описания оптических моделей и выбора наилучшей с помощью байесовского информационного критерия для каждой измеренной клетки. Использование информационного критерия показало меньшую эффективность для разделения разнородных субпопуляций в сравнении с их идентификацией по морфологическим характеристикам. Наилучшая точность идентификации различающихся по форме клеток в смешанной культуре палочковидных и шаровидных бактерий была достигнута для одиночных кокков (97%), при этом точность определения формы несферических частиц в



результате сравнения модели палочки и димера из двух шаров составила только 80%. Точность идентификации бактерий внутри одного класса формы (видовая и штаммовая классификация), как и следовало ожидать, сильно зависит от степени перекрытия распределений морфологических характеристик отдельных субпопуляций клеток. Так, например, точность классификации трех видов палочковидных бактерий *Escherichia coli* XL2-Blue, *Bacillus subtilis* 1327 и *Ochrobactrum sp.* 1325 по длине и диаметру клеток составила 88%, в то время как попытки разделить отдельные штаммы бактерий *E. coli* (XL2-Blue и XL10-GOLD) и штаммы шаровидных бактерий *Micrococcus spp.* (386, 388, 389 и 392) по размеру и показателю преломления не привели к желаемым результатам. Потенциальным решением проблемы классификации бактерий в случае значительного перекрытия статических характеристик является их динамическая характеристика и разделение субпопуляций клеток по динамике их функций распределения по размерам, что является одной из приоритетных задач для дальнейших исследований культур бактерий с помощью СПЦ.

Для повышения скорости идентификации субпопуляций бактерий в смешанных культурах, а также для исследования культур, содержащих бактерии, сложная форма которых не позволяет точно характеризовать их морфологию по светорассеянию, в данном разделе была рассмотрена принципиальная возможность разделения субпопуляций бактерий без решения обратной задачи, на основании уникальной формы измеряемых индикатрис светорассеяния, с использованием алгоритмов машинного обучения и баз данных индикатрис различных культур бактерий. Были рассмотрены два способа обучения, на теоретических и экспериментальных индикатрисах, с использованием двух алгоритмов: метода опорных векторов и random forest. Экспериментальная проверка показала, что точность классификации различных штаммов бактерий как со схожей, так и с различающейся морфологией, с помощью автоматического обучения оказалась в среднем на 15% выше по сравнению с результатами, полученными на основании статической характеристики клеток. Также автоматическое обучение оказалось более эффективным при разделении смешанных культур, содержащих более трех классов частиц. Однако эффективность данного подхода была продемонстрирована только при обучении на экспериментальных сигналах чистых культур клеток, поэтому его использование в будущем требует накопления больших баз данных сигналов. В целом, было показано, что простой сигнал СПЦ может успешно применяться для классификации бактерий, но проведенное исследование носит ознакомительный характер, а дальнейшее развитие данного направления требует более углубленного изучения.

## Глава 6. Характеризация микрочастиц в плазме крови\*

Плазма крови представляет сложную по составу многокомпонентную полидисперсную среду. По определению, плазма - жидкая часть крови, в которой во взвешенном состоянии находятся форменные элементы (клетки крови). После осаждения крупных элементов, включая эритроциты и лейкоциты, из наиболее крупных объектов в плазме остаются тромбоциты, а помимо них множество других частиц субмикронных размеров, которые лежат в пределах детекции проточной цитометрии, включая клеточные микровезикулы, липопротеиновые частицы, белковые комплексы и другие объекты. Диапазоны размеров различных частиц плазмы крови существенно пересекаются, поэтому при анализе плазмы крови помимо измерения размера, большую роль для установления типа частицы, имеет определение и других, в т.ч. морфологических характеристик, включая форму и показатель преломления.

### 6.1. Оптические модели частиц плазмы

Оптической моделью, стандартно применяемой для моделирования светорассеяния клеточными микровезикулами и липопротеиновыми частицами, является модель гомогенной сферы, которая описывается двумя параметрами: диаметром  $d$  и показателем преломления  $n$  (Рис. 48а). Оправданность выбора сферической формы вполне обосновывается тем, что микровезикулы принимают энергетически выгодную форму пузырька в результате «отпочковывания» участка мембраны от родительских клеток [274,275]. Многочисленные наблюдения, полученные с помощью просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии [127,276–281], действительно показывают, что большая часть наблюдаемых микровезикул имеет форму близкую к сфере, но некоторые частицы представлены в виде агрегатов из сферических частиц или имеют несферическую форму, для описания которой подходит цилиндрическая модель или модель вытянутого сфероида. Существует предположение, что эти везикулы имеют неестественное происхождение, а искажения их формы являются следствием воздействия обработки, которой подвергаются образцы плазмы, включая использование фиксирующих агентов и ультрацентрифугирование [278]. Сравнительно недавние исследования субмикронных частиц в плазме крови с помощью крио-электронной микроскопии, позволяющей максимально сохранить исходную структуру образца, показали, что около 95% микрочастиц в плазме действительно являются сферическими [109], причем большая их часть составляет фракцию липопротеиновых частиц, даже в плазме крови, сданной натощак, т.е. после голодания в течение 10-12 часов, и только небольшая доля частиц

---

\*Часть результатов данного раздела опубликована в работах

Konokhova A.I. et al. Light-scattering flow cytometry for identification and characterization of blood microparticles // J Biomed Opt. 2012. Vol. 17, № 5. P. 057006

Konokhova A.I. et al. Super-resolved calibration-free flow cytometric characterization of platelets and cell-derived microparticles in platelet-rich plasma // Cytometry. 2016. Vol. 89, № 2. P. 159–168.

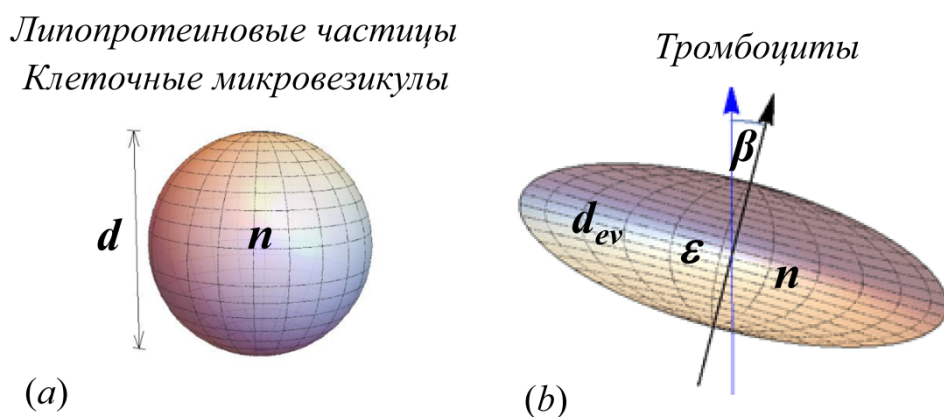


Рис. 48. Оптические модели частиц плазмы: однородная сфера (липопротеиновые частицы и клеточные микровезикулы) и сплюснутый сфероид (тромбоциты).

идентифицируется как клеточные микровезикулы по наличию двойной фосфолипидной мембраны [156]. Остальные 5% частиц имеют несферическую форму, представленную преимущественно в виде вытянутых цилиндрических и сфероидальных структур.

В качестве оптической модели тромбоцита использовалась модель сплюснутого сфероида, предложенная ранее в работе [200], которая описывается четырьмя параметрами, включая: диаметр эквивалентной сферы  $d_{ev}$ , отношение полуосей  $\epsilon$ , показатель преломления  $n$  и угол ориентации в потоке  $\beta$  (Рис. 48b).

Моделирование светорассеяния для сферических и несферических частиц осуществлялось соответственно с помощью теории Ми и методом дискретных диполей (подробнее в подразделе 3.1.2). Решение обратной задачи светорассеяния осуществлялось методами глобальной оптимизации, детально описанными в подразделе 3.2.2. Для сферической модели диаметр частиц варьировался в диапазоне [0.1, 1.2] мкм, а показатель преломления  $n$  – в диапазоне [1.35, 1.7], что заведомо покрывает биологическую вариабельность частиц. Для характеристики тромбоцитов была насчитана база данных, содержащая 100 000 индикатрис, с параметрами, равномерно распределёнными в следующих диапазонах:

Таблица 13. Границы базы данных тромбоцитов.

	Нижняя граница	Верхняя граница
Диаметр эквивалентной сферы $d_{ev}$	1 мкм	4 мкм
Отношение полуосей $\epsilon$	1	8
Показатель преломления $n$	1.39	1.41
Угол ориентации $\beta$	0°	90°

## 6.2. Эксперимент

### 6.2.1. Подготовка образцов плазмы крови

Следуя общим рекомендациям по забору крови [123], диаметр иглы составлял не менее 0.8 мм (21G), кровь бралась в вакуумные пробирки с 3.2% цитрата натрия в качестве антикоагулянта (BD Vacutainer Systems, BD, UK). Для сравнительных экспериментов кровь забиралась в несколько пробирок, одна из которых с кровью условно здорового донора, взятой натощак, служила контрольным образцом. Протокол подготовки контрольных образцов плазмы для анализа был предельно упрощен. Согласно ему, слой обогащенной тромбоцитами плазмы получался в результате естественного осаждения клеток при комнатной температуре в течение двух часов после забора пробы, не подвергался никакой дополнительной обработке и разводился в 300 раз в 0.9% физиологическом растворе, предварительно отфильтрованном через фильтр 0.2 мкм (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany), в который также были добавлены полистирольные микросферы диаметром 0.7 и 1.87 или 2 мкм (Molecular Probes, США) для контроля работы прибора.

### 6.2.2. Схема экспериментов

Для проверки влияния ускоренной пробоподготовки на характеристики субмикронных частиц в результате выделения плазмы с помощью центрифугирования сравнивались несколько образцов плазмы крови. Центрифугирование проводилось в несколько этапов. На первом этапе в результате «мягкого» центрифугирования при 200g в течение 5 мин выделялся слой богатой тромбоцитами плазмы, 5 мкл которого собирались и разводились в 300 раз в физиологическом растворе. На втором этапе после дополнительного двухступенчатого центрифугирования ( $2 \times 10$  минут при 1500g) из образца удалялась оставшаяся часть тромбоцитов и выделялась обедненная тромбоцитами плазма, которая также разводилась и измерялась на СПЦ.

Для проведения анализа образцов плазмы с различной долей субмикронных частиц во фракции клеточных микровезикул и липопротеинов (хиломикронов), использовалась плазма крови условно здоровых доноров, сданная натощак и после еды (повышенное содержание хиломикронов), и кровь пациентов с установленным риском атеросклероза и нарушенным липидным обменом. Повышенное образование микровезикул клеточного (тромбоцитарного) происхождения стимулировалось в плазме путем активации тромбоцитов *in vitro* с помощью аденозиндифосфата (АДФ) и коллагена.

В частности, для сравнительного анализа образцов, содержащих различный уровень липопротеиновых частиц, использовалась кровь условно здоровых доноров, сданная натощак и через 3 часа после еды, когда концентрация хиломикронов в плазме достигает своего максимума [282,283]. При сотрудничестве с СФБМИЦ им.ак.Е.Н. Мешалкина дополнительно

были проведены исследования плазмы крови пациентов с установленным риском атеросклероза и нарушением липидного обмена и эксперимент по исследованию постпрандиальной динамики характеристик микрочастиц плазмы в крови условно здорового донора. Измерения динамики проводились в течение 6 часов после приема пищи донором. Для измерений на СПЦ кровь забиралась у донора каждые 30 мин. Также для сравнительного анализа каждый час сотрудниками СФБМИЦ им.ак.Е.Н. Мешалкина проводился стандартный колориметрический фотометрический тест для количественного определения триглицеридов в сыворотке крови [284].

При проведении экспериментов по исследованию влияния активации тромбоцитов на характеристики субпопуляций субмикронных частиц активация тромбоцитов производилась путем добавления в плазму индукторов АДФ (40 мкмоль/л) и коллагена (2.2 мг/мл).

### 6.2.3. Измерения на сканирующем проточном цитометре

Измерения индикатрис светорассеяния одиночных частиц проводились с помощью СПЦ на длине волны 405 нм. По результатам измерений строились стандартные двумерные карты по интенсивности рассеяния вперед (FSC) и бокового рассеяния (SSC) (Рис. 49), на которых можно выделить области, соответствующие разным типам измеряемых частиц. Полистирольные микросферы 0.7 и 2 мкм отчетливо выделены областями  $G_{0.7}$  и  $G_2$ , соответственно. Частицы плазмы попадают в область  $G_{PI}$ , где можно отметить два характерных скопления частиц,

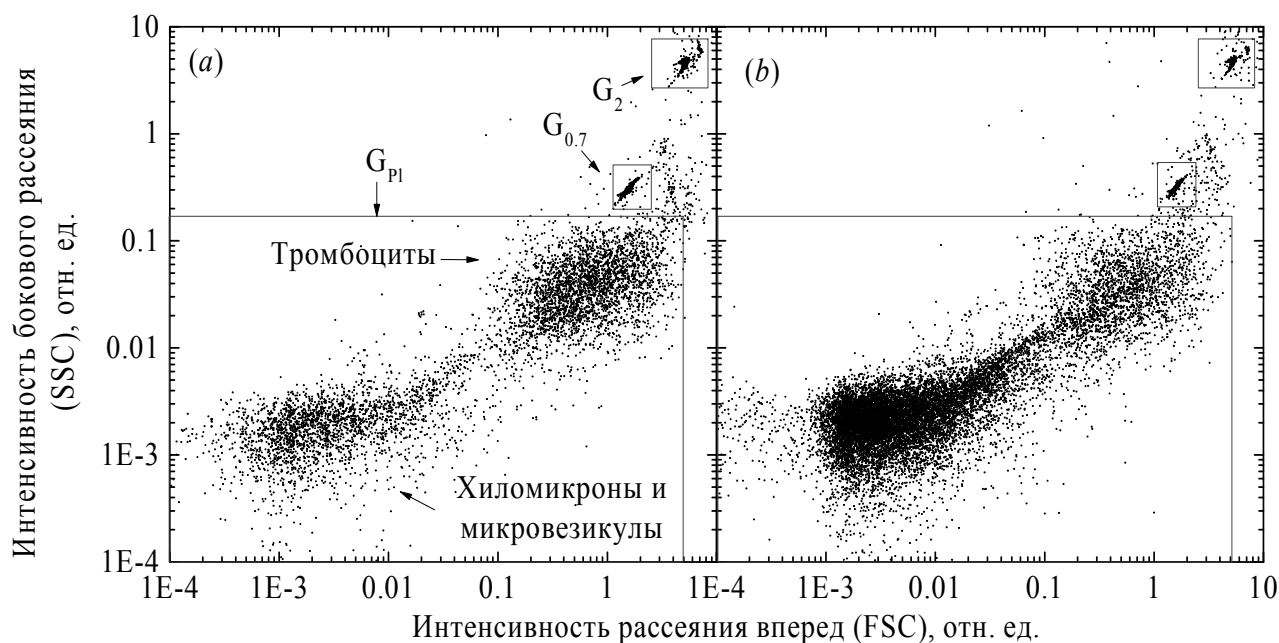


Рис. 49. Характерные двумерные карты по интенсивности рассеяния вперед (FSC) и бокового рассеяния (SSC) плазмы крови условно здорового донора (a) и пациента с диагнозом риска атеросклероза (b). Полистирольные микросферы диаметром 0.7 и 2 мкм находятся в областях  $G_{0.7}$  и  $G_2$ , соответственно. Область  $G_{PI}$ , содержит частицы плазмы, в том числе тромбоциты, клеточные микровезикулы и хиломикроны.

соответствующих тромбоцитам и субмикронным частицам плазмы.

В крови условно здорового донора, где содержание субмикронных частиц не так велико, данные скопления практически не перекрываются и могут быть условно разделены (Рис. 49а), но в крови пациента с диагнозом риска атеросклероза наблюдается повышенное содержание небольших частиц, часть которых по интенсивности рассеяния начинает перекрываться с облаком тромбоцитов (Рис. 49б). Данный пример наглядно демонстрирует сложность разделения частиц в значениях  $SSC \times FSC$ , измеряемых на цитометрах стандартной конфигурации [126]. Но благодаря дополнительной информации, заключенной в измеряемых на СПЦ индикатрисах светорассеяния одиночных части, данная задача может быть решена на основании решения обратной задачи светорассеяния с использованием различных оптических моделей частиц плазмы в результате их сравнения и выбора наиболее подходящей для описания морфологии измеренных объектов.

### **6.3. Идентификация тромбоцитов и субмикронных частиц в плазме крови**

Клеточные микровезикулы и хиломикроны, форма которых преимущественно сферическая, могут быть отделены от тромбоцитов на основании решения обратной задачи светорассеяния с использованием теории Ми. Погрешность определения характеристик частиц служила хорошим критерием при идентификации шаровидных бактерий в смешанной культуре сферических и несферических клеток (раздел 5.4), однако для субмикронных частиц плазмы, размеры и показатель преломления которых лежат на границе чувствительности СПЦ (Рис. 7), точность их определения в большей степени зависит от размера и плотности частиц и значительно падает вблизи предела детекции из-за потери особенностей в индикатрисе и уменьшения отношения сигнал/шум. Оценку применимости сферической модели для описания реальной формы измеренных частиц плазмы можно провести на основе регрессионного анализа отклонений экспериментального сигнала от модели (см. подраздел 3.2.4). В качестве количественных мер описания согласия между экспериментальными сигналами и наилучшей подгонкой по теории Ми рассмотрим взвешенную сумму квадратов отклонений (СКО), определённую согласно (9), количество серий  $k$  (критерий серий Вальда-Вольфовитца или количество пересечений между экспериментальной и теоретической кривой) и коэффициент автокорреляции  $\rho_1$ , рассчитываемый согласно (12). Согласно критерию Вальда-Вольфовитца для некоррелированных регрессионных остатков значение  $k^*$  стремится к 0.5 и уменьшается с усилением зависимости между последовательными отклонениями. Абсолютное значение

---

\* Здесь и далее под  $k$  будет подразумеваться число пересечений, нормированное на число точек в индикатрисе:  $k/N$

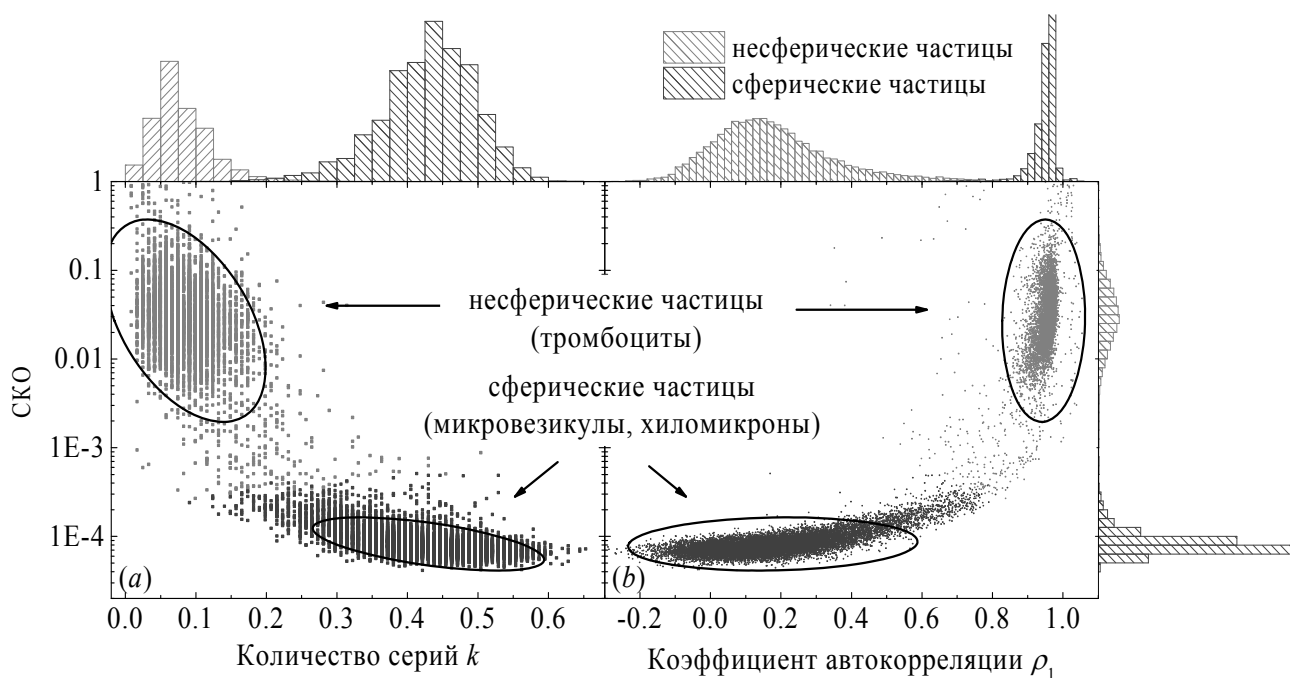


Рис. 50. Разделение сферических и несферических частиц в плазме крови с помощью алгоритма EM-кластеризации по результатам обработки с помощью теории Ми в параметрах количества серий отклонений  $k$ , коэффициента автокорреляции  $\rho_1$  и СКО. На рисунке представлены двумерные проекции распределений частиц в параметрах  $k \times$  СКО (a) и  $\rho_1 \times$  СКО (b) вместе с проекциями доверительных эллипсоидов уровня 0.95. Напротив осей, соответствующих параметрам разделения, также построены одномерные проекции распределений идентифицированных субпопуляций по  $k$ ,  $\rho_1$  (сверху) и СКО (справа).

коэффициента автокорреляции  $\rho_1$  ( $|\rho_1| \in [0,1]$ ) в случае независимых отклонений близко к 0 и растет при наличии корреляции.

На Рис. 50 представлены характерные двумерные и одномерные распределения частиц плазмы в параметрах количества серий  $k$ , коэффициента автокорреляции  $\rho_1$  и СКО, на которых четко выделяется наличие двух субпопуляций. В рамках предположения сферической модели основным источником отклонений для сферических частиц является шум, вызываемый электроникой или несовершенством оптической системы, который несет преимущественно случайный характер. Для несферических частиц основным источником отклонений экспериментальной индикатрисы от результатов моделирования является модельная ошибка, и она же вносит корреляцию в регрессионные остатки, что в совокупности приводит к увеличению СКО, уменьшению числа серий  $k$  и приближает коэффициент автокорреляции  $\rho_1$  к 1. На одномерных распределениях  $k$ ,  $\rho_1$  и СКО пики, соответствующие сферическим и несферическим частицам, разделяются достаточно четко, и позволяют ввести критерий разделения по каждому из параметров. Чтобы исключить произвольность выбора границ, разделение частиц плазмы на сферические (клеточные микровезикулы и липопротеиновые частицы) и несферические частицы (тромбоциты, агрегаты частиц, дериваты разрушенных

клеток и др.) осуществлялось автоматически одновременно по всем трем параметрам с помощью алгоритма EM-кластеризации (подраздел 3.4.1). Частицы, отнесенные алгоритмом к соответствующим субпопуляциям, представлены на Рис. 50 более светлыми и темными цветами.

Характерные индикатрисы светорассеяния частиц плазмы, включая сильно несферический тромбоцит, тромбоцит, близкий к сферической форме, и различающиеся по показателю преломления сферические микровазикалы плазмы (клеточная микровазикала и хиломикрон) представлены на Рис. 51.

При ухудшении настройки СПЦ, которая может привести к появлению корреляции отклонений и повышению отношения сигнал/шум, отклонения, связанные с модельной ошибкой, могут стать сравнимыми с инструментальными, из-за чего границы разделения в

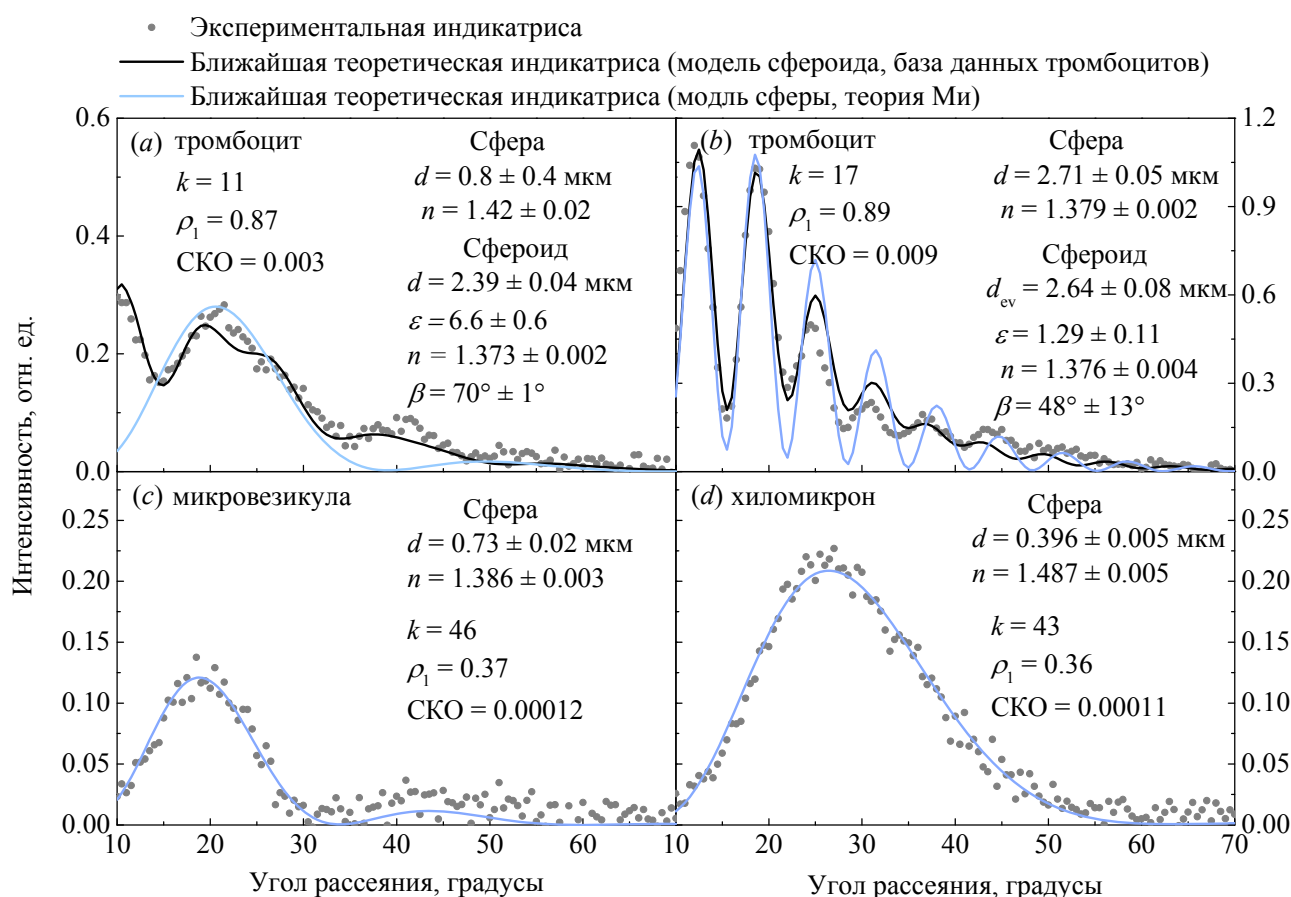


Рис. 51. Характерные экспериментальные и соответствующие теоретические индикатрисы светорассеяния тромбоцитов (a,b), клеточной микровазикалы (c) и хиломикрона (d), полученные при идентификации и характеристике частиц плазмы по результатам решения обратной задачи светорассеяния с использованием модели сфероида (база данных тромбоцитов) и модели сферы (теория Ми). Для каждой частицы приведены оценки параметров модели (математическое ожидание  $\pm$  стандартное отклонение) и критерии согласия формы частицы с моделью сферы, используемые для разделения частиц на сферическую и несферическую фракции (количество серий отклонений  $k$ , коэффициент автокорреляции  $\rho_1$  и SKO).



рассмотренных параметрах могут стать более размытыми (данные не представлены). Помимо этого, при разделении частиц плазмы на фракции сферических и несферических частиц, может быть частично потеряна информация о потенциальных несферических субмикронных частицах, среди которых в том числе могут находиться димеры клеточных микровезикул.

В качестве альтернативного подхода к разделению различающихся по морфологии субпопуляций тромбоцитов, микровезикул и липопротеиновых частиц, по результатам характеристики рассмотрим подход, в основе которого вместо модели сферы и теории Ми лежит решение обратной задачи с использованием модели сплюснутого сфероида и базы данных тромбоцитов. Основываясь на предлагаемой оптической модели, на первом этапе, после обработки всех измеренных частиц плазмы с помощью базы данных сфероидов, происходит разделение частиц плазмы на тромбоциты и частицы, не относящиеся к ним. В частности, область тромбоцитов хорошо выделяется в параметрах объема одиночных частиц, определенных в результате характеристики, и рассеяния вперед, рассчитываемого как интеграл от индикатрисы в углах от  $10^\circ$  до  $15^\circ$  (Рис. 52).

На основе карты контрольного образца (Рис. 52а, плазма условно здорового донора, сданная натощак и выделенная из крови в результате естественного осаждения в течение 2 часов), содержащего преимущественно тромбоциты, можно рассчитать матрицу ковариации<sup>†</sup> и построить доверительный эллипс уровня 99%, определив его как область тромбоцитов для их последующей идентификации. Однако на верхней границе построенной области можно отметить частицы с высокой интенсивностью рассеяния вперед, не отнесенные к тромбоцитам, и которые, при этом, также не могут быть отнесены к субмикронным частицам. Поэтому для построения области, отделяющей субмикронные частицы плазмы, эллипс был аппроксимирован параболой, а частицы, лежащие вне ее, отнесены к потенциальным микровезикулам, хиломикронам и другим субмикронным частицам.

Достоверность области, выбранной для идентификации тромбоцитов, подтверждается при сравнительном анализе других образцов плазмы крови, полученных у того же донора через 3 часа после еды, включая образец с нативной плазмой, выделенной естественным осаждением клеток крови (Рис. 52b), и образцы с богатой и обедненной тромбоцитами плазмой, полученные с помощью центрифугирования: сначала при 200g в течение 5 мин (Рис. 52c), а затем при 1500g в течение 10 минут (Рис. 52d), соответственно. Относительная доля тромбоцитов, детектируемых в плазме, полученной после еды, существенно уменьшается в связи с постпрандиальным выбросом в кровь хиломикронов.

---

<sup>†</sup> Робастная оценка матрицы ковариации производилась с помощью пакета 'rscov' в программной среде R [285].

Центрифугирование на невысоких скоростях приводит к небольшой потере тромбоцитов, абсолютная концентрация и доля которых (28%), тем не менее, сравнима с образцом, полученным в результате естественного осаждения крупных клеток крови (23%). Центрифугирование на высоких скоростях, действительно, удаляет практически все тромбоциты, в область которых попадает всего 0.5% измеренных частиц. Следует отметить, что результаты разделения частиц на тромбоциты и субмикронные частицы плазмы, полученные с помощью базы данных сфероидов, хорошо согласуются с результатами разделения частиц плазмы на сферическую и несферическую фракции, полученным по результатам характеристики с помощью теории Ми, что наглядно продемонстрировано на Рис. 52(e-h), где частицы, идентифицированные по базе данных как тромбоциты, и частицы, к ним не относящиеся, представлены в параметрах разделения сферических и несферических частиц.

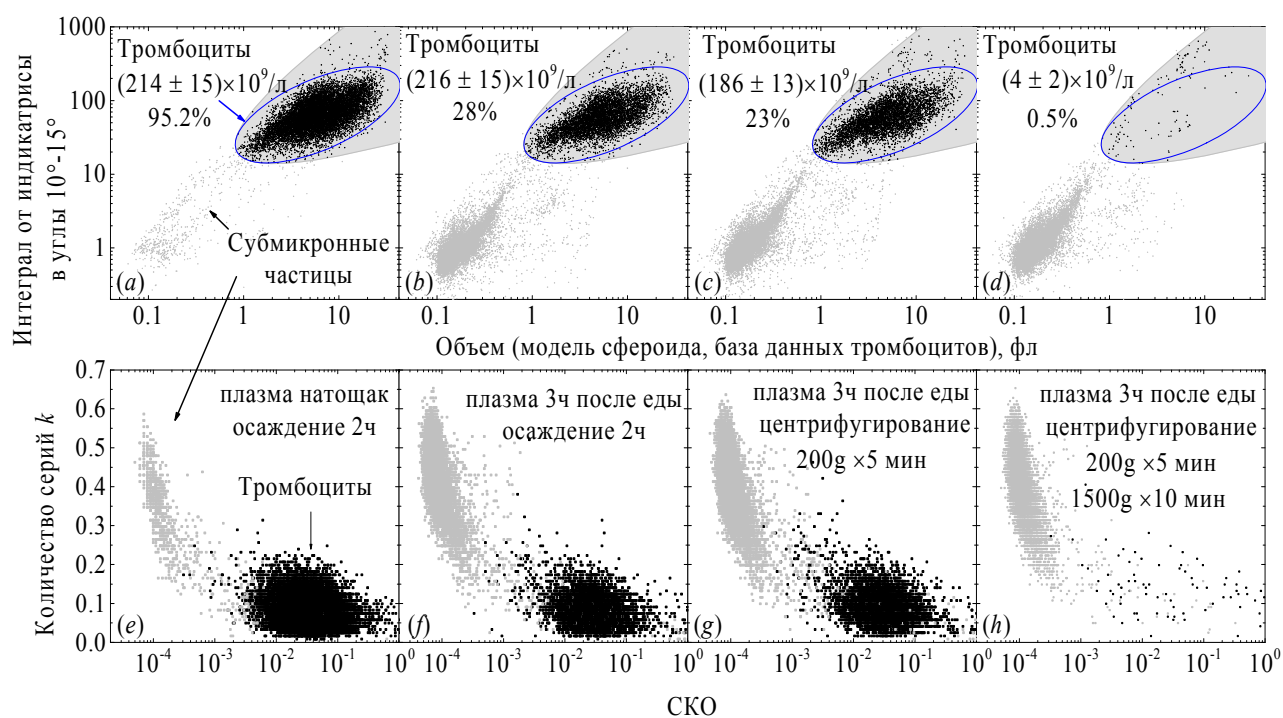


Рис. 52. Идентификация тромбоцитов и субмикронных частиц в плазме крови по результатам обработки с помощью базы данных тромбоцитов в параметрах объема частицы и интенсивности рассеяния в углы  $10^{\circ}-15^{\circ}$  (сверху). Соответствующие субпопуляции тромбоцитов и других частиц плазмы представлены в параметрах SKO и количества серий  $k$ , используемых для разделения сферических и несферических частиц по результатам обработки с помощью теории Ми (снизу). Слева направо представлены результаты разделения частиц в контрольном образце (плазма крови, сданная натощак и не подвергавшаяся обработке) (a,e) и плазме крови, сданной через 3 часа после приема пищи и выделенной естественным осаждением (b,f) и с помощью центрифугирования: изначально при 200g в течение 5 мин (c,d) и дополнительно при 1500g в течение 10 мин. Область тромбоцитов (доверительный эллипс уровня 99%) устанавливалась в контрольном образце на (a) и использовалась для их идентификации в других пробах (b-d). На (a-d) также указаны концентрации тромбоцитов и их доля, относительно всех измеренных частиц плазмы.

Среднее расхождение для представленных данных составило 2.1%.

Частицы, не идентифицированные на первом этапе как тромбоциты, на втором этапе обрабатывались с помощью теории Ми, используя амплитуды сигналов рассеяния в передние и боковые углы в качестве дополнительной информации для повышения точности определения размера и показателя преломления частиц. Погрешности определения характеристик частиц, и различные меры, отражающие степень согласия расчетов с экспериментальными индикатрисами, включая среднеквадратичное отклонение, использовались для того, чтобы откинуть часть частиц, плохо описывающихся теорией Ми, среди которых могли быть агрегаты субмикронных частиц, обломки клеток, белковые комплексы и другие частицы плазмы крови, не относящиеся к микровезикулам и липопротеиновым частицам. Данные события были отнесены к группе «неидентифицированных частиц».

## 6.4. Результаты и обсуждение

### 6.4.1. Характеризация субмикронных частиц в плазме крови

Рассмотрим типичные результаты характеризации субмикронных частиц плазмы на примере сравнения плазмы крови условно здорового донора, сданной натощак и через 3 часа после приема пищи.

В плазме крови условно здорового донора, сданной натощак, большая часть измеренных

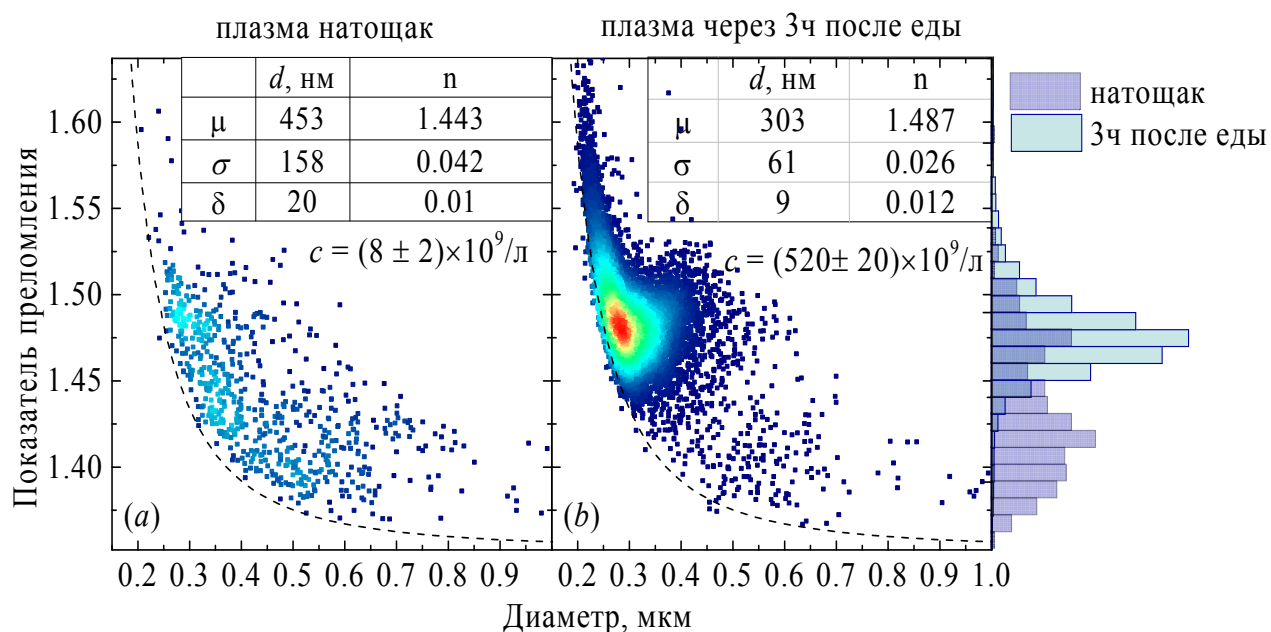


Рис. 53. Карта плотности распределения сферических субмикронных частиц по диаметру и показателю преломления в плазме крови, сданной натощак (а) и через 3 часа после еды (б). Пунктирная линия описывает границу детекции частиц. Для размера  $d$  и показателя преломления  $n$  в таблицах приведены средние значения, стандартные отклонения и медианная погрешность одиночных измерений по популяции частиц. Также приведена концентрация частиц в плазме.

частиц была идентифицирована как тромбоциты, в то время как доля сферических субмикронных частиц составила всего 3.7%. Распределение характеристик измеренных частиц представлены в координатах размера и показателя преломления на карте плотности (Рис. 53а). Размеры частиц лежат в диапазонах, соответствующих хиломикронам и клеточным микровезикулам. Распределение микрочастиц по показателю преломления очень широкое, несмотря на высокую точность характеристики одиночных частиц: медиана погрешности определения показателя преломления и размера для приведенных результатов измерений составила соответственно 0.012 и 20 нм. Проблема разделения субпопуляций микровезикул и хиломикронов на основании полученных результатов может быть связана как с естественной вариабельностью показателя преломления частиц, которая приводит к наблюдаемому уширению распределений, так и с искажением самой формы распределений, связанным с ограничением СПЦ по чувствительности, которая не позволяет детектировать большую часть микровезикул в области  $< 400$  нм. Хиломикроны на 86-92% состоят из триглицеридов [86], для которых, согласно литературным данным, показатель преломления может варьировать от 1.441 до 1.491 (на длине волны 434 нм) [286]. О составе и плотности клеточных микровезикул известно не так много, но на имеющихся в литературе электронных микрофотографиях они все же представлены как различные по плотности мембранные структуры, преимущественно содержащие цитозоль [127,156,287,288], в связи с чем наиболее вероятный для них показатель преломления должен соответствовать показателю преломления цитоплазмы клеток крови.

И действительно, в плазме крови, сданной через три часа после еды, в результате постпрандиального выброса липопротеинов в кровотоки наблюдается заметное увеличение субмикронных частиц с показателем преломления в диапазоне  $1.487 \pm 0.048$ , которые могут быть отнесены к фракции хиломикронов. Важно отметить, что уровень детекции, соответствующий данной области показателей преломления ( $> 250$  нм) практически захватывает медиану распределения хиломикронов, циркулирующих в крови, размер которых обычно варьирует в диапазоне от 100 до 500 нм [87,289].

#### **6.4.2. Влияние центрифугирования на характеристики субмикронных частиц плазмы**

Карты плотности характеристик частиц плазмы, полученной различными способами выделения, включая естественное осаждение крупных клеток в течение двух часов после забора крови, сводящее к минимуму внешнее воздействие на пробу, и центрифугирование, позволяющее удалить как крупные клетки крови (200g в течение 5 мин), так и тромбоциты (дополнительное центрифугирование при 1500g в течение 10 мин), представлены на Рис. 53 (см. также Рис. 52).

Вопреки предположениям, что центрифугирование может привести к потере доли крупных субмикронных частиц или вызвать разрушение и активацию тромбоцитов,

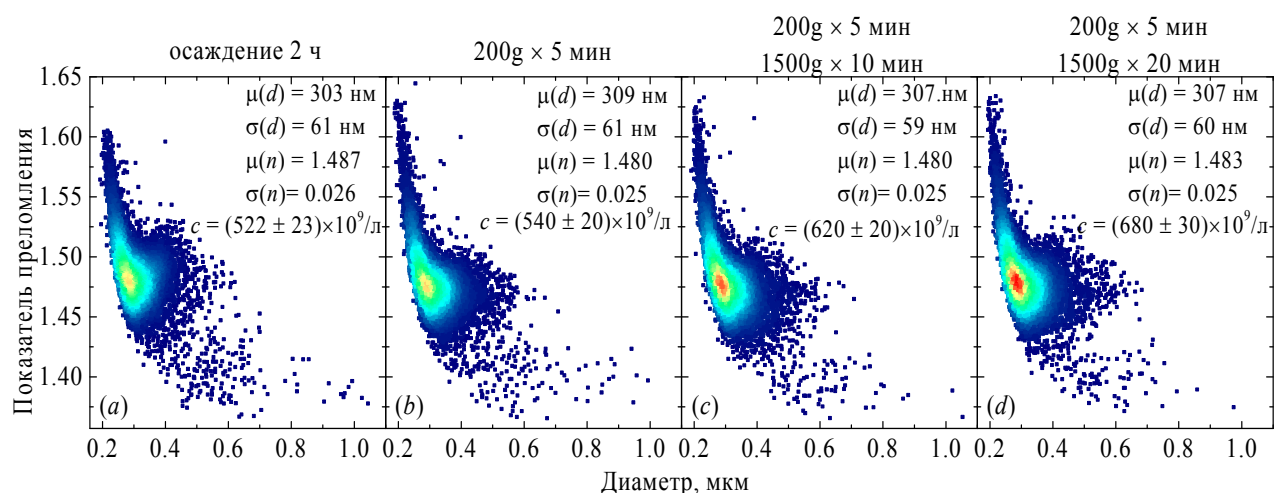


Рис. 54. Характеристики субмикронных частиц в (а) плазме, выделенной в результате осаждения в течение 2 часов после забора крови; (б) плазме, полученной с помощью центрифугирования при 200g в течение 5 минут; в обедненной тромбоцитами плазме, полученной с помощью центрифугирования при 1500g в течение 10 (с) и 20 (d) минут. На графиках приведены концентрации, для размера  $d$  и показателя преломления  $n$  частиц показаны средние значения и стандартные отклонения.

сопровождающиеся выбросом микровезикул тромбоцитного происхождения, в пределах использовавшихся скоростей и времен оно не привело к заметной потере больших частиц и существенному изменению параметров их распределений.

Различия в средних значениях для показателя преломления, вероятнее всего, вызваны погрешностью измерений (систематический сдвиг, <1%). Однако остается вероятность того, что потенциальные изменения в распределении характеристик субмикронных частиц остались не выявленными, если были связаны с изменением доли микровезикул, находящихся за пределом детекции СПЦ. Плазма во всех случаях бралась из середины слоя, образовавшегося в пробирке, и увеличение концентрации детектируемых частиц вероятно связано с их постепенным осаждением.

### 6.4.3. Характеризация субмикронных частиц в плазме, активированный с помощью коллагена и АДФ

Для выявления области характеристик частиц, соответствующих микровезикулам клеточного происхождения на карте «размер»×«показатель преломления», стимуляция их выброса в плазму крови проводилась посредством активации тромбоцитов с помощью коллагена и АДФ. При добавлении коллагена в плазму крови, сданную натощак, действительно, было зарегистрировано большое количество субмикронных частиц с показателем преломления, отличным от хиломикроннов (Рис. 55а,б). Однако сравнение данной пробы с раствором коллагена (Рис. 55с), молекулы которого, по-видимому, способны формировать мицеллы и/или

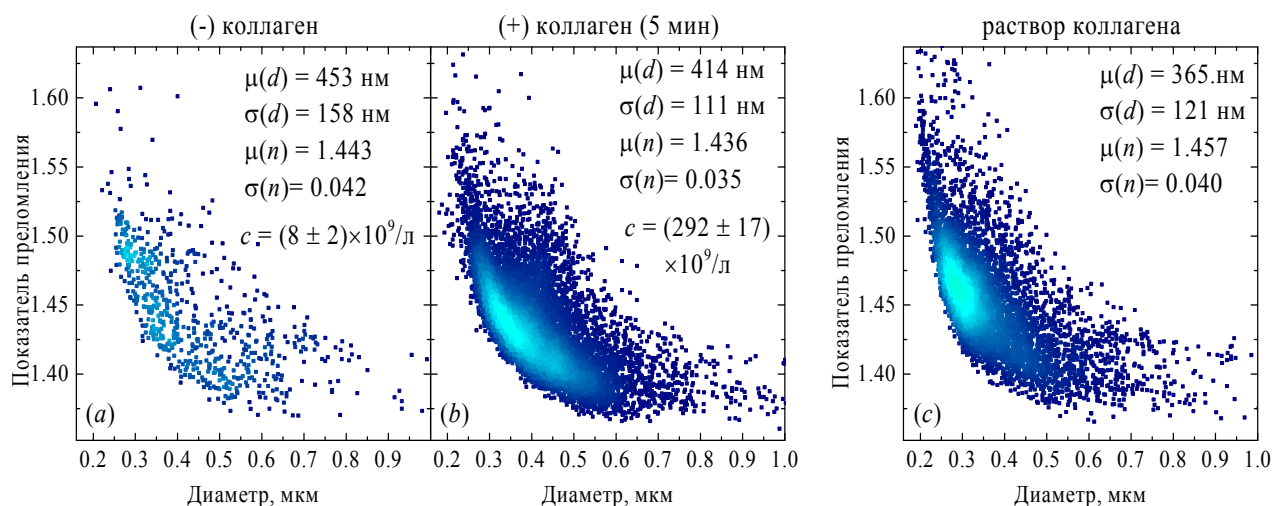


Рис. 55. Изменение характеристик субмикронных частиц плазмы в результате активации тромбоцитов с помощью коллагена: (а) контрольный образец (плазма крови, сданная натощак), (б) плазма крови с добавлением коллагена. (с) Распределение субмикронных частиц по размеру и показателю преломления в растворе коллагена, использовавшемся для активации. На графиках приведены концентрации, для размера  $d$  и показателю преломления  $n$  частиц показаны средние значения и стандартные отклонения.

липосомы, показало, что появление данных частиц не может быть однозначно связано с активацией тромбоцитов и образованием микровезикул.

В отличие от активирующего раствора коллагена, раствор АДФ не содержал частиц, которые могли бы быть приняты за субмикронные частицы плазмы (данные не представлены). На Рис. 56 приведены результаты характеристики субмикронных частиц плазмы до и после активации тромбоцитов с помощью АДФ (через 5 минут и через час после добавления АДФ в плазму крови, сданную условно здоровым донором натощак и через 3 часа после еды).

Из-за большой доли липопротеиновых частиц, содержащихся в постпрандиальной плазме [Рис. 56(d-f)], появление новых частиц на их фоне менее заметно по сравнению в плазме крови, сданной натощак [Рис. 56(a-c)], где доля детектируемых субмикронных частиц увеличивается приблизительно в 2 раза через 5 минут после активации и в 6 раз – через 1 час. Характеристики частиц, включая средний размер и показатель преломления по всей популяции, претерпевают незначительные изменения. О появлении новой субпопуляции частиц в плазме, содержащей липопротеиновые частицы, свидетельствует хвост распределения в области меньших показателей преломления и сдвиг его среднего значения с 1.4873 до 1.4764 через 5 минут и 1.4782 через час.

Предполагая полное отсутствие или наличие лишь малой доли хиломикроннов в плазме крови, сданной натощак, и исходя из распределений, представленных на [Рис. 56(a-c)], можно сделать вывод, что искомая субпопуляция микровезикул клеточного происхождения, по-видимому, не может быть точно идентифицирована по измеряемому показателю преломления из-за высокой погрешности его определения (точность определения показателя преломления в

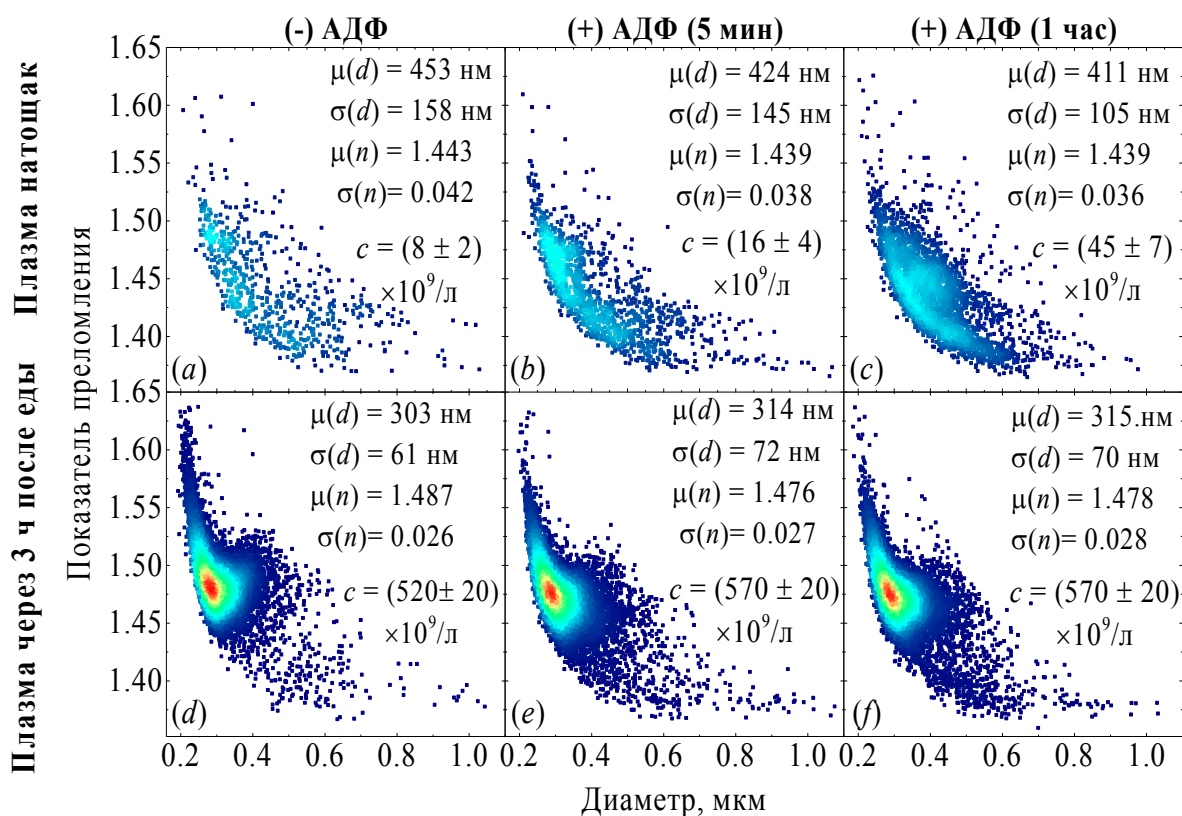


Рис. 56. Влияние активации тромбоцитов с помощью АДФ на характеристики субмикронных частиц в плазме, сданной натощак (а-с) и через 3 часа после еды (d-f). Слева направо приведены контрольные пробы без добавления АДФ (а,d), с добавлением АДФ спустя 5 минут (b,e) и спустя час (с,f), соответственно. На графиках приведены концентрации, для размера  $d$  и показателя преломления  $n$  частиц показаны средние значения и стандартные отклонения.

зависимости от параметров частицы проиллюстрирована на Рис. 57а), особенно вблизи границы детекции СПЦ ( $\sigma_n \rightarrow 0.05$ ), которая приводит к сильному уширению распределения.

На Рис. 57b представлены характерные доверительные области субмикронных частиц плазмы, чьи характеристики лежат вблизи границы детекции СПЦ (частицы, пронумерованные от 1 до 3) и вдали от нее (частица 4). Соответствующие индикатрисы светорассеяния и оценки параметров, включая математическое ожидание и стандартное отклонение (погрешность) представлены на Рис. 57(с-е) и Рис. 57f, соответственно. Более высокая точность характеристики частиц с большим показателем преломления обеспечивается как за счет более высокой интенсивности рассеяния и меньшего отношения сигнал/шум, так и благодаря возможности детекции бокового рассеяния (SSC), который используется в качестве дополнительной измеряемой оптической информации при решении обратной задачи (см. раздел 3.3). С уменьшением показателя преломления частиц происходит сильное уширение и перекрытие доверительных областей, что и является одной из причин невозможности точно разделить субпопуляции хиломикроннов и клеточных микровезикул в плазме по результатам их характеристики.

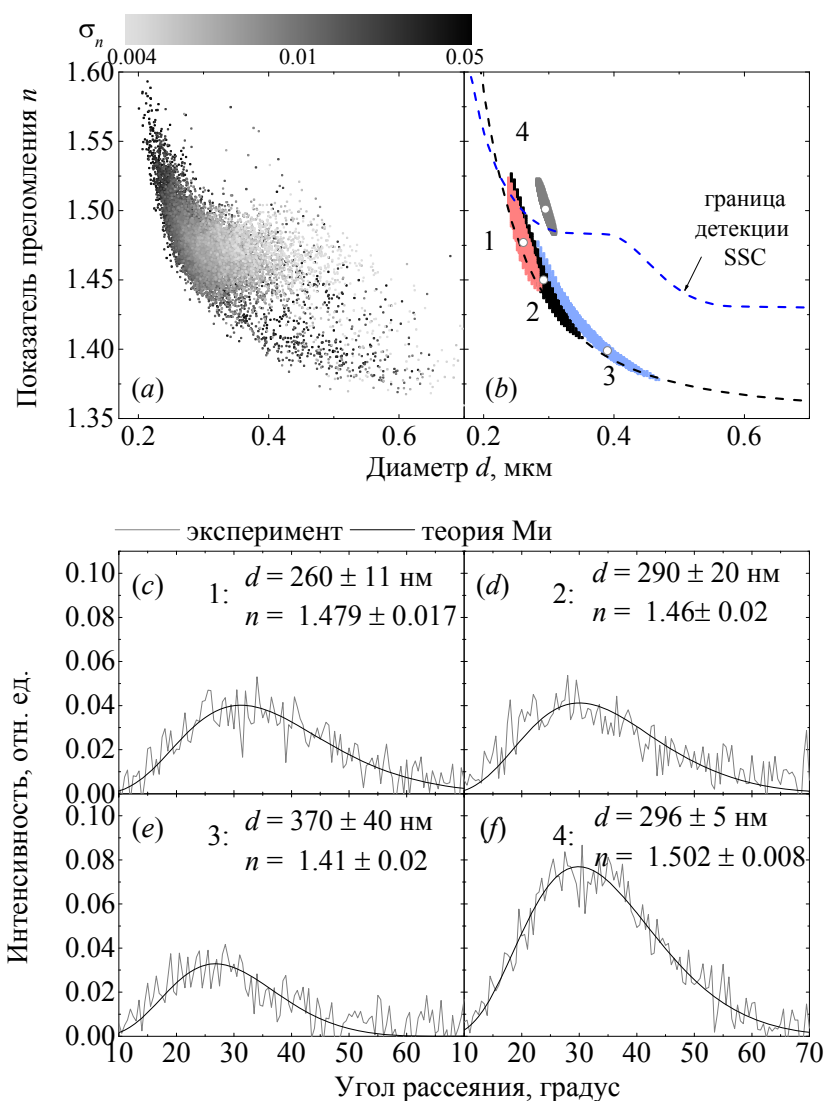


Рис. 57. (а) Точность определения показателя преломления в зависимости от параметров субмикронных частиц. (б) Характерные доверительные области параметров для четырех субмикронных частиц и соответствующие им индикатрисы светорассеяния с оценками размера и показателя преломления (с-ф).

#### 6.4.4. Постпрандиальная динамическая характеристика хиломикронов в плазме крови

Тот факт, что в область субмикронных частиц с показателем преломления 1.45 - 1.5 в действительности попадают преимущественно хиломикроны, также подтверждается динамикой изменения характеристик частиц, которая исследовалась у условно-здорового донора в течение 6 часов после приема пищи.

Известно, что в норме хиломикроны, образующиеся в эпителиальных клетках слизистой кишечника, начинают поступать в кровоток приблизительно через час после приема пищи, где через 3-4 часа их концентрация достигает максимума с постепенным выходом на нормальный уровень через 5-6 часов, и полностью исчезают через 10-12 часов [92].



Согласно проведенным измерениям, минимальная концентрация субмикронных частиц, действительно наблюдалась в плазме донора в начальный момент времени (Рис. 58а), когда кровь была сдана через 12 часов после крайнего приема пищи. В течение получаса после еды не наблюдалось значительных изменений ни в концентрации (Рис. 58а), ни в характеристиках частиц (Рис. 59а,б), которые были распределены в широких диапазонах, со смещением средних значений размера и показателя преломления в область детекции менее плотных частиц, т.е. в сторону увеличения размера и уменьшения показателя преломления, что характерно для плазмы крови, сданной натощак (см. также Рис. 53). О появлении хиломикрон в крови через час свидетельствует увеличившаяся практически в пять раз концентрация детектируемых субмикронных частиц и смещение их характеристик в область детекции хиломикрон (размер от 250-300 нм и показатель преломления около 1.5) (Рис. 59с), средние значения и форма распределений которых оставались практически неизменными до конца наблюдений (Рис. 59д-ф), что говорит об однородности их размера и состава по времени. Согласно измеренной динамике, концентрация хиломикрон в плазме крови действительно достигает максимума через 2.5-3 часа после приема пищи, превышая начальный уровень практически в 50 раз, после чего начинает уменьшаться с выходом на постоянный уровень  $(330 \pm 40) \times 10^9$  ед/л после 4 часов.

Изменение количества детектируемых в плазме хиломикрон хорошо согласуется с динамикой накопления триглицеридов в крови, количество которых определялось каждый час с помощью стандартного клинического теста (Рис. 58б). Хиломикроны в крови подвергаются быстрому гидролизу под действием липопротеин липазы, поэтому в течение первых трех часов,

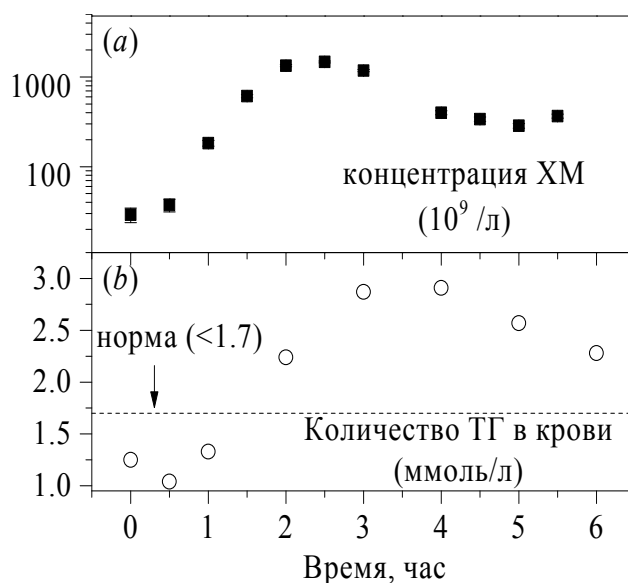


Рис. 58. Постпрандиальная динамика концентрации субмикронных частиц в плазме крови, детектируемых с помощью СПЦ (а), и уровня ТГ, определенном стандартным клиническим тестом (б).

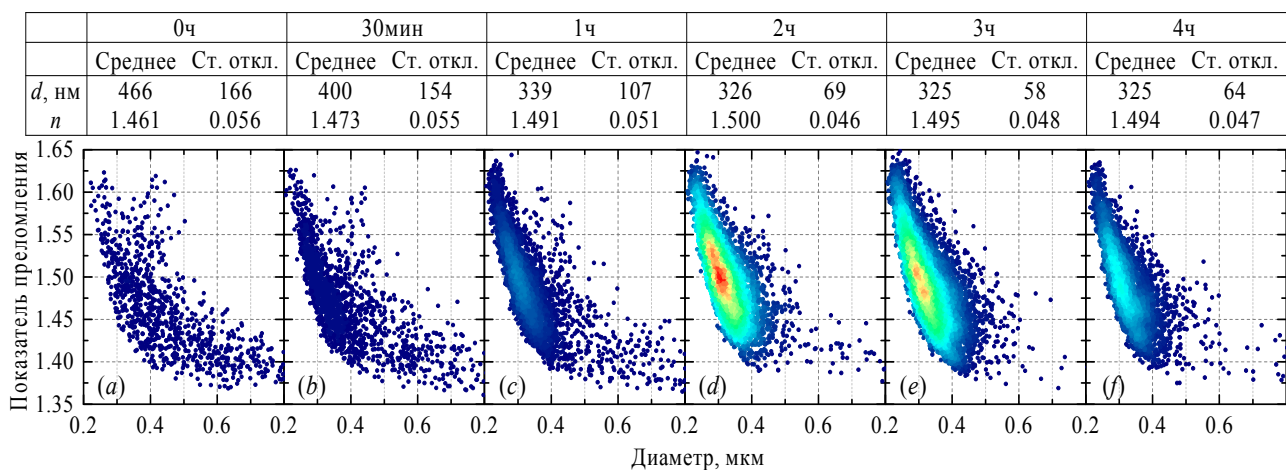


Рис. 59. Динамика распределений характеристик субмикронных частиц в плазме крови после еды. В таблице приведены соответствующие распределения средние значения и стандартные отклонения размера и показателя преломления.

когда скорость их поступления в кровь превышает скорость их элиминации, наблюдается рост количества триглицеридов с выходом на максимальный уровень 3 ммоль/л. К 4 часам процесс накопления хиломикроннов, по-видимому, приходит в равновесие с процессом их липолиза, и рост уровня триглицеридов замедляется. При этом часть триглицеридов поглощается тканями, а другая остается циркулировать в крови в виде остаточных частиц и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), которые находятся за пределом детекции СПЦ. Именно тот факт, что стандартный тест на уровень триглицеридов не разделяет жиры, входящие в состав разных классов частиц, объясняет расхождение в динамике процессов на Рис. 58а и б, согласно которой концентрация хиломикроннов в плазме крови уменьшается быстрее, чем количество триглицеридов, а большая часть триглицеридов начинает переноситься не крупными хиломикронами, а их ремнантами и ЛПОНП [282].

#### 6.4.5. Сравнительный анализ субмикронных частиц плазмы в норме и при риске атеросклероза

Проведенный в данной работе сравнительный анализ плазмы крови условно-здоровых доноров, сдавших кровь натощак и через 3 часа после приема пищи, и доноров с установленным риском атеросклероза, действительно показал повышенное содержание хиломикроннов у группы пациентов, подтверждая у них нарушение метаболизма и замедленное постпрандиальное поглощение экзогенных триглицеридов.

Результаты идентификации и характеристики тромбоцитов и субмикронных частиц в плазме крови, включая параметры распределений субмикронных частиц по размеру и показателю преломления, приведены для каждого донора в Таблице 14.

Несмотря на то, что в норме через 10-12 часов после крайнего приема пищи хиломикроны не должны наблюдаться в крови, согласно полученным данным, количество хиломикронов в плазме при атеросклерозе сопоставимо с их уровнем в норме через 3 часа после приема пищи, когда их содержание в крови достигает максимального значения. Также у данных групп сопоставимы и средние значения показателя преломления циркулирующих частиц, подтверждая общую природу их происхождения. На основании полученных данных, у исследуемых пациентов может быть установлена гиперлипопротеидемия I или V типа, однако для уточнения диагноза и определения соответствующего направления лечения необходимо проведение дополнительного клинического теста на уровень ЛП. В целом, проведенные пробные эксперименты позволяют рассматривать метод анализа субмикронных частиц с помощью СПЦ и полученные количественные показатели, включая долю субмикронных частиц в плазме и их показатель преломления, для определения постпрандиального уровня хиломикронов в крови как одного из факторов риска развития атеросклероза.

Таблица 14 Результаты идентификации и характеристики частиц плазмы условно здоровых доноров (натощак и через 3 часа после приема пищи) и доноров с риском атеросклероза (нарушением липидного обмена). Для основных классов идентифицированных частиц, включая тромбоциты (PLT) и субмикронные частицы плазмы [хиломикроны (CM) и микровезикулы (MV)], приведены их концентрации в плазме. Для размера и показателя преломления субмикронных частиц приведены средние значения ( $\mu$ )  $\pm$  стандартные отклонения среднего (SE), стандартные отклонения ( $\sigma$ ), медианы (med) и медианы погрешностей индивидуальных измерений ( $\delta$ ).

Концентрация частиц, 10 <sup>9</sup> /л		Характеризация субмикронных частиц							
PLT	CM, MV	Размер $d$ , нм				Показатель преломления $n$			
		$\mu \pm SE(d)$	$\sigma(d)$	med( $d$ )	$\delta(d)$	$\mu \pm SE(n)$	$\sigma(n)$	med( $n$ )	$\delta(n)$
условно здоровые доноры (натощак)									
214	8	453 $\pm$ 6	158	418	20	1.4433 $\pm$ 0.0016	0.0422	1.4351	0.011
208	54	394 $\pm$ 3	150	358	18	1.4590 $\pm$ 0.0012	0.0518	1.4534	0.014
241	29	466 $\pm$ 5	166	419	25	1.4608 $\pm$ 0.0019	0.0566	1.4514	0.02
условно здоровые доноры (3 часа после приема пищи)									
190	1424	327.1 $\pm$ 0.5	76.9	317.9	15	1.4857 $\pm$ 0.0003	0.0442	1.4788	0.017
240	1319	324.9 $\pm$ 0.6	58.5	318.2	17	1.4947 $\pm$ 0.0004	0.048	1.4908	0.022
207	1500	315.8 $\pm$ 0.8	83.5	297.5	13	1.5176 $\pm$ 0.0004	0.0398	1.5125	0.02
доноры с риском атеросклероза (натощак)									
291	860	312.6 $\pm$ 0.7	70.1	297.9	6	1.4855 $\pm$ 0.0002	0.0263	1.4856	0.008
318	1549	297.6 $\pm$ 0.6	70.5	285.9	10	1.5069 $\pm$ 0.0004	0.036	1.5016	0.014
218	1234	296.8 $\pm$ 0.6	74.6	283.3	9	1.5317 $\pm$ 0.0004	0.0462	1.5278	0.017

## 6.5. Заключение главы

В данной главе был разработан метод характеристики субмикронных частиц в плазме крови. Было предложено два альтернативных способа безфлуоресцентной идентификации сферических субмикронных частиц (клеточных микровезикул и хиломикронов) среди других частиц плазмы крови, включая тромбоциты. Характеризация микровезикул и хиломикронов осуществлялась в результате решения обратной задачи светорассеяния по индикатрисам светорассеяния, измеренным на СПЦ, с помощью теории Ми, используя также сигналы рассеяния вперед и бокового рассеяния в качестве дополнительной измеряемой оптической информации для повышения точности определения характеристик частиц. Точность определения размера составила одиночных частиц менее 20 нм, а показателя преломления от 0.008 до 0.02 (указаны медианные значения). В настоящий момент предел чувствительности СПЦ позволяет измерять микровезикулы размером от 350 нм и хиломикроны - от 250 нм.

Сравнение распределений характеристик частиц в плазме крови, полученной с помощью различных протоколов выделения плазмы, показало, что для ускорения проведения анализа альтернативой обычному осаждению может быть центрифугирование при малых скоростях (не более 200g), которое не оказывает существенного влияния ни на морфологические характеристики частиц, ни на оценку их концентрации.

Было проведено исследование возможности дифференциации субпопуляций микровезикул и хиломикронов по показателю преломления частиц. В результате сравнительного анализа распределений характеристик субмикронных частиц плазмы в контрольном образце плазмы (сданная натощак), и в плазме, сданной через 3ч после приема пищи, был определен диапазон для показателя преломления хиломикронов:  $1.487 \pm 0.048$  (среднее  $\pm$  стандартное отклонение). Достоверность этого в дальнейшем подтверждается измерением постпрандиальной динамики характеристик субмикронных частиц в плазме, и сравнением полученных результатов с результатами липидного анализа на триглицериды. На основании данных измерений также было показано, что динамика уровня триглицеридов в крови не в полной мере отражает динамику метаболизма хиломикронов, а потому анализ на содержание триглицеридов в крови не подходит для диагностики заболеваний, связанных с нарушением метаболизма хиломикронов, тем самым повышая диагностическую ценность разработанного метода.

На основании сравнительного анализа распределений частиц в контрольном образце и в образце плазмы после добавления агента активации тромбоцитов, было, во-первых, показано, что коллаген не подходит в качестве активирующего агента при исследовании микровезикул тромбоцитарного происхождения, поскольку его раствор содержит мицеллы, размер и показатель преломления которых сильно перекрываются с характеристиками микровезикул, а

во-вторых, было установлено, что распределение показателя преломления микровезикул очень широкое и попадает в диапазон значений хиломикронов. Это может быть связано с двумя факторами: с точностью определения показателя преломления одиночных субмикронных частиц, которой недостаточно для достоверной идентификации микровезикул на фоне липопротеиновых частиц, или с тем, что микровезикулы в действительности имеют большую вариабельность по составу и, соответственно, по показателю преломления.

В результате исследования плазмы крови доноров с риском атеросклероза было обнаружено повышенное содержание хиломикронов в крови по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует об их замедленном выведении из организма. Данные результаты подтверждают диагностическую ценность метода, а также открывают возможности для углубленного изучения роли хиломикронов в патогенезе атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

## Заключение

Биологические полидисперсные среды, содержащие разнородные популяции клеток и частиц биологического происхождения или назначения, являются широко распространенным объектом исследования в медицине, биотехнологии, биофизике и других областях науки, а разработка методов анализа подобных систем, включая кровь человека, различные эмульсии и суспензионные культуры клеток, является одной из актуальных проблем, связанных с их изучением. Среди множества методов, применимых для анализа дисперсных систем, особое место занимают оптические неинвазивные методы. Однако лишь единичные технологии из существующих совмещают в себе необходимые качества, включая высокую скорость, информативность, точность и статистическую достоверность анализа, необходимые для решения широкого спектра задач, связанных с исследованием рассматриваемых объектов.

Технология сканирующей проточной цитометрии (СПЦ), основанная на измерении угловой зависимости интенсивности рассеянного излучения (индикатрису) для одиночных частиц, обеспечивает не только статистическую точность анализа благодаря высокой скорости измерений (порядка  $10^2$  частиц в секунду), но также позволяет детально характеризовать морфологию (размер, форму и показатель преломления) частиц благодаря большому объему измеряемой информации, содержащейся в каждой индикатресе, и применению передовых методов решения прямой и обратной задачи светорассеяния.

Настоящая работа посвящена развитию технологии СПЦ для анализа сложных биологических полидисперсных систем, содержащих разнородные популяции клеток и частиц различных форм и размеров, включая биологические частицы в субмикронном диапазоне размеров.

В диссертационной работе разработаны алгоритмы, которые позволяют идентифицировать субпопуляции клеток и частиц на основе определения их формы и прецизионного измерения морфологических характеристик, высокая точность определения которых была достигнута благодаря усовершенствованию методов характеристики одиночных частиц по светорассеянию, измеряемому на СПЦ. Данные методы и алгоритмы были применены для (1) характеристики жировых частиц в молоке, (2) идентификации, статической и динамической характеристики шаровидных и палочковидных бактерий в суспензиях микроорганизмов, (3) идентификации и характеристики клеточных микровезикул и хиломикронов в плазме крови.

В работе было показано, что наиболее вероятным источником экспериментальных искажений, приводящих как к систематическому сдвигу оценок характеристик частиц, так и увеличению погрешности их определения на СПЦ, является отклонение траектории пролета

частицы от оптической оси прибора. В связи с этим было предложено несколько подходов для повышения точности и состоятельности оценок характеристик частиц при наличии неслучайных ошибок измерений индикатрисы светорассеяния, заключающихся в использовании дополнительной измеряемой информации, инвариантной к источнику данных искажений, и модификации процедуры нелинейной регрессии, включая: (1) дополнительное использование интегральных сигналов рассеяния (рассеяние вперед и бокового рассеяние) при решении обратной задачи для сферических субмикронных частиц; (2) использование Фурье-параметров индикатрисы для более крупных сферических частиц и частиц, имеющих небольшое отклонение от модели сферы; (3) использование модификации процедуры нелинейной регрессии с помощью обобщённого метода наименьших квадратов для несферических частиц, для которых применимость первых двух подходов имеет ограничения. Эффективность данных подходов была подтверждена сравнением полученных результатов измерения морфологических характеристик и показателей преломления частиц с результатами электронного и оптического микрокопирования и литературными данными.

Для возможности использования сигналов рассеяния вперед FSC и бокового рассеяния SSC в качестве дополнительно измеряемой оптической информации при решении обратной задачи был разработан алгоритм определения телесных углов сбора интенсивности данных сигналов, который применим для оценки угловых диапазонов измерений интегральных сигналов светорассеяния проточных цитометров любой оптической конфигурации с известной геометрией апертуры фотоприемника. Данный подход позволяет оценивать углы сбора FSC и SSC с точностью до нескольких долей градуса, что, в свою очередь, позволяет производить расчеты амплитуд данных сигналов для любых частиц и определять порог чувствительности прибора в пространстве параметров рассматриваемых объектов.

На основании усовершенствованных процедур решения обратной задачи светорассеяния, были разработаны и экспериментально проверены методы идентификации и характеристики жировых частиц молока, шаровидных и палочковидных бактерий и клеточных микровезикул и хиломикронов в плазме крови.

Представленный в Главе 4 метод характеристики жировых частиц молока, основанный на решении обратной задачи светорассеяния с использованием двух оптических моделей, сферы и сплюснутого сфероида, позволяет идентифицировать в жировой эмульсии субпопуляции частиц, для которых дополнительная модель сфероида обеспечивает лучшее совпадение измеренных индикатрис с теоретическими расчетами и, таким образом, повышает точность определения формы, размеров и показателей преломления одиночных частиц. Апробация метода на образцах сырого молока и молока, прошедшего технологическую обработку у разных производителей, показала, что измеряемые распределения жировых частиц

по размеру, площади поверхности и показателю преломления отражают степень обработки молока. При этом медианная погрешность одиночных измерений размера и показателя преломления частиц составила 74 нм и 0.0094 соответственно. Полученные результаты позволяют рассматривать технологию СПЦ, адаптированную для анализа жировых частиц молока, в качестве эффективного метода, который может применяться в условиях производства молока и молочных продуктов для контроля качества сырья и эффективности технологических процессов, например, гомогенизации, с целью предотвращения потери качества молочных продуктов в процессе обработки.

В Главе 5 разработаны методы характеристики простых форм шаровидных и палочковидных бактерий с использованием предварительно насчитанных баз данных теоретических индикатрис для несферических форм клеток (палочки, димеры шаров). Алгоритмы характеристики шаровидных бактерий с использованием оптических моделей гомогенного шара и димера из идентичных шаров позволяют надежно идентифицировать формы клеток в виде одиночных кокков и диплококков и определять параметры клеток с точностью до 20 нм и 0.003 для размера и показателя преломления одиночных кокков, 55 нм и 0.008 для размера и показателя преломления диплококков (приведена медианная погрешность определения характеристик одиночных бактерий по всей популяции). Метод характеристики палочковидных бактерий с использованием оптической модели цилиндра с полусферическими концами позволяет определять длину и диаметр одиночных бактерий с точностью 400 и 40 нм, соответственно. Апробация методов на четырех штаммах шаровидных бактерий *Micrococcus spp.* и трех видах палочковидных бактерий, включая *Bacillus subtilis* 1327, *Ochrobactrum sp.* 1325 и штаммы *Escherichia coli* XL2-Blue и XL10-GOLD продемонстрировала хорошее согласие между распределениями клеток по размерам (диаметр для шаровидных бактерий, диаметр и длина для палочковидных бактерий), построенными по результатам характеристики с помощью СПЦ, и по измерениям, полученным с помощью оптического микроскопа. На примере исследования роста культуры бактерий *Escherichia coli* В было показано, что высокая точность характеристики отдельных клеток, а также высокая скорость измерений позволяют использовать СПЦ не только для статической, но и для динамической характеристики бактериальных культур. Проведение измерений на СПЦ с одновременным контролем роста культуры клеток с помощью измерений оптической плотности и анализом морфологии бактерий на оптическом микроскопе показало, что средний объём бактерий является чувствительным индикатором фазы роста культуры, однако при этом динамика изменения функции распределения по объёму дополнительно показала наличие двух субпопуляций в исследуемой пробе. Помимо этого, в работе впервые была рассмотрена возможность идентификации и классификации бактерий в смешанных культурах, содержащих как сходные,



так и различающиеся по морфологии субпопуляции клеток, на основании измерений индикатрис одиночных клеток. Результаты, полученные с использованием двух различных подходов классификации: на основании решения обратной задачи светорассеяния с использованием нескольких оптических моделей формы клеток и по измеренным индикатрисам светорассеяния с помощью методов автоматического обучения, - показали сравнимую точность как при рассмотрении задач идентификации различающихся по форме клеток в смешанной культуре палочковидных и шаровидных бактерий, так и для задач идентификации бактерий внутри одного класса формы (видовая и штаммовая классификация), точность решения которых, как и следовало ожидать, показала сильную зависимость от степени перекрытия распределений морфологических характеристик отдельных субпопуляций клеток. Потенциальным решением данной проблемы является динамическая характеристика бактерий и разделение их субпопуляций по динамике их функций распределения по размерам, что является одной из приоритетных задач для дальнейших исследований культур бактерий с помощью СПЦ.

В Главе 6 был разработан метод характеристики субмикронных частиц в плазме крови. Было предложено два альтернативных способа безфлуоресцентной идентификации сферических субмикронных частиц (клеточных микровезикул и хиломикронов) среди других частиц плазмы крови, включая тромбоциты, адекватность и согласие которых прошли проверку на различных образцах плазмы, полученных из цельной крови, сданной натощак и после приема пищи, а также полученных с помощью различных способов выделения плазмы, с помощью осаждения и центрифугирования крови. Усовершенствованный метод характеристики субмикронных частиц по индикатрисе светорассеяния и интегральным сигналам рассеяния вперед и бокового рассеяния позволил определять размер и показатель преломления одиночных частиц с медианной точностью от 6 до 20 нм по размеру, и от 0.011 до 0.02 по показателю преломления (приведен разброс по измерениям для девяти доноров). Было проведено исследование возможности дифференциации субпопуляций микровезикул и хиломикронов по показателю преломления частиц. В результате сравнительного анализа распределений характеристик субмикронных частиц плазмы в контрольном образце плазмы (сданная натощак), и в плазме, сданной через 3ч после приема пищи, был определен диапазон для показателя преломления хиломикронов:  $1.487 \pm 0.048$  (среднее  $\pm$  стандартное отклонение). Его достоверность в дальнейшем была подтверждена измерением постпрандиальной динамики характеристик субмикронных частиц в плазме, и сравнением полученных результатов с результатами липидного анализа на триглицериды. На основании сравнительного анализа распределений частиц в контрольном образце и в образце плазмы после добавления агента активации тромбоцитов, было, во-первых, показано, что коллаген не подходит в качестве

активирующего агента при исследовании микровезикул тромбоцитарного происхождения, поскольку его раствор содержит мицеллы, размер и показатель преломления которых сильно перекрываются с характеристиками микровезикул. В результате активации тромбоцитов с помощью АДФ было установлено, что распределение показателя преломления микровезикул очень широкое (доверительный интервал уровня 95% для  $n$  составил от 1.385 до 1.500) и попадает в диапазон значений хиломикронов. В результате исследования плазмы крови доноров с риском атеросклероза было обнаружено повышенное содержание хиломикронов в крови по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует об их замедленном выведении из организма. Данные результаты подтверждают диагностическую ценность метода, а также открывают возможности для углубленного изучения роли хиломикронов в патогенезе атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

## Выводы

1. Разработан метод определения телесных углов сбора сигналов рассеяния вперед и бокового рассеяния триггерной системы СПЦ. На основании полученных оценок строго определена область детекции одиночных сферических субмикронных частиц с помощью СПЦ в параметрах размера и показателя преломления частиц, и показано, что обратная задача светорассеяния, заключающаяся в определении данных характеристик частиц по двум измеряемым интегральным сигналам светорассеяния, имеет однозначное решение только в ограниченном диапазоне параметров.
2. Показано, что отклонение траектории пролета частицы от оптической оси СПЦ приводит к систематическому сдвигу и увеличению погрешности определения ее характеристик, степень которых зависит от размера частицы. Предложено несколько способов повышения точности характеристики сферических и несферических частиц по светорассеянию при наличии неслучайных ошибок в измерении индикатрисы.
3. Разработаны методы характеристики биологических клеток и частиц различных форм и размеров, включая методы характеристики жировых частиц в молоке, простых форм шаровидных (кокки, диплококки) и палочковидных бактерий, а также методы безфлуоресцентной идентификации и характеристики сферических субмикронных частиц в плазме крови. Данные методы позволяют измерять статические характеристики исследуемых объектов (размеры и показатель преломления), а также наблюдать динамику их изменения при различных процессах (рост бактерий, постпрандиальный метаболизм хиломикронов в крови).
4. Разработаны подходы к идентификации и классификации разнородных популяций частиц в составе многокомпонентных биологических полидисперсных сред по индикатрисе светорассеяния в результате решения обратной задачи светорассеяния с использованием нескольких оптических моделей и их сравнения на основании различных статистических критериев.

### **Основные результаты диссертации докладывались на конференциях:**

1. 49-й и 51-й Международных научных студенческих конференциях «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 16-20 апреля 2011 г., 12-18 апреля 2013 г.);
2. XXVII, XXVIII и XXX конгрессах Международного общества развития цитометрии (Лейпциг, Германия, 23-27 июня 2012 г.; Сан-Диего, США, 19-22 мая 2013 г.; Глазго, Великобритания, 26-30 июня 2015 г.);
3. IV Международной молодежной школы-конференции «Теория и численные методы решения обратных и некорректных задач», Новосибирск, 5–12 августа 2012г.;
4. XV Международной конференции «Electromagnetic and Light Scattering» (Лейпциг, Германия, 21-26 июня 2015 г.)
5. Международной конференции «Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology», Новосибирск, 24-27 июня 2014 г.;
6. Научных семинарах в Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Институте молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Институте Биофизики СО РАН и Ягеллонском университете (Краков, Польша).

### **Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах::**

1. Konokhova A.I., Yurkin M.A., Moskalensky A.E., Chernyshev A.V., Tsvetovskaya G.A., Chikova E.D., Maltsev V.P. Light-scattering flow cytometry for identification and characterization of blood microparticles // J. Biomed. Opt.–2012–Vol. 17, № 5–P. 057006.
2. Konokhova A.I., Gelash A.A., Yurkin M.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. High-precision characterization of individual *E. coli* cell morphology by scanning flow cytometry // Cytometry A–2013–Vol. 83A, № 6–P. 568–575.
3. Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Konokhova A.I., Strokotov D.I., Nekrasov V.M., Chernyshev A.V., Tsvetovskaya G.A., Chikova E.D., Maltsev V.P. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering // J. Biomed. Opt. –2013–Vol. 18, № 1–P. 17001.
4. Konokhova A.I., Rodionov A.A., Gilev K.V., Mikhaelis I.M., Strokotov D.I., Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Enhanced characterisation of milk fat globules by their size, shape and refractive index with scanning flow cytometry // Int. Dairy J.–2014–Vol. 39, № 2–P. 316–323.
5. Konokhova A.I., Chernova D.N., Moskalensky A.E., Strokotov D.I., Yurkin M.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Super-resolved calibration-free flow cytometric characterization of platelets and cell-derived microparticles in platelet-rich plasma // Cytometry A–2016–Vol. 89, № 2–P. 159–168.

6. Konokhova A.I., Chernova D.N., Strokotov D.I., Karpenko A.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P., Yurkin M.A. Light-scattering gating and characterization of plasma microparticles // J. Biomed. Opt.–2016–Vol. 21, № 11–P. 115003–115003.
7. Litvinenko A. I., Moskalensky A.E., Karmadonova N.A., Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Konokhova A.I., Yurkin M.A., Pokushalov E.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Fluorescence-free flow cytometry for measurement of shape index distribution of resting, partially activated, and fully activated platelets // Cytometry A–2016–Vol. 89, № 11–P. 1010–1016.
8. Romanov A.V., Konokhova A.I., Yastrebova E.S., Gilev K.V., Strokotov D.I., Chernyshev A.V., Maltsev V.P., Yurkin M.A. Spectral solution of the inverse Mie problem // J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer–2017–Vol. 200–P. 280–294.

## Список литературы

1. Young K.D. The Selective Value of Bacterial Shape // *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006. Vol. 70, № 3. P. 660–703.
2. Воробьев А.А. et al. *Микробиология.* 2nd ed. М.: Медицина, 2003. 336 p.
3. Петрусов А.И., Котова Е.Б. *Микробиология.* 3rd ed. М.: Академия, 2006. 352 p.
4. Nebe-von-Caron G. et al. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting // *Journal of microbiological methods.* 2000. Vol. 42, № 1. P. 97–114.
5. Bridson E.Y., Gould G.W. Quantal microbiology // *Letters in Applied Microbiology.* 2000. Vol. 30, № 2. P. 95–98.
6. Jordana-Lluch E. et al. Improving the Diagnosis of Bloodstream Infections: PCR Coupled with Mass Spectrometry // *Biomed Res Int.* 2014. Vol. 2014.
7. Wiley: *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*, 3rd Edition - Richard K. Robinson [Electronic resource]. URL: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471385964.html> (accessed: 06.06.2016).
8. Nicolaou N., Xu Y., Goodacre R. Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species // *J. Dairy Sci.* 2010. Vol. 93, № 12. P. 5651–5660.
9. Singhal N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis // *Front Microbiol.* 2015. Vol. 6. P. 791.
10. Guo L. et al. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification // *J Thorac Dis.* 2014. Vol. 6, № 5. P. 534–538.
11. Prod'hom G. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets // *J. Clin. Microbiol.* 2010. Vol. 48, № 4. P. 1481–1483.
12. Ferreira L. et al. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry // *J. Clin. Microbiol.* 2010. Vol. 48, № 6. P. 2110–2115.
13. Mackay I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory // *Clinical Microbiology and Infection.* 2004. Vol. 10, № 3. P. 190–212.
14. Bonne N. et al. Elimination of false-positive polymerase chain reaction results resulting from hole punch carryover contamination // *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008. Vol. 20, № 1. P. 60–63.
15. Rogers G.B. et al. The exclusion of dead bacterial cells is essential for accurate molecular analysis of clinical samples // *Clinical Microbiology and Infection.* 2010. Vol. 16, № 11. P. 1656–1658.
16. Turner N. a. et al. Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents // *Journal of Applied Microbiology.* 2000. Vol. 89, № 5. P. 751–759.
17. Suller M. t. e., Lloyd D. Fluorescence monitoring of antibiotic-induced bacterial damage using flow cytometry // *Cytometry.* 1999. Vol. 35, № 3. P. 235–241.
18. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review // *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2016. Vol. 6, № 2. P. 71–79.
19. Bunthof C.J., Abee T. Development of a Flow Cytometric Method To Analyze Subpopulations of Bacteria in Probiotic Products and Dairy Starters // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. Vol. 68, № 6. P. 2934–2942.
20. Hewitt C.J., Nebe-Von-Caron G. The Application of Multi-Parameter Flow Cytometry to Monitor Individual Microbial Cell Physiological State // *Physiological Stress Responses in Bioprocesses.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. Vol. 89. P. 197–223.
21. Katsuragi T., Tani Y. Screening for microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell sorting // *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2000. Vol. 89, № 3. P. 217–222.
22. Stender H. et al. PNA for rapid microbiology // *Journal of Microbiological Methods.* 2002. Vol. 48, № 1. P. 1–17.

23. Suchwalko A., Buzalewicz I., Podbielska H. Statistical identification of bacteria species // *Microb. Pathog. Strateg. Combat. Sci. Technol. Educ.* 2013. P. 711–721.
24. Robinson J.P. et al. Using Scattering to Identify Bacterial Pathogens // *Opt. Photonics News*. 2011. Vol. 22, № 10. P. 20–27.
25. Bayraktar B. et al. Feature extraction from light-scatter patterns of *Listeria* colonies for identification and classification // *J Biomed Opt.* 2006. Vol. 11, № 3. P. 34006.
26. Banada P.P. et al. Label-free detection of multiple bacterial pathogens using light-scattering sensor // *Biosensors and Bioelectronics*. 2009. Vol. 24, № 6. P. 1685–1692.
27. Suchwalko A. et al. Bacteria species identification by the statistical analysis of bacterial colonies Fresnel patterns // *Opt. Express, OE*. 2013. Vol. 21, № 9. P. 11322–11337.
28. Wyatt P.J. Differential light scattering: a physical method for identifying living bacterial cells // *Appl Opt.* 1968. Vol. 7, № 10. P. 1879–1896.
29. Wyatt P.J. Identification of Bacteria by Differential Light Scattering. 1969. P. 1257–1258.
30. Wyatt P.J., Phillips D.T. Structure of single bacteria from light scattering. 1972. P. 493–501.
31. Rajwa B. et al. Automated classification of bacterial particles in flow by multiangle scatter measurement and support vector machine classifier // *Cytometry A*. 2008. Vol. 73, № 4. P. 369–379.
32. Venkatapathi M. et al. High speed classification of individual bacterial cells using a model-based light scatter system and multivariate statistics // *Appl Opt.* 2008. Vol. 47, № 5. P. 678–686.
33. Pan Y.-L. et al. Measurement and autocorrelation analysis of two-dimensional light-scattering patterns from living cells for label-free classification // *Cytometry*. 2011. Vol. 79A, № 4. P. 284–292.
34. Wilson B.K., Vigil G.D. Automated bacterial identification by angle resolved dark-field imaging // *Biomed Opt Express*. 2013. Vol. 4, № 9. P. 1692–1701.
35. Jo Y. et al. Label-free identification of individual bacteria using Fourier transform light scattering // *Opt. Express*. 2015. Vol. 23, № 12. P. 15792.
36. Barer M.R., Harwood C.R. Bacterial Viability and Culturability // *Advances in Microbial Physiology* / ed. Poole R.K. Academic Press, 1999. Vol. 41. P. 93–137.
37. Kell D.B. et al. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998. Vol. 73, № 2. P. 169–187.
38. Comas-Riu J., Rius N. Flow cytometry applications in the food industry // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009. Vol. 36, № 8. P. 999–1011.
39. Józwa W., Czaczyk K. Flow cytometric analysis of microbial contamination in food industry technological lines--initial study // *Acta. Sc.i Pol. Technol. Aliment.* 2012. Vol. 11, № 2. P. 110–119.
40. Harding S.E. Applications of light scattering in microbiology. 1986. P. 489–509.
41. Fouchet P. et al. Recent advances of flow cytometry in fundamental and applied microbiology // *Biol Cell*. 1993. Vol. 78, № 1–2. P. 95–109.
42. Diaspro A., Radicchi G., Nicolini C. Polarized light scattering: a biophysical method for studying bacterial cells // *IEEE Trans Biomed Eng.* 1995. Vol. 42, № 10. P. 1038–1043.
43. Skarstad K., Steen H.B., Boye E. Cell cycle parameters of slowly growing *Escherichia coli* B/r studied by flow cytometry. // *J Bacteriol.* 1983. Vol. 154, № 2. P. 656–662.
44. Steen H.B., Boye E. Bacterial growth studied by flow cytometry // *Cytometry*. 1980. Vol. 1, № 1. P. 32–36.
45. Steen H.B., Skarstad K., Boye E. Flow cytometry of bacteria: cell cycle kinetics and effects of antibiotics // *Ann N Y Acad Sci*. 1986. Vol. 468. P. 329–338.
46. Xu M., Katz A. Statistical interpretation of light anomalous diffraction by small particles and its applications in bio-agent detection and monitoring // *Light Scattering Reviews 3* / ed. Kokhanovsky A.A. Springer Berlin Heidelberg, 2008. P. 27–67.
47. Müller S., Nebe-von-Caron G. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities // *FEMS Microbiol Rev.* 2010.

48. Su X.-T. et al. 2D light scattering patterns of mitochondria in single cells // *Opt. Express*, OE. 2007. Vol. 15, № 17. P. 10562–10575.
49. Maltsev V.P. Scanning flow cytometry for individual particle analysis // *Rev Sci Instrum*. 2000. Vol. 71, № 1. P. 243–255.
50. Shvalov A.N. et al. Individual *Escherichia coli* cells studied from light scattering with the scanning flow cytometer // *Cytometry*. 2000. Vol. 41, № 1. P. 41–45.
51. FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY // *Handbook of Milk Composition* / ed. Jensen R.G. San Diego: Academic Press, 1995.
52. Spreer E. *Milk and Dairy Product Technology*. CRC Press, 1998. 506 p.
53. Michalski M.-C. et al. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese // *Le Lait*. 2003. Vol. 83, № 2. P. 131–143.
54. Michalski M.-C., Januel C. Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? // *Trends in Food Science & Technology*. 2006. Vol. 17, № 8. P. 423–437.
55. Argov N., Lemay D.G., German J.B. Milk fat globule structure and function: nanoscience comes to milk production // *Trends in Food Science & Technology*. 2008. Vol. 19, № 12. P. 617–623.
56. Wiking L. et al. Milk fat globule size is affected by fat production in dairy cows // *International Dairy Journal*. 2004. Vol. 14, № 10. P. 909–913.
57. Mesilati-Stahy R., Argov-Argaman N. The relationship between size and lipid composition of the bovine milk fat globule is modulated by lactation stage // *Food Chemistry*. 2014. Vol. 145. P. 562–570.
58. Barłowska J. et al. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2011. Vol. 10, № 6. P. 291–302.
59. Huppertz T., Kelly A.L. *Physical Chemistry of Milk Fat Globules* // *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* / ed. Fox P.F., McSweeney P.L.H. Springer US, 2006. P. 173–212.
60. Lopez C. Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2011. Vol. 16, № 5. P. 391–404.
61. Freudenstein C. et al. Preparation and characterization of the inner coat material associated with fat globule membranes from bovine and human milk // *Experimental Cell Research*. 1979. Vol. 118, № 2. P. 277–294.
62. Singh H. The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2006. Vol. 11, № 2–3. P. 154–163.
63. Keenan T.W. Historical Perspective: Milk Lipid Globules and Their Surrounding Membrane: A Brief History and Perspectives for Future Research // *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001. Vol. 6, № 3. P. 365–371.
64. Ong L. et al. The Effect of Milk Processing on the Microstructure of the Milk Fat Globule and Rennet Induced Gel Observed Using Confocal Laser Scanning Microscopy // *Journal of Food Science*. 2010. Vol. 75, № 3. P. E135–E145.
65. Zamora A. et al. Changes in the surface protein of the fat globules during ultra-high pressure homogenisation and conventional treatments of milk // *Food Hydrocolloids*. 2012. Vol. 29, № 1. P. 135–143.
66. Остроумова. *Химия и физика молока*. Кемерово: КемТИПП, 2004. 196 p.
67. Keenan T.W., Moon T.-W., Dylewski D.P. Lipid Globules Retain Globule Membrane Material After Homogenization // *Journal of Dairy Science*. 1983. Vol. 66, № 2. P. 196–203.
68. Lopez C. Focus on the supramolecular structure of milk fat in dairy products // *Reproduction Nutrition Development*. 2005. Vol. 45, № 4. P. 497–511.
69. Michalski M.C. et al. Native vs. Damaged Milk Fat Globules: Membrane Properties Affect the Viscoelasticity of Milk Gels // *Journal of Dairy Science*. 2002. Vol. 85, № 10. P. 2451–2461.
70. Salentinig S. et al. Formation of Highly Organized Nanostructures during the Digestion of Milk // *ACS Nano*. 2013. Vol. 7, № 12. P. 10904–10911.



71. Michalski M.C. et al. Microfiltration of Raw Whole Milk to Select Fractions with Different Fat Globule Size Distributions: Process Optimization and Analysis // *Journal of Dairy Science*. 2006. Vol. 89, № 10. P. 3778–3790.
72. Lopez C. et al. Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains // *Food Chemistry*. 2011. Vol. 125, № 2. P. 355–368.
73. Garcia C. et al. The size and interfacial composition of milk fat globules are key factors controlling triglycerides bioavailability in simulated human gastro-duodenal digestion // *Food Hydrocolloids*. 2014. Vol. 35. P. 494–504.
74. Truong T. et al. Techniques to Measure Milk Fat Globule size // *Effect of Milk Fat Globule Size on the Physical Functionality of Dairy Products*. Cham: Springer International Publishing, 2016. P. 11–14.
75. Walstra P., Oortwijn H. Estimating globule-size distribution of oil-in-water emulsions by coulter counter // *Journal of Colloid and Interface Science*. 1969. Vol. 29, № 3. P. 424–431.
76. Michalski M.-C., Briard V., Michel F. Optical parameters of milk fat globules for laser light scattering measurements // *Le Lait*. 2001. Vol. 81, № 6. P. 787–796.
77. Hillbrick G., McMahon D., Deeth H. Electrical Impedance Particle Size Method (Coulter Counter) Detects the Large Fat Globules in Poorly Homogenized UHT Processed Milk // *Australian Journal of Dairy Technology*. 1998. № 53. P. 17–21.
78. Miles C.A., Shore D., Langley K.R. Attenuation of ultrasound in milks and creams // *Ultrasonics*. 1990. Vol. 28, № 6. P. 394–400.
79. Wade T., Beattie J.K. Electroacoustic determination of size and zeta potential of fat globules in milk and cream emulsions // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1997. Vol. 10, № 2. P. 73–85.
80. Cheong F.C., Xiao K., Grier D.G. Technical note: Characterizing individual milk fat globules with holographic video microscopy // *Journal of Dairy Science*. 2009. Vol. 92, № 1. P. 95–99.
81. Konokhova A.I. et al. Enhanced characterisation of milk fat globules by their size, shape and refractive index with scanning flow cytometry // *Int. Dairy J.* 2014. Vol. 39, № 2. P. 316–323.
82. Nolan J.P., Jones J.C. Detection of platelet vesicles by flow cytometry // *Platelets*. 2017. Vol. 28, № 3. P. 256–262.
83. Nakajima K. et al. Apolipoprotein B-48 // *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, 2014. Vol. 64. P. 117–177.
84. Биохимия. Учебник для ВУЗов. под ред. Е.С.Северина. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. 779 p.
85. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 5th ed / ed. Vance D.E., Vance J.E. Amsterdam ; Boston: Elsevier, 2008. 631 p.
86. Green P.H., Glickman R.M. Intestinal lipoprotein metabolism. // *J. Lipid Res.* 1981. Vol. 22, № 8. P. 1153–1173.
87. Lossow W.J. et al. Particle size and protein content of six fractions of the Sf > 20 plasma lipoproteins isolated by density gradient centrifugation // *J. Lipid Res.* 1969. Vol. 10, № 1. P. 68–76.
88. Haberbosch W., Poli A., Augustin J. Characterization of human chylomicrons // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1982. Vol. 713, № 2. P. 398–409.
89. Karpe F. et al. Chylomicron/chylomicron remnant turnover in humans: evidence for margination of chylomicrons and poor conversion of larger to smaller chylomicron remnants. // *J. Lipid Res.* 1997. Vol. 38, № 5. P. 949–961.
90. Proctor S.D., Vine D.F., Mamo J.C.L. Arterial Permeability and Efflux of Apolipoprotein B–Containing Lipoproteins Assessed by In Situ Perfusion and Three-Dimensional Quantitative Confocal Microscopy // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004. Vol. 24, № 11. P. 2162–2167.
91. Irawati D. et al. Dietary fat and physiological determinants of plasma chylomicron remnant homeostasis in normolipidaemic subjects: insight into atherogenic risk // *British Journal of Nutrition*. 2017. Vol. 117, № 03. P. 403–412.
92. Gibney M.J. et al. *Introduction to Human Nutrition*. John Wiley & Sons, 2013. 719 p.

93. Grundy S.M., Mok H.Y. Chylomicron clearance in normal and hyperlipidemic man // *Metab. Clin. Exp.* 1976. Vol. 25, № 11. P. 1225–1239.
94. Cohen J.C. Chylomicron triglyceride clearance: comparison of three assessment methods. // *Am J Clin Nutr.* 1989. Vol. 49, № 2. P. 306–313.
95. Климов А.Н., Никульчева Н.Г., Маграчева Е.Я. Фенотипирование гиперлипопротеидемий. М., 1975. 35 p.
96. Casdorph H.R. Treatment of the Hyperlipidemic States. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas, 1971. 434 p.
97. Schettler G. Lipids and Lipidoses. Springer Science & Business Media, 2012. 637 p.
98. McNeely S. et al. The 16-hour-standing test and lipoprotein electrophoresis compared for detection of chylomicrons in plasma. // *Clinical chemistry.* 1981. Vol. 27, № 5. P. 731–732.
99. Mero N. et al. Postprandial metabolism of apolipoprotein B-48- and B-100-containing particles in type 2 diabetes mellitus: relations to angiographically verified severity of coronary artery disease // *Atherosclerosis.* 2000. Vol. 150, № 1. P. 167–177.
100. Cohn J.S. Are we ready for a prospective study to investigate the role of chylomicrons in cardiovascular disease? // *Atherosclerosis Supplements.* 2008. Vol. 9, № 2. P. 15–18.
101. Redgrave T.G. Chylomicrons in disease-future challenges // *Atherosclerosis Supplements.* 2008. Vol. 9, № 2. P. 3–6.
102. Tomkin G.H., Owens D. The Chylomicron: Relationship to Atherosclerosis // *International Journal of Vascular Medicine.* 2011. Vol. 2012. P. e784536.
103. Pal S. et al. Identification of Lipoproteins of Intestinal Origin in Human Atherosclerotic Plaque // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2003. Vol. 41, № 6.
104. Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma // *British Journal of Haematology.* 1967. Vol. 13, № 3. P. 269–288.
105. Heijnen H.F.G. et al. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and  $\alpha$ -Granules // *Blood.* 1999. Vol. 94, № 11. P. 3791–3799.
106. Barteneva N.S. et al. Circulating microparticles: square the circle // *BMC cell biology.* 2013. Vol. 14, № 1. P. 23.
107. Berckmans R.J. et al. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation // *Thromb. Haemost.* 2001. Vol. 85, № 4. P. 639–646.
108. Owens A.P., Mackman N. Microparticles in Hemostasis and Thrombosis // *Circulation Research.* 2011. Vol. 108, № 10. P. 1284–1297.
109. Arraud N. et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration // *J Thromb Haemost.* 2014. Vol. 12, № 5. P. 614–627.
110. Dragovic R.A. et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis // *Nanomedicine.* 2011. Vol. 7, № 6. P. 780–788.
111. Hargett L.A., Bauer N.N. On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication // *Pulm Circ.* 2013. Vol. 3, № 2. P. 329–340.
112. Pol E. van der et al. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles // *Pharmacol Rev.* 2012. Vol. 64, № 3. P. 676–705.
113. Piccin A., Murphy W.G., Smith O.P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications // *Blood Reviews.* 2007. Vol. 21, № 3. P. 157–171.
114. Ratajczak J. et al. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication // *Leukemia.* 2006. Vol. 20, № 9. P. 1487–1495.
115. Mause S.F., Weber C. Microparticles Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange // *Circulation Research.* 2010. Vol. 107, № 9. P. 1047–1057.
116. Yuana Y., Sturk A., Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions // *Blood Rev.* 2013. Vol. 27, № 1. P. 31–39.
117. Enjeti A.K., Lincz L.F., Seldon M. Microparticles in health and disease // *Semin. Thromb. Hemost.* 2008. Vol. 34, № 7. P. 683–691.

118. EL Andaloussi S. et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities // *Nat Rev Drug Discov*. 2013. Vol. 12, № 5. P. 347–357.
119. Lannigan J., P. Nolan J., Zucker R. Measurement of extracellular vesicles and other submicron size particles by flow cytometry // *Cytometry*. 2016. Vol. 89, № 2. P. 109–110.
120. Ayers L. et al. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: Sources of variability within the assay // *Thrombosis Research*. 2011. Vol. 127, № 4. P. 370–377.
121. Yuana Y., Bertina R.M., Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles // *Thromb Haemost*. 2011. Vol. 105, № 3. P. 396–408.
122. Lacroix R. et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012. Vol. 10, № 3. P. 437–446.
123. Poncelet P. et al. Tips and tricks for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles // *Transf Apheres Sci*. 2015. Vol. 53, № 2. P. 110–126.
124. Chandler W.L. Measurement of microvesicle levels in human blood using flow cytometry // *Cytometry*. 2016. Vol. 90, № 4. P. 326–336.
125. Sódar B.W. et al. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6. P. 24316.
126. Cantero M. et al. Interference of Chylomicrons in Analysis of Platelets by Flow Cytometry // *Thrombosis Research*. 1998. Vol. 91, № 1. P. 49–52.
127. György B. et al. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters // *Blood*. 2011. Vol. 117, № 4. P. e39-48.
128. Lacroix R. et al. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop // *J Thromb Haemost*. 2013.
129. Cointe S. et al. Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017. Vol. 15, № 1. P. 187–193.
130. Linares R. et al. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles // *J Extracell Vesicles*. 2015. Vol. 4.
131. Dey-Hazra E. et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing // *Vasc Health Risk Manag*. 2010. Vol. 6. P. 1125–1133.
132. Chandler W.L. Microparticle counts in platelet-rich and platelet-free plasma, effect of centrifugation and sample-processing protocols // *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013. Vol. 24, № 2. P. 125–132.
133. Böing A.N. et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography // *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014. Vol. 3, № 0.
134. van der Pol E. et al. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles // *J Thromb Haemost*. 2016. Vol. 14, № 1. P. 48–56.
135. Shapiro H.M. *Practical Flow Cytometry*. 4 edition. New York: John Wiley & Sons, 2003. 736 p.
136. Erdbrügger U., Lannigan J. Analytical challenges of extracellular vesicle detection: A comparison of different techniques // *Cytometry*. 2016. Vol. 89, № 2. P. 123–134.
137. Nolan J.P. *Flow Cytometry of Extracellular Vesicles: Potential, Pitfalls, and Prospects* // *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc., 2001.
138. Shah M.D. et al. Flow cytometric measurement of microparticles: Pitfalls and protocol modifications // *Platelets*. 2008. Vol. 19, № 5. P. 365–372.
139. van der Pol E. et al. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry // *J Thromb Haemost*. 2012. Vol. 10, № 5. P. 919–930.
140. Nolan J.P., Stoner S.A. A trigger channel threshold artifact in nanoparticle analysis // *Cytometry Part A*. 2013. Vol. 83A, № 3. P. 301–305.

141. Poncelet P. et al. Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter-based triggering: Forward or side scatter? // *Cytometry*. 2016. Vol. 89, № 2. P. 148–158.
142. Arraud N. et al. Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry // *Cytometry*. 2016. Vol. 89, № 2. P. 184–195.
143. van der Vlist E.J. et al. Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry // *Nat. Protocols*. 2012. Vol. 7, № 7. P. 1311–1326.
144. Hoen E.N.M.N.-'t et al. Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2012. Vol. 8, № 5. P. 712–720.
145. Kormelink T.G. et al. Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry // *Cytometry*. 2016. Vol. 89, № 2. P. 135–147.
146. Zwaal R.F., Schroit A.J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells // *Blood*. 1997. Vol. 89, № 4. P. 1121–1132.
147. Connor D.E. et al. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib // *Thromb. Haemost.* 2010. Vol. 103, № 5. P. 1044–1052.
148. Latham S.L. et al. Immuno-analysis of microparticles: probing at the limits of detection // *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5. P. 16314.
149. Stoner S.A. et al. High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles // *Cytometry*. 2016. Vol. 89, № 2. P. 196–206.
150. Robert S. et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009. Vol. 7, № 1. P. 190–197.
151. Konokhova A.I. et al. Light-scattering gating and characterization of plasma microparticles // *J. Biomed. Opt.* 2016. Vol. 21, № 11. P. 115003–115003.
152. Mullier F. et al. More on: calibration for the measurement of microparticles: needs, interests, and limitations of calibrated polystyrene beads for flow cytometry-based quantification of biological microparticles // *J Thromb Haemost.* 2011. Vol. 9, № 8. P. 1679–1681.
153. van der Pol E. et al. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing // *J Thromb Haemost.* 2014. Vol. 12, № 7. P. 1182–1192.
154. van der Pol E. et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes // *J Thromb Haemost.* 2010. Vol. 8, № 12. P. 2596–2607.
155. Yuana Y. et al. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles // *J Thromb Haemost.* 2010. Vol. 8, № 2. P. 315–323.
156. Yuana Y. et al. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma // *J Extracell Vesicles*. 2013. Vol. 2.
157. Issman L. et al. Cryogenic transmission electron microscopy nanostructural study of shed microparticles // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 12. P. e83680.
158. Dragovic R.A. et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis // *Nanomedicine*. 2011. Vol. 7, № 6. P. 780–788.
159. Gardiner C. et al. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis // *J Extracell Vesicles*. 2013. Vol. 2, № 1.
160. Zwicker J. Impedance-Based Flow Cytometry for the Measurement of Microparticles // *Semin Thromb Hemost.* 2010. Vol. 36, № 08. P. 819–823.
161. Coumans F.A.W. et al. Reproducible extracellular vesicle size and concentration determination with tunable resistive pulse sensing // *J Extracell Vesicles*. 2014. Vol. 3, № 0.
162. Filipe V., Hawe A., Jiskoot W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates // *Pharm Res*. 2010. Vol. 27, № 5. P. 796–810.

163. Anderson W. et al. Observations of Tunable Resistive Pulse Sensing for Exosome Analysis: Improving System Sensitivity and Stability // *Langmuir*. 2015. Vol. 31, № 23. P. 6577–6587.
164. Mørk M. et al. Preanalytical, analytical, and biological variation of blood plasma submicron particle levels measured with nanoparticle tracking analysis and tunable resistive pulse sensing // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2016. Vol. 76, № 5. P. 349–360.
165. van der Pol E. et al. Refractive Index Determination of Nanoparticles in Suspension Using Nanoparticle Tracking Analysis // *Nano Lett*. 2014.
166. Gardiner C. et al. Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles // *J Extracell Vesicles*. 2014. Vol. 3.
167. Anderson W. et al. A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013. Vol. 405. P. 322–330.
168. Maltsev V.P., Semyanov K.A. *Characterisation of Bio-Particles from Light Scattering*. Utrecht: VSP, 2004. 132 p.
169. Fulwyler M.J. Electronic Separation of Biological Cells by Volume // *Science*. 1965. Vol. 150, № 3698. P. 910–911.
170. Robinson J.P., Roederer M. Flow cytometry strikes gold // *Science*. 2015. Vol. 350, № 6262. P. 739–740.
171. Givan A.L. *Flow Cytometry: First Principles*. 2 edition. New York: Wiley-Liss, 2001. 296 p.
172. In *Living Color: Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting*. Softcover reprint of the original 1st ed. 2000 edition / ed. Diamond R.A., DeMaggio S. Berlin Heidelberg: Springer, 2013. 800 p.
173. Perfetto S.P., Chattopadhyay P.K., Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system // *Nat Rev Immunol*. 2004. Vol. 4, № 8. P. 648–655.
174. Saeys Y., Gassen S.V., Lambrecht B.N. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data // *Nat Rev Immunol*. 2016. Vol. 16, № 7. P. 449–462.
175. Nolan J.P., Condello D. *Spectral Flow Cytometry* // *Curr Protoc Cytom*. 2013. Vol. CHAPTER. P. Unit1.27.
176. Bandura D.R. et al. Mass Cytometry: Technique for Real Time Single Cell Multitarget Immunoassay Based on Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometry // *Anal. Chem*. 2009. Vol. 81, № 16. P. 6813–6822.
177. Salzman G.C. Light scatter: detection and usage // *Current Protocols in Cytometry*. 2001. P. 1–13.
178. McGrath K.E., Bushnell T.P., Palis J. Multispectral Imaging of Hematopoietic Cells: Where Flow Meets Morphology // *J Immunol Methods*. 2008. Vol. 336, № 2. P. 91–97.
179. Barteneva N.S., Fasler-Kan E., Vorobjev I.A. Imaging Flow Cytometry // *J Histochem Cytochem*. 2012. Vol. 60, № 10. P. 723–733.
180. Han Y. et al. Review: imaging technologies for flow cytometry // *Lab Chip*. 2016. Vol. 16, № 24. P. 4639–4647.
181. Merola F. et al. Tomographic flow cytometry by digital holography // *Light Sci Appl*. 2017. Vol. 6, № 4. P. e16241.
182. Cheong F.C. et al. Holographic characterization of individual colloidal spheres' porosities // *Soft Matter*. 2011. Vol. 7, № 15. P. 6816.
183. Bartholdi M. et al. Differential light scattering photometer for rapid analysis of single particles in flow // *Appl Opt*. 1980. Vol. 19, № 10. P. 1573–1581.
184. Meyer R.A. et al. Light-scattering patterns of isolated oligodendroglia // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1974. Vol. 22, № 7. P. 594–597.
185. Salzman G.C. et al. A flow-system multiangle light-scattering instrument for cell characterization // *Clinical chemistry*. 1975. Vol. 21, № 9. P. 1297–1304.
186. Loken M.R., Sweet R.G., Herzenberg L.A. Cell discrimination by multiangle light scattering. // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1976. Vol. 24, № 1. P. 284–291.

187. Neukammer J. et al. Angular distribution of light scattered by single biological cells and oriented particle agglomerates // *Appl. Opt., AO*. 2003. Vol. 42, № 31. P. 6388–6397.
188. Su X.-T. et al. Measurements of light scattering in an integrated microfluidic waveguide cytometer // *J. Biomed. Opt.* 2008. Vol. 13, № 2. P. 024024-024024-10.
189. Jacobs K.M., Lu J.Q., Hu X.-H. Development of a diffraction imaging flow cytometer // *Opt Lett*. 2009. Vol. 34, № 19. P. 2985–2987.
190. Kaye P.H. Spatial light-scattering analysis as a means of characterizing and classifying non-spherical particles // *Measurement Science and Technology*. 1998. Vol. 9, № 2. P. 141.
191. Dong K. et al. Label-free classification of cultured cells through diffraction imaging // *Biomed Opt Express*. 2011. Vol. 2, № 6. P. 1717–1726.
192. Su X. et al. Pattern recognition cytometry for label-free cell classification by 2D light scattering measurements // *Optics Express*. 2015. Vol. 23, № 21. P. 27558.
193. Hulst H.C. van de, *Physics. Light Scattering by Small Particles*. Corrected Edition edition. New York: Dover Publications, 1981. 496 p.
194. Bohren C.F., Huffman D.R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. New York: Wiley, 1983. 544 p.
195. Mishchenko M.I., Travis L.D. Capabilities and limitations of a current FORTRAN implementation of the T-matrix method for randomly oriented, rotationally symmetric scatterers // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 1998. Vol. 60, № 3. P. 309–324.
196. Mishchenko M.I., Travis L.D., Mackowski D.W. NASA GISS: Scattering -- T-Matrix Codes [Electronic resource]. URL: [http://www.giss.nasa.gov/staff/mmishchenko/t\\_matrix.html](http://www.giss.nasa.gov/staff/mmishchenko/t_matrix.html).
197. Yurkin M.A., Maltsev V.P., Hoekstra A.G. The discrete dipole approximation for simulation of light scattering by particles much larger than the wavelength // *J Quant Spectrosc Radiat Transfer*. 2007. Vol. 106, № 1–3. P. 546–557.
198. Mishchenko M.I., Travis L.D., Mackowski D.W. T-matrix computations of light scattering by nonspherical particles: A review // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 1996. Vol. 55, № 5. P. 535–575.
199. Doicu A., Wriedt T., Eremin Y.A. *Light Scattering by Systems of Particles: Null-Field Method with Discrete Sources: Theory and Programs*. 2006 edition. Berlin; New York: Springer, 2006. 322 p.
200. Moskalensky A.E. et al. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering // *J Biomed Opt*. 2013. Vol. 18, № 1. P. 17001.
201. Yurkin M.A. et al. Systematic comparison of the discrete dipole approximation and the finite difference time domain method for large dielectric scatterers // *Opt. Express, OE*. 2007. Vol. 15, № 26. P. 17902–17911.
202. Gilev K.V. et al. Comparison of the discrete dipole approximation and the discrete source method for simulation of light scattering by red blood cells // *Opt. Express, OE*. 2010. Vol. 18, № 6. P. 5681–5690.
203. Maltsev V.P., Lopatin V.N. Parametric solution of the inverse light-scattering problem for individual spherical particles // *Appl. Opt., AO*. 1997. Vol. 36, № 24. P. 6102–6108.
204. Zhang L. et al. Scattering pulse of label free fine structure cells to determine the size scale of scattering structures // *Review of Scientific Instruments*. 2016. Vol. 87, № 4. P. 044301.
205. Min S.L., Gomez A. High-resolution size measurement of single spherical particles with a fast Fourier transform of the angular scattering intensity // *Applied Optics*. 1996. Vol. 35, № 24. P. 4919.
206. Semyanov K.A. et al. Single-particle sizing from light scattering by spectral decomposition // *Appl Opt*. 2004. Vol. 43, № 26. P. 5110–5115.
207. Yu S. et al. A novel method of diffraction imaging flow cytometry for sizing microspheres // *Opt. Express, OE*. 2012. Vol. 20, № 20. P. 22245–22251.
208. Ludlow I.K., Everitt J. Application of Gegenbauer analysis to light scattering from spheres: Theory // *Phys. Rev. E*. 1995. Vol. 51, № 3. P. 2516–2526.

209. Tycko D.H. et al. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration // *Appl Opt.* 1985. Vol. 24, № 9. P. 1355.
210. Green R.E. et al. Flow cytometric determination of size and complex refractive index for marine particles: comparison with independent and bulk estimates // *Appl Opt.* 2003. Vol. 42, № 3. P. 526–541.
211. Romanov A.V. et al. Spectral solution of the inverse Mie problem // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer.* 2017. Vol. 200. P. 280–294.
212. Tarasov P. et al. OPTICS OF ERYTHROCYTES // *Optics of Biological Particles.* Springer, Dordrecht, 2007. P. 243–259.
213. Semyanov K. et al. OPTICS OF LEUCOCYTES // *Optics of Biological Particles.* Springer, Dordrecht, 2007. P. 269–280.
214. Haykin S.O. *Neural Networks and Learning Machines.* 3 edition. New York: Pearson, 2008. 936 p.
215. Crosta G.F. et al. Automated classification of single airborne particles from two-dimensional angle-resolved optical scattering (TAOS) patterns by non-linear filtering // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer.* 2013. Vol. 131. P. 215–233.
216. Ulanowski Z. et al. Application of neural networks to the inverse light scattering problem for spheres // *Appl. Opt., AO.* 1998. Vol. 37, № 18. P. 4027–4033.
217. Berdnik V.V. et al. Characterization of spherical particles using high-order neural networks and scanning flow cytometry // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer.* 2006. Vol. 102, № 1. P. 62–72.
218. Apostolopoulos G., Tsinopoulos S.V., Dermatas E. A methodology for estimating the shape of biconcave red blood cells using multicolor scattering images // *Biomedical Signal Processing and Control.* 2013. Vol. 8, № 3. P. 263–272.
219. Jones D.R., Perttunen C.D., Stuckman B.E. Lipschitzian optimization without the Lipschitz constant // *J Optim Theory Appl.* 1993. Vol. 79, № 1. P. 157–181.
220. Bartholomew-Biggs M.C., Ulanowski Z.J., Zakovic S. Using Global Optimization for a Microparticle Identification Problem with Noisy Data // *J Glob Optim.* 2005. Vol. 32, № 3. P. 325–347.
221. Strokotov D.I. et al. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, № 6. P. 064036.
222. Zharinov A. et al. A study of light scattering of mononuclear blood cells with scanning flow cytometry // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer.* 2006. Vol. 102, № 1. P. 121–128.
223. Strokotov D.I. et al. Polarized light-scattering profile-advanced characterization of nonspherical particles with scanning flow cytometry // *Cytometry A.* 2011. Vol. 79, № 7. P. 570–579.
224. Kolesnikova I.V. et al. Determination of volume, shape and refractive index of individual blood platelets // *J Quant Spectrosc Radiat Transfer.* 2006. Vol. 102. P. 37–45.
225. Pyhtila J.W., Wax A. Polarization effects on scatterer sizing accuracy analyzed with frequency-domain angle-resolved low-coherence interferometry // *Appl. Opt., AO.* 2007. Vol. 46, № 10. P. 1735–1741.
226. Wojtkiewicz S. et al. Optical method for characterization of nanoplates in lysol // *Microelectronic Engineering.* 2013. Vol. 108. P. 121–126.
227. Yurkin M.A. et al. Discrimination of granulocyte subtypes from light scattering: theoretical analysis using a granulated sphere model // *Opt Exp.* 2007. Vol. 15. P. 16561–16580.
228. Xu S., Liu J., Sun Z. Optical factors determined by the T-matrix method in turbidity measurement of absolute coagulation rate constants // *J Colloid Interface Sci.* 2006. Vol. 304, № 1. P. 107–114.
229. Yurkin M.A., Hoekstra A.G. The discrete-dipole-approximation code ADDA: Capabilities and known limitations // *J Quant Spectrosc Radiat Transfer.* 2011. Vol. 112, № 13. P. 2234–2247.
230. Supercomputing center of the Novosibirsk State University [Electronic resource]. URL: <http://nusc.nsu.ru/>.

231. Ackleson S.G., Spinrad R.W. Size and refractive index of individual marine particulates: A flow cytometric approach // *Appl Opt.* 1988. Vol. 27, № 7. P. 1270–1277.
232. Strokotov D.I. et al. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? // *J Biomed Opt.* 2009. Vol. 14, № 6. P. 064036.
233. Shapiro S.S., Wilk M.B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples) // *Biometrika.* 1965. Vol. 52, № 3/4. P. 591.
234. Wald A., Wolfowitz J. On a Test Whether Two Samples are from the Same Population // *Ann Math Statist.* 1940. Vol. 11, № 2. P. 147–162.
235. Семьянов К.А. Развитие техники сканирующей проточной цитометрии и методов решения обратной задачи светорассеяния для анализа одиночных сферических частиц: диссертация ... кандидата физико-математических наук: 01.04.05. Новосибирск, 2001. 83 p.
236. Aitken A.C. On Least Squares and Linear Combinations of Observations // *Proc Math Roy Soc Edinb.* 1935. № 55. P. 42–48.
237. Гантмахер Ф.П. Теория матриц. М.: Наука, 1967.
238. Schäfer J., Strimmer K. A Shrinkage Approach to Large-Scale Covariance Matrix Estimation and Implications for Functional Genomics // *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology.* 2005. Vol. 4, № 1.
239. R package “corpcor” [Electronic resource]. URL: <http://cran.r-project.org/web/packages/corpcor/index.html>.
240. Kasarova S.N. et al. Analysis of the dispersion of optical plastic materials // *Opt Mater.* 2007. Vol. 29, № 11. P. 1481–1490.
241. Protocol for the preparation of LB liquid media and agar plates with Ampicillin [Electronic resource]. URL: <http://www.goldbio.com/pdf/543-Protocol%201.pdf>.
242. Dempster A.P., Laird N.M., Rubin D.B. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm // *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological).* 1977. Vol. 39, № 1. P. 1–38.
243. Королёв В.Ю. EM-алгоритм, его модификации и их применение к задаче разделения смесей вероятностных распределений. Теоретический обзор. М.: ИПИРАН, 2007.
244. Fraley C. et al. *mclust: Gaussian Mixture Modelling for Model-Based Clustering, Classification, and Density Estimation.* 2017.
245. Chen W.-C., Maitra R., Melnykov V. *EMCluster: EM Algorithm for Model-Based Clustering of Finite Mixture Gaussian Distribution.* 2016.
246. Motulsky H., Christopoulos A. *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting.* Oxford University Press, USA, 2004. 353 p.
247. Burnham K.P., Anderson D.R. *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach.* Springer, 2002. 528 p.
248. Akaike H. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle // *Selected Papers of Hirotugu Akaike* / ed. Parzen E., Tanabe K., Kitagawa G. Springer New York, 1998. P. 199–213.
249. Schwarz G. Estimating the Dimension of a Model // *Ann. Statist.* 1978. Vol. 6, № 2. P. 461–464.
250. Evans J., Sullivan J. Approximating Model Probabilities in Bayesian Information Criterion and Decision-Theoretic Approaches to Model Selection in Phylogenetics // *Mol Biol Evol.* 2011. Vol. 28, № 1. P. 343–349.
251. Neath A.A., Cavanaugh J.E. The Bayesian information criterion: background, derivation, and applications // *WIREs Comp Stat.* 2012. Vol. 4, № 2. P. 199–203.
252. Cortes C., Vapnik V. Support-vector networks // *Mach Learn.* 1995. Vol. 20, № 3. P. 273–297.
253. Breiman L. Random Forests // *Machine Learning.* 2001. Vol. 45, № 1. P. 5–32.
254. Aly M. Survey on multiclass classification methods // *Technical Report, Caltech.* 2005.
255. Meyer D. et al. e1071: Misc Functions of the Department of Statistics, Probability Theory Group (Formerly: E1071), TU Wien. 2017.



256. Cutler F. original by L.B. and A., Wiener R. port by A.L. and M. randomForest: Breiman and Cutler's Random Forests for Classification and Regression. 2015.
257. Powers D.M.W. Evaluation: from precision, recall and F-measure to ROC, informedness, markedness and correlation // *International Journal of Machine Learning Technology*. 2011. Vol. 2, № 1. P. 37–63.
258. Stehman S.V. Selecting and interpreting measures of thematic classification accuracy // *Remote Sensing of Environment*. 1997. Vol. 62, № 1. P. 77–89.
259. El-Zeini H. Microstructure, rheological and geometrical properties of fat globules of milk from different animal species // *Polish Journal of Nutrition Sciences*. 2006. Vol. 56, № 2. P. 147–154.
260. Huston G.E., Patton S. Factors Related to the Formation of Cytoplasmic Crescents on Milk Fat Globules // *Journal of Dairy Science*. 1990. Vol. 73, № 8. P. 2061–2066.
261. Heid H.W., Keenan T.W. Intracellular origin and secretion of milk fat globules // *European Journal of Cell Biology*. 2005. Vol. 84, № 2–3. P. 245–258.
262. Glantz M. et al. Revealing the Size, Conformation, and Shape of Casein Micelles and Aggregates with Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Multiangle Light Scattering // *Langmuir*. 2010. Vol. 26, № 15. P. 12585–12591.
263. McMeekin T.L., Groves M.L., Hipp N.J. Refractive Indices of Amino Acids, Proteins, and Related Substances // *Amino Acids and Serum Proteins* / ed. Stekol J.A. WASHINGTON, D.C.: American Chemical Society, 1964. Vol. 44. P. 54–66.
264. Berton A. et al. Effect of the size and interface composition of milk fat globules on their in vitro digestion by the human pancreatic lipase: Native versus homogenized milk fat globules // *Food Hydrocolloids*. 2012. Vol. 29, № 1. P. 123–134.
265. Bronk B.V. et al. Measuring diameters of rod-shaped bacteria in vivo with polarized light scattering. // *Biophys J*. 1995. Vol. 69, № 3. P. 1170–1177.
266. Begg K.J., Donachie W.D. Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and division mutants. // *J Bacteriol*. 1985. Vol. 163, № 2. P. 615–622.
267. Bateman J.B., Wagman J., Carstensen E.L. Refraction and absorption of light in bacterial suspensions // *Colloid Polym Sci*. 1966. Vol. 208, № 1. P. 44–58.
268. Bryant F.D., Seiber B.A., Latimer P. Absolute optical cross sections of cells and chloroplasts // *Arch Biochem Biophys*. 1969. Vol. 135. P. 97–108.
269. Waltham C. et al. Light scattering and absorption caused by bacterial activity in water // *Appl Opt*. 1994. Vol. 33, № 31. P. 7536–7540.
270. Balaev A.E., Dvoretzki K.N., Doubrovski V.A. Refractive index of *Escherichia coli* cells // *SPIE Proc*. 2002. Vol. 4707. P. 253–260.
271. Sliusarenko O. et al. High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics // *Mol Microbiol*. 2011. Vol. 80, № 3. P. 612–627.
272. Cooper S. Bacterial growth and division: biochemistry and regulation of prokaryotic and eukaryotic division cycles. MI, USA: Academic Press, 1991.
273. Bronk B.V., Van de Merwe W.P., Stanley M. In vivo measure of average bacterial cell size from a polarized light scattering function // *Cytometry*. 1992. Vol. 13, № 2. P. 155–162.
274. Sackmann E. Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions // *FEBS Letters*. 1994. Vol. 346, № 1. P. 3–16.
275. Yáñez-Mó M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions // *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015. Vol. 4, № 1. P. 27066.
276. Hughes M. et al. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia // *Blood*. 2000. Vol. 96, № 1. P. 188–194.
277. Boulanger C.M., Amabile N., Tedgui A. Circulating Microparticles A Potential Prognostic Marker for Atherosclerotic Vascular Disease // *Hypertension*. 2006. Vol. 48, № 2. P. 180–186.
278. Junkar I. et al. Blood and synovial microparticles as revealed by atomic force and scanning electron microscope // *Open Autoimmun J*. 2009. Vol. 1, № 9. P. e50–e58.

279. Burger D. et al. Endothelial Microparticle Formation by Angiotensin II Is Mediated via Ang II Receptor Type I/NADPH Oxidase/ Rho Kinase Pathways Targeted to Lipid Rafts // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011. Vol. 31, № 8. P. 1898–1907.
280. Tramontano A.F. et al. Circulating Endothelial Microparticles in Diabetes Mellitus // *Mediators of Inflammation.* 2010. Vol. 2010.
281. Пономарева А.А. et al. Структурная характеристика тромбоцитов и тромбоцитарных микровезикул // *ЦИТОЛОГИЯ.* 2016. Vol. 58, № 2. P. 105–114.
282. Nakajima K. et al. Postprandial lipoprotein metabolism; VLDL vs chylomicrons // *Clin Chim Acta.* 2011. Vol. 412, № 15–16. P. 1306–1318.
283. Knuth N.D., Horowitz J.F. The Elevation of Ingested Lipids within Plasma Chylomicrons Is Prolonged in Men Compared with Women // *J. Nutr.* 2006. Vol. 136, № 6. P. 1498–1503.
284. Tietz N. // *Clinical Guide to Laboratory Tests.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1995. P. 610–611.
285. Todorov V., Filzmoser P. An object oriented framework for robust multivariate analysis // *Journal of Statistical Software.* 2009. Vol. 32, № 3. P. 1–47.
286. Gouw T.H., Vlugter J.C. Physical Properties of Triglycerides. I. Density and Refractive Index // *Fette, Seifen, Anstrichm.* 1966. Vol. 68, № 7. P. 544–549.
287. Distler J.H.W. et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles // *PNAS.* 2005. Vol. 102, № 8. P. 2892–2897.
288. Boulanger C.M., Amabile N., Tedgui A. Circulating Microparticles A Potential Prognostic Marker for Atherosclerotic Vascular Disease // *Hypertension.* 2006. Vol. 48, № 2. P. 180–186.
289. Ruf H., Gould B.J. Size distributions of chylomicrons from human lymph from dynamic light scattering measurements // *Eur. Biophys. J.* 1999. Vol. 28, № 1. P. 1–11.