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

На правах рукописи

Москаленский Александр Ефимович

ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТРОМБОЦИТОВ В НАТИВНОМ И АКТИВИРОВАННОМ СОСТОЯНИИ, А ТАКЖЕ ИХ АГРЕГАТОВ, С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Специальность 03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук.

Научный руководитель:
кандидат физико-математических наук
Юркин М.А.

Новосибирск – 2015

Оглавление

Введение

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания, в основном ишемическая болезнь сердца и инсульты, являются главной причиной смерти во всем мире [1]. Эти заболевания тесно связаны с нарушением тромбообразования и системы гемостаза в целом.

Тромбоциты – небольшие безъядерные клетки крови, которые играют важнейшую роль в системе гемостаза. При повреждении сосуда происходит активация тромбоцитов, что сопровождается изменением их формы. Активированные тромбоциты способны агрегировать между собой, формируя тромб и препятствуя выходу крови из сосуда. Для выявления риска заболеваний, связанных с нарушениями функции тромбоцитов (отклонениями в их форме, размере, способности агрегировать и др.), важно диагностировать эти нарушения на ранних стадиях.

Существующие методы диагностики дают лишь ограниченную информацию о функциональном состоянии тромбоцитов пациента. Так, при общем анализе крови методом Култера измеряется распределение тромбоцитов по объёму, однако информация о форме тромбоцитов при этом не извлекается [2]. Исследования агрегации тромбоцитов проводятся с помощью агрегометрии – метода, основанного на измерении оптической плотности богатой тромбоцитами плазмы в процессе агрегации [3]. Однако изменение оптической плотности можно зарегистрировать лишь при появлении достаточно больших агрегатов, хотя именно образование димеров является важнейшей стадией для поддержания гемостаза. Активация тромбоцитов исследуется лишь на уровне определения количества активированных клеток непосредственно после взятия крови или после стимуляции различными активаторами [4]. Для этого применяются метки к активированным тромбоцитам, флуоресценция от которых измеряется на проточных цитометрах.

Сканирующий проточный цитометр (СПЦ), в отличие от проточных цитометров стандартной конфигурации, позволяет измерять индикатрису светорассеяния одиночных частиц, которая содержит информацию, потенциально достаточную для характеризации их морфологии [5,6]. Одним из преимуществ СПЦ по сравнению с микроскопом и другими оптическими методами является высокая скорость анализа клеток и большой объём собираемой информации, что обеспечивает высокую статистическую точность. Однако такая характеризация требует решения обратной задачи светорассеяния, т.е. определения характеристик частицы из данных о светорассеянии, что нетривиально даже для простейших форм частиц [7–10]. Для

частицы сложной формы, а также агрегатов простых частиц, решение задачи характеризации затруднено, однако измеряемую информацию можно использовать для их идентификации.

Целью работы является исследование взаимодействия электромагнитного излучения с нативными и активированными тромбоцитами и их агрегатами, включая создание метода характеризации тромбоцитов с субдифракционной точностью для изучения динамики морфологии клеток при активации.

В настоящей работе предложен метод характеризации одиночных тромбоцитов крови человека по индикатрисам светорассеяния, измеренным с помощью сканирующего проточного цитометра. Данный метод позволяет определить не только объём, но и форму (отношение полуосей) тромбоцитов наряду с оценкой погрешностей характеризации. Высокая точность метода позволяет детектировать изменение формы тромбоцитов при активации, что можно использовать для определения доли активированных тромбоцитов в пробе без использования флуоресцентных меток. Отсутствие длительной пробоподготовки позволяет исследовать изменение формы тромбоцитов непосредственно во время активации, что открывает новые возможности в понимании данного процесса.

Для исследования начальной стадии агрегации тромбоцитов необходимо детектировать появление димеров. Однако структура индикатрисы светорассеяния, измеряемой с помощью СПЦ, слабо меняется в процессе агрегации [11]. В данной работе на основе систематического моделирования объяснён этот эффект, а также показано, что для идентификации димеров тромбоцитов недостаточно измерения индикатрисы светорассеяния в стандартном угловом диапазоне (10°–70º). Кроме того, показано, что рассеяние света агрегатами частиц с малым показателем преломления (в том числе биологических клеток) можно в большинстве случаев считать однократным.

Задачами данной работы являются:

1. Разработать метод характеризации морфологии тромбоцитов крови человека по индикатрисе светорассеяния, включая оценку погрешностей решения обратной задачи светорассеяния. Верифицировать метод с использованием стандартных методик;
2. С помощью предложенного метода исследовать изменение объёма и формы тромбоцитов при активации различными агонистами. Выявить гетерогенность популяции тромбоцитов по форме (покоящиеся и активированные клетки);
3. Исследовать динамику формы тромбоцитов после добавления активаторов и сравнить с данными по динамике внутриклеточной концентрации ионов кальция;

4. Исследовать особенности рассеяния света агрегатами тромбоцитов с помощью систематического численного моделирования. Предложить подходы для решения задачи идентификации димеров тромбоцитов по светорассеянию.

Теоретическая ценность работы заключается в развитии общих методов решения обратной задачи светорассеяния для несферических частиц с использованием базы данных предварительно насчитанных модельных индикатрис. Эти методы, включая их программную реализацию, непосредственно применимы к различным несферическим объектам, например, бактериям, эритроцитам крови, сфероидальным жировым частицам и димерам сферических частиц. Предложенные идеи, например, подход для оценки достаточности размера базы данных и метод оценки погрешностей решения обратной задачи светорассеяния, применимы для баз данных любой структуры и могут быть использованы в смежных областях науки. Кроме того, в работе на основе моделирования получены общие выводы о рассеянии света агрегатами частиц с малым контрастом (показателем преломления, близким к единице), в частности, показана применимость приближения однократного рассеяния и аддитивность индикатрис после интегрирования по азимутальному углу рассеяния.

Практическая ценность работы связана с разработкой новых методов исследования тромбоцитов. В частности, эти методы впервые позволяют надёжно измерять распределение тромбоцитов по форме, что является диагностически важным показателем. Это также открывает путь к пониманию для до сих пор не ясных механизмов изменения формы тромбоцитов при активации для поиска новых способов терапевтического влияния на активность клеток. Кроме того, полученные результаты повышают потенциал СПЦ для проведения общего гематологического анализа. Это обусловлено, с одной стороны, модернизацией оптической схемы прибора, которая будет использоваться в новых версиях СПЦ, а с другой – новыми методами характеризации клеток крови.

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, а также стипендией Президента РФ для молодых учёных и аспирантов.

Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 117 наименований. Диссертация изложена на 97 страницах, включает 5 таблиц и 43 рисунка.

Первая глава представляет собой общий литературный обзор, в котором рассмотрена морфология тромбоцитов, молекулярный базис изменения их формы при

активации, методы моделирования и существующие подходы к решению обратной задачи светорассеяния, а также особенности рассеяния света агрегатами частиц.

Вторая глава посвящена модернизации программного обеспечения СПЦ для измерения быстропротекающих процессов, таких как активация тромбоцитов. В частности, удалось существенно увеличить количество измеряемых в единицу времени сигналов, а также ускорить процедуру определения скорости потока и положения триггерного луча СПЦ.

Третья глава посвящена развитию методов решения прямой и обратной задач светорассеяния для одиночных тромбоцитов и их агрегатов. Предложена оптическая модель тромбоцитов, проведено сравнение различных методов для расчёта индикатрис светорассеяния (метод Т-матриц и метод дискретных диполей), а также предложен метод решения обратной задачи светорассеяния с использованием базы данных теоретических индикатрис. Проведено моделирование светорассеяния агрегатами тромбоцитов, которое позволило объяснить наблюдаемые в эксперименте эффекты и предложить подход для решения задачи идентификации димеров тромбоцитов.

В четвёртой главе представлены результаты проведенных исследований. Продемонстрированы возможности метода характеризации тромбоцитов, в частности, наблюдалась гетерогенность популяции тромбоцитов и эффект изменения формы при активации и других внешних воздействиях. Показано сходство динамики изменения формы и внутриклеточной концентрации кальция. Проведено сравнение метода с методом Култера и стандартным методом детекции активированных тромбоцитов на основе флуоресцентных меток. Показано, что при использовании коротковолнового лазера (405 нм) можно исследовать форму тромбоцитов более детально, что открывает возможности для более прямого исследования цитоскелета. Измеренные индикатрисы агрегатов тромбоцитов подтверждают результаты численного моделирования.

В заключении сформулированы основные результаты работы. Они опубликованы в 4 статьях и 13 тезисах конференций, включённых в прилагаемый перечень.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Метод характеризации тромбоцитов на основе измерения индикатрис клеток на СПЦ и решения обратной задачи светорассеяния позволяет измерять распределение клеток по объёму с точностью 0.9 фл и отношению полуосей с точностью 0.6 (указаны медианные погрешности).

2. Популяция тромбоцитов является гетерогенной по отношению полуосей, что соответствует покоящимся и активированным клеткам. Среднее по пробе отношение полуосей тромбоцитов составляет 3.7–3.9, а после стимуляции аденозиндифосфатом – 2.2–2.9 (приведён разброс для 6 доноров).
3. Приближение однократного рассеяния выполняется для частиц с размером больше длины волны и с относительным показателем преломления, близким к единице. Интегрирование по азимутальному углу приводит к аддитивности индикатрис частиц, составляющих агрегат.
4. Для идентификации димеров тромбоцитов необходимо измерять индикатрису одиночных частиц для углов рассеяния больше 90°, например, от 110° до 160°.

Содержание диссертации докладывалось на научных студенческих конференциях «*Студент и научно-технический прогресс*» в 2010 и 2012 гг. (Новосибирск, Россия), научной школе-конференции «*Теория и численные методы решения обратных и некорректных задач*» в 2012 г. (Новосибирск, Россия), конгрессах международного общества развития цитометрии ISAC в 2012 (Германия), 2013, 2014 гг (США) и 2015 г. (Великобритания), международных конференциях «*Electromagnetic and Light Scattering - XIV*» в 2014 г (Франция) и «*Electromagnetic and Light Scattering - XV*» в 2015 г. (Германия), международной конференции «*Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology*» в 2014 г. (Россия), международном семинаре «*Workshop "Scattering by aggregates (on surfaces)"*» в 2014 г. (Германия), а также на научных семинарах в Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Институте Биофизики СО РАН и Ягеллонском университете г. Кракова (Польша).

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Морфология тромбоцитов

Тромбоциты в обычном (неактивированном) состоянии представляют собой небольшие дисковидные безъядерные клетки. Их средние размеры, измеренные с помощью сканирующего электронного микроскопа, составляют 3 мкм (диаметр) на 1 мкм (толщина) ([12,13]). Подобные результаты были получены с помощью фазово-контрастной микроскопии свободно вращающихся клеток в суспензии [14]. Сравнение этих измерений с другими данными, проведенное в работе [15], показало, что модель сплюснутого сфероида подходит для описания морфологии тромбоцитов. Было также показано, что отношение полуосей сфероида может меняться от клетки к клетке в широком диапазоне – от 2 до 8.

Тромбоциты также имеют широкое распределение по объему [16]. Это распределение измеряется с помощью гематологических анализаторов, основанных на принципе Култера [2,17]. Клетки в этих приборах проходят через узкий капилляр, заполненный электролитом, и в зависимости от объёма меняют его сопротивление на различную величину. В норме распределение тромбоцитов по объёму имеет вид логнормального в диапазоне 2-15 фл. Однако измеряемая величина зависит не только от объема, но и от формы клетки. Этот эффект в анализаторах не учитывается и может давать ошибку в определении объема до 3 раз [18]. Тем не менее, такие измерения используются при общем анализе крови. Диагностическую значимость имеют такие параметры распределения тромбоцитов по объему, как средний объём тромбоцитов (в норме составляет 8-12 фл) и ширина распределения тромбоцитов по объёму [19].

Активация тромбоцитов является первым шагом в образовании тромбов. Существуют тесты для детекции активированных тромбоцитов с использованием специфичных моноклональных антител и проточной цитометрии ([4,20]), что позволяет оценивать количество *in vivo* активированных тромбоцитов [21]. Также часто проводится изучение активации тромбоцитов *in vitro* в ответ на такие агонисты, как аденозиндифосфат (АДФ), коллаген и тромбин [22].

Карты рассеяния вперед и вбок (FSC-SSC), измеряемые на проточных цитометрах, отличаются лишь незначительно для нативных и активированных тромбоцитов [23]. В то же время тромбоциты испытывают значительное изменение формы в процессе активации, становясь «колючими шарами» с псевдоподиями [24]. Одно из возможных объяснений этого факта состоит в том, что псевдоподии почти не влияют на рассеяние света тромбоцитами, что было показано численным

моделированием в работе [25]. Если не учитывать псевдоподии, то форму активированного тромбоцита также можно описать моделью сплюснутого сфероида с отношением полуосей около 1–2. Так, в количественном исследовании с использованием фазово-контрастной микроскопии показано, что среднее отношение полуосей тромбоцитов уменьшается с 3 до 1.25 после добавления 10 мкмоль/л АДФ [26]. В другом исследовании [27] приведены аналогичные результаты для тромбоцитов кролика, полученные с помощью электронной микроскопии.

1.2. Молекулярный базис изменения формы

Тромбоциты активируются в ответ на различные стимулы, например, связывание со специфичными рецепторами таких агонистов, как тромбин, коллаген, АДФ и т.д. Активация тромбоцитов представляет из себя целую серию событий, включая перестройку поверхностных гликопротеинов, высвобождение внутриклеточных гранул и реорганизацию цитоскелета. Последнее приводит к изменению формы, уникальной и наиболее заметной реакции тромбоцитов, которая происходит через несколько секунд после стимуляции [12,28]. Эта физическая трансформация описана еще со времён первых микроскопических исследований тромбоцитов [29–32]; она состоит из перехода «диск-сфера» и формирования псевдоподий и может быть охарактеризована изменением отношения полуосей клетки от 3–5 к 1–2 [15,26,27,33]. Однако молекулярная основа такой трансформации известна лишь частично.

Наиболее общий путь активации включает в себя увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция $[Ca^{2+}]_i$ [34]. Ca^{2+}-независимые пути (например, путь, включающий активацию Rho-киназы) намного медленнее и дают малый вклад в процесс в нормальных условиях. Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ связано с высвобождением ионов из внутриклеточных хранилищ, что контролируется каналами-рецепторами к инозитол-1,4,5-трифосфату (IP3). Другим источником повышения $[Ca^{2+}]_i$ является поток через плазматическую мембрану [35]; однако это можно не учитывать при изучении тромбоцитов *in vitro* с использованием различных антикоагулянтов. Весь путь от связывания АДФ с рецептором до увеличения $[Ca^{2+}]_i$ был успешно сформулирован в виде математической модели, которая очень хорошо согласуется с экспериментальными данными [36]. Таким образом, эту часть каскада активации можно считать хорошо изученной и не вызывающей вопросов.

Однако о дальнейших реакциях известно из множества отдельных исследований. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ запускает (A) реорганизацию сети актиновых филаментов, (B)

взаимодействие актина с миозином и (C) реорганизацию периферического кольца микротрубочек.

Актиновые филаменты в покоящемся тромбоците формируют жесткую цитоплазматическую сеть [37]. Ионы кальция активируют гельзолин, белок, который разрезает филаменты. Хотя актиновая сеть не является главным фактором, поддерживающим дисковидную форму [38], её дестабилизация даёт вклад в переход «диск-сфера» [39]. Последующая полимеризация новых актиновых филаментов отвечает за формирование псевдоподий [40,41].

Ионы кальция также активируют кальмодулин, что в конечном счёте запускает фосфорилирование лёгких цепей миозина и их взаимодействие с актином [42]. Следующее за этим сокращение вовлечено в процесс движения гранул [43] и может влиять на изменение структуры периферического кольца микротрубочек [44].

Периферическое кольцо поддерживает дисковидную форму тромбоцита [38,45–47] и состоит из нескольких микротрубочек, как стабильных, так и динамических, то есть постоянно находящихся в процессе сборки-разборки [48]. Ранние исследования выявили частичную временную деполимеризацию тубулина в начале изменения формы [49] и сжатие периферического кольца в центр [50,51]. Однако недавно было показано, что на самом деле наблюдается не сжатие исходного, а образование нового кольца меньшего диаметра, в то время как исходное кольцо скручивается в трёхмерную искривлённую структуру, поддерживающую округлую форму активированного тромбоцита. Хотя этот механизм может быть определяющим в физической трансформации клетки, каскад реакций, ведущий от повышения $[Ca^{2+}]_i$ к скручиванию периферического кольца, до сих пор не прояснён. Ионы кальция могут напрямую вызывать деполимеризацию тубулина [52,53] и таким образом влиять на жёсткость кольца микротрубочек; с другой стороны, обработка тромбоцитов таксолом, веществом, стабилизирующим микротрубочки, не приводит к значительным изменениям в ходе активации [54]. Более вероятным механизмом является воздействие ионов кальция на молекулярные моторы динеин и кинезин, оба из которых присутствуют в тромбоцитах и участвуют в регуляции длины и жёсткости периферического кольца микротрубочек [44].

1.3. Рассеяние света одиночными тромбоцитами

Так как размеры тромбоцитов близки к длине волны видимого излучения (см. Раздел 1.1), рассеяние света этими клетками не описывается приближенными закономерностями, такими как теория Рэлея-Ганса или, напротив, приближение

геометрической оптики. В силу того, что относительный показатель преломления тромбоцитов в воде близок к единице (1.03–1.05) [55,56], в некоторых случаях применимо приближение аномальной дифракции ([57–59], см. также раздел 3.1.7). Однако в общем случае необходимо использовать общий численный метод расчёта, такой как метод Т-матриц или метод дискретных диполей (МДД).

Метод Т-матриц сравнительно быстрый, однако не сходится для отношения полуосей больше 3–4 [60]. Существует модифицированный метод Т-матриц с дискретными источниками [61], который позволяет проводить расчёт для частиц с существенно несферической геометрией [62]. Однако скорость вычислений данным методом в области небольших показателей преломления сравнима с МДД, а результаты в некоторых случаях неточны (см. Раздел 3.1.2). Поэтому в нашей работе для решения прямой задачи рассеяния света тромбоцитами мы использовали МДД [63,64]. Данный метод гарантирует сходимость к точному результату при увеличении числа диполей. Кроме того, он позволяет проводить расчёты для частиц любой формы, в частности, для агрегатов сфероидов, что применялось в настоящем исследовании.

Тот факт, что размеры тромбоцитов по порядку величины совпадают с длиной волны света, приводит не только к сложности расчёта, но и к нетривиальной зависимости индикатрисы светорассеяния от характеристик клетки. Именно это позволяет с хорошей точностью восстановить данные характеристики из экспериментальных данных.

1.4. Обратная задача светорассеяния

Рассеяние света является основой многих методов исследования дисперсных систем, включая аэрозоли, межзвездную пыль, биологические образцы и др. Наиболее точная характеризация таких систем достигается методиками, измеряющими информацию об одиночных частицах, например, проточной цитометрией для биологических частиц [65] или измерением пространственной картины рассеяния частиц в воздухе [66]. Определение характеристик частиц исходя из измеренной информации подразумевает решение обратной задачи светорассеяния. Это может быть сделано с хорошей точностью лишь в случае частиц сравнительно простой формы. В частности, было продемонстрировано решение обратной задачи светорассеяния для данных, измеренных на сканирующем проточном цитометре (СПЦ) [5,6], для нескольких простых форм с использованием различных методов:

- Шар – параметрическое решение [7], спектральный метод [67], метод прямой подгонки [68], метод адаптивной базы данных [69];

- Двуслойный шар – метод прямой подгонки [8];
- Димер шаров – метод баз данных [70], метод прямой подгонки [6];
- Цилиндр со сферическими крышками – метод баз данных [9];
- Сплюснутый сфероид – метод баз данных [33];
- Эритроциты – метод баз данных, спектральный метод [71].

Метод параметрического решения и спектральный метод, хотя и дают прямые формулы для решения, надёжны только в случае шаров, поэтому представляют ограниченный интерес. Остальные методы основаны на минимизации невязки между измеренной и модельной индикатрисами. Модельная индикатриса может рассчитываться как непосредственно в ходе минимизации целевой функции (прямая подгонка), так и заранее (метод баз данных). Метод баз данных является наиболее общим методом, который может быть применён для характеризации любых частиц. Суть метода заключается в предварительном расчёте большого количества (базы данных) индикатрис светорассеяния, которые затем сравниваются с измеренными в эксперименте. Это позволяет не только определить параметры частицы, найдя минимум целевой функции, но и получить зависимость целевой функции от характеристик модели. По данной зависимости можно охарактеризовать точность решения обратной задачи. В настоящей диссертации были разработаны методы и математический аппарат для решения обратной задачи светорассеяния с использованием базы данных предварительно рассчитанных индикатрис с определением точности (Разделы 3.1.4, 3.1.5). Данные методы уже использовались в работах [9,10,33].

1.5. Рассеяние света агрегатами тромбоцитов

Агрегация малых частиц часто встречается в природе. Например, слипание частиц при горении [72] является ключевым процессом в образовании сажи, адгезия родственных клеток – важнейшее свойство многих тканей [73], а агрегация тромбоцитов – процесс, который останавливает кровотечение, но также может привести к тромбозу сосудов. Вместе с тем, рассеяние света даже агрегатами частиц простой формы сложно интерпретировать.

Сложность рассеяния света агрегатами обусловлена взаимодействием составляющих его частиц вследствие как многократного рассеяния (одна частица изменяет поле во второй), так и интерференции волн в дальней зоне. Последняя может быть легко вычислена, если известны поля, рассеянные каждой частицей (т.н. парциальные поля). Учет многократного рассеяния, напротив, в общем случае требует

использования строгого численного метода расчёта. Такой метод может либо явно учитывать взаимодействие между частицами [74], как, например, метод суперпозиции Т-матриц [75–77], или рассматривать агрегат как одну частицу сложной формы, как МДД [78] и метод конечных разностей во временной области [79]. Частным случаем метода суперпозиции является метод приближений по порядку рассеяния, в котором многократное рассеяние вычисляется итерационно [80,81]. Данный метод имеет простую физическую интерпретацию, но не гарантированно сходится для произвольной системы.

Во многих случаях парциальные поля можно достаточно точно оценить, не учитывая многократное рассеяние. Простейшим примером является приближение Рэлея-Ганса-Дебая (РГД), применённое к целому кластеру, что эквивалентно пренебрежению многократным рассеянием не только между мономерами, но и между частями одного мономера. Приближение РГД даёт хорошую точность для агрегатов наночастиц, даже если общий размер кластера намного превышает длину волны [82,83]. Необходимыми условиями для этого является малый размер частиц и фрактальная размерность кластера менее двух [84]. При увеличении размера частиц (точнее, параметра набега фазы [84]) приближение РГД теряет применимость даже для отдельных частиц, что требует более строгого метода расчета парциальных полей. В этом более общем случае пренебрежение многократным рассеянием приводит к приближению однократного рассеяния, эквивалентному первому порядку в методе приближения по порядку рассеяния. Это иногда называют приближением независимого рассеяния [85], но обычно применительно к суспензии частиц, когда относительные положения случайным образом меняются за время измерения, или к агрегатам в случайной ориентации. В обоих случаях интерференция в дальней зоне замывается, так что результат определяется простой суммой парциальных полей.

Биологические клетки в воде, как правило, имеют небольшой относительный показатель преломления (например, типичные значения для бактерий *E. Coli*, эритроцитов и тромбоцитов – от 1.02 до 1.06 [9,33,86]). Однако их размер составляет порядка нескольких длин волн, а форма существенно несферическая. Это означает, что приближение РГД неприменимо, и необходим более строгий метод, такой как МДД [87,88]. Рассеяние агрегатами таких частиц до сих пор не моделировалось. Однако была высказана гипотеза [85], что как большой размер, так и малый показатель преломления могут уменьшить влияние многократного рассеяния, даже если частицы расположены близко. Это означает, что для агрегатов тромбоцитов может быть применимо приближение однократного рассеяния. Кроме того, если рассматривать измерения

агрегации в суспензии или на СПЦ, где происходит интегрирование по азимутальному углу рассеяния [89], можно ожидать замывания интерференции, что приведет к применимости приближения независимого рассеяния. Более подробно применимость данных приближений обсуждается в разделе 3.2.

Глава 2. Модернизация сканирующего проточного цитометра

2.1. Сканирующий проточный цитометр

Экспериментальные исследования в настоящей диссертации были выполнены в основном на сканирующем проточном цитометре (Рис. 1). Основой этого прибора является зеркало полусферической формы, вдоль оси которого в узком капилляре движутся частицы. Сигнал светорассеяния измерялся с помощью ФЭУ 2 по мере движения. Для каждого положения частицы существует определённый полярный угол рассеяния, для которого лучи отразятся параллельно оси капилляра (Рис. 2, справа). С помощью оптической системы (линза 2 и диафрагма) только такие параллельные лучи собираются на ФУЭ 2. Поэтому существует однозначная связь положения частицы в кювете с углом рассеяния, для которого лучи попадут на ФЭУ (Рис. 2, слева). Это позволяет преобразовать измеряемый сигнал в индикатрису светорассеяния, которая дается следующим выражением:

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

где S – матрица Мюллера [90], θ и φ – полярный и азимутальный углы рассеяния, соответственно. Рабочий угловой диапазон СПЦ был определен из анализа индикатрис полистирольных микросфер, как описано в [91], и составил от 10° до 70°.

Ключевым свойством прибора для решения обратной задачи светорассеяния, в особенности для определения погрешностей характеризации частиц, является зависимость амплитуды экспериментального шума от угла рассеяния. Эта зависимость (весовая функция) определяется аппаратной функцией СПЦ и имеет вид

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

Для измерения индикатрис светорассеяния одиночных тромбоцитов использовался СПЦ, произведенный ООО Цитонова (Новосибирск, http://cyto.kinetics.nsc.ru/). Для возбуждения рассеяния использовался лазер с длиной волны 660 нм мощностью 40 мВ (LM-660-20-S) (Лазер 1 на Рис. 1). Другой лазер с длиной волны 488 нм мощностью 25 мВ (Uniphase 2214-12SLAB) использовался в триггерном канале (Лазер 2).

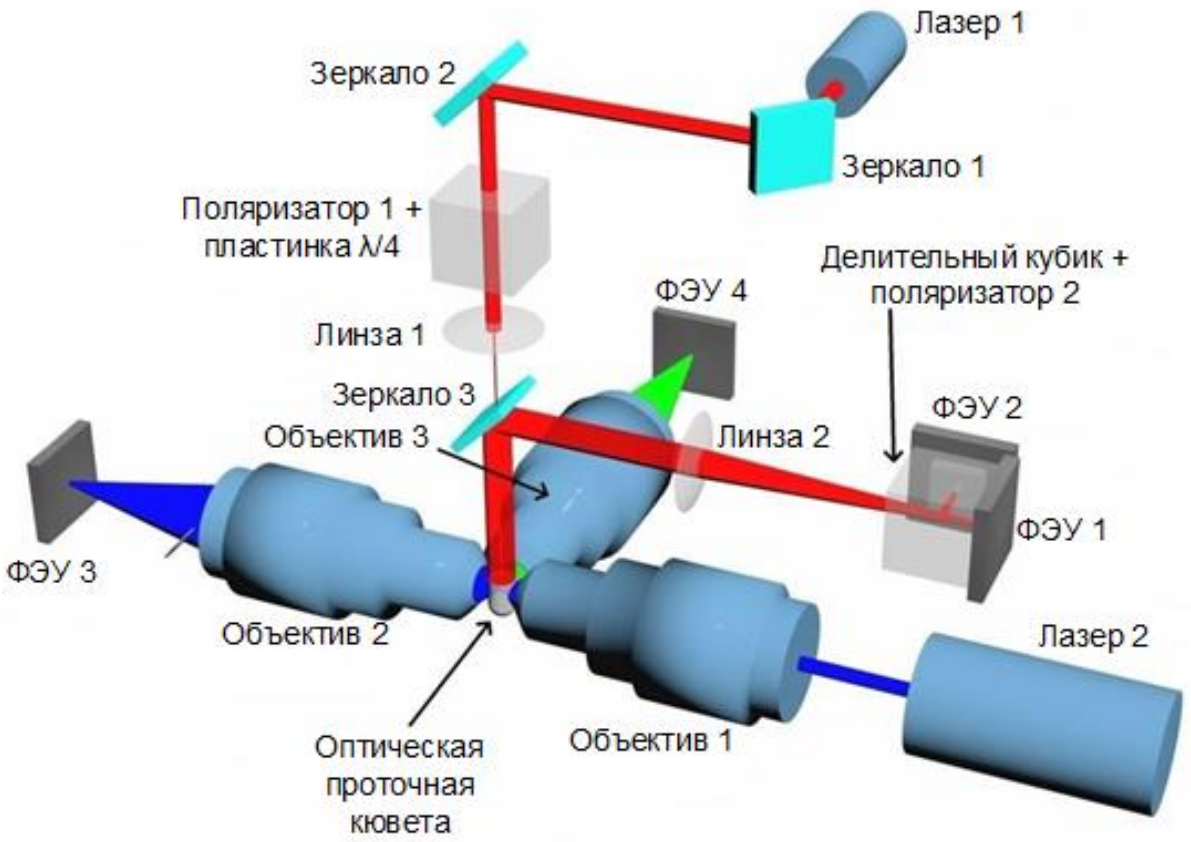

Рис. 1. Схема оптической системы сканирующего проточного цитометра.

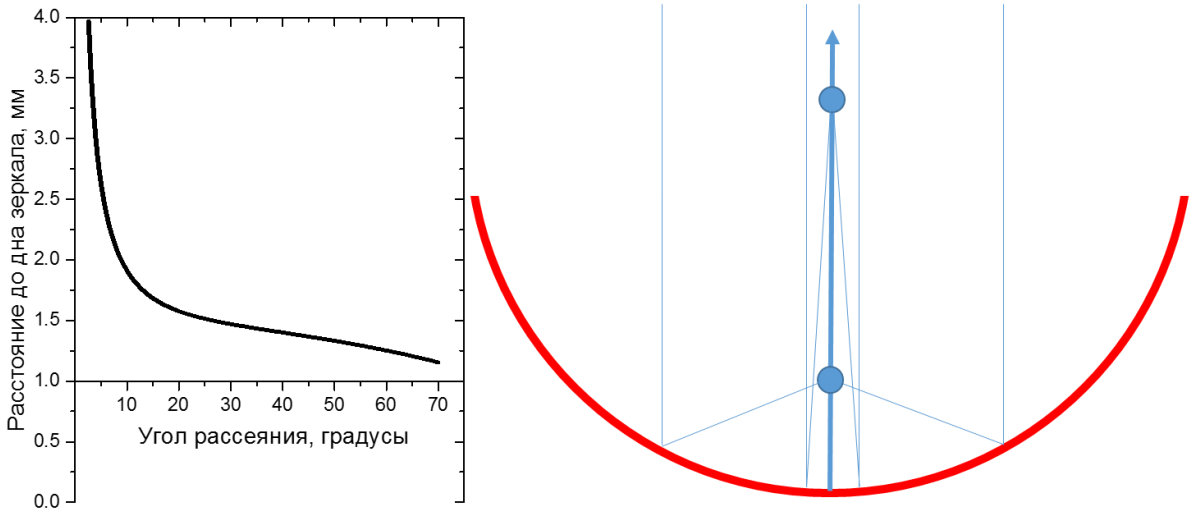

Рис. 2. Передаточная функция сканирующего проточного цитометра и схема отражения лучей для двух различных положений частицы.

2.2. Улучшение программного обеспечения сканирующего проточного цитометра

В данном разделе описывается новое программное обеспечение (ПО) для работы со сканирующим проточным цитометром, созданное как для преодоления принципиальных проблем, нерешённых в существовавшей версии ПО, так и для повышения удобства использования. Последнее особенно важно для будущего использования прибора в сторонних медицинских и других лабораториях.

Как и существовавшее ранее ПО, новое обеспечение реализуется в среде LabView. К настоящему моменту реализована его начальная версия, включающая в себя идеи, которые будут изложены ниже. Проведены первые испытания, которые показали эффективность нового ПО и также описаны далее. На следующем этапе будет выполнено тестирование ПО пользователями, которые работают с СПЦ.

2.2.1. Запись данных

Стандартное ПО сканирующего проточного цитометра позволяет производить измерение индикатрис светорассеяния не более чем 20 частиц в секунду. Такая низкая частота измерения обусловлена тремя факторами:

1. Недостаточная пропускная способность канала. Передача нативных данных с АЦП в компьютер происходит по протоколу Ethernet со скоростью 100 Мбит/с. Количество информации для каждой частицы определяется количеством измеренных точек (samples), которое в стандартном ПО задается равным 11600 точек на канал для каждого из 6 каналов АЦП (канал триггера, два канала индикатрисы, два канала флуоресценции, канал рассеяния вперёд). Каждая точка имеет тип данных I16, то есть занимает 16 бит, что дает для каждой частицы 0.94 МБ и ограничивает частоту измерения до ~100 частиц в секунду.
2. Обработка сигналов происходит синхронно со считыванием данных. Некоторая простейшая обработка сигналов необходима для контроля за настройкой прибора во время проведения эксперимента, однако в существующем ПО это занимает на порядок больше времени, чем собственно считывание. В результате частота измерения радикально уменьшается до 10-20 частиц в секунду. Кроме того, в силу недостаточной оптимизации даже при отключении модулей обработки происходят излишние манипуляции с сигналами, занимающие существенное время.
3. Еще одним фактором, который может ограничивать частоту измерения, является количество частиц, проходящих за секунду через зону измерения. Скорость потока в зоне измерения составляет порядка 2 м/с, а длина зоны измерения – около 2 мм,

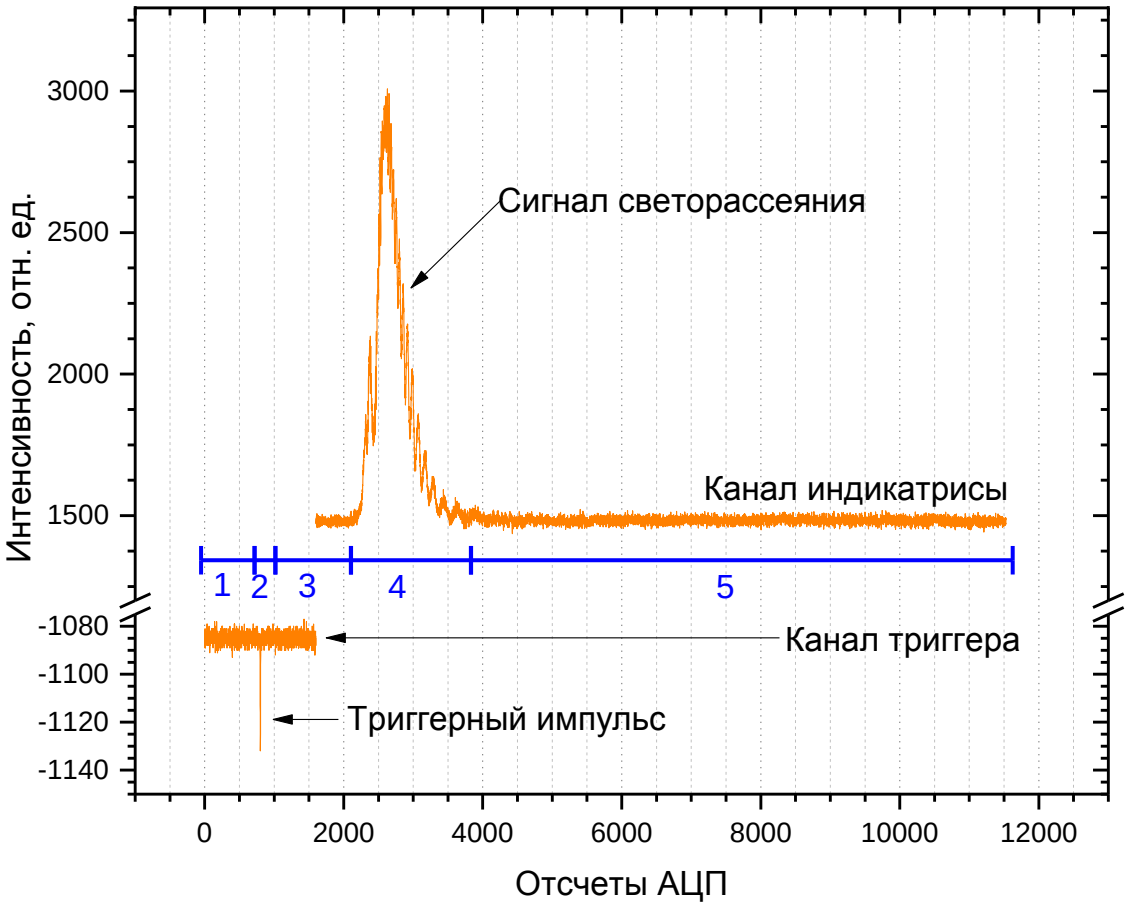

Рис. 3. Сигнал, измеряемый АЦП для каждой частицы. Длина данных в каждом канале – 11600 точек. На рисунке показаны первые 1600 точек из канала триггера и последние 10000 точек из канала индикатрисы: 2 – зона триггерного импульса, 4 – зона индикатрисы светорассеяния, 3 –промежуточная зона, 1 и 5 – зона избыточной информации.

поэтому время одного измерения составляет около 1 мс. Таким образом, при достаточно большой концентрации частиц можно обеспечить прохождение через зону измерения порядка 1000 частиц в секунду. Чтобы снизить вероятность кратных событий (одновременное присутствие двух и более частиц в зоне измерения), в реальных экспериментах следует понизить концентрацию в несколько раз от максимальной.

В настоящей работе исследовались сравнительно быстрые процессы, поэтому стояла задача увеличить частоту измерения. Например, при активации тромбоцитов изменение формы происходит за несколько секунд, поэтому для точного измерения кинетики процесса необходимо регистрировать сотни индикатрис светорассеяния в секунду. Для решения этой задачи было написано новое программное обеспечение, основными характеристиками которого являются следующие:

1. Ограничение количества точек в сигнале. Необходимыми являются только точки, которые измерены во время нахождения частицы в области измерения

индикатрисы (зона *4* на Рис. 3) и во время прохождения через триггерный луч (зона *2* на Рис. 3). Это примерно 1500 точек при частоте АЦП в 1.56 МГц[1].

В силу особенностей работы электроники начало и конец данных, которые будут передаваться в компьютер, должны совпадать для всех каналов. В частности, из-за этого точки, соответствующие перемещению частицы от триггерного луча до области измерения индикатрисы (зоны 2 и 3 на Рис. 3, около 1000 точек), передаются в компьютер не только в триггерном канале, но и в канале индикатрисы, а также во всех остальных. Аналогично точки, измеренные в триггерном канале во время измерения индикатрисы (зона 4 на Рис. 3), также должны передаваться в компьютер. Несмотря на это, с помощью нового ПО удалось сократить количество информации, передаваемой по каналу Ethernet в компьютер для каждой частицы, примерно в 4 раза за счёт зон 1 и 5 (Рис. 3). Это позволяет довести частоту измерения до 400 частиц в секунду.

2. Обработка данных и их считывание происходит асинхронно. Таким образом, считывание сигналов происходит всё время, а обработка проводится в реальном времени отдельным потоком. Это позволяет регистрировать (например, записывать на диск) все индикатрисы. Модуль обработки данных при этом не успевает обрабатывать каждый сигнал, но это и не является необходимым для контроля настройки при проведении экспериментов.

Управление всеми параметрами, включая длину сигнала светорассеяния, уровень триггерного импульса и частоту АЦП, осуществляется в реальном времени без перезапуска программы. С одной стороны, это является необходимым, так как теперь сигнал светорассеяния жёстко ограничен, и границы необходимо подстраивать для предотвращения обрезки индикатрис. С другой стороны, это повышает удобство использования и уменьшает время настройки прибора.

В экспериментах с новым ПО удалось достичь частоты измерения в 150–200 частиц в секунду при измерении индикатрис тромбоцитов и полистирольных микросфер. В частности, была измерена кинетика изменения формы тромбоцитов при активации (см. раздел 4.3.2). При этом определяющим фактором является появление кратных событий при повышении концентрации клеток для увеличения частоты измерений. При большой концентрации клеток частота измерения возрастает до 300-

[1] Данная частота АЦП является достаточной для измерения индикатрис тромбоцитов, а для изучения бóльших клеток существует возможность её увеличения до 6.25 МГц, что приведет к соответствующему увеличению длины сигнала.

400 частиц в секунду, но и частота кратных событий увеличивается, приводя к наложению индикатрис соседних частиц.

Для оценки доли кратных событий можно воспользоваться моделью, которая выведена в [92] и успешно применяется к описанию измерений на проточных цитометрах [93]. В данной модели вероятность появления n клеток в зоне измерения связана с временем измерения Δt и средней частотой измерения ν следующим законом (распределение Пуассона):

$$P_n = \frac{(\nu\Delta t)^n}{n!}\exp(-\nu\Delta t). \quad (3)$$

При этом относительная частота кратного события есть

$$F = \frac{1-P_0-P_1}{1-P_0} = \frac{\nu\Delta t}{2} - \frac{(\nu\Delta t)^2}{12} + O\left((\nu\Delta t)^4\right). \quad (4)$$

Время измерения на СПЦ составляет Δt = 1.3 мс, что при частоте измерения 150 частиц в секунду даёт вероятность двойного события 9%, а при частоте 400 частиц в секунду – 23%. Важно отметить, что средняя частота ν, входящая в (3), является частотой следования частиц через зону измерения, которая в общем случае не совпадает с количеством измеренных в единицу времени индикатрис – последнее может определяться пропускной способностью канала передачи данных, временем обработки сигнала и т.д. В этом случае значение ν можно определить, проводя разведение пробы, пока частота измерения не начнёт уменьшаться. В случае небольшой доли кратных событий ν пропорциональна концентрации частиц. При известной ν формула (4) будет давать верный результат в силу случайного выбора измеряемых частиц.

В новом ПО также изменился формат записи данных в файл. Более гибкий формат позволяет считывать измеренные данные без знания таких служебных параметров, как длина измеренного сигнала. Более того, её изменение в процессе записи в файл не приведет к каким-либо искажениям при считывании.

2.2.2. Считывание данных

Программное обеспечение для считывания и обработки данных, существовавшее ранее, также имело несколько недостатков. Главный из них – это то, что для получения экспериментальных сигналов со сканирующего проточного цитометра и для считывания уже измеренных данных из файла использовалась одна и та же программа с разными входными модулями. Это привело к тому, что записанные ранее данные можно было просмотреть и обработать в строгом порядке, как они

появлялись в эксперименте. С другой стороны, при обработке эксперимента часто возникает необходимость вернуться к определенной частице. Например, при необходимости найти частицу с максимальным сигналом светорассеяния нужно сначала считать все измеренные сигналы, затем найти среди них максимальный и продолжить работать с этим сигналом. В существовавшей версии ПО для этого приходилось запускать программу заново и считывать данные вплоть до нужной частицы.

Это усугублялось тем, что в силу общей недостаточной оптимизации программы считывание происходило со скоростью не более 20 сигналов в секунду, при том что в типичном эксперименте измеряется несколько тысяч сигналов. Это приводило к немотивированному увеличению времени, затраченному на обработку экспериментов, на десятки минут.

В силу этого были сформулированы следующие принципы для создания нового ПО для считывания данных:

1. Максимизировать скорость считывания с диска. Для этого минимизируется обработка считываемых сигналов и вообще количество операций с данными;
2. Реализовать возможность мгновенного перехода к интересующему сигналу независимо от его порядкового номера.

Данные принципы были реализованы в ПО (Рис. 4), алгоритм работы которого следующий:

- Из файла считываются все данные, при этом для каждого сигнала рассчитываются интегралы (площадь под сигналом) в двух разных диапазонах. Например, на Рис. 4 интегралы берутся в диапазонах от 2100 до 2600 точек и от 2600 до 3100 точек, что соответствует площади под левой и правой половинами сигнала светорассеяния. Интеграл – это простейший параметр, который может использоваться для выбора интересующей пользователя частицы, можно использовать и другие параметры.
- Два интеграла для каждого сигнала используются как координаты на плоскости, в результате чего каждая частица изображается точкой на двумерной карте (справа на Рис. 4). При нажатии на точку на карте соответствующий ей сигнал считывается из файла и отображается на графике слева.

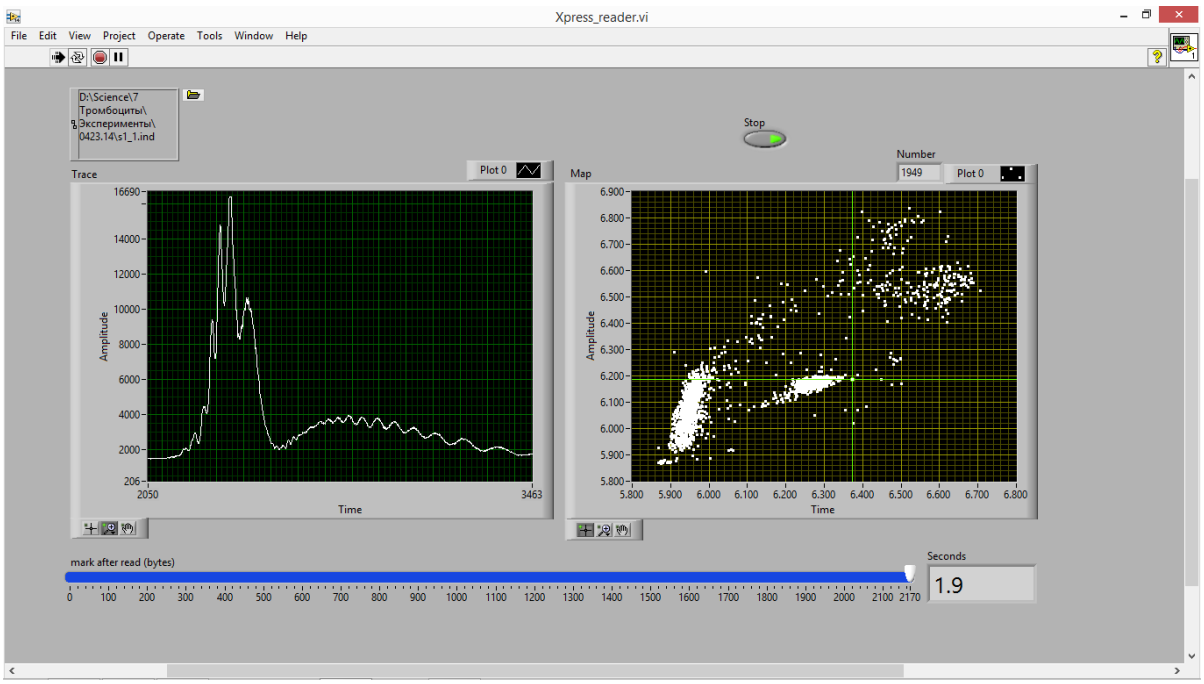

Рис. 4. Общий вид программы для считывания сигналов, измеренных ранее на СПЦ. Справа – двумерная карта, где каждому сигналу соответствует точка, при нажатии на которую сигнал появляется на графике слева. Файл размером 2170 сигналов был загружен за 1.9 с, что соответствует скорости считывания ~1150 сигналов/с.

Испытания программы на компьютере с процессором Intel Celeron с тактовой частотой 1.7 ГГц показали скорость считывания около 500 сигналов в секунду (до 1500 при последующих открытиях этого же файла в силу встроенного в LabVIEW алгоритма буферизации). Это даёт возможность на два порядка сократить время обработки эксперимента. В дальнейшем производится дальнейшая обработка выбранного сигнала. Например, актуальной задачей, решение которой описано ниже (Раздел 2.2.3), являлось быстрое сравнение сигнала, измеренного для сферической частицы, с рассчитанным теоретически. Это используется для определения служебных параметров СПЦ, таких как положение триггерного луча и скорость потока жидкости, что необходимо для расчета передаточной функции для дальнейшего получения индикатрис светорассеяния из измеренных сигналов для несферических частиц. Планируется реализовать сохранение в файл индикатрис для частиц из определённой области на двумерной карте.

2.2.3. Определение скорости потока и положения триггерного луча

Определение параметров СПЦ ранее осуществлялось с помощью сравнения сигнала светорассеяния, измеренного для калибровочных полистирольных микросфер, с теоретической функцией. Эта функция является результатом свёртки индикатрисы

светорассеяния, которая зависит от диаметра d и показателя преломления n сферической частицы и рассчитывается с помощью теории Ми, с передаточной функцией СПЦ, которая зависит от служебных параметров – расстояния от триггерного луча до дна сферического зеркала D и скорости потока в кювете V ([94]). Таким образом, теоретический сигнал зависит от четырёх параметров, причем эта зависимость нелинейная.

Для получения индикатрисы светорассеяния из измеренных сигналов необходимо знание передаточной функции, а для этого нужно определить D и V. Для этого можно использовать нелинейную регрессию с целью поиска параметров, которые дают наилучшее совпадение теории с экспериментом для сферической частицы, а затем использование этих параметров для получения индикатрис всех частиц, в том числе и несферических. Опыт показывает, что эту процедуру необходимо проводить отдельно для каждого эксперимента.

В существующем ПО определение параметров D и V происходит с помощью метода глобальной оптимизации DiRect [95]. При этом вычисление индикатрис по теории Ми происходит в реальном времени для каждого набора параметров, даже если меняются только D и V, а размер и показатель преломления частицы d и n остаётся прежним. При типичном количестве итераций в несколько десятков тысяч это приводит к общему времени процедуры порядка минуты, что сильно затрудняет обработку экспериментов и настройку СПЦ. Для оптимизации данной процедуры была предложена следующая идея.

Скорость потока и положение триггерного луча по сути определяют номер точки, с которой начинается сигнал светорассеяния, а также его длину. Поэтому при изменении служебных параметров сигнал лишь растягивается и сдвигается. Это даёт возможность применить более прямые методы поиска, чем глобальная оптимизация. В частности, нами был реализован алгоритм определения D и V на основе определения положения центра масс сигнала (первый момент) и его ширины (второй центральный момент). Сравнение положения центра масс экспериментального и посчитанного для определенного размера и показателя преломления теоретического сигналов позволяет определить сдвиг и растяжение. После сдвига и растяжения теоретического сигнала производится вычисление суммы квадратов отклонений между сигналами, а затем эта величина минимизируется при изменении размера и показателя преломления частицы, для которой рассчитывается индикатриса.

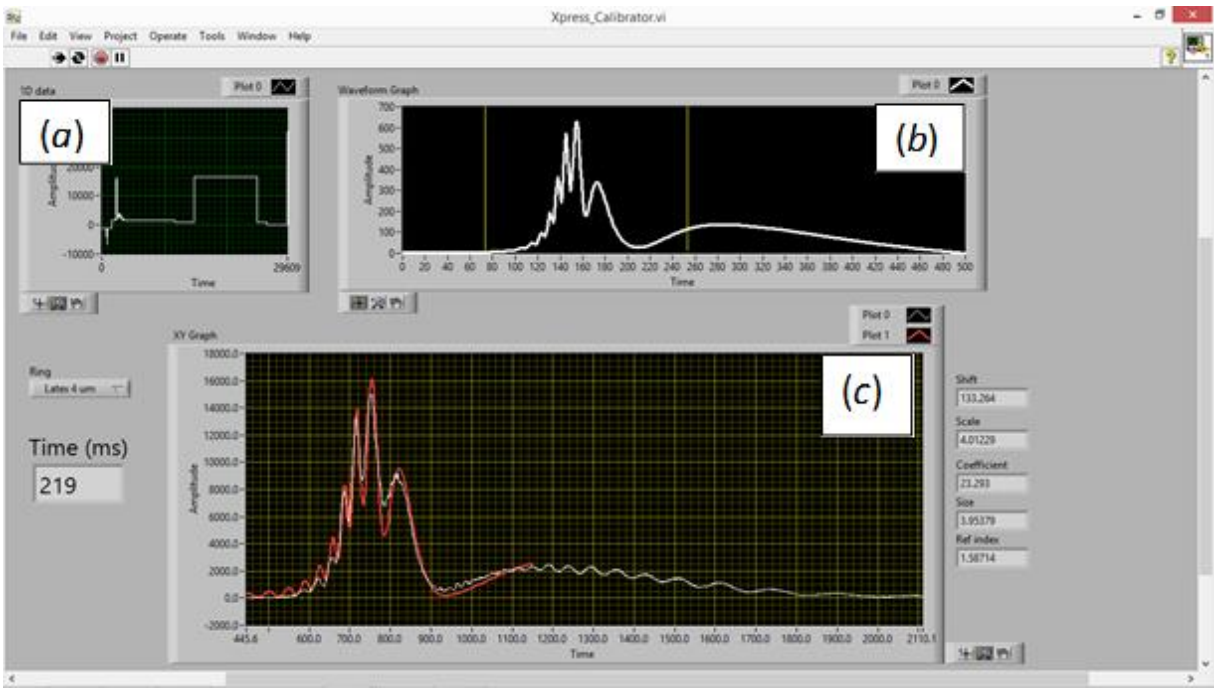

Рис. 5. Модуль для определения положения триггерного луча и скорости потока. (*a*): экспериментальный сигнал, (*b*): типичный теоретический сигнал светорассеяния, а также границы для выбора диапазона расчета суммы квадратов отклонений. (*c*): экспериментальный сигнал светорассеяния и наиболее близкий теоретический. Время работы модуля составило 0.219 с.

Данный подход был реализован в виде ПО (Рис. 5), которое в качестве модуля встроено в описанную ранее программу для считывания экспериментальных данных (2.2.2). Помимо вышеописанной идеи, для ускорения работы применяется база данных предварительно насчитанных экспериментальных сигналов для различных размеров и показателей преломления калибровочных микросфер. Это позволяет производить определение параметров *D* и *V* за время порядка 0.2–0.4 с, что уже можно использовать для контроля настройки СПЦ в реальном времени.

Для последнего особенно важно, что диапазон, в котором рассчитывается сумма квадратов отклонений, задается на теоретическом сигнале (Рис. 5, верхний график). Это позволяет учитывать при минимизации только те области сигнала, где ожидается хорошее совпадение с теорией. Например, в области углов рассеяния менее 5º совпадение обычно становится существенно хуже.

Созданное ПО быстро и устойчиво работает при условии, что центр масс сигнала определяется с хорошей точностью. Нами было эмпирически обнаружено, что точность определения повышается, если перед расчётом первого и второго моментов сигнал возвести в нечётную степень. Наилучшие результаты работы программа показала при возведении сигнала в седьмую степень. При этом эффект шума (в частности, влияние участка, где нет полезного сигнала) радикально уменьшается.

Таблица 1. Параметры СПЦ, полученные различными методами

	Микросфера диаметром 2 мкм				**Микросфера диаметром 4 мкм**			
	V, м/с	*D*, мм	*d*, мкм	*n*	*V*, м/с	*D*, мм	*d*, мкм	*n*
Стандартная процедура	2.88	1.15	1.91	1.586	2.88	1.15	3.99	1.574
Центр масс	2.78	1.25	1.92	1.585	2.81	1.27	3.97	1.585
Эквидистантность	2.75	1.20			2.92	1.39		

Тестирование показало, что определённые с помощью модуля параметры совпадают при использовании калибровочных микросфер размером 2 и 4 мкм в одной пробе, а также с точностью до нескольких процентов совпадают с существующим ПО (Таблица 1).

2.2.4. Определение параметров *D* и *V* без использования теории Ми

Использование теории Ми позволяет рассчитать индикатрису светорассеяния шара с определенным размером и показателем преломления. При правильном выборе *D* и *V* индикатриса, полученная из экспериментального сигнала для калибровочной микросферы с этим же размером и показателем преломления, должна совпасть с теоретической. Оказывается, что существуют общие свойства индикатрисы сферической частицы, которые можно использовать для проверки соответствия экспериментальной индикатрисы теоретической, даже не проводя расчёта последней. Так, в работе [96] было показано, что минимумы в индикатрисе сферической частицы распределены эквидистантно. С другой стороны, в сигнале светорассеяния калибровочных микросфер минимумы расположены нерегулярно. Передаточная функция (Рис. 6*b*) при переводе времени в угол рассеяния растягивает одни области сигнала (Рис. 6*a*) сильнее, чем другие, и при некоторых значениях служебных параметров в результате преобразования получится функция, минимумы которой расположены эквидистантно (Рис. 6*c*). Эти параметры и будут соответствовать настоящему расстоянию до триггерного луча и скорости потока.

Данный подход был также реализован в виде ПО, которое позволяет определять значения служебных параметров на основе эквидистантности минимумов в индикатрисе светорассеяния сферической частицы (Рис. 6). Результаты работы программы с точностью до 10% совпадают с результатами стандартной процедуры и метода, описанного в разделе 2.2.3 (Таблица 1).

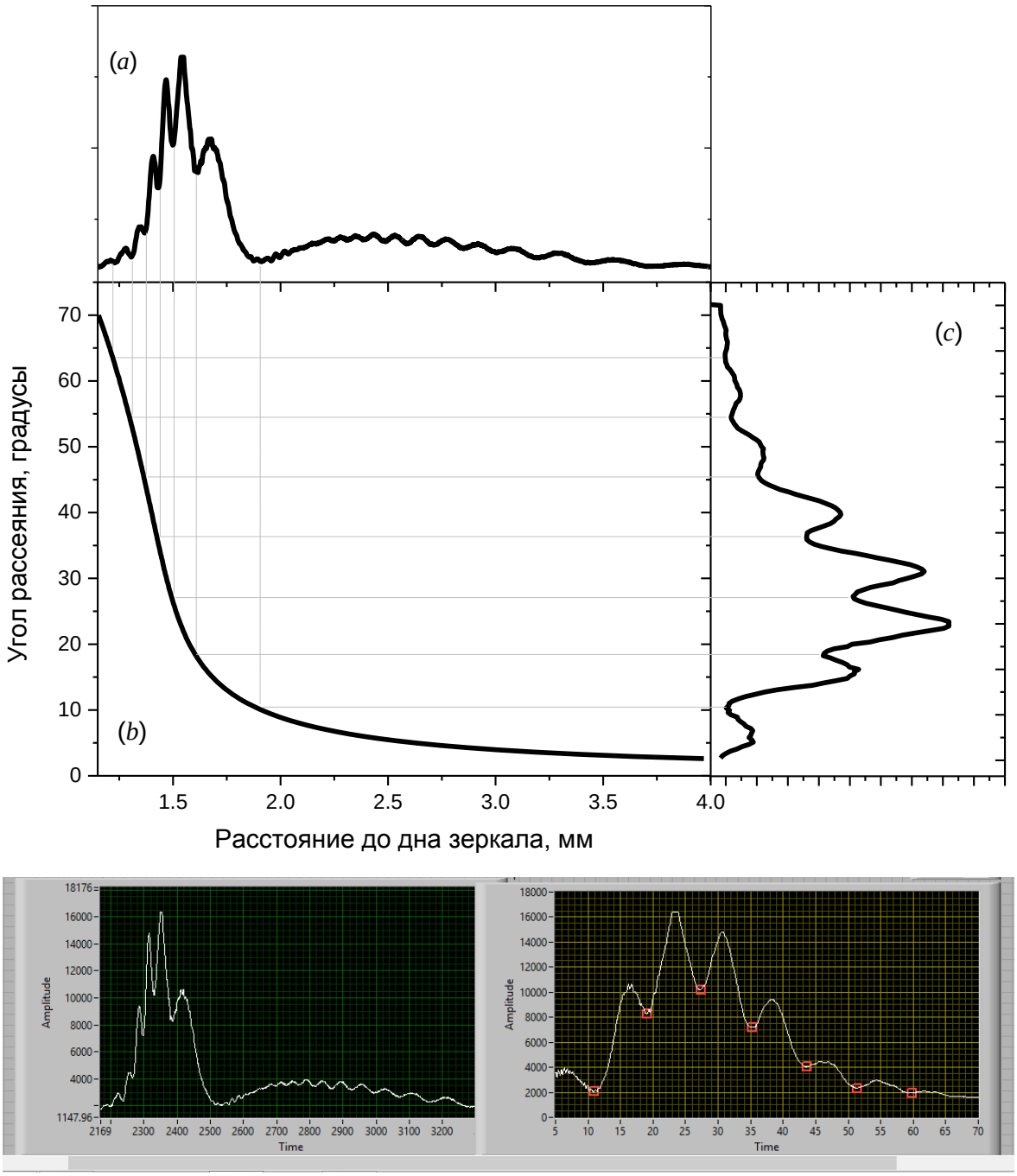

Рис. 6. Передаточная функция СПЦ (*b*) переводит зависимость интенсивности от времени (*a*) в зависимость от угла рассеяния (*c*). (*d*) Модуль для определения положения триггерного луча и скорости потока на основе эквидистантности минимумов в индикатрисе сферической частицы.

Использование новых методов определения скорости потока и положения триггерного луча вместо стандартной процедуры было реализовано в программе для считывания и обработки данных (Раздел 2.2.2 и Рис. 4). Показано, что полученные в результате работы алгоритма на основе определения центра масс сигнала светорассеяния индикатрисы практически не отличаются от полученных с помощью стандартной процедуры. В частности, в результате решения обратной задачи светорассеяния (Раздел 3.1) получены те же параметры тромбоцитов. Можно сделать

вывод, что новые подходы, разработанные в настоящей диссертации, позволяют более быстро обрабатывать измеренные данные. Это особенно важно для возможных приложений СПЦ, связанных с рутинной диагностикой, где задержки неприемлемы в силу большого потока пациентов. В таких приложениях также важно быстрое решение обратной задачи светорассеяния, что подразумевает использование предварительно насчитанного набора (базы данных) теоретических индикатрис светорассеяния для проведения глобальной оптимизации.

* * *

В результате модернизации СПЦ удалось повысить частоту измерений (количество измеряемых частиц в секунду) до 150–400. Это важно как для измерения быстрых процессов, таких как активация тромбоцитов, так и для рутинных анализов, в том числе и с точки зрения коммерциализации СПЦ. Кроме того, была ускорена процедура определения скорости потока и положения триггерного луча, что необходимо для получения индикатрис светорассеяния из измеренных сигналов. Предложен новый метод определения этих параметров без использования теории Ми.

Глава 3. Решение прямой и обратной задач светорассеяния для тромбоцитов и их агрегатов

3.1. Решение обратной задачи светорассеяния для одиночных тромбоцитов

3.1.1. Оптическая модель тромбоцита

В качестве оптической модели тромбоцита был выбран сплюснутый сфероид. Эта модель может быть описана четырьмя параметрами, например:

- радиус эквивалентной сферы r;
- отношение полуосей ε;
- показатель преломления n;
- угол ориентации в потоке Ψ.

Моделирование светорассеяния сплюснутым сфероидом производилось с помощью метода дискретных диполей [63]. Для расчетов использовалась программа с открытым исходным кодом ADDA v.1.0 [64]. Индикатрисы рассчитывались с шагом 1°

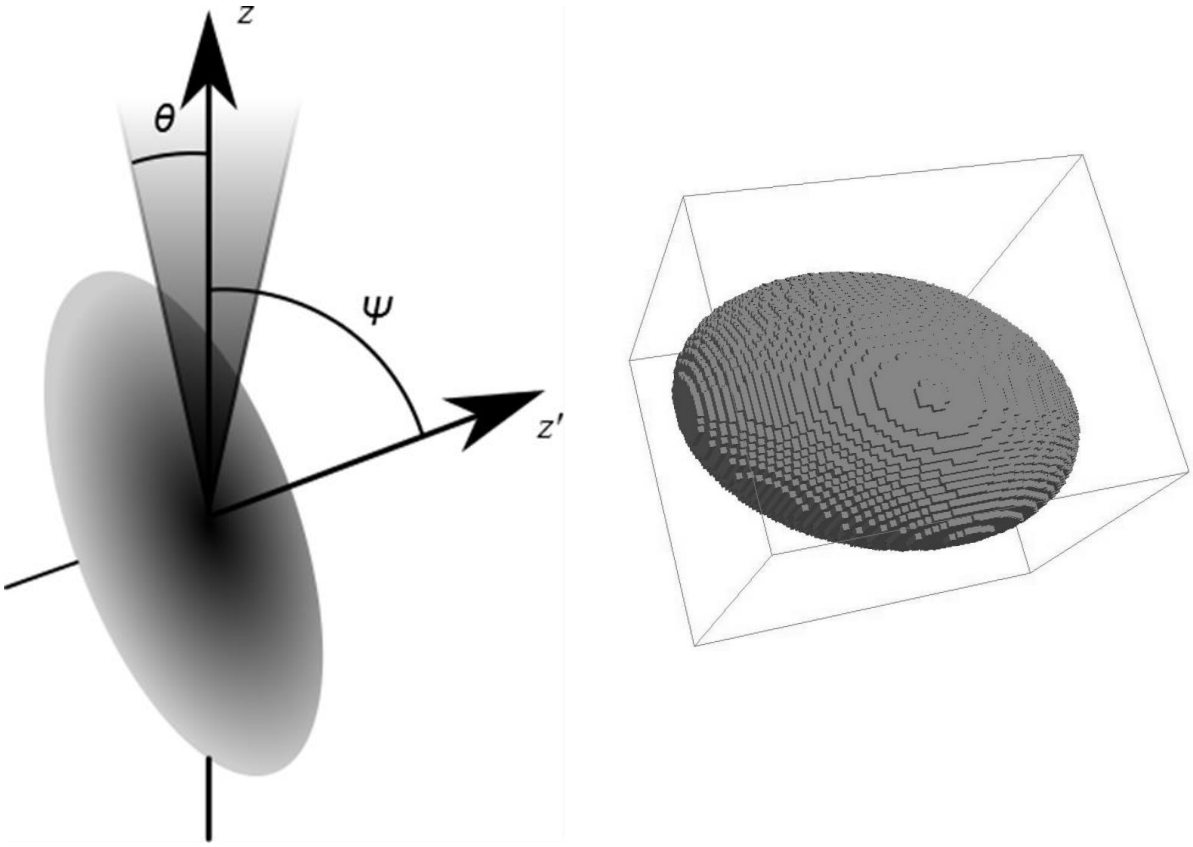

Рис. 7. Геометрия задачи рассеяния света сплюснутым сфероидом (слева) и его модель для расчётов методом дискретных диполей (справа).

по углу рассеяния θ. При расчетах использовалось 12 диполей на длину волны или 12 диполей на малую ось сфероида, если она была меньше длины волны, чтобы более точно описать форму частицы. Модель для расчёта, полученная в результате дискретизации, показана на Рис. 7 справа. Интегрирование по азимутальному углу φ от 0° to 360° было выполнено по 32 точкам. Командная строка для запуска программы выглядела следующим образом:

```
adda -shape ellipsoid 1 ASPRAT -lambda WLEN -size DIAM -m
REL_REF_INDEX 0.00000 -scat_grid_inp 1.txt -phi_integr 7 -dir
DIRECTORY -orient 0 BETA 0 -dpl DPL ,
```

где `ASPRAT` – отношение полуосей ε, `WLEN` – длина волны в среде (660 нм, в некоторых случаях также проводились расчёты для длины волны 405 нм, см. раздел 4.2.6), `DIAM` – большая ось сфероида, `REL_REF_INDEX` – относительный показатель преломления частицы, `DIRECTORY` – директория для сохранения файлов расчета, `BETA` – угол ориентации Ψ, `DPL` – количество диполей на длину волны.

Для оценки точности вычислений несколько типичных индикатрис были пересчитаны с увеличенным до 40 числом диполей. Норма отличия индикатрис в смысле (7) составила не более 0.7%.

3.1.2. Сравнение метода дискретных диполей и метода Т-матриц

Метод Т-матриц также может быть использован для расчета светорассеяния сфероидом. Он более быстрый, однако не сходится для отношения полуосей больше 4 [60]. Существует модифицированный метод Т-матриц с дискретными источниками [61], который позволяет проводить расчет для рассеивающих частиц с существенно несферической геометрией [62]. Мы провели тестирование данного метода и его сравнение с DDA. Для расчетов использовался пакет NFM-DS v.1.1 (Schmidt et al, [http://www.scattport.org/index.php/programs-menu/t-matrix-codes-menu/239-nfm-ds]).
Необходимо отметить, что расчет одной Т-матрицы дает возможность получить индикатрису для любого угла ориентации, что может быть использовано для увеличения производительности расчетов.

Мы провели сравнение результатов расчётов методом дискретных диполей и методом Т-матриц с дискретными источниками для сфероида с r = 1 мкм и отношением полуосей ε = 1..10. Падающее излучение с длиной волны 660 нм было направлено вдоль оси симметрии сфероида. Показатель преломления сфероида брался равным n = 1.4, или ~1.05 относительно среды.

При расчётах методом Т-матриц использовались распределённые источники в комплексной плоскости, что необходимо для сплюснутых частиц, координаты которых рассчитывались в коде NFM-DS. Параметр во входном файле, отвечающий за их распределение (`EpsZReIm`), брался равным 0.95.

Еще одним важнейшим параметром является число членов ряда в разложении по сферическим гармоникам. Этот параметр (`Nrank`) оценивался исходя из радиуса сферы, описывающей частицу, согласно критерию Вискомба [97]:

$$Nrank = x + 4x^{1/3} + 5, \qquad x = \frac{2\pi r \varepsilon^{1/3} n_0}{\lambda} \tag{5}$$

Это значение дополнительно умножалось на 1, 1.2 … 2 для оценки сходимости вычислений.

Параметр `Nint,` контролирующий точность интегрирования по поверхности, выбирался равным

$$Nint = 6 \cdot Nrank \tag{6}$$

Командная строка для запуска программы выглядела следующим образом:

```
nfm-ds -ref_index 1.047120E+0 -semi_axis_sym 62.996052E-3 -
semi_axis_asym 125.992105E-3 -beta 50.000000E+0 -nint 72 -
nrank 12 -wavelength 660.000000E-3 -medium_ref_index
1.337000E+0
```

ADDA выдаёт ненормализованную матрицу Мюллера, в то время как NFM-DS вычисляет среднее дифференциальное сечение рассеяния для двух различных поляризаций. Поэтому было необходимо сложить результаты для двух поляризаций вместе и умножить их на квадрат модуля волнового вектора k^2 для сравнения с элементом S_{11} матрицы Мюллера.

Таким образом, с помощью обоих методов рассчитывался элемент S_{11}, затем он интегрировался по азимутальному углу (аналогично уравнению (1)). Расчёты выполнялись для полного диапазона полярного угла рассеяния с шагом 1°.

Расчеты проводились для при различных значениях параметра *Nrank* для метода Т-матриц. При этом точность метода дискретных диполей также контролировалась.

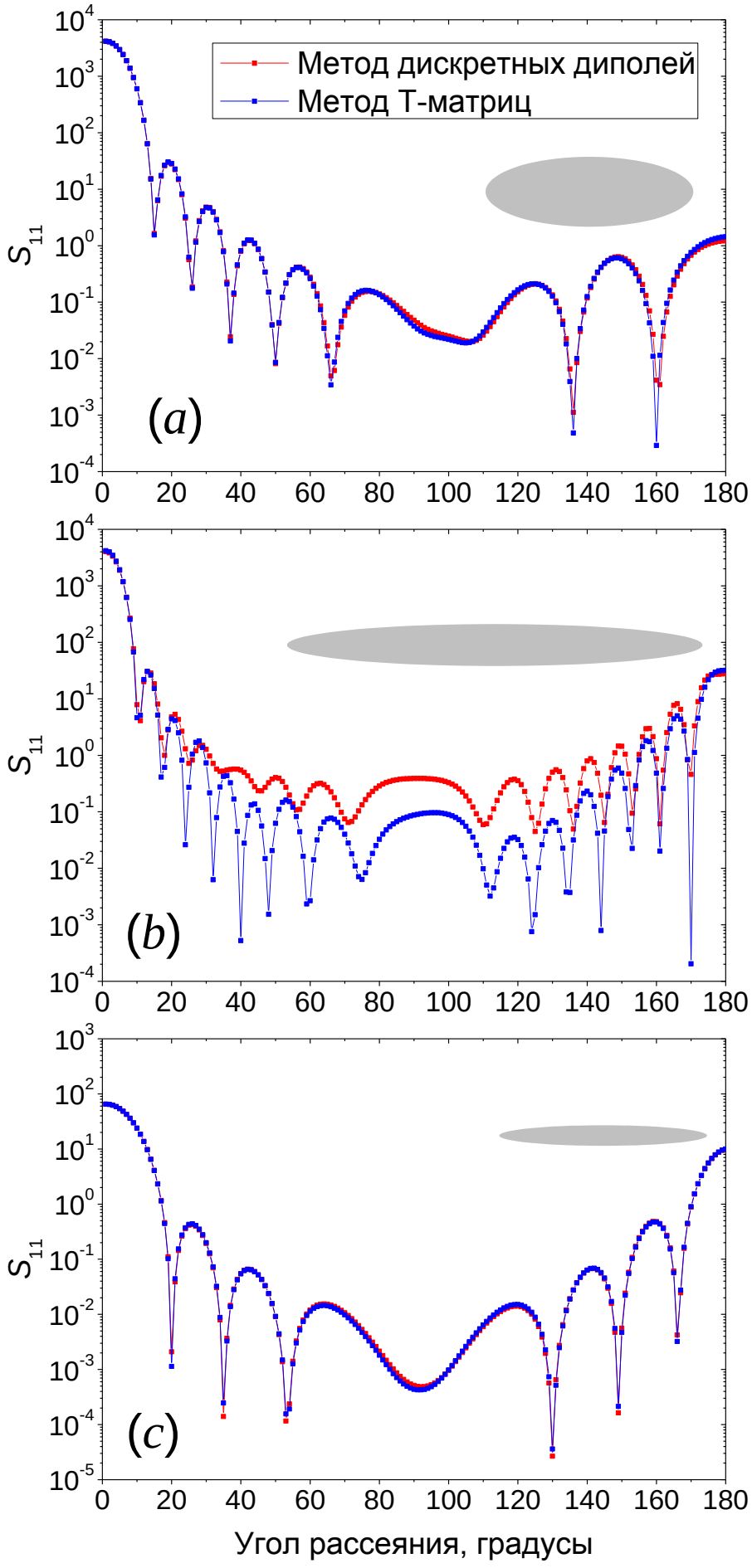

Рис. 8. Сравнение расчётов методом дискретных диполей и методом Т-матриц.

Для сфероида с отношением полуосей $\varepsilon = 3$ удалось достичь хорошего результата (Рис. 8*a*) уже при значении *Nrank*, определённого выражением (5). При этом время расчётов для ADDA составило 50 с, для NFM-DS – 330 с. Однако при $\varepsilon = 10$ метод Т-матриц не сошелся (Рис. 8*b*) даже при значении *Nrank* в два раза больше (5), причём время вычисления при таком значении параметра занимало 4030 с, что больше времени вычислений для ADDA примерно в 60 раз. Поэтому дальнейшее увеличение *Nrank* бессмысленно.

Чтобы проверить, что расходимость метода Т-матриц связана с большим размером частицы, мы провели расчёты для сфероида с радиусом сферы эквивалентного объёма $r = 0.5$ мкм. В этом случае метод Т-матриц также сошёлся сразу (Рис. 8*c*), причем время расчёта было сравнимо с МДД.

Тем не менее, для того, чтобы покрыть все возможные параметры тромбоцитов, метод Т-матриц не подходит. Поэтому было решено использовать для расчётов метод дискретных диполей.

3.1.3. Расчёт базы данных теоретических индикатрис

Так как для расчетов необходимо использовать достаточно медленный метод DDA, расчет индикатрисы занимает около 1 минуты на современном компьютере, что не позволяет проводить прямую подгонку. Поэтому мы насчитали базу данных теоретических индикатрис, состоящую из $N = 500\,000$ индикатрис с параметрами $\boldsymbol{\beta}_i$, равномерно распределёнными в следующих диапазонах:

Таблица 2. Границы базы данных.

	Нижняя граница	**Верхняя граница**
Радиус эквивалентной сферы r	0.5 мкм	2 мкм
Отношение полуосей ε	1	8
Показатель преломления n	1.35	1.5
Угол ориентации Ψ	0°	90°

Случайное распределение параметров индикатрис в базе данных имеет несколько преимуществ по сравнению с регулярной решеткой. Во-первых, это автоматически учитывает разную чувствительность индикатрисы к параметрам модели. Например, в чисто умозрительном случае, когда индикатриса не зависит от одного из параметров модели, регулярная решетка приведет к избыточному многократному расчету одной и той же индикатрисы. При этом случайное распределение параметров позволяет преодолеть эту проблему, так как все параметры разные (если не учитывать ограниченную вычислительную точность). Во-вторых, размер базы данных со случайно

распределенными параметрами может быть легко увеличен на произвольное число элементов, что особенно важно для адаптивного расчета базы данных. В-третьих, формулы для статистического анализа результатов глобальной оптимизации (раздел 3.1.5) приобретают особенно простой вид.

Все вычисления производились на кластере информационно-вычислительного центра НГУ. Типичное время расчета индикатрисы для тромбоцита составляет 1 минуту на одном ядре процессора Intel X5355 (2.66 GHz).

3.1.4. Глобальная оптимизация с использованием базы данных

В данном параграфе мы излагаем общий метод решения обратной задачи светорассеяния для несферических частиц, описываемых несколькими параметрами. В методе используются идеи, изначально опубликованные в [91] и примененные в [98] для палочкообразных бактерий. Здесь мы описываем метод во всех деталях и в виде, готовом для применения для характеризации любых частиц с использованием базы данных любой структуры.

Обратная задача светорассеяния преобразуется в задачу глобальной минимизации взвешенной суммы квадратов отклонений теоретического и экспериментального сигналов:

$$S(\boldsymbol{\beta}) = \left\| I_{\exp} - I(\boldsymbol{\beta}) \right\|^2 = \sum_{j=1}^{k} \left[w(\theta_j) \left(I_{\exp}(\theta_j) - I(\theta_j, \boldsymbol{\beta}) \right) \right]^2 , \qquad (7)$$

где $\boldsymbol{\beta}$ – вектор параметров модели (в нашем случае $\boldsymbol{\beta} = (r, \varepsilon, n, \Psi)$), $I(\boldsymbol{\beta})$ и $I_{\exp}$ – теоретическая и экспериментальная индикатрисы, соответственно, k – количество точек в индикатрисе, $w(\theta)$ – весовая функция (2). Уравнение (7) также задает норму, или расстояние, в k-мерном пространстве индикатрис, что используется в разделе 3.1.6.

Мы рассматриваем общее определение базы данных как набор $\{\boldsymbol{\beta}_i, p_i, I(\boldsymbol{\beta}_i)\}$, $i = 1,\ldots,N$. Значения p_i – относительные вероятности (веса) элементов базы данных, определяемые структурой базы данных и нормированные так, что $\sum_{i=1}^{N} p_i = 1$. В случае случайного распределения параметров (раздел 3.1.3) $p_i = 1/N$. Другим важным случаем является детерминированное деление начальной области параметров $\mathbf{B}$ (объемом V) на непересекающиеся области V_i с $\boldsymbol{\beta}_i \in V_i$, тогда $p_i = V_i/V$. Этот случай возникает, в частности, при глобальной оптимизации методом DiRect.

Таким образом, если имеется насчитанная база данных, обработка экспериментальной индикатрисы состоит в сравнении со всеми индикатрисами из нее. Обратная задача светорассеяния решается методом нахождения ближайшей индикатрисы из базы данных, используя расстояние, определенное формулой (7). В

дополнение к приблизительному нахождению глобального минимума $S(\boldsymbol{\beta})$ с параметрами $\boldsymbol{\beta}_0$, это дает примерное описание всей поверхности $S(\boldsymbol{\beta})$ набором значений $\{S(\boldsymbol{\beta}_i)\}$.

3.1.5. Оценка погрешностей метода

Для оценки погрешностей определения параметров используется Байесовский подход. Он позволяет вычислить плотность вероятности $P(\boldsymbol{\beta})$ того, что частица с данной экспериментальной индикатрисой имеет параметры $\boldsymbol{\beta}$:

$$P(\boldsymbol{\beta}) = \kappa\left[S(\boldsymbol{\beta})\right]^{-k_{eff}/2}, \kappa = \left(\int_{\mathbf{B}} \left[S(\boldsymbol{\beta})\right]^{-k_{eff}/2} \mathrm{d}\boldsymbol{\beta}\right)^{-1}, \quad (8)$$

где $\mathbf{B}$ – область в пространстве параметров, занятая базой данных, $k_{\text{eff}} < k$ – эффективное число степеней свободы, используемое для приближенного описания зависимости шума в соседних точках экспериментальной индикатрисы. Оно определяется структурой невязки $I_{\text{exp}} - I(\boldsymbol{\beta}_0)$ [91].

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

$$\langle f(\boldsymbol{\beta})\rangle = \int_{\mathbf{B}} f(\boldsymbol{\beta}) P(\boldsymbol{\beta}) d\boldsymbol{\beta}. \quad (9)$$

Так как $S(\boldsymbol{\beta})$ известна в наборе точек $\boldsymbol{\beta}_i$ с весами p_i, интегрирование может быть приближенно заменено суммированием, как отношение двух средних:

$$\langle f(\boldsymbol{\beta})\rangle \approx \bar{g}/\bar{h}, \quad \bar{x} \equiv \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i, \quad g_i = f(\boldsymbol{\beta}_i) h_i, \quad h_i = N p_i S(\boldsymbol{\beta}_i)^{-k_{\text{eff}}/2}, \quad (10)$$

что верно для любого распределения параметров в базе данных. Последовательность $h = \{h_i\}$ содержит всю информацию о $P(\boldsymbol{\beta})$, а $\bar{h}$ является оценкой $1/\kappa$. Можно оценить погрешность формулы (10), воспользовавшись стандартными формулами статистики:

$$\mathrm{Var}[\bar{x}] = \frac{\mathrm{Var}[x]}{N} \approx \frac{\mathrm{SV}[x]}{N}, \quad \mathrm{SV}[x] = \frac{1}{N-1}\sum_{i=1}^{N}\left(x_i - \bar{x}\right)^2, \quad (11)$$

где Var[…] обозначает (неизвестную) дисперсию величины, а SV[…] – выборочную. Предполагая, что $\bar{g}$ и $\bar{h}$ независимы, что асимптотически верно при $N \to \infty$, получаем:

$$\frac{\mathrm{Var}\left[\langle f(\boldsymbol{\beta})\rangle\right]}{\langle f(\boldsymbol{\beta})\rangle^2} = \frac{1}{N}\left(\frac{\mathrm{SV}[g]}{\bar{g}^2} + \frac{\mathrm{SV}[h]}{\bar{h}^2}\right), \quad (12)$$

Согласно уравнению (9) мы рассчитывали математическое ожидание параметров $\boldsymbol{\mu} = \langle\boldsymbol{\beta}\rangle$ (в общем случае отличающееся от $\boldsymbol{\beta}_0$) и матрицу ковариаций $\mathbf{C} = \langle(\boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\mu})(\boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\mu})^T\rangle$. Также, зная вероятности $P(\boldsymbol{\beta}_i)$, легко получить доверительные

области, определяемые как $\mathbf{R}(P_0) = \{\boldsymbol{\beta} | P(\boldsymbol{\beta}) > P_0\}$. Здесь P_0 – переменный порог, который неявно определяется уровнем достоверности α:

$$\alpha = \int_{\mathbf{R}(P_0)} P(\boldsymbol{\beta}) d\boldsymbol{\beta} \approx \kappa \sum_{\boldsymbol{\beta}_i \in \mathbf{R}(P_0)} p_i S(\boldsymbol{\beta})^{-k_{\text{eff}}/2} \quad . \tag{13}$$

Важно отметить, что точность определения **C**, а следовательно, и доверительных областей, сильно зависит от точности определения $S(\boldsymbol{\beta}_0)$. Последняя может быть определена как ожидаемое изменение значения $S(\boldsymbol{\beta}_0)$ при разбиении базы данных заново. Если база данных достаточно плотная, $S(\boldsymbol{\beta}_0)$ близка к точному значению $S(\boldsymbol{\beta}_\perp)$, которое определяется только экспериментальным шумом конкретной обрабатываемой индикатрисы (см. раздел 3.1.6). В этом случае точность $S(\boldsymbol{\beta}_0)$ достаточно хорошая (см. раздел 4.2.1). Однако в случае обработки тестовой (теоретической) индикатрисы (см. раздел 3.1.7) $S(\boldsymbol{\beta}_\perp) = 0$, следовательно, вариации $S(\boldsymbol{\beta}_0)$ большие при любом размере базы данных. Таким образом, метод характеризации, описанный в данном разделе, неприменим в случае нулевого экспериментального шума, то есть для обработки тестовых (теоретических) индикатрис.

3.1.6. Зависимость величины глобального минимума от размера базы данных

Оценим влияние количества элементов в базе данных Q на величину $S(\boldsymbol{\beta}_0)$. При увеличении плотности базы данных $\boldsymbol{\beta}_0$ приближается к точному значению $\boldsymbol{\beta}_\perp$ (которое может быть получено, например, при достаточно долгой работе какого-либо алгоритма прямой подгонки) для данного I_{exp}. Геометрически $I(\boldsymbol{\beta}_\perp)$ – ближайшая индикатриса из многообразия всех индикатрис модели $L = \{I(\boldsymbol{\beta}) | \boldsymbol{\beta} \in \mathbf{B}\}$, то есть основание перпендикуляра из I_{exp} на L (Рис. 9). Предположим, что $\boldsymbol{\gamma} = \boldsymbol{\beta}_0 - \boldsymbol{\beta}_\perp$ мало, и линеаризуем $I(\boldsymbol{\beta})$ вблизи $\boldsymbol{\beta}_\perp$:

$$I(\boldsymbol{\beta}_0) \approx I(\boldsymbol{\beta}_\perp) + \sum_{\mu=1}^{p} J_\mu \gamma_\mu, \quad J_\mu = \frac{\partial I(\boldsymbol{\beta}_\perp)}{\partial \beta_\mu}, \tag{14}$$

где J_μ – матрица Якоби I в точке $\boldsymbol{\beta}_\perp$. По определению J_μ и $\boldsymbol{\beta}_\perp$, $(J_\mu, I_{\text{exp}} - I(\boldsymbol{\beta}_\perp)) = 0$, где $(.,.)$ – скалярное произведение в смысле (7). Таким образом, $S(\boldsymbol{\beta}_0)$ принимает вид:

$$S(\boldsymbol{\beta}_0) \approx \left\| \sum_{\mu=1}^{p} J_\mu \gamma_\mu \right\|^2 + S(\boldsymbol{\beta}_\perp) = \sum_{\mu,\nu=1}^{p} T_{\mu\nu} \gamma_\mu \gamma_\nu + S(\boldsymbol{\beta}_\perp), \quad T_{\mu\nu}(\boldsymbol{\beta}_\perp) = (J_\mu, J_\nu). \tag{15}$$

Рассмотрим среднюю по всем экспериментальным индикатрисам величину $S(\boldsymbol{\beta}_0)$. Усреднение по экспериментальным индикатрисам можно рассматривать как усреднение по $\boldsymbol{\beta}_\perp$, распределенным с некоторой плотностью вероятности. Мы предполагаем, что эта плотность вероятности существенно отлична от нуля в области

внутри **B**, достаточно широкой, чтобы покрыть множество элементов базы данных. Тогда среднее $S(\boldsymbol{\beta}_0)$ не должно зависеть от конкретной реализации базы данных (с заданным размером). Поэтому оно не должно меняться при усреднении по реализациям базы данных, в частности, по всем возможным положениям $\boldsymbol{\beta}_0$. Это вместе с уравнением (15) дает:

$$\left\langle S(\boldsymbol{\beta}_0)\right\rangle_\perp \approx \left\langle\left\langle S(\boldsymbol{\beta}_0)\right\rangle_\perp\right\rangle_0 = \left\langle\left\langle S(\boldsymbol{\beta}_0)\right\rangle_0\right\rangle_\perp \approx \left\langle \sum_{\mu,\nu=1}^{p} T_{\mu\nu}\left\langle\gamma_\mu\gamma_\nu\right\rangle_0\right\rangle_\perp + \left\langle S(\boldsymbol{\beta}_\perp)\right\rangle_\perp, \qquad (16)$$

где индексы $\perp$ и 0 обозначают усреднение по $\boldsymbol{\beta}_\perp$ и $\boldsymbol{\beta}_0$, соответственно. Порядок усреднений изменен в силу их независимости, также мы воспользовались тем фактом, что $T_{\mu\nu}$ и $S(\boldsymbol{\beta}_\perp)$ не зависят от $\boldsymbol{\beta}_0$. Единственный член с зависимостью от Q – это $<\gamma_\mu\gamma_\nu>_0$, и он определяется в основном локальной плотностью базы данных около $\boldsymbol{\beta}_\perp$. Если $\boldsymbol{\beta}_\perp$ не лежит вблизи границы базы данных, результат не должен зависеть от формы **B**, поэтому мы для простоты рассматриваем **B** как сферу с радиусом r_0 и центром в $\boldsymbol{\beta}_\perp$.

Так как распределение $\boldsymbol{\gamma}$ изотропно, то

$$\left\langle\gamma_\mu\gamma_\nu\right\rangle_0 = \left\langle|\boldsymbol{\gamma}|^2\right\rangle_0 \delta_{\mu\nu}/p\,. \qquad (17)$$

Распределение элементов базы данных с равномерной плотностью в **B** предполагает, что вероятность $|\boldsymbol{\gamma}|$ принимать значения от r до $r + \mathrm{d}r$ равна

$$P(r) = -\frac{d}{dr}\left(1-\frac{V(r)}{V(r_0)}\right)^Q = \left(1-\frac{V(r)}{V(r_0)}\right)^{Q-1}\frac{Q}{V(r_0)}\frac{dV(r)}{dr}, \qquad (18)$$

где $V(r)$ объем p-мерной сферы радиусом r. Таким образом,

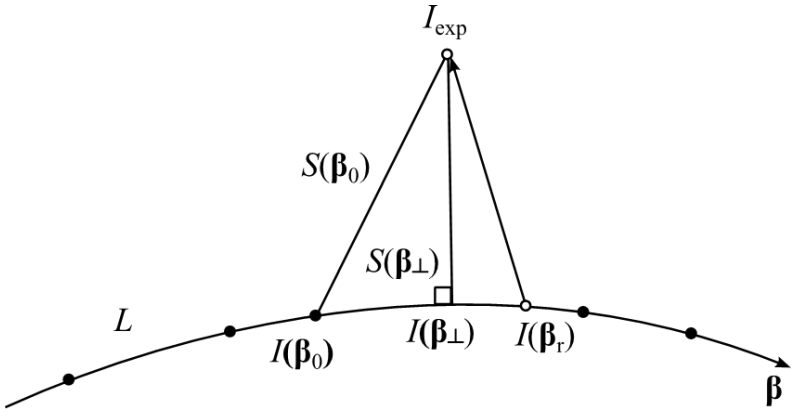

Рис. 9. Иллюстрация глобальной оптимизации с использованием предварительно насчитанной базы данных в случае $k = 2$, $p = 1$. L – p-мерное многообразие модельных индикатрис, в котором черные точки обозначают элементы базы данных. Идеальная индикатриса тромбоцита $I(\boldsymbol{\beta}_r)$ и измеренная индикатриса I_{exp} показаны белыми точками. $I(\boldsymbol{\beta}_0)$ – ближайшая индикатриса из базы данных, $I(\boldsymbol{\beta}_\perp)$ – основание перпендикуляра из I_{exp} на L.

$$\left\langle |\boldsymbol{\gamma}|^2 \right\rangle_0 = \int_0^{r_0} \mathrm{d}r P(r) r^2 = Q r_0^2 \int_0^1 \mathrm{d}u (1-u)^{Q-1} u^{2/p} = Q r_0^2 \mathrm{B}\left(\frac{2}{p}+1, Q\right) \approx r_0^2 \Gamma\left(\frac{2}{p}+1\right) Q^{-2/p}, . \qquad (19)$$

где $u = V(r)/V(r_0) = (r/r_0)^p$ и использованы асимптотические свойства бета-функции для большого Q.

Окончательно, подставив выражения (19), (17) в уравнение (16), получаем:

$$\left\langle S(\boldsymbol{\beta}_0) \right\rangle_\perp \approx \left\langle S(\boldsymbol{\beta}_\perp) \right\rangle_\perp + \frac{r_0^2}{p} \Gamma\left(\frac{2}{p}+1\right) Q^{-2/p} \left\langle \left\| \mathbf{J}(\boldsymbol{\beta}_\perp) \right\|^2 \right\rangle_\perp = A + B Q^{-2/p}, \quad \left\| \mathbf{J} \right\|^2 = \sum_{\mu=1}^{p} T_{\mu\mu}, \qquad (20)$$

где A – мера экспериментального шума, а B определяется фундаментальными свойствами многообразия L и зависит от набора экспериментальных индикатрис только за счет распределения $\boldsymbol{\beta}_\perp$.

3.1.7. Тестирование базы данных

Чтобы проверить применимость подхода базы данных для решения задачи, мы провели тестирование базы данных на 1000 теоретических дополнительно насчитанных индикатрисах, называемых далее тестовыми индикатрисами. Параметры тестовых индикатрис были случайно распределены в тех же диапазонах, что и при расчете базы данных. Для каждой из тестовых индикатрис была найдена ближайшая из базы данных и определены ее параметры $\boldsymbol{\beta}_0$, которые затем сравнивались с настоящими параметрами $\boldsymbol{\beta}_\text{г}$.

Для большого количества тестовых индикатрис $\boldsymbol{\beta}_0$ находились достаточно далеко от $\boldsymbol{\beta}_\text{г}$. Так, расстояние между r_0 и $r_\text{г}$ составило не более 10% диапазона только для 75% тестовых индикатрис, в то время как для остальных расстояние было больше, вплоть до 94% диапазона. Подобная ситуация наблюдалась и для остальных трех параметров. Это показывает наличие в базе данных одинаковых или сильно похожих индикатрис с существенно различающимися параметрами. Для исследования данной проблемы мы рассмотрели параметры 50-ти ближайших индикатрис из базы данных для каждой тестовой индикатрисы. На Рис. 10 показаны два типичных случая: угол ориентации $\Psi < 40°$ (левая колонка) и $\Psi > 50°$ (правая колонка). Нужно отметить, что показаны индикатрисы, умноженные на весовую функцию (2), так как тестирование производилось именно с этими функциями.

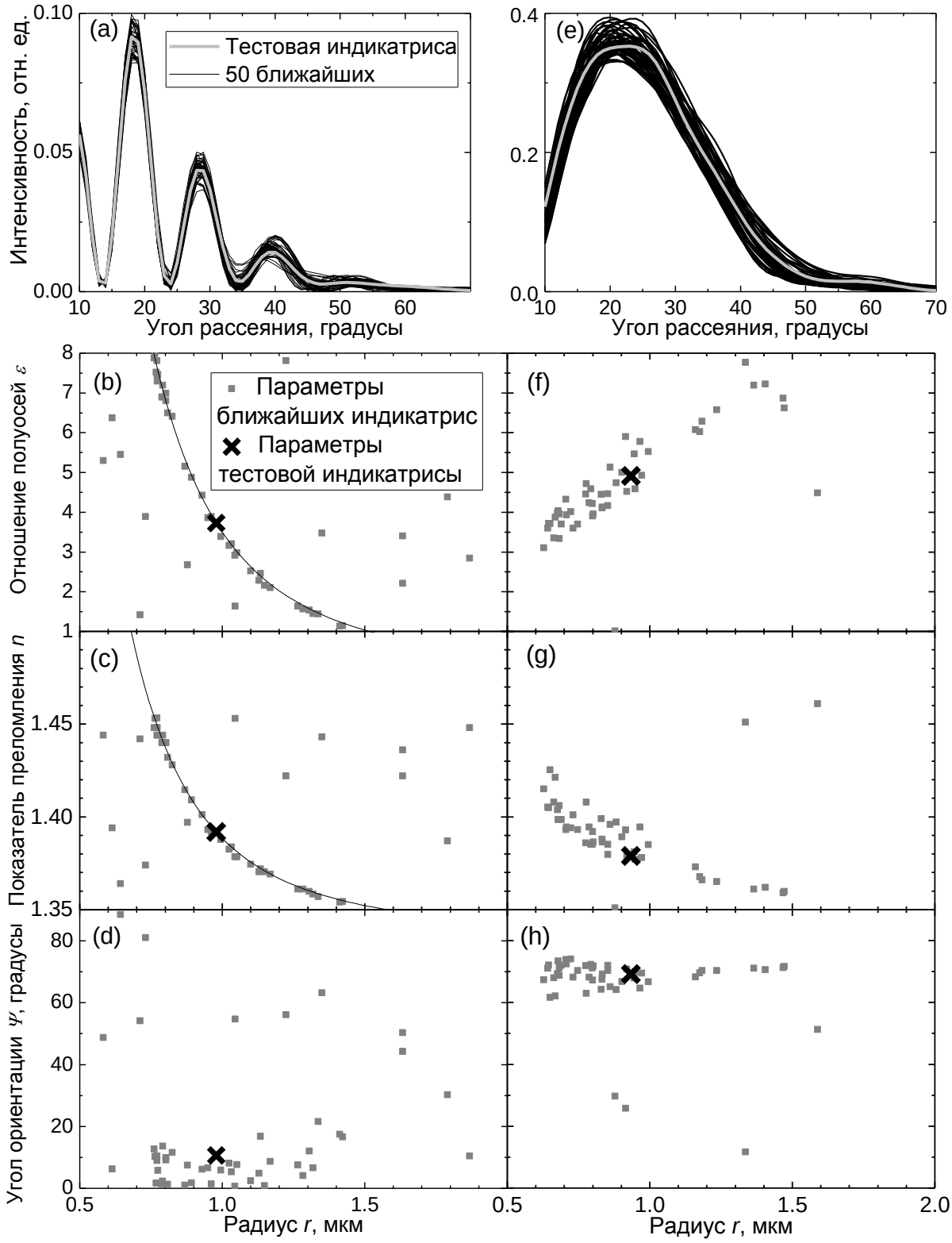

Рис. 10. (a,e): тестовые индикатрисы (серые линии) и 50 ближайших из базы данных (черные линии; показаны индикатрисы, умноженные на весовую функцию (2)); (b-d и f-h): проекции параметров 50 ближайших индикатрис из базы данных (серые точки). Черными крестами отмечены истинные параметры тестовых индикатрис. Линии на (b) и (c) – кривые const$\times r^{-3}$, проходящие через них.

В случае, когда $\Psi < 40°$, индикатрисы практически одинаковы (Рис. 10a), в то время как соответствующие точки на проекциях лежат на неких узких кривых, особенно в $r\varepsilon$- и εn-плоскостях (Рис. 10b,c). Было обнаружено, что эти кривые описываются соотношениями

$$r\varepsilon^{1/3} = a = \text{const} \qquad (21)$$
$$r(n-n_0)^{1/3} = \text{const} \Rightarrow r\varepsilon^{-2/3}(n-n_0) = b(n-n_0) = \text{const},$$

где n_0 – показатель преломления среды, a и b обозначают большую и меньшую полуоси сфероида, соответственно. Соответствующие изолинии, проходящие через проекции точки $\boldsymbol{\beta}_r$, показаны на Рис. 10b,c сплошными линиями.

Уравнение (21) может быть объяснено в рамках теории аномальной дифракции, в которой индикатриса зависит только от проекции сфероида на плоскость, перпендикулярную направлению распространения падающего излучения, и максимального набега фазы [57]. Это приближение применимо к т.н. оптически мягким ($n - n_0 << n_0$) частицам с размерами, много большими длины волны. Последнее условие не верно для тромбоцитов, размеры которых всего в несколько раз превышают длину волны. Тем не менее, индикатриса, рассчитанная в рамках приближение аномальной дифракции, хорошо согласуется с расчетами МДД для $\Psi = 0°$ (Рис. 11, слева). В этом случае условия (22) эквивалентны условию одинаковой проекции частиц и набега фазы. В общем случае $\Psi \neq 0°$ площадь проекции равна $\pi a^2 f$, а набег фазы – $b(n - n_0)/f$, где множитель f дается следующим выражением [58]:

$$f = \sqrt{\cos^2\beta + \frac{\sin^2\beta}{\varepsilon^2}}. \qquad (22)$$

Кривые в $r\varepsilon$- и εn-плоскостях хорошо описываются условиями (22), пока f близок к единице, что верно для $\Psi < 40°$ (так, $f = 0.87$ для $\Psi = 30°$ и $\varepsilon = 4$).

Явление компенсации параметров также имеет место в случае $\Psi > 50°$, что дает почти одинаковые индикатрисы (Рис. 10e). В этом случае точки также лежат на кривых, хотя и не таких узких. Однако мы не можем объяснить это таким же простым образом. Приближение аномальной дифракции очевидно теряет применимость в этом случае (Рис. 11b). Возможно, одно из других приближений для оптически мягких частиц [99] может разрешить эту загадку. Хотя данное явление может быть связано не столько с физикой рассеяния света, сколько с интегрированием по азимутальному углу в (1). Другими словами, для некоторых индикатрис, приведенных на Рис. 10e, двумерное распределение интенсивности имеет существенно другую структуру, чем для остальных. Наконец, можно заметить, что антикорреляция между r и n (Рис. 10c,g)

существует как в первом, так и во втором случаях. В первом случае это вытекает из формул аномальной дифракции. Во втором случае это связано с тем, что общая интенсивность индикатрисы зависит от комбинации r и n, а именно интенсивность является одним из главных факторов при обработке индикатрисы с небольшим количеством особенностей, как на Рис. 10e.

Описанная компенсация параметров красива с теоретической точки зрения, но неприемлема для практического применения, так как она дает огромные погрешности определения параметров тромбоцита. Преодоление этой проблемы возможно, если зафиксировать один из параметров в узком диапазоне, используя дополнительную априорную информацию о параметрах тромбоцита. Первым кандидатом для такой коррекции является показатель преломления – диапазон [1.35,1.5], используемый в базе данных, является весьма широким, покрывая все вообразимые значения. Однако существуют методы измерения показателя преломления тромбоцитов, в частности, система ADVIA-120, использующая двухугловое рассеяния света. Это прибор измеряет среднюю плотность тромбоцита (mean platelet component, MPC), пропорциональную показателю преломления, используя сферизацию клеток с сохранением объема и теорию Ми для решения обратной задачи светорассеяния [55]. Показано, что MPC зависит от используемого антикоагулянта. В цитрате натрия нативные тромбоциты имеют MPC 25.7±0.9 г/дл (среднее ± стандартное отклонение), а после добавления тромбина – 21.9±1.9 г/дл [56]. Это соответствует показателю преломления 1.3833±0.0016 и 1.376±0.003, соответственно. Удвоив стандартное отклонение, можно оценить 95% доверительные интервалы для показателя преломления нативных и

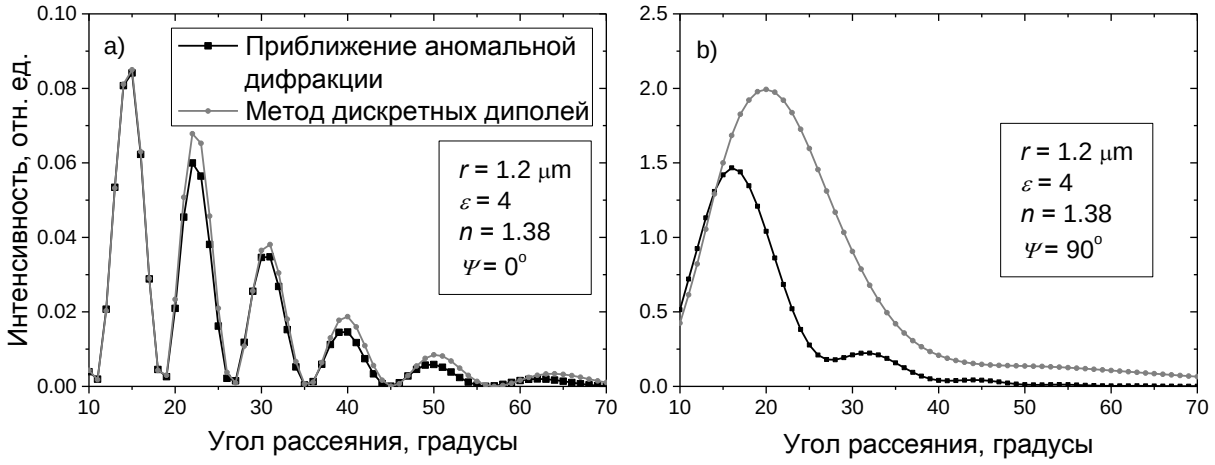

Рис. 11. Взвешенные индикатрисы светорассеяния для типичного тромбоцита, рассчитанные методом дискретных диполей и в рамках приближения аномальной дифракции для угла ориентации $\Psi = 0°$ (a) и 90° (b).

активированных тромбоцитов как 1.383±0.003 и 1.377±0.007, соответственно. Таким образом, ограничение показателя преломления в узком диапазоне [1.37,1.39] является разумным, и мы использовали это для решения проблемы компенсации параметров. Заметим, что при этом из всей базы данных используется только ~65000 индикатрис.

3.2. Рассеяние света агрегатами тромбоцитов: разделение мономеров и димеров

3.2.1. Приближение однократного рассеяния для агрегатов несферических частиц

Рассеяние агрегатом, или кластером, состоящим из N частиц, может быть представлено как суперпозиция полей, рассеянных каждой частицей, или парциальных полей:

$$\mathbf{E}^{\mathrm{sca}} = \sum_{k=1}^{N} \mathbf{E}_k^{\mathrm{sca}}, \tag{23}$$

Рассеяние на каждой частице, в свою очередь, возбуждается суммой падающего поля и парциальных полей остальных частиц:

$$\mathbf{E}_k^{\mathrm{ex}} = \mathbf{E}^{\mathrm{inc}} + \left(\sum_{l \neq k} \mathbf{E}_l^{\mathrm{sca}} \right), \tag{24}$$

Парциальное поле связано с возбуждающим через линейное отображение T:

$$\mathbf{E}_k^{\mathrm{sca}} = \mathsf{T}\left(\mathbf{E}_k^{\mathrm{ex}}\right). \tag{25}$$

Суть приближения однократного рассеяния для агрегатов частиц – это подстановка падающего поля $\mathbf{E}^{\mathrm{inc}}$ в качестве возбуждающего поля $\mathbf{E}^{\mathrm{ex}}$ в уравнении (25). Однако при этом оператор T остаётся тем же. Таким образом, первый шаг при вычислении поля в приближении однократного рассеяния – провести расчёт для каждой частицы независимо с помощью строгого метода, такого как МДД и метод Т-матриц. Вторым шагом является соединение результатов расчётов с помощью уравнения (23).

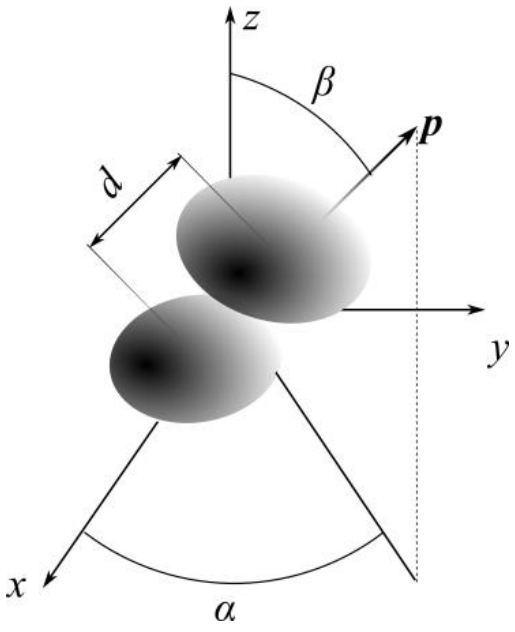

Рис. 12. Геометрия задачи рассеяния света для агрегата из двух частиц.

В дальней зоне, где поля, рассеянные отдельными частицами, являются поперечными и распространяются в одном направлении, вычисление векторной суммы в уравнении (23) выполняется очевидным образом. Однако необходимо учитывать разности фаз между парциальными полями. Рассмотрим агрегат из двух частиц, показанный на Рис. 12. Падающее поле с волновым вектором k распространяется вдоль оси z, а ориентация димера определяется полярным (β) и азимутальным (α) углами, задающими направление оси между центрами частиц $\boldsymbol{p}$. Расстояние между центрами частиц равно d. Тогда сдвиг фаз в точке наблюдения (θ,φ) выражается следующим образом:

$$\Delta(\theta,\varphi) = kd\left(\cos\beta\cos\theta + \sin\beta\sin\theta\cos(\alpha-\varphi)\right). \tag{26}$$

Здесь и далее без ограничения общности будем считать $\alpha = 0$. Следовательно, в приближении однократного рассеяния результирующее поле равно

$$\mathbf{E}^{\mathrm{sca}} = \mathbf{E}_1^{\mathrm{sca}} + \mathbf{E}_2^{\mathrm{sca}} e^{\mathrm{i}\Delta}, \tag{27}$$

что также выполняется для любого элемента амплитудной матрицы рассеяния S [90]. Измеряемая интенсивность равна:

$$I(\theta,\varphi) = \left|\mathbf{E}^{\mathrm{sca}}\right|^2 = I_1 + I_2 + \mathbf{E}_1^{\mathrm{sca}} \cdot \overline{\mathbf{E}_2^{\mathrm{sca}} e^{\mathrm{i}\Delta}} + \overline{\mathbf{E}_1^{\mathrm{sca}}} \cdot \mathbf{E}_2^{\mathrm{sca}} e^{\mathrm{i}\Delta} = I_1 + I_2 + 2\,\mathrm{Re}\left[\mathbf{E}_1^{\mathrm{sca}} \cdot \overline{\mathbf{E}_2^{\mathrm{sca}} e^{\mathrm{i}\Delta}}\right], \tag{28}$$

где I_1 и I_2 – это интенсивность 1-го и 2-го мономеров в отсутствие соседнего, а черта обозначает комплексное сопряжение. Последний член соответствует интерференции парциальных полей.

Далее для простоты мы будем рассматривать только случай, когда интенсивность даётся элементом S_{11} матрицы Мюллера (опуская множитель $(kr)^2$) [90]. Тогда интенсивность выражается через уравнения (27), (28):

$$\begin{aligned} I(\theta,\varphi) &= S_{11} = S_{11}^{(1)} + S_{11}^{(2)} + \mathrm{Re}\left[f(\theta,\varphi)e^{-\mathrm{i}\Delta}\right], \\ f(\theta,\varphi) &\equiv S_1^{(1)}\overline{S_1^{(2)}} + S_2^{(1)}\overline{S_2^{(2)}} + S_3^{(1)}\overline{S_3^{(2)}} + S_4^{(1)}\overline{S_4^{(2)}}, \end{aligned} \tag{29}$$

где верхние индексы обозначают номер частицы, а левая часть относится к агрегату. Мы пользовались уравнением (29) для вычисления $I(\theta,\varphi)$ для агрегатов тромбоцитов (см. Раздел 3.2.4) и его упрощенную версию (30) для димеров полистирольных микросфер (Раздел 3.2.3).

3.2.2. Интегрирование по азимутальному углу

В данном разделе рассматривается, к чему приводит интегрирование по углу φ в предположениях однократного рассеяния. Рассмотрим сначала случай агрегата, состоящего из двух одинаковых сфер. Тогда уравнение (29) можно упросить:

$$I(\theta,\varphi) = 2S_{11}^{(1)}(\theta)\left(1+\cos\left(\Delta(\theta,\varphi)\right)\right), \tag{30}$$

что после интегрирования по φ даёт:

$$I(\theta) = \frac{1}{2\pi}\int_0^{2\pi} S_{11}(\theta,\varphi)\mathrm{d}\varphi = 2S_{11}^{(1)}(\theta)\left(1+\frac{1}{2\pi}\int_0^{2\pi}\cos\left(\Delta(\theta,\varphi)\right)\mathrm{d}\varphi\right). \tag{31}$$

Последний интеграл равен

$$\begin{gathered}\int_0^{2\pi}\cos\left(\Delta(\theta,\varphi)\right)\mathrm{d}\varphi = \cos\tau\int_0^{2\pi}\cos\left(\rho\cos\varphi\right)\mathrm{d}\varphi = 2\pi\cos(\tau)J_0\left(\rho\right), \\ \tau \equiv kd\cos\beta\cos\theta, \quad \rho \equiv kd\sin\beta\sin\theta,\end{gathered} \tag{32}$$

где J_0 – функция Бесселя нулевого порядка. Выражение (32) равно единице только в случае, если аргумент функции Бесселя $\rho \approx 0$, и много меньше единицы, если $\rho \gg 1$. В частности, когда $kd \gg 1$ и оба угла β и θ не близки к 0 или π, мажоранта уравнения (32) асимптотически приближается к $\rho^{-1/2}$. Это означает, что интерференция парциальных волн замывается в результате интегрирования по φ для димера сферических частиц, то есть начинает выполняться приближение независимого рассеяния.

В общем случае агрегата из двух разных несферических частиц уравнение (31) принимает более сложный вид:

$$I(\theta) = I_1(\theta) + I_2(\theta) + 2\,\mathrm{Re}\left[\exp(-\mathrm{i}\tau)\int_0^{2\pi} f(\theta,\varphi)\exp(-\mathrm{i}\rho\cos\varphi)\mathrm{d}\varphi\right], \tag{33}$$

Перекрестный член (функция f) теперь зависит от φ и не может быть вынесен за знак интеграла. Однако, если эта зависимость медленная по сравнению с осцилляциями комплексной экспоненты (то есть характерный масштаб зависимости много больше $\rho^{-1/2}$), с помощью метода стационарной фазы можно показать, что интеграл имеет асимптотическое поведение $\rho^{-1/2}$ и, таким образом, приближение независимого рассеяния также выполняется. Более того, остальные элементы матрицы Мюллера удовлетворяют уравнениям, аналогичным (29) и (33), но с другими функциями f (которые всегда квадратично зависят от элементов амплитудной матрицы рассеяния).

3.2.3. Димеры полистирольных микросфер

СПЦ способен измерять сигнал флюоресценции одновременно с индикатрисой светорассеяния (1). Мономеры и димеры полистирольных микросфер, содержащие молекулы флуоресцеина, можно разделить на основе сигнала флюоресценции. В частности, в данной работе мы использовали микросферы FluoSpheres® F-8823 диаметром 1.1 мкм. На Рис. 13*a* приведено несколько типичных измеренных индикатрис димеров (тонкие линии) и индикатриса мономера (жирная линия). Можно

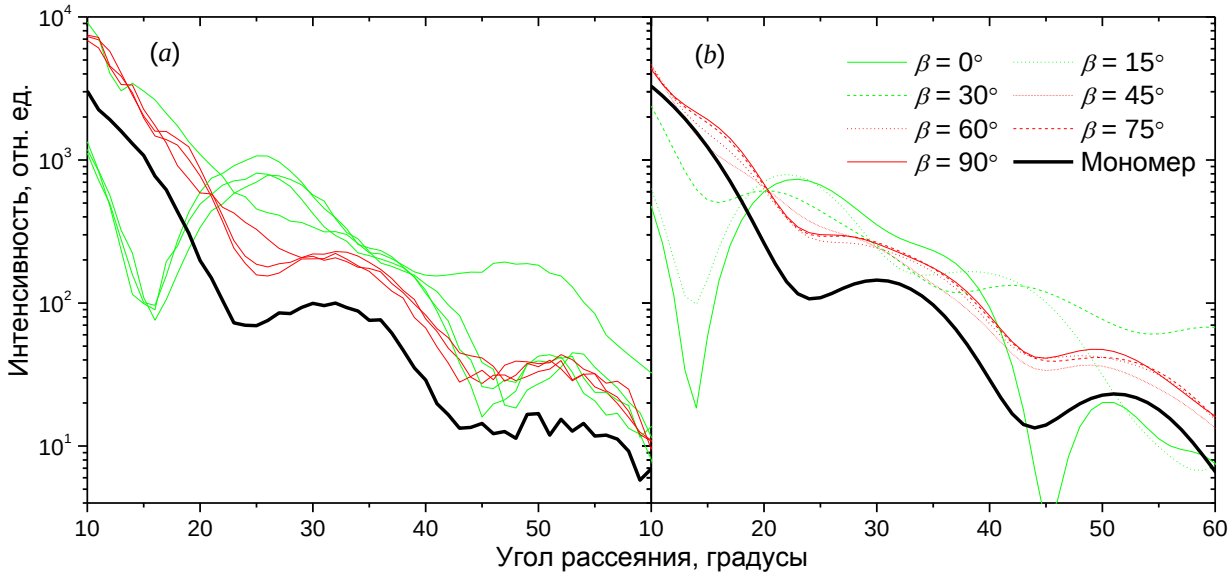

Рис. 13 Индикатрисы димеров полистирольных микросфер, измеренные на СПЦ (*a*, тонкие линии) и рассчитанные методом суперпозиции Т-матриц для различных ориентаций димеров (*b*, тонкие линии). Индикатрисы мономеров также показаны на обоих графиках (толстые линии). Красные линии соответствуют приблизительно независимому рассеянию мономеров в димере.

заметить, что некоторые из них, выделенные красным на Рис. 13a, имеют форму как у индикатрисы мономера, но в два раза бóльшую интенсивность.

Для объяснения этого эффекта мы провели численное моделирование с помощью метода Т-матриц [100] для агрегатов сферических частиц. Численное моделирование для димеров сфер выявило те же типы индикатрис – см. Рис. 13*b*. Жирная линия – индикатриса светорассеяния для шара диаметром 1.1 мкм с показателем преломления 1.605 (1.20 относительно воды), рассчитанная с помощью теории Ми, а тонкие линии – индикатрисы димеров таких шаров, рассчитанные с помощью метода суперпозиции Т-матриц. Индикатрисы димеров, имеющие форму, похожую на форму индикатрисы мономера, соответствуют углу ориентации β от 50° до 90°.

Рассчитанные сигналы немного отличаются от экспериментальных (особенно в области передних углов), что может быть связано с отличием в размерах, показателе преломления или другими отклонениями от модели. Нужно заметить, что в данном случае не ставилась задача подобрать параметры частиц, дающие наилучшее совпадение теории и эксперимента. Необходимо было лишь объяснить эффект наличия индикатрис димеров, пропорциональных индикатрисе мономера. И действительно, видно, что при увеличении угла ориентации β индикатрисы димеров сходятся к

удвоенной индикатрисе мономера. Введём следующую меру близости (относительную разность в логарифмической шкале) для количественного описание этой сходимости:

$$S = \frac{\sum_i \left[\log I(\theta_i) - \log I_{\text{sum}}(\theta_i)\right]^2}{\sum_i \left[\log I_{\text{sum}}(\theta_i)\right]^2}, \qquad (34)$$

где $I(\theta)$ – индикатриса димера, $I_{\text{sum}}(\theta)$ – сумма индикатрис составляющих его мономеров, а суммирование идет по углам рассеяния θ_i, в которых были рассчитаны индикатрисы. Зависимость S от β показана на Рис. 14 и подкрепляет сделанные наблюдения.

Рассмотрим теперь двумерные индикатрисы светорассеяния, то есть интенсивность рассеяния в зависимости от полярного и азимутального углов. Для одиночной сферы в силу симметрии зависимость от азимутального угла отсутствует, а для димера, ориентированного под углом 90°, появляются значительные осцилляции интенсивности вдоль φ [Рис. 15(a)]. Эти осцилляции обусловлены интерференцией парциальных полей (см. раздел 3.2.1). Действительно, прямой учёт интерференции с использованием уравнения (32), то есть приближение однократного рассеяния, даёт ту же картину распределения интенсивности [Рис. 15(d)]. Угол ориентации димера β = 50°

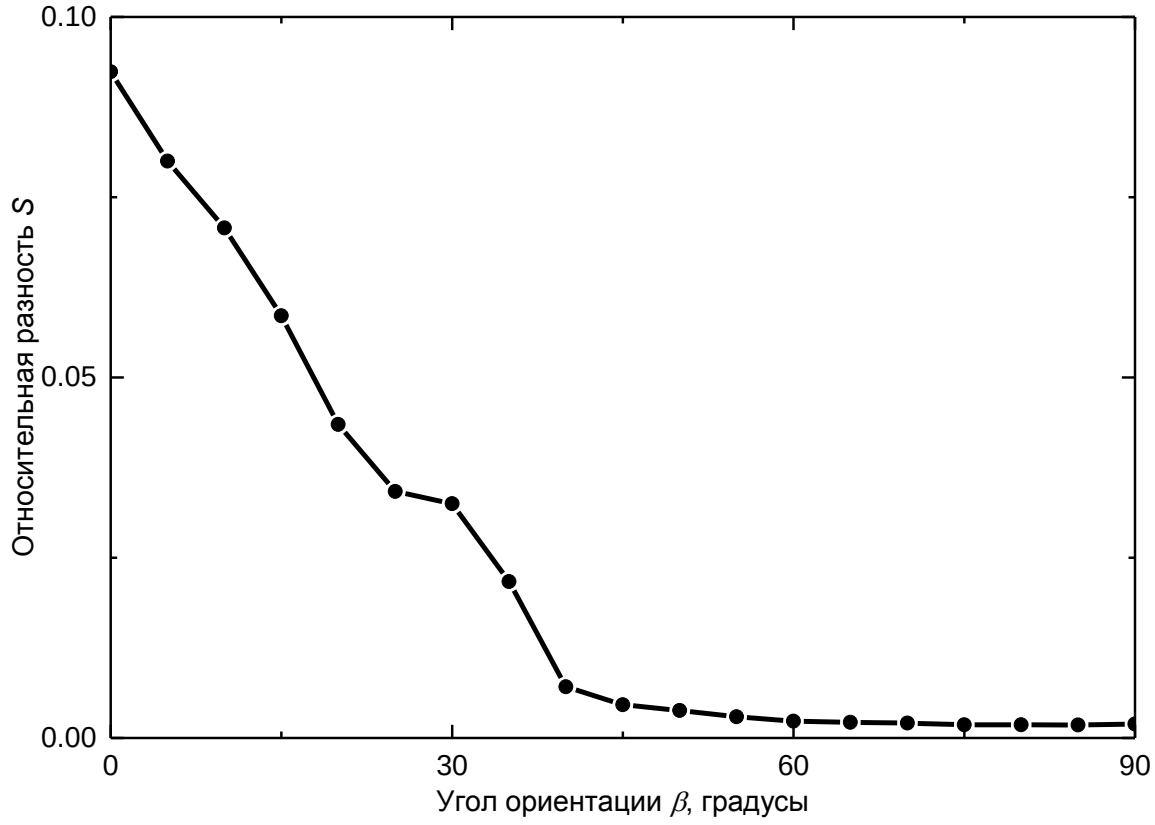

Рис. 14. Относительная разность индикатрисы димера и удвоенной индикатрисы мономера в зависимости от угла ориентации β.

– в некотором смысле точка перехода (Рис. 14), где точный результат начинает отличаться от приближённого [Рис. 15(*b*,*e*)]. При ориентации димера $\beta = 10°$ результаты совпадают лишь на качественном уровне [Рис. 15(*c*,*f*)].

Таким образом, многократное рассеяние значительно только в случае, когда одна частица затеняет другую. То, что приближение однократного рассеяния применимо к агрегатам полистирольных микросфер вплоть до $\beta = 45°$, несмотря на достаточно большой показатель преломления, является неочевидным фактом. Более того, при таких углах ориентации для одномерных индикатрис выполняется приближение независимого рассеяния (кроме области передних углов рассеяния), то есть одномерные индикатрисы являются аддитивными.

3.2.4. Моделирование для димеров тромбоцитов

В отличие от полистирольных микросфер, тромбоциты неоднородны по объему и форме, так как они изначально являются клеточными фрагментами [16,101]. В обычном состоянии тромбоциты имеют дисковидную форму с отношением полуосей 2–8 и объём 2–30 фл [15,27]. В процессе активации тромбоциты меняют свою форму и

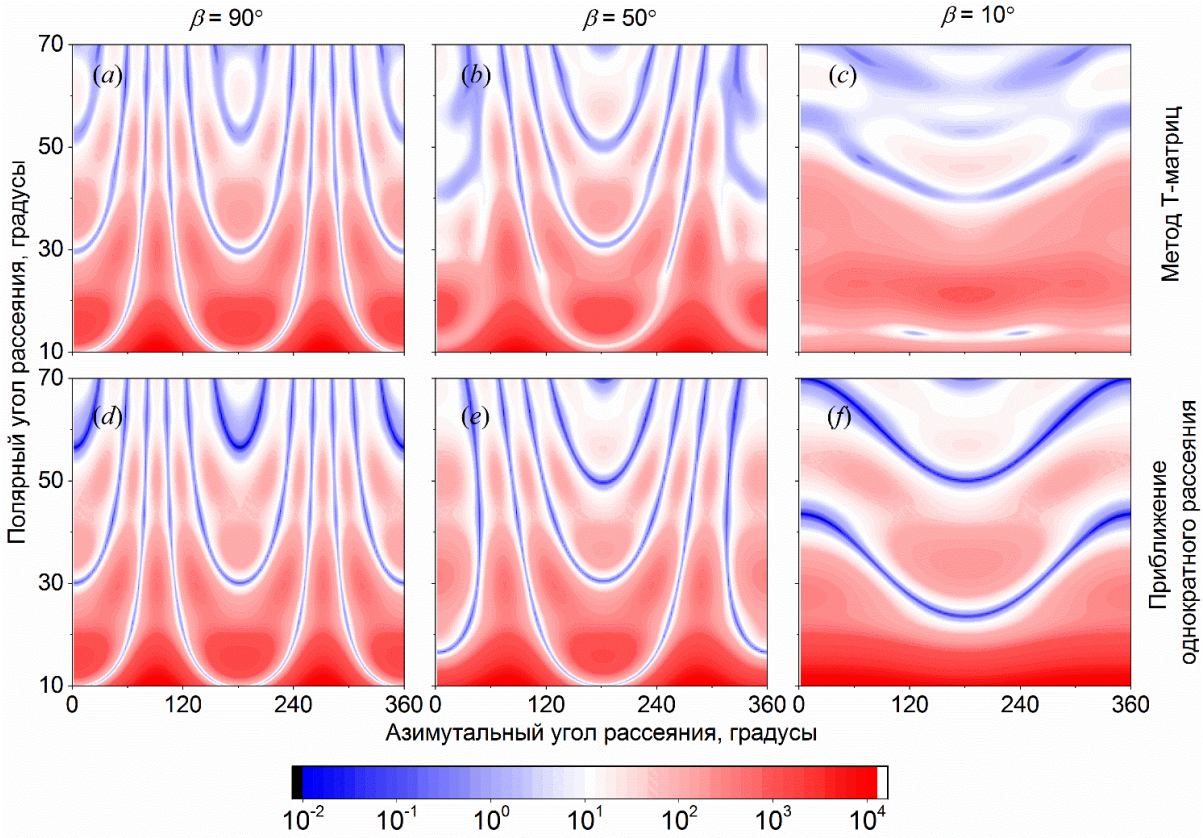

Рис. 15. Двумерные картины рассеяния света для димеров полистирольных микросфер в разных ориентациях: точный расчет (верхний ряд) и приближение однократного рассеяния (нижний ряд).

мембранные рецепторы и становятся способны к агрегации. Форма активированного тромбоцита более сферическая (отношение полуосей 1–2), а также могут присутствовать выросты мембраны – псевдоподии. Сплюснутый сфероид является подходящей оптический моделью для расчета светорассеяния тромбоцитами [33].

Для моделирования светорассеяния агрегатами тромбоцитов мы использовали метод дискретных диполей. Для расчётов конструировалась модель димера тромбоцитов, состоящая из двух сфероидов и разделённая на большое количество диполей. Сначала выбирались два сплюснутых сфероида с параметрами, случайно выбранными из физиологического диапазона для активированных тромбоцитов. (Таблица 3). Один из сфероидов также случайным образом поворачивался вокруг оси *z*. Каждый сфероид был разбит на диполи так, что на длину волны приходилось не менее 12 диполей (см. детали в 3.1.1). Затем один из двух получившихся наборов диполей двигался вдоль оси *z*, пока наборы не переставали перекрываться. Пример результирующей конфигурации диполей показан на Рис. 16 в центре. Наконец, димер ориентировался случайным образом по отношению к падающему излучению. Подобная процедура использовалась и для построения бóльших агрегатов путём последовательного добавления мономеров (справа на Рис. 16).

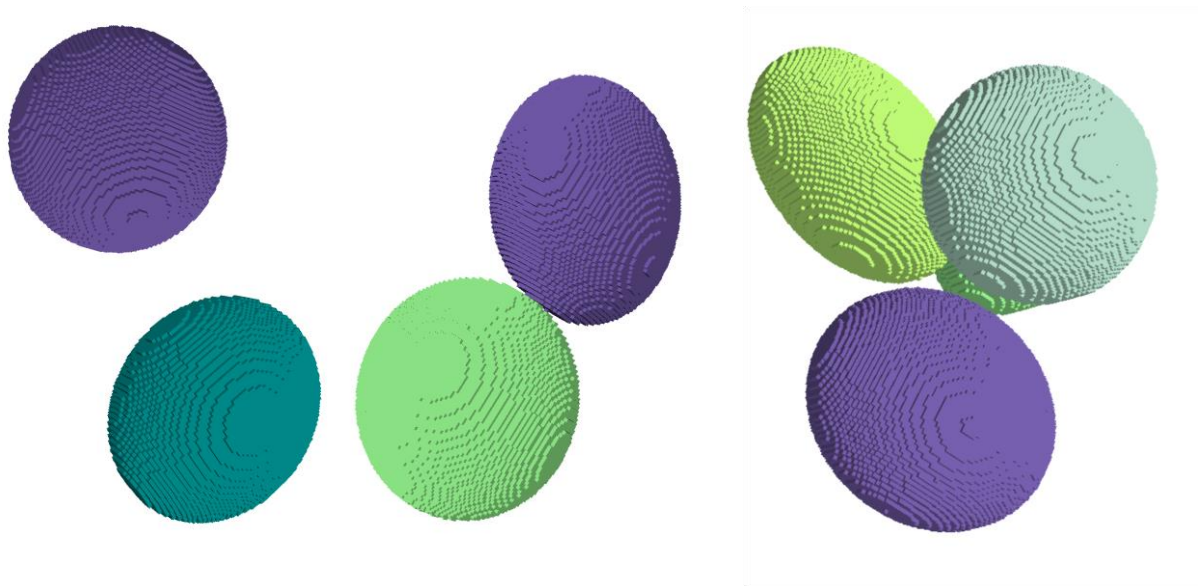

Рис. 16. Примеры полученных конфигураций диполей для моделирования светорассеяния агрегатами тромбоцитов. Визуализация выполнена с помощью LiteBil [102].

Таблица 3. Параметры для моделирования активированных тромбоцитов. Относительный показатель преломления приведён в скобках.

	Нижняя граница	**Верхняя граница**
Радиус эквивалентной сферы r	1.1 мкм	1.3 мкм
Отношение полуосей ε	1	2
Показатель преломления n (m)	1.37 (1.024)	1.39 (1.040)
Угол ориентации Ψ	0°	90°

Для расчётов использовалась программа ADDA v1.1 [64]. Индикатрисы были рассчитаны в полном диапазоне углов рассеяния θ (0°–180°) с интегрированием по φ от 0° до 360° с шагом 12°. Всего было рассчитано 8756 индикатрис различных димеров, а также индикатрисы нескольких агрегатов из большего числа клеток. Также отдельно рассчитывались индикатрисы светорассеяния для каждого мономера, входящего в состав агрегата. В некоторых случаях также были рассчитаны двумерные индикатрисы и внутренние поля.

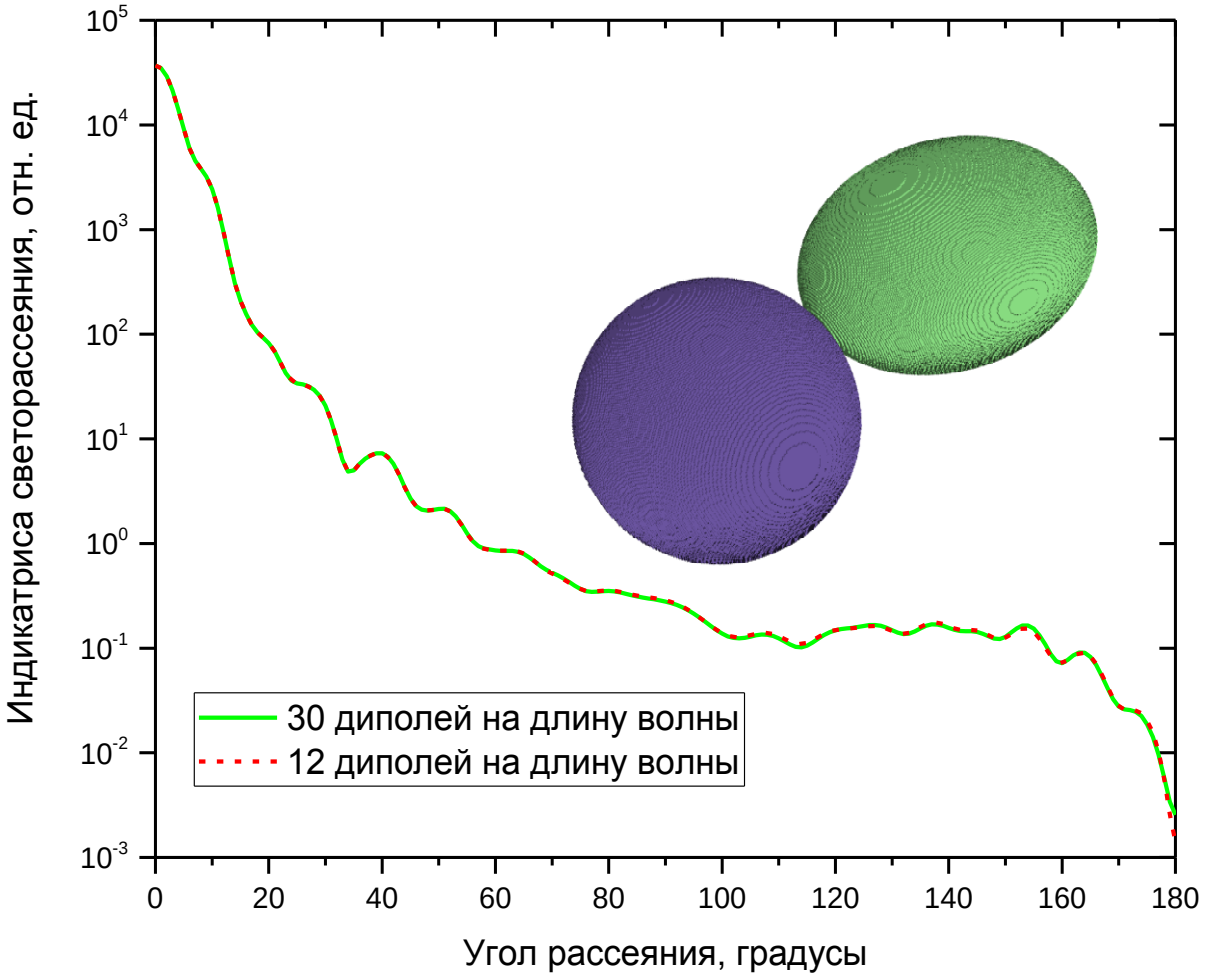

Рис. 17. Сравнение индикатрис светорассеяния, посчитанных для модели димера тромбоцитов с разной степенью дискретизации. На рисунке показана модель с 30 диполями на длину волны, модель с 12 диполями можно увидеть на Рис. 16.

Для проверки точности для одного из димеров были проделаны расчёты с улучшенной дискретизацией (30 диполей на длину волны). Результаты расчётов совпали для стандартной и улучшенной дискретизации (Рис. 17), что говорит о хорошей точности результатов моделирования.

3.2.5. Приближение независимого рассеяния для индикатрис димеров тромбоцитов

Средние индикатрисы димеров и составляющих их мономеров показаны на Рис. 18. Видно, что они практически совпадают с точностью до множителя 2, за исключением передних углов (0°–5°). То же самое наблюдается, если усреднять индикатрисы мономеров из независимого набора (базы данных, см. Раздел 3.1.3). Таким образом, индикатриса димера в среднем равна удвоенной индикатрисе мономера, то есть приближение независимого рассеяния выполняется по крайней мере для усреднённых индикатрис.

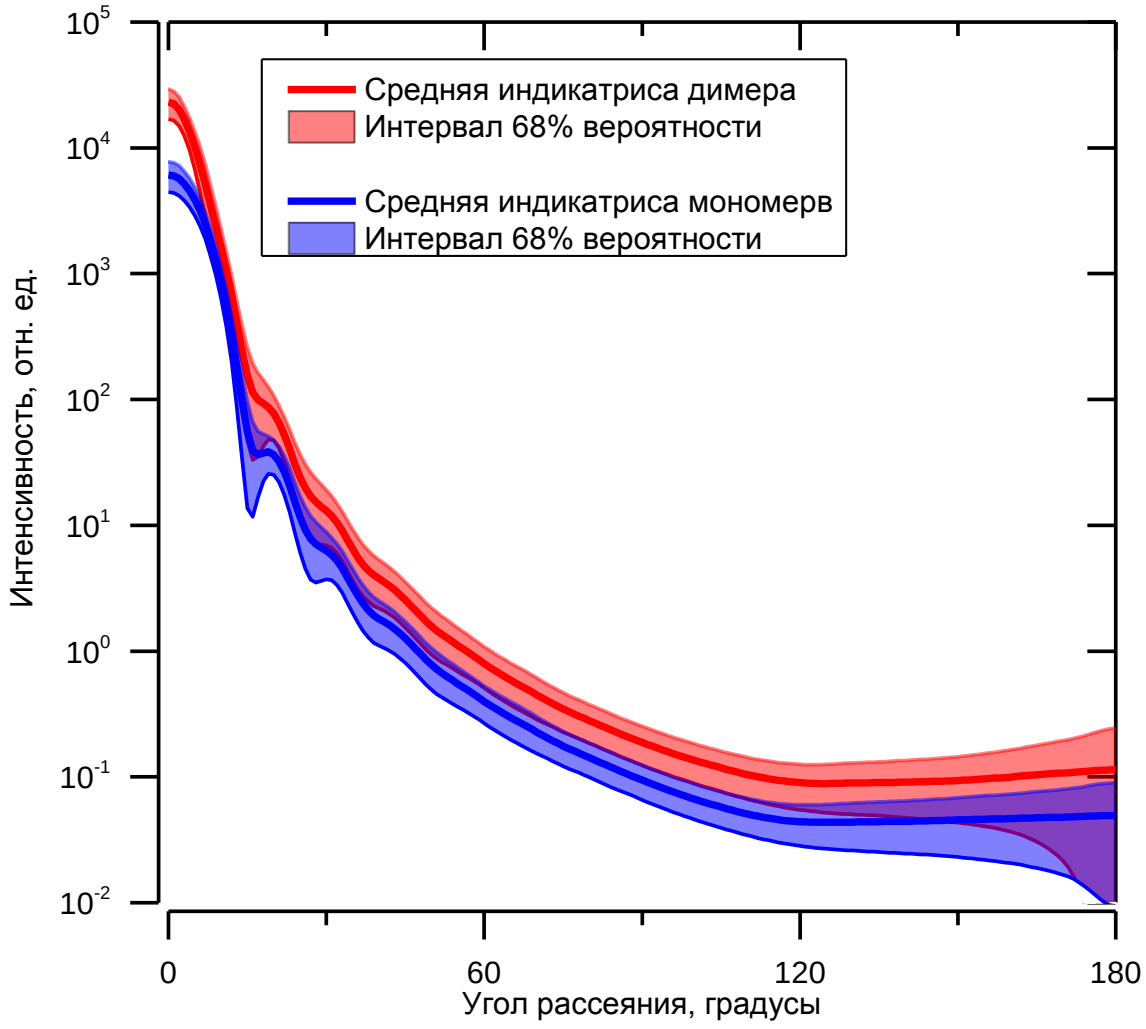

Рис. 18. Средние индикатрисы светорассеяния димеров и мономеров. Также показаны интервалы, соответствующие 68%-й вероятности.

Рассмотрим применимость приближения независимого рассеяния для отдельных димеров. Мера близости S (17) приведена на Рис. 19 в зависимости от β. Прямое сравнение с результатами для полистирольных микросфер не следует производить в силу разных угловых диапазонов, в которых рассчитывались индикатрисы; однако, хотя график достаточно шумный из-за высокой вариабельности рассматриваемых клеток, общая тенденция такая же, как на Рис. 14. Более того, присутствуют точки с малой величиной S даже при малых значениях β. Таким образом, тромбоциты могут слабо влиять друг на друга, даже если одна из клеток заслоняет другую. Это можно объяснить тем, что показатель преломления тромбоцитов близок к показателю преломления воды (Таблица 3).

Абсолютное большинство димеров (88%) имеют значение S меньше, чем 0.025, а доля таких клеток при $\beta > 40°$ еще выше (99.9%). Важно понять, насколько хорошее качественное согласие между индикатрисами соответствует такому значению S. Для этого на Рис. 20 приведено несколько примеров. Рис. 20(a) соответствует одному из самых плохих совпадений, соответствующая точка располагается в левом верхнем углу Рис. 19. В этом случае индикатрисы визуально отличаются, то есть многократное рассеяния и/или интерференция приводят к значительному искажению индикатрисы.

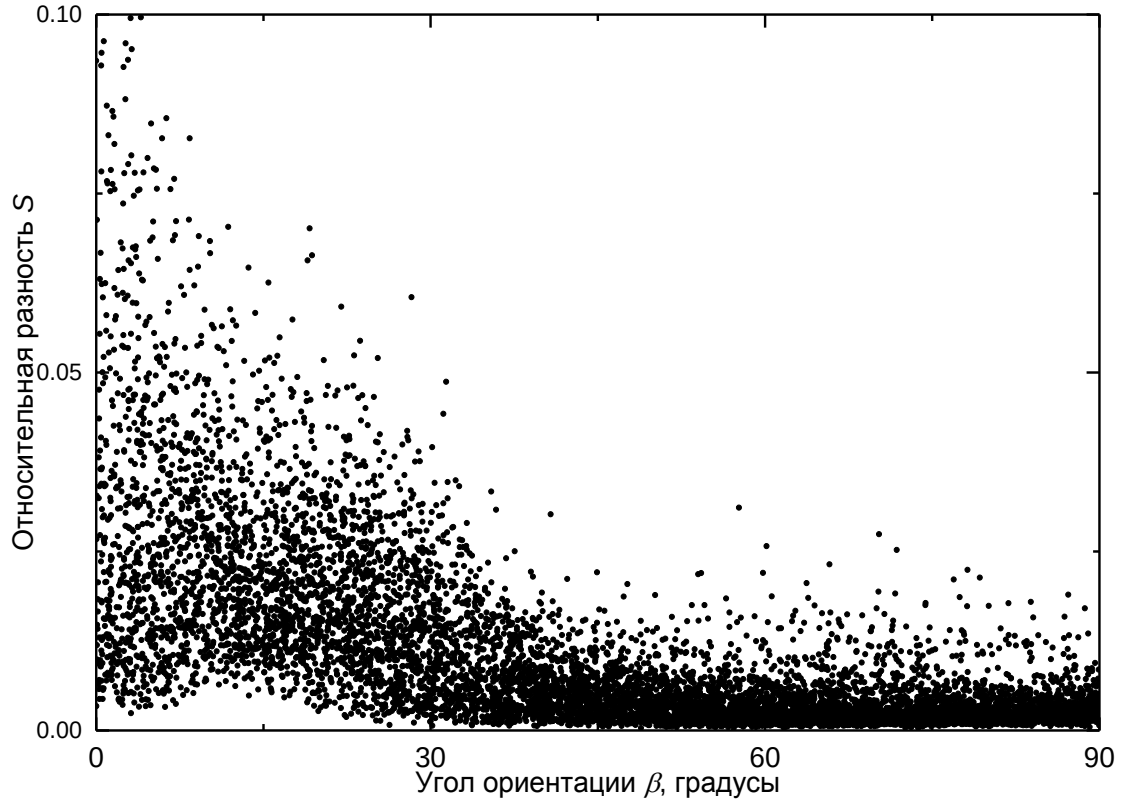

Рис. 19. Относительная разность между индикатрисой димера и суммой индикатрис составляющих его мономеров в зависимости от угла ориентации β.

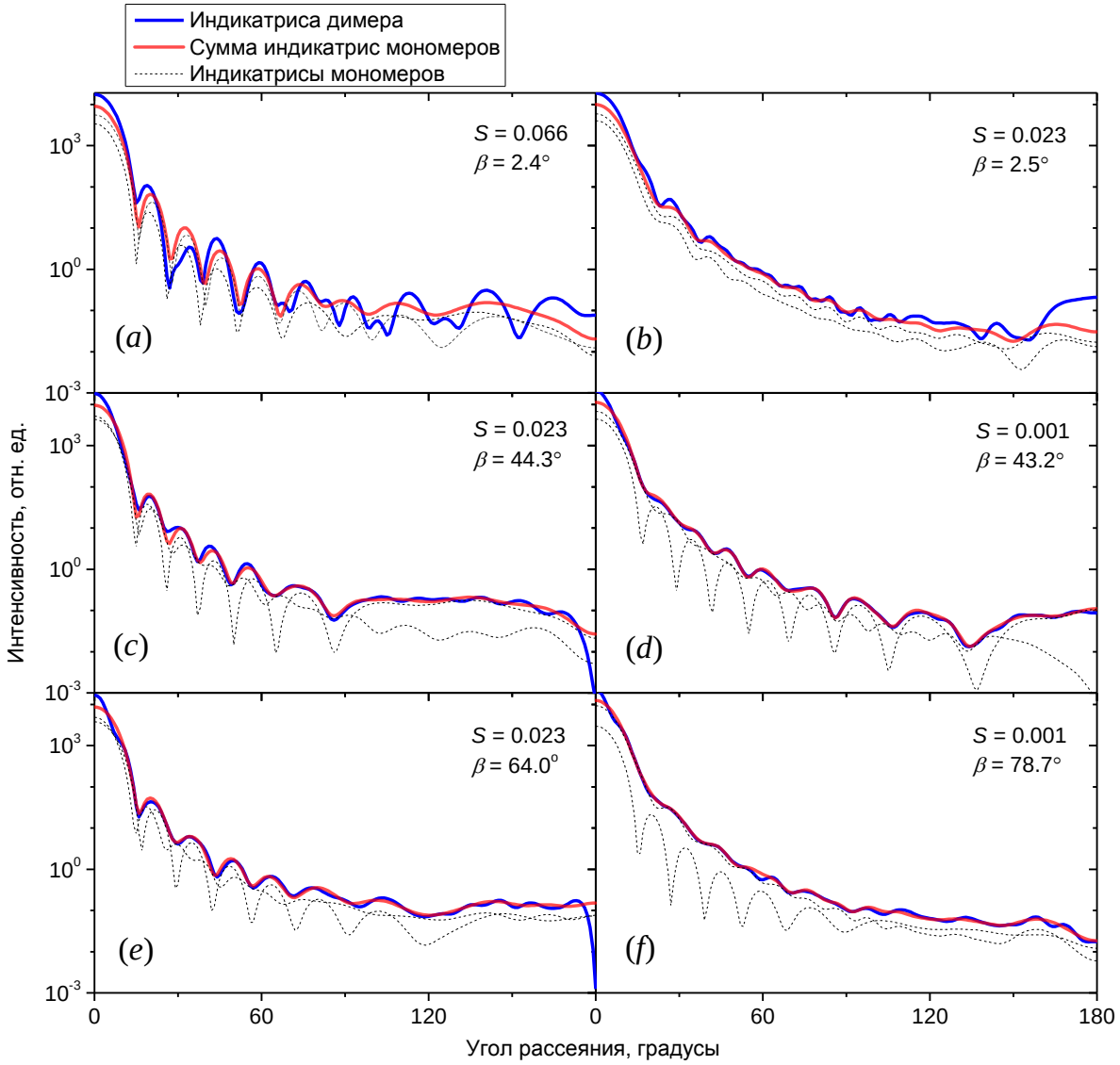

Рис. 20. Примеры совпадения индикатрисы димера и суммы индикатрис составляющих его мономеров. Значения относительной разности S и угол ориентации β указаны на каждом графике. Индикатрисы мономеров также приведены (пунктирные линии).

Тем не менее, на Рис. 20(*b*) другой димер с такой же ориентацией уже имеет $S < 0.025$. Не совпадая идеально, кривые имеют одинаковую структуру, показывая применимость приближения независимого рассеяния, кроме области углов рассеяния, близких к 0° и 180°, как и обсуждалось ранее в разделе 3.2.2. То же можно сказать для Рис. 20(*c*,*e*), соответствующих промежуточному и большому значениям β, соответственно, хотя визуальное совпадение ещё лучше. Абсолютное большинство димеров имеют еще меньшее значение S, поэтому следует ожидать еще более хорошего совпадения. На Рис. 20(*d*,*f*) представлены примеры наилучшего выполнения приближения независимого рассеяния (наименьшие значения S).

3.2.6. Двумерные индикатрисы и внутренние поля

Индикатрисы светорассеяния, показанные на Рис. 20, показывают применимость приближения независимого рассеяния и, таким образом (косвенно), применимость приближения однократного рассеяния. Для прямой проверки последнего рассмотрим двумерные индикатрисы, которые приведены для одного и того же димера в разной ориентации на Рис. 21. Точный и приближенный результаты очень похожи как по структуре, так и по общей интенсивности, хотя согласие немного уменьшается при увеличении β.

Чтобы понять, почему рассеяния агрегатами тромбоцитов можно считать однократным, рассмотрим внутренние поля этого же димера. На Рис. 22 приведена величина (квадрат модуля) внутреннего электрического поля в плоскости *xz* для перпендикулярной поляризации падающего поля. Если рассеяние однократное, внутренние поля в каждой из частиц в агрегате должны быть такими же, как если бы частицы были отдельными. Можно видеть, что это всегда так для нижней частицы, однако для верхней данный факт выполняется только для $\beta = 90°$. В случае $\beta = 50°$ внутренние поля различаются в области, которая затенена (или на которую сфокусировано падающее поле) нижней частицей. То же применимо и к случаю $\beta = 10°$, хотя тут присутствует и некоторое расхождение в незатенённом регионе. Важно отметить, что на Рис. 22 показаны только центральные сечения, где искажения внутренних полей должны быть наибольшими. В других сечениях, где расстояние между мономерами больше, внутренние поля практически такие же, как и в отдельных частицах. Таким образом, доля объёма тромбоцитов, где присутствуют искажения, достаточно мала. Это объясняет хорошее согласие двумерных индикатрис (Рис. 21). Таким образом, можно ожидать применимость приближения однократного рассеяния для агрегатов частиц с малым показателем преломления («оптически мягких» частиц), когда площадь их контакта достаточно мала. Для частиц с большой площадью контакта многократное рассеяние должно быть значительным. Например, индикатрисы двух половинок сфероида не являются аддитивными. То же можно ожидать для внутренних агрегатов (частица внутри другой).

Также следует отметить, что амплитуда внутренних полей существенно отличается от единицы во всех случаях, что показывает неприменимость приближения РГД, которое эквивалентно замене внутреннего поля в частице на падающее. Другими словами, взаимодействие, или многократное рассеяние, между частями тромбоцита намного более значительное, чем между различными тромбоцитами.

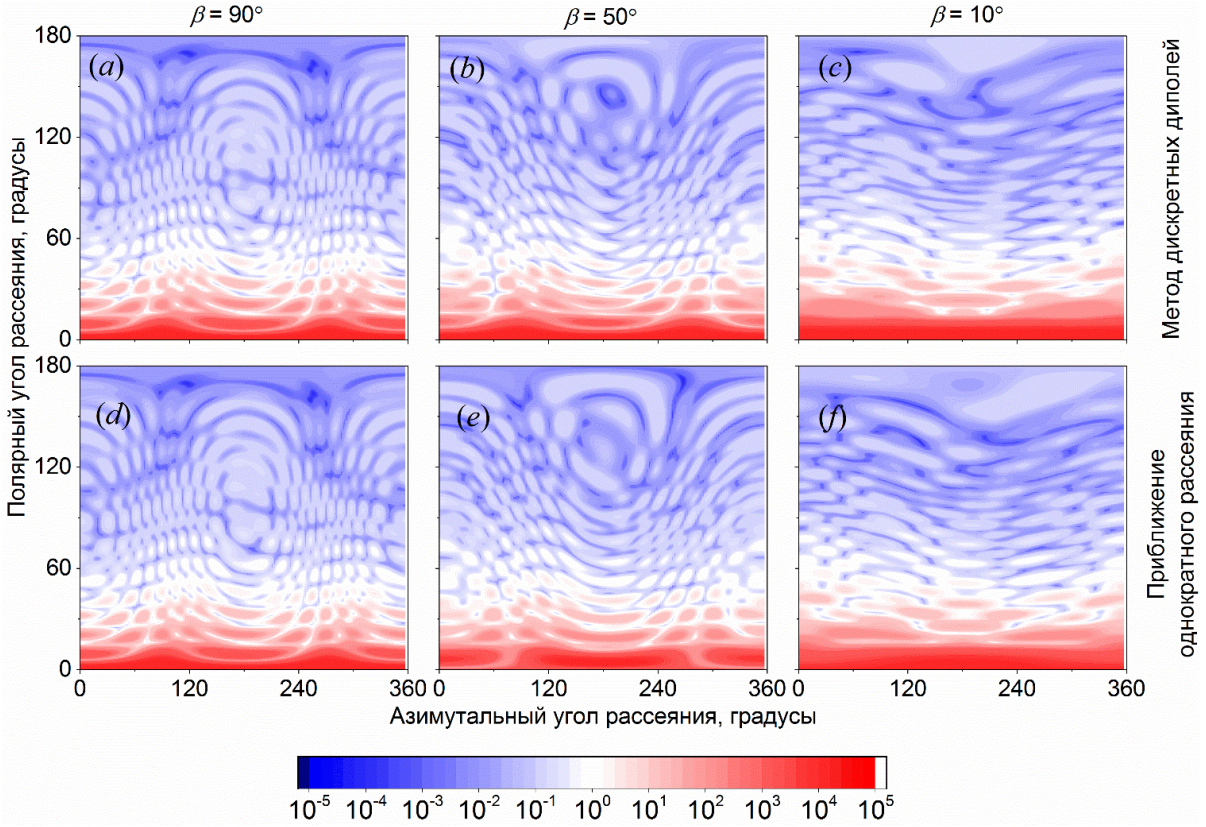

Рис. 21. Двумерные картины светорассеяния для одного димера в различных ориентациях. Верхний ряд – точный расчёт методом дискретных диполей, нижний ряд – приближение однократного рассеяния.

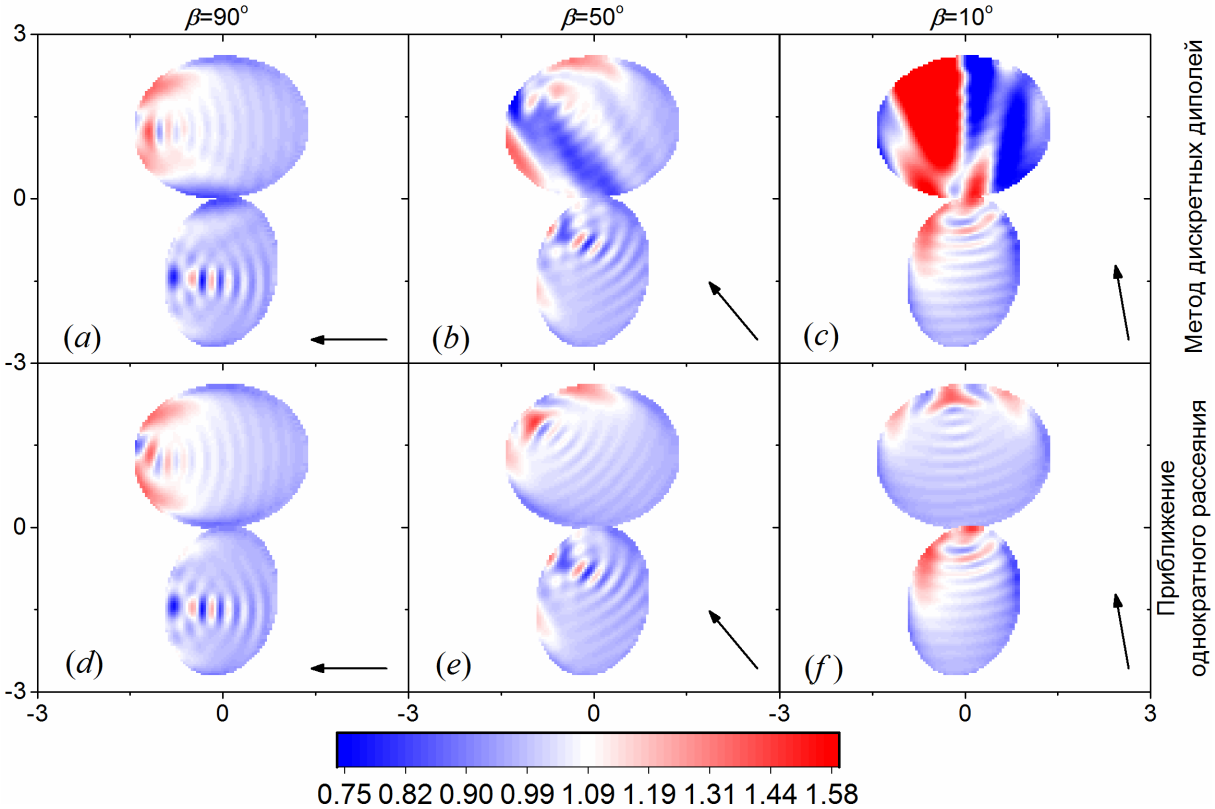

Рис. 22. Квадрат модуля внутреннего поля в агрегате тромбоцитов (верхний ряд) и в составляющих его частицах в отсутствие соседней (нижний ряд, частицы показаны вместе для сравнения с агрегатом). Стрелки указывают направление распространения излучения.

Можно сделать вывод, что приближение однократного рассеяния почти всегда применимо для агрегатов тромбоцитов (по крайней мере для двумерных индикатрис). Данное приближение может использоваться как многообещающий метод для моделирования светорассеяния агрегатами биологических частиц следующим образом. Во-первых, с помощью строгого метода необходимо вычислить двумерное распределение рассеянного поля, например, в виде амплитудной матрицы рассеяния [90], для каждого мономера в агрегате. Во-вторых, эти распределения должны быть соединены, используя уравнения (28) или (29). Возможное ускорение зависит от используемого метода расчётов и строения агрегата. В нашем моделировании методом дискретных диполей практически не наблюдалось ускорения для димеров тромбоцитов, а для октамера расчёты ускорились примерно на 30% (Раздел 3.2.7). Существенное ускорение может быть достигнуто в задачах, где можно пользоваться более простым методом моделирования светорассеяния для мономеров. Например, агрегат лейкоцита и тромбоцита можно моделировать как сфероид в контакте с двуслойным шаром большего размера [8], для которого можно использовать теорию Ми. При этом, конечно, применимость приближения однократного рассеяния к конкретным задачам должна проверяться перед его использованием.

3.2.7. Агрегаты из большего числа клеток

На Рис. 23 показаны рассчитанные индикатрисы светорассеяния для трёх различных агрегатов: плоский и пирамидальный тетрамеры и октамер (см. вставку на каждом графике). Также показаны суммы индикатрис отдельных частиц, составляющих

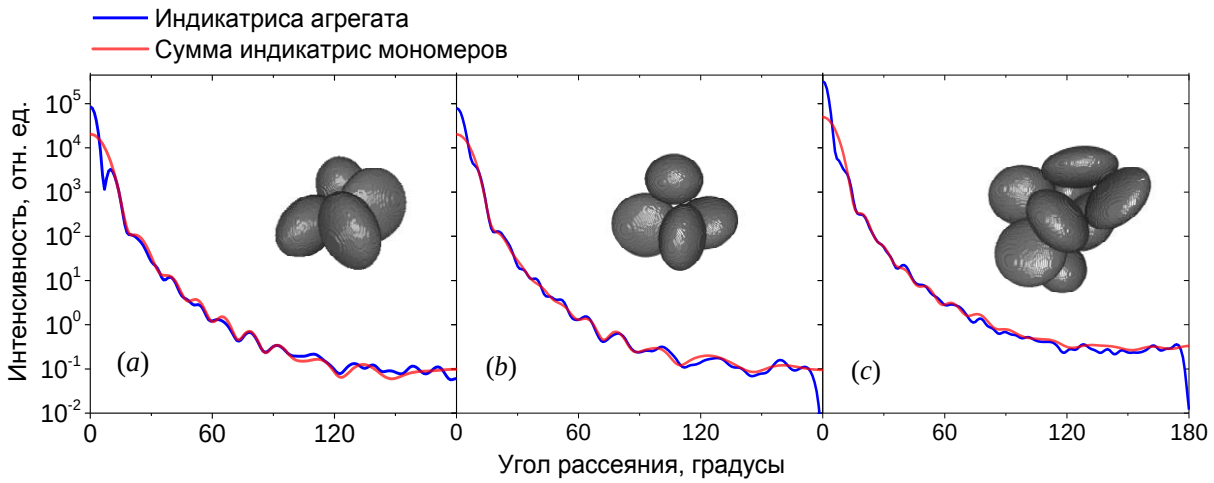

Рис. 23. Индикатрисы, рассчитанные для различных агрегатов: плоского (*a*) и пирамидального (*b*) тетрамеров и октамера (c). Падающее излучение распространяется снизу вверх. Агрегаты визуализированы с помощью LiteBil [102].

каждый агрегат. Визуальное совпадение очень хорошее, хотя в области передних и задних углов видно расхождение, как и раньше (Рис. 20). Особенно неочевидным является результат на Рис. 23(*b*): верхний мономер заслонён нижними, но многократное рассеяние тем не менее слабо влияет на индикатрису.

Это приводит к двум важным следствиям. Во-первых, индикатриса агрегата в среднем пропорциональна количеству составляющих его частиц. Однако, так как интенсивность индикатрисы мономера не является постоянной в силу большой вариабельности тромбоцитов, этот факт не позволяет вычислить размер конкретного агрегата. Во-вторых, структура индикатрисы агрегата, т.е. положения экстремумов, напоминает структуру индикатрисы мономера, но может быть сглажена в силу различных положений максимумов и минимумов в индикатрисах отдельных тромбоцитов. Действительно, индикатриса октамера [Рис. 23(*c*)] очевидно менее контрастная (имеет меньшую амплитуду осцилляций), чем индикатрисы тетрамеров [Рис. 23(*a,b*)]. Эти теоретические предсказания действительно наблюдаются в эксперименте (см. раздел 4.5).

3.2.8. Идентификация димеров

Тот факт, что индикатриса димера близка к сумме индикатрис составляющих его мономеров, приводит к ещё одному важному следствию для экспериментальной идентификации димеров тромбоцитов. Рассмотрим сначала простой случай, когда димер состоит из двух одинаковых частиц. Тогда индикатриса димера будет такой же, как у одиночного тромбоцита, только в два раза больше по интенсивности. С другой стороны, индикатриса тромбоцита увеличивает интенсивность при увеличении показателя преломления, приблизительно сохраняя структуру. Таким образом, можно подобрать такой плотный одиночный тромбоцит, что его индикатриса будет неотличима от индикатрисы димера других менее плотных тромбоцитов. Аналогичное обоснование можно привести и для димера из разных тромбоцитов, если они не слишком отличаются друг от друга. В этом случае можно ожидать, что похожую индикатрису будет иметь тромбоцит с некоторыми средними параметрами и бóльшим показателем преломления. При этом двумерные распределения интенсивности мономера и димера будут существенно отличаться в силу интерференции.

Типичная ситуация показана на Рис. 24. Двумерные распределения интенсивностей для димера (*a*) и мономера (*b*) отличаются, однако после интегрирования по φ дают одинаковые индикатрисы в области передней полусферы. Этот мономер был подобран с использованием базы данных индикатрис тромбоцитов (Раздел 3.1.3) и имеет показатель преломления 1.384, в то время как показатели преломления тромбоцитов, составляющих димер – 1.374 и 1.378. Все три значения с запасом укладываются в физиологический диапазон для тромбоцитов (см. раздел 4.2.2). Расхождение индикатрис в области больших углов имеет универсальный характер и может быть использовано для разделения мономеров и димеров, если измерять сигнал в данном диапазоне углов рассеяния.

Ещё одним перспективным, но технологически более сложным экспериментальным решением для идентификации димеров тромбоцитов представляется измерение двумерной индикатрисы светорассеяния. Теоретическая база для инструментального решения данной задачи на основе СПЦ была разработана в [103], однако до сих пор не было создано прототипа прибора, а тем более попыток измерить двумерное распределение интенсивности рассеяния для тромбоцитов. В силу технологической сложности подхода и проблемы чувствительности (тромбоциты имеют сравнительно малый размер, а значит, и интенсивность рассеяния) было решено оставить данный подход в качестве перспективного направления исследований.

3.2.9. Поляризационные индикатрисы

Другим возможным вариантом для идентификации димеров тромбоцитов

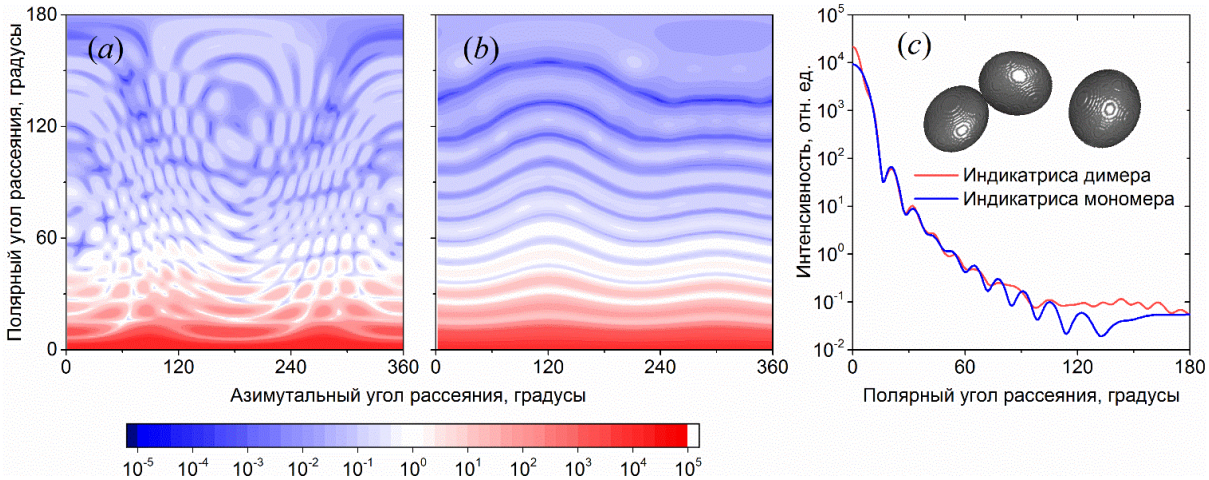

Рис. 24. Рассеяние света димером и мономером: двумерные распределения интенсивности сильно различаются – (*a*) и (*b*) соответственно, но после усреднения по углу φ индикатрисы светорассеяния совпадают в передней полусфере (c). Димер и мономер показаны в масштабе на (*c*), показатель преломления последнего 1.035, а частиц в димере – 1.028 и 1.031.

является использование поляризационных измерений. В работе [104] использовался поляризационный сканирующий проточный цитометр, который наряду с обычной индикатрисой светорассеяния позволяет измерять следующую комбинацию элементов матрицы Мюллера:

$$I_{\text{p}}(\theta) = \int_0^{2\pi} \left[\left(S_{21}(\theta,\varphi) + S_{24}(\theta,\varphi) \right) \cos(2\varphi) - \left(S_{31}(\theta,\varphi) + S_{34}(\theta,\varphi) \right) \sin(2\varphi) \right] d\varphi. \quad (35)$$

Данный сигнал равен нулю для сфер и отличается от нуля для сферических частиц. Однако в случае агрегатов тромбоцитов для I_{p} также выполняется свойство аддитивности, что вытекает теоретически из разделов 3.2.2, 3.2.4 и продемонстрировано с помощью моделирования на Рис. 25. Сигналы, как и ранее, сильно отличаются в области передних углов, а далее сходятся. Таким образом, рассуждения, показывающие невозможность отделить димеры тромбоцитов от одиночных клеток по индикатрисе светорассеяния (раздел 3.2.8), верны и для поляризационной индикатрисы. Также нужно отметить, что в силу низкой интенсивности поляризационной индикатрисы даже само измерение данного сигнала для тромбоцитов и их агрегатов представляет собой сложнейшую экспериментальную

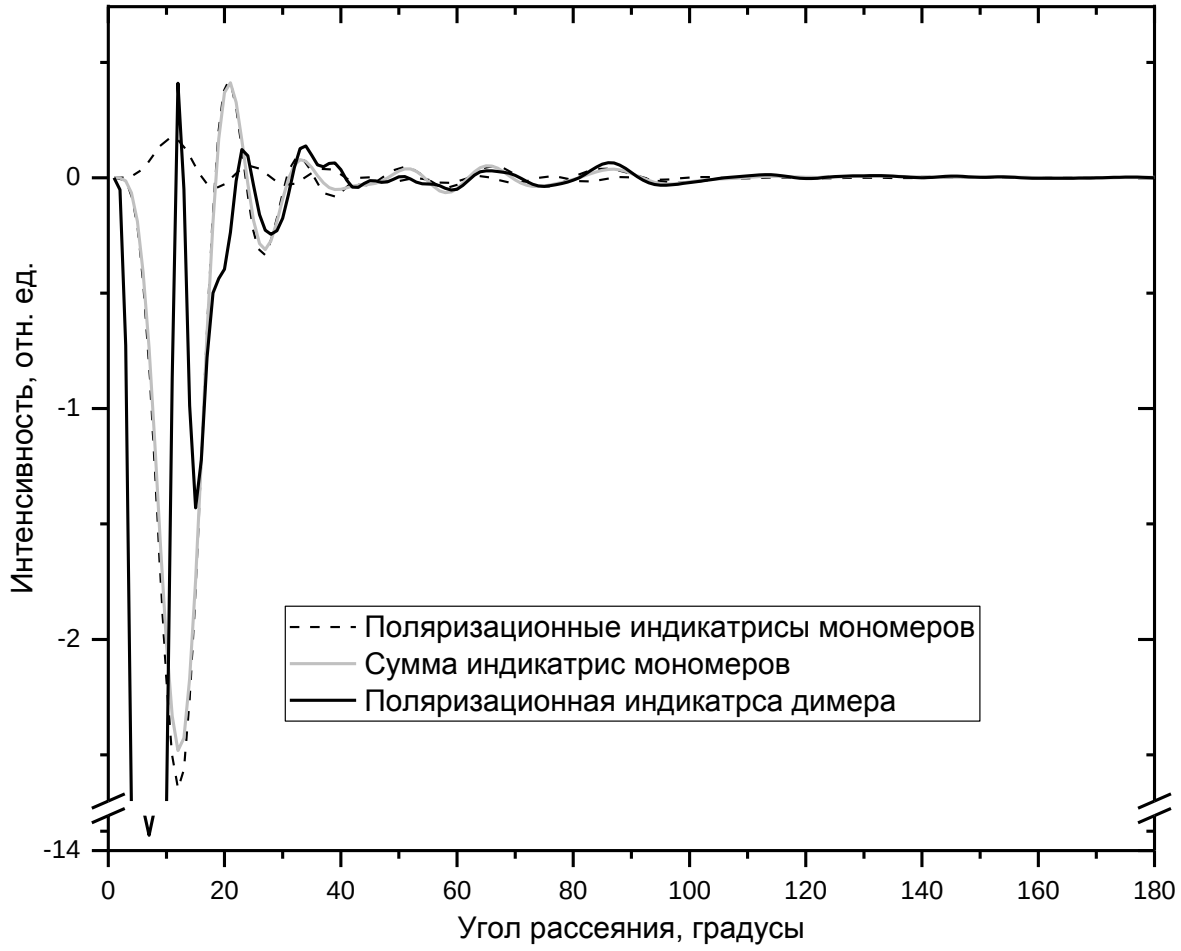

Рис. 25. Поляризационные индикатрисы димера и мономеров, а также их сумма.

задачу.

* * *

В результате исследований, описанных в данной главе, был разработан общий метод решения обратной задачи светорассеяния с использованием базы данных предварительно насчитанных модельных индикатрис. Были предложены новые подходы для оценки погрешностей характеризации частиц и оценки достаточности размера базы данных. В качестве оптической модели тромбоцита использовался сплюснутый сфероид. В результате тестирования базы данных было показано, что для преодоления компенсации параметров модели необходимо использовать априорную информацию, в качестве которой из литературных данных было взят диапазон значений показателя преломления тромбоцитов. Разработанный метод позволяет измерять характеристики тромбоцитов с помощью СПЦ и проводить исследования морфологии клеток, в том числе её динамики в процессе активации. Использованные подходы моделирования светорассеяния позволяют рассмотреть влияние отклонений реальной формы тромбоцитов от сфероидальной на индикатрису и оценить возможность измерений этих отклонений (Раздел 4.2.6). Это важно для статических и динамических исследований цитоскелета тромбоцитов, что прольёт свет на открытые вопросы (Раздел 1.2) и поможет найти новые терапевтические стратегии влияния на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз.

Было проведено теоретическое рассмотрение рассеяния света агрегатами тромбоцитов, включая аналитическое описание интерференции парциальных волн и численное моделирование рассеянных и внутренних полей. Показано, что для агрегатов клеток применимо приближение однократного рассеяния, а замывание интерференции при интегрировании по азимутальному углу приводит к аддитивности индикатрис тромбоцитов в агрегате. В силу высокой биологической вариабельности тромбоцитов могут встречаться мономеры и димеры с одинаковыми индикатрисами светорассеяния, причём как регулярными, так и поляризационными. Было предложено несколько возможных путей развития СПЦ для преодоления данной неоднозначности.

Глава 4. Экспериментальные исследования

4.1. Выделение и активация тромбоцитов крови человека

В эксперименте использовалась венозная кровь здоровых доноров. Кровь бралась в пробирку с цитратом натрия в качестве антикоагулянта (9:1 крови к цитрату натрия), а также в некоторых экспериментах (раздел 4.3.4) использовались пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) и с гепарином натрия. Богатая тромбоцитами плазма была получена в результате осаждения эритроцитов при комнатной температуре. Образец был разведен в 100 раз в 0.9% физиологическом растворе, затем для контроля работы прибора были добавлены полистирольные микросферы диаметром 2 мкм (Molecular Probes, США). Часть образца была проанализирована на СПЦ, и индикатрисы всех частиц, включая полистирольные микросферы, тромбоциты и другие составляющие обогащенной тромбоцитами плазмы, были измерены и записаны в файл. Другая часть образца использовалась для получения активированных тромбоцитов (раздел 4.3) путём добавления АДФ (от 0.2 до 40 мкмоль/л) или коллагена (2.2 мг/мл) и последующего анализа на СПЦ.

Важно отметить, что разведение существенно замедлило агрегацию тромбоцитов, поэтому стимуляция приводила только к их активации. Для изучения агрегации тромбоцитов (раздел 4.5) сначала в богатую тромбоцитами плазму добавлялся АДФ, а затем в различные моменты времени производился отбор небольшого количества плазмы и её разведение и измерение, как описано выше. Такой подход позволяет проследить за ходом процесса агрегации во времени.

Все проанализированные частицы строились на двумерной карте: интеграл от индикатрисы от 10° до 60° против интеграла от 10° до 11° (Рис. 26a). Это аналогично SSC×FSC карте, используемой в проточных цитометрах стандартной конфигурации. Видны скопления точек, соответствующие полистирольным микросферам и их димерам – они обозначены как G1, G3 и G2, соответственно. Характерная область для тромбоцитов обозначена G4. После добавления АДФ (Рис. 26b) область тромбоцитов сужается, что находится в согласии с экспериментами на стандартных проточных цитометрах [23]. Тем не менее, мы использовали одну и ту же область G4 для выделения индикатрис тромбоцитов до и после стимуляции.

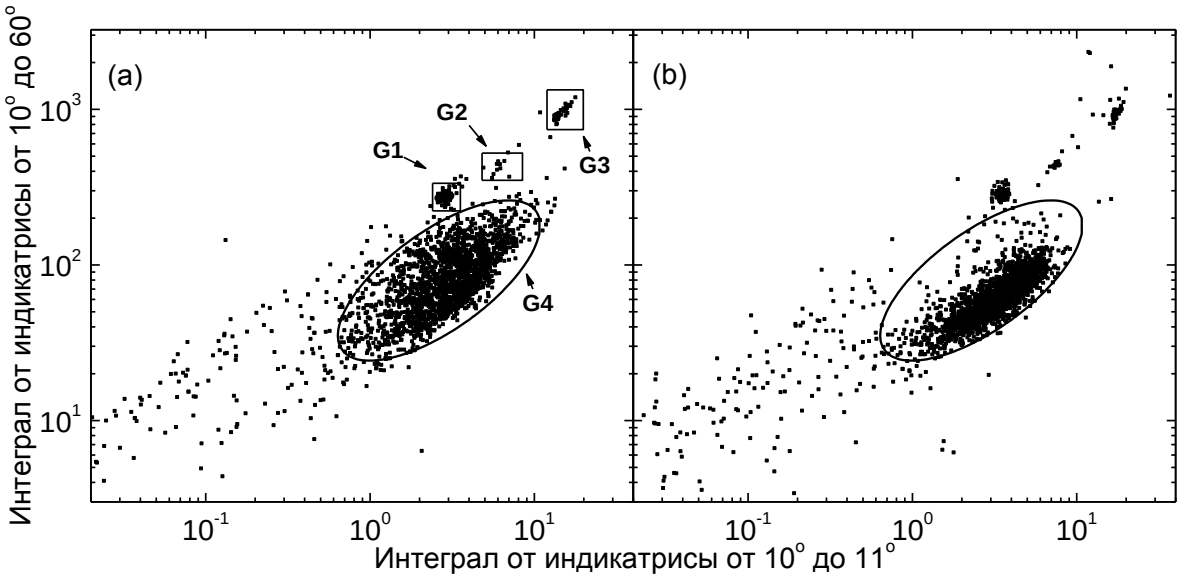

Рис. 26 Двумерная карта экспериментальных индикатрис: интеграл от индикатрисы в диапазоне [10°,60°] против интеграла в диапазоне [10°,11°] для нативных тромбоцитов (a) и после добавления 10 мкмоль/л АДФ (b). Полистирольные микросферы диаметром 1 и 2 мкм находятся в областях G1 и G3, соответственно, в области G2 сосредоточены димеры 1-микронных микросфер. Индикатрисы из области G4, которые и были отобраны для дальнейшей обработки, в основном относятся к тромбоцитам.

4.2. Статическая характеризация тромбоцитов

4.2.1. Оценка достаточности размера базы данных.

Чтобы оценить достаточность размера базы данных N, был выполнена следующая процедура. Сначала была произведена глобальная оптимизация с использованием полной базы данных, содержащей N = 500 000 индикатрис, и получены N значений $\{S(\boldsymbol{\beta}_i)\}$. По этим N значениям рассчитывалась величина $s(Q) = \min_{i \le Q} S(\boldsymbol{\beta}_i)$, которая эквивалентна $S(\boldsymbol{\beta}_0)$ при глобальной оптимизации с использованием первых Q индикатрис из базы данных. Величина $s(Q)$ была рассчитана для Q от 10^5 до 5×10^5 с шагом 10^5 для каждой экспериментальной индикатрисы и затем усреднена между ними. Соответствующие точки показаны на Рис. **27**. Теоретическая зависимость $\langle s(Q) \rangle$ выведена в разделе 3.1.6. Этот анализ позволяет провести подгонку точек на Рис. **27** теоретической кривой и определить асимптотическое значение $A = \lim_{Q\to\infty} \langle s(Q) \rangle = 6.5\times10^{-2}$, которое является мерой экспериментального шума, то есть отклонения экспериментальной индикатрисы от теоретической для модели сплюснутого сфероида. Оставшееся отклонение за счет разреженности базы данных для наибольшего Q составляет только 0.8×10^{-2}, что много меньше A. Таким образом,

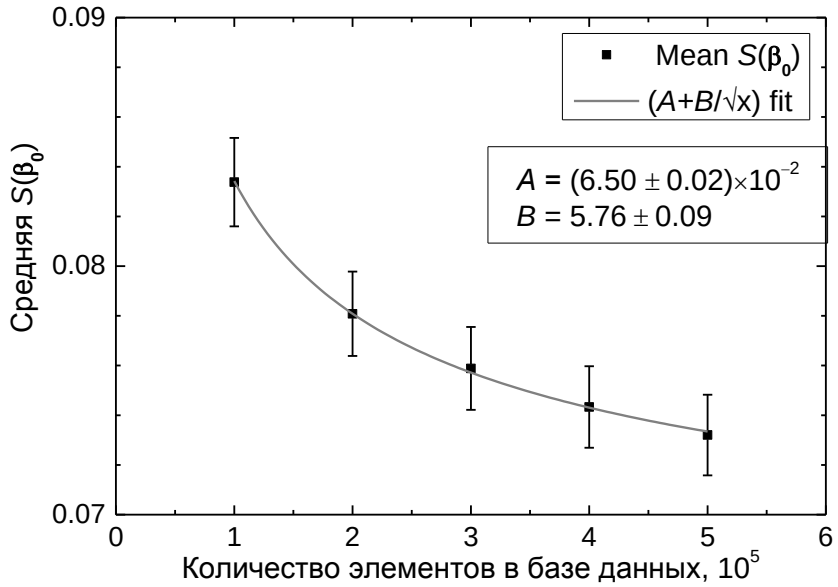

Рис. 27 Зависимость средней по экспериментальным индикатрисам величины S(β0) от размера базы данных.

дальнейшее увеличение размера базы данных не должно существенно изменить результаты.

Мы также оценили погрешности численного интегрирования (12), зависящие от N. При использовании полной базы данных погрешности для $\boldsymbol{\mu}$ и $\mathbf{C}$ составили не более 0.5%.

4.2.2. Ограничение по показателю преломления

Чтобы подтвердить обоснованность ограничения показателя преломления (раздел 3.1.7), мы выполнили несколько тестов, проведя глобальную оптимизацию с полной и ограниченной (т.е. с показателем преломления, ограниченным в узком диапазоне [1.37,1.39]) базами данных.

Во-первых, для каждой экспериментальной индикатрисы было определено, пересекает ли доверительный интервал, полученный при глобальной оптимизации с полной базой данных, точнее, его проекция на показатель преломления, диапазон [1.37,1.39]. Это означает, что гипотеза о нахождении показателя преломления в указанном диапазоне верна в смысле 95% вероятности. Такое пересечение имело место для абсолютного большинства (95%) экспериментальных индикатрис. Для остальных 5% экспериментальных индикатрис ограничение по показателю преломления также не приводило к неадекватным результатам, поэтому мы не стали исключать их из рассмотрения.

Во-вторых, мы рассмотрели наименьшую сумму квадратов отклонений $S(\boldsymbol{\beta}_0)$. Распределения экспериментальных индикатрис по $S(\boldsymbol{\beta}_0)$ показаны на Рис. 28 для полной

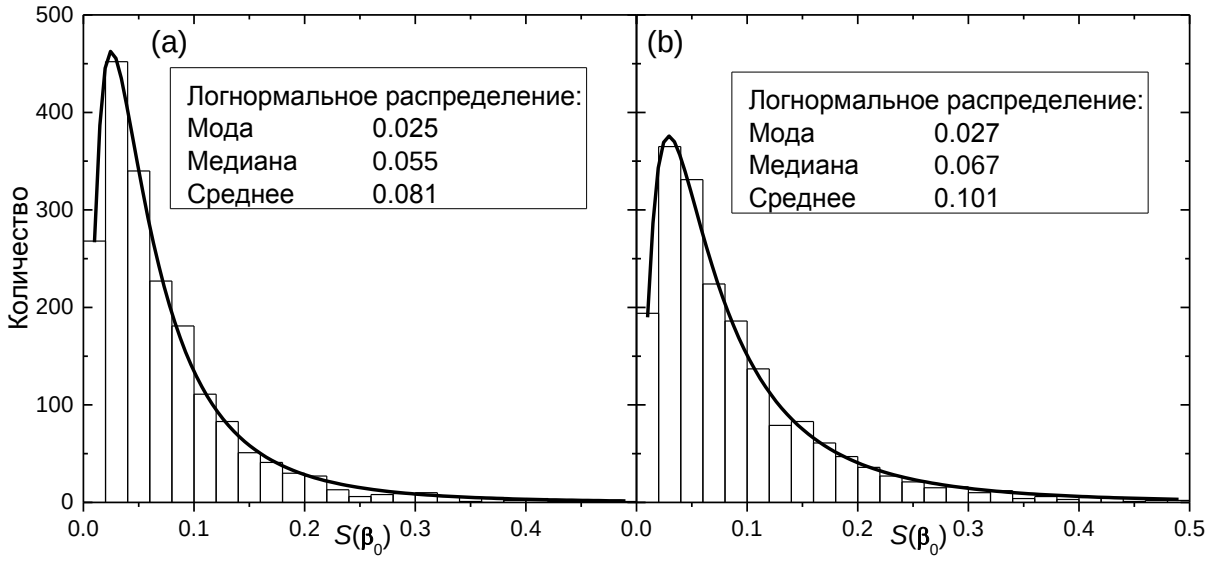

Рис. 28 Распределение по наименьшей взвешенной сумме квадратов отклонений $S(\beta_0)$ для полной базы данных (a) и базы данных с показателем преломления, ограниченным в диапазоне [1.37,1.39]. Также показаны результаты фитинга логнормальным распределением.

и ограниченной баз данных. Распределения хорошо описываются логнормальными кривыми, соответствующие параметры которых показаны на графиках. Можно увидеть, что ограничение показателя преломления лишь немного ухудшает согласие между теоретическими и экспериментальными индикатрисами.

4.2.3. Программное обеспечение для решения обратной задачи

Для решения обратной задачи светорассеяния для измеренных индикатрис тромбоцитов было создано программное обеспечение, в котором реализованы идеи, описанные в разделе 3.1. Эти идеи достаточно общие и применимы для базы данных любой структуры для характеризации любых объектов, включая определение погрешностей полученных параметров и определение границ доверительного интервала. Так, данное ПО уже применялось для характеризации не только тромбоцитов, но и эритроцитов крови, бактерий *E. Coli* [9] и частиц молочного жира [10].

Общий вид программы показан на Рис. 29(*a*). При запуске существует возможность указать диапазон параметров и угловой диапазон, в котором производится подгонка экспериментальной индикатрисы теоретическими. Далее для каждой экспериментальной индикатрисы программа перебирает все теоретические индикатрисы из базы данных, параметры которых лежат в заданных диапазонах, и для каждой из них рассчитывается сумма квадратов отклонений (7), которая затем пересчитывается в вероятность данных параметров (8). Далее с помощью формул, данных в разделе 3.1.5, рассчитывается математическое ожидание параметров и

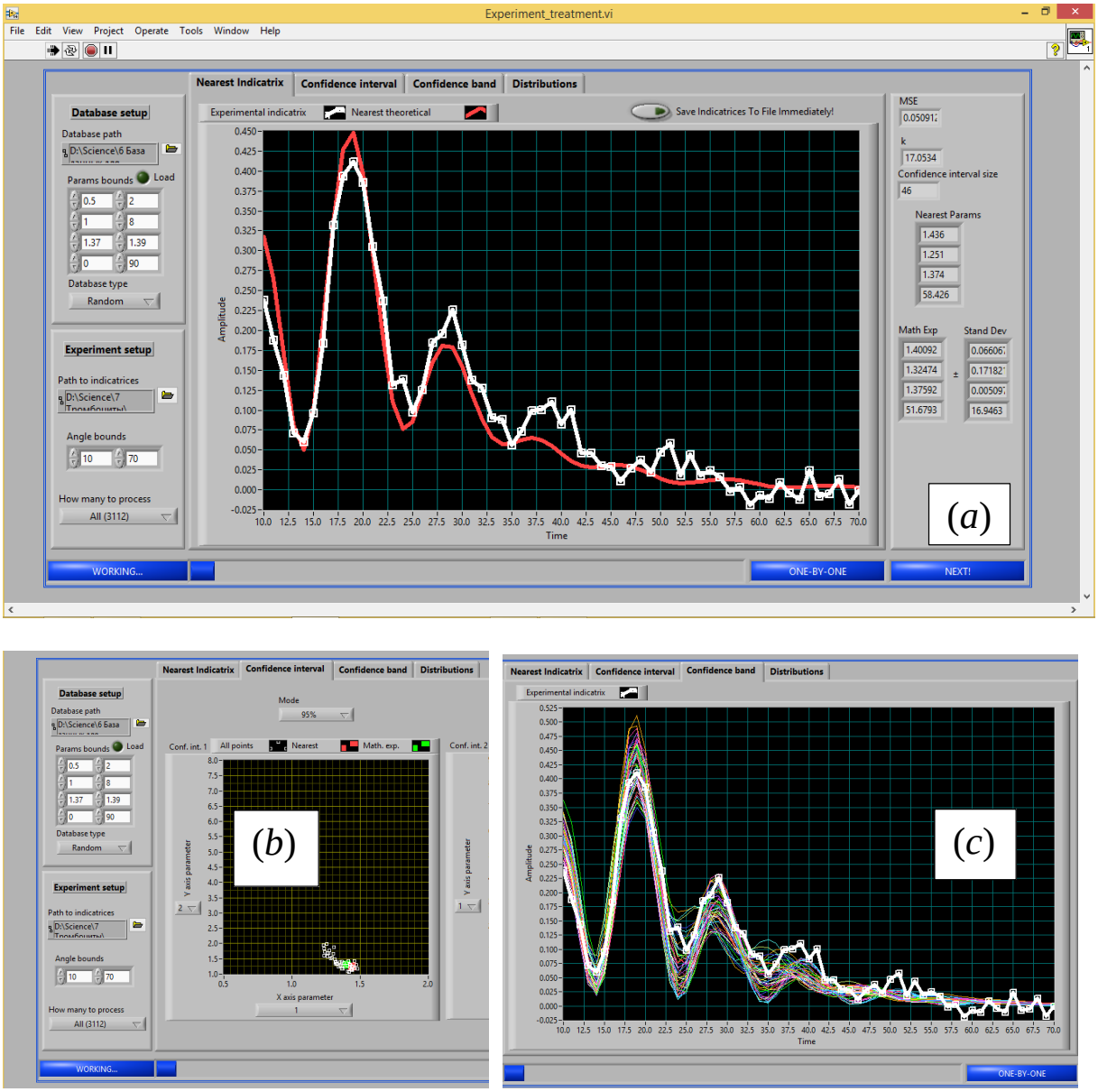

Рис. 29. Программа для решения обратной задачи светорассеяния с использованием базы данных индикатрис. (*a*): показаны экспериментальная индикатриса (белая линия) и наиболее близкая из базы данных. (*b*): проекция доверительного интервала (ср. Рис. 30). (*c*) экспериментальная индикатриса и индикатрисы из доверительного интервала.

матрица ковариаций, которая даёт погрешности их определения.

Также строится доверительный интервал, состоящий из точек базы данных, в которых сосредоточено 68% или 95% вероятности, начиная с точки, имеющей максимальную вероятность. В программе имеется возможность отображения проекции доверительного интервала на любую плоскость параметров (Рис. 29*b*), а также отображение индикатрис из доверительного интервала (Рис. 29*c*). Одновременно с этим

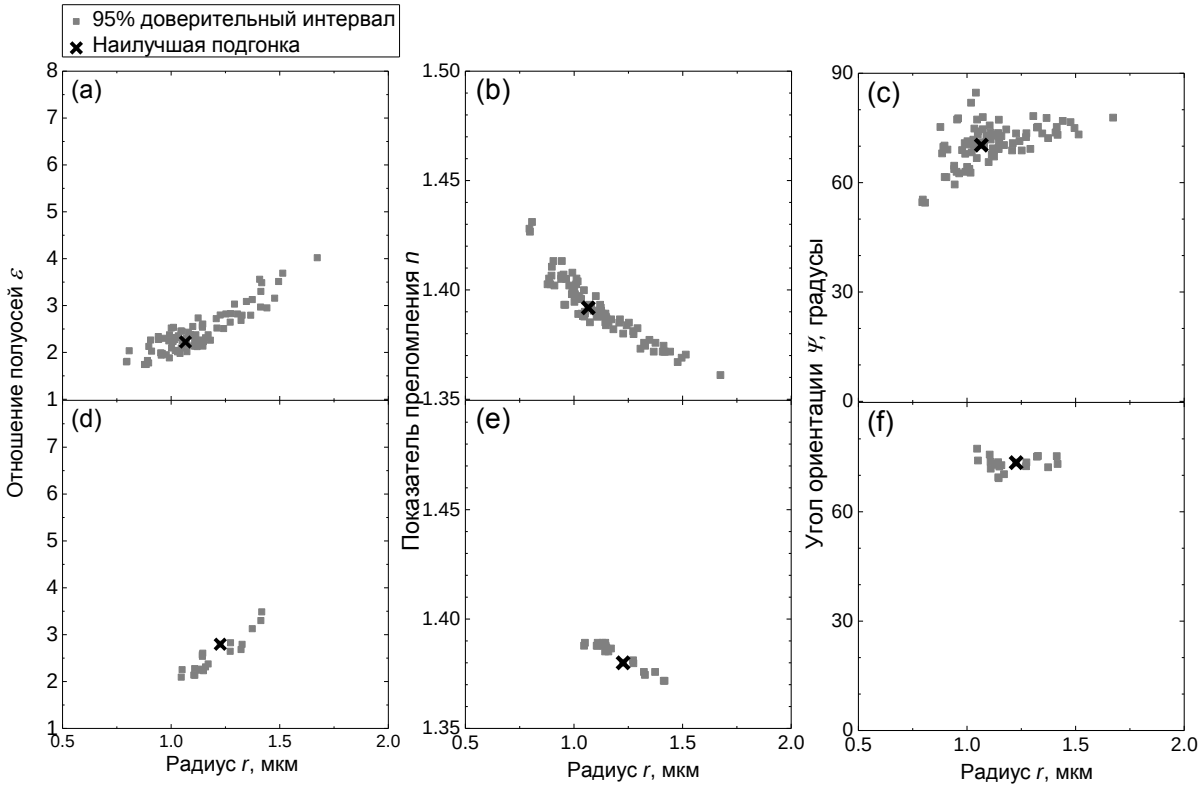

Рис. 30. Проекции 95% доверительной области для типичной экспериментальной индикатрисы при использовании полной (a-c) и ограниченной (d-f) баз данных.

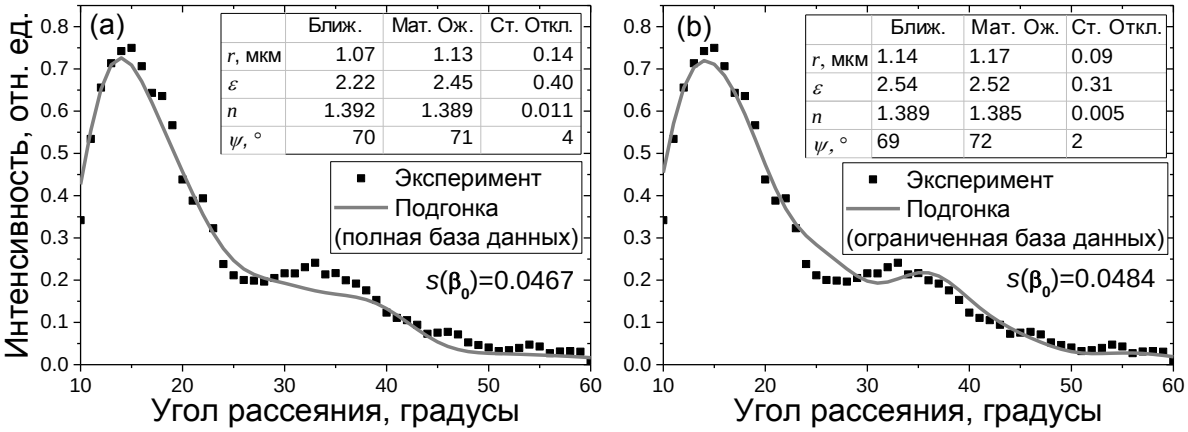

Рис. 31. Типичная экспериментальная индикатриса (показана точками) и ближайшие к ней (показаны линиями) из полной (a) и ограниченной (b) баз данных. Показаны индикатрисы, умноженные на весовую функцию (2). Также указаны параметры ближайших индикатрис, математическое ожидание и стандартное отклонение параметров.

строится распределение всех обработанных частиц по параметрам (наилучшая подгонка). После завершения обработки всех экспериментальных индикатрис программа сохраняет результаты в файл.

4.2.4. Типичные результаты характеризации тромбоцитов

Проекции доверительного интервала для типичной экспериментальной индикатрисы показаны на Рис. 30. Они следуют тому же шаблону, что и облако параметров 50 ближайших индикатрис в разделе 3.1.7 (см. Рис. 10, справа). Сама индикатриса и ближайшая из полной и ограниченной баз данных показаны на Рис. 31(a,b) (индикатрисы умножены на весовую функцию (2)). Можно заметить, что $S(\boldsymbol{\beta}_0)$ лишь немного больше в случае ограниченной базы данных, как и ожидалось. При этом соответствующая теоретическая индикатриса в определенном смысле подходит лучше, в частности, она лучше прописывает второй максимум.

Это показывает перспективное направление дальнейших исследований – замену суммы квадратов отклонений на более физически обоснованную меру близости индикатрис, например, основанную на положениях экстремумов. Тем не менее, основным эффектом ограничения показателя преломления является уменьшение погрешностей определения параметров в 3–6 раз, что и являлось нашей целью.

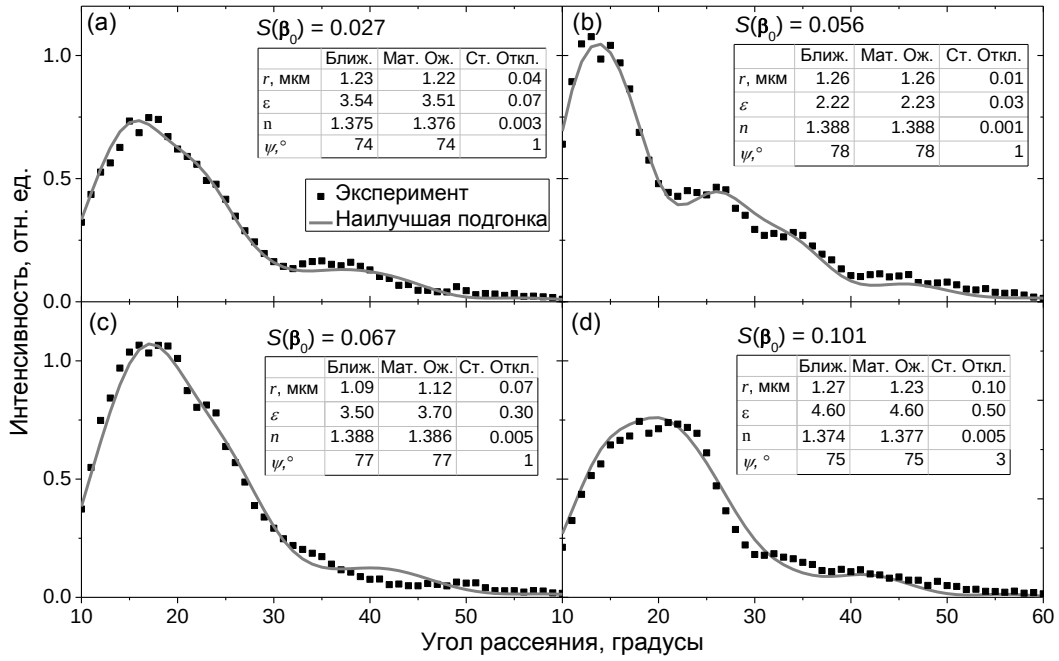

Рис. 32 Типичные экспериментальные и ближайшие теоретические индикатрисы, полученные в результате глобальной оптимизации с использованием базы данных с ограниченным показателем преломления. Показаны индикатрисы, умноженные на весовую функцию (2).

Последующие результаты получены с использованием ограниченной базы данных. В частности, результаты характеризации 4 типичных тромбоцитов показаны на Рис. 32 (индикатрисы также умножены на весовую функцию (2)).

4.2.5. Распределение тромбоцитов по объёму

Описанный метод позволяет получить объём каждой измеренной клетки и, таким образом, получить распределение популяции тромбоцитов по объёму. С другой стороны, распределение тромбоцитов по объёму измеряется при общем анализе крови методом Култера. Мы провели сравнение методов, взяв одновременно две пробы крови одного донора и измерив одну на СПЦ, а другую на гематологическом анализаторе BC-5300. Полученные распределения по объёму показаны на Рис. 33. Кривые были нормированы так, чтобы площадь под ними была одинаковой. Распределения достаточно хорошо согласуются, хотя СПЦ показывает в среднем больший объём. Различие может быть связано как с неточностями решения обратной задачи светорассеяния, так и с неточностью работы гематологического анализатора, не

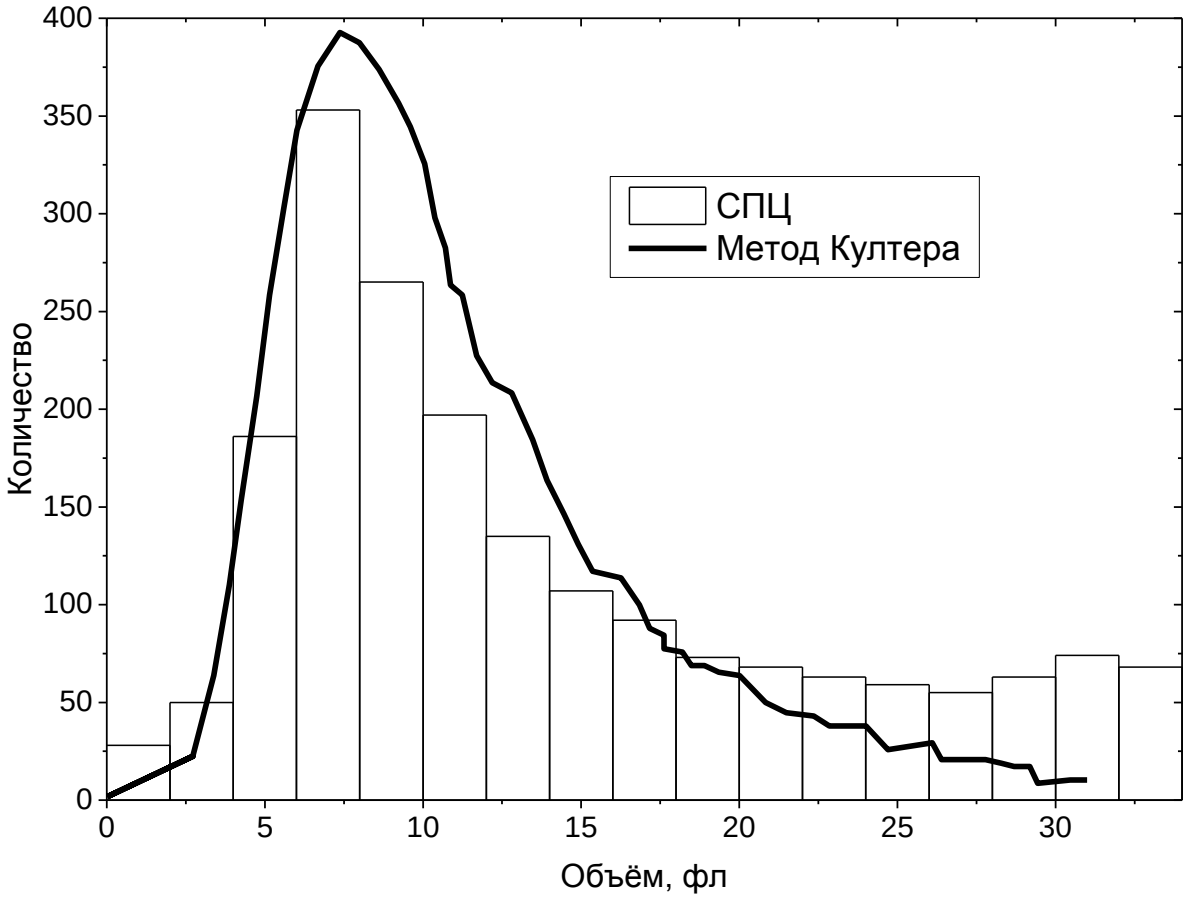

Рис. 33 Распределение тромбоцитов по объёму, полученное в результате решения обратной задачи светорассеяния для индикатрис тромбоцитов, измеренных на СПЦ (столбики) и полученное на гематологическом анализаторе BC-5300 (линия).

учитывающего зависимость амплитуды импульса от формы клетки, что может дать существенную ошибку в определении объёма [18].

4.2.6. Измерения индикатрис тромбоцитов на другой длине волны

Изложенные результаты были получены на длине волны 660 нм. Для улучшения точности решения обратной задачи была предпринята попытка характеризации тромбоцитов с использованием лазера с более короткой длиной волны – 405 нм. Для этого таким же образом (раздел 3.1.3) была рассчитана база данных из примерно 10^5 индикатрис, заранее ограниченная по показателю преломления в диапазоне 1.37–1.39. Однако при обработке экспериментальных индикатрис оказалось, что доверительный интервал имеет вид двух отдельных областей, причём с примерно одинаковым значением вероятности (Рис. 34*a*). Это подтверждается тем, что математическое ожидание находится между областями. В экспериментах с лазером с длиной волны 660 нм подобный эффект разделения доверительного интервала тоже иногда присутствует, но вероятность для одной из областей всегда гораздо больше (локальный минимум глубже). Также на Рис. 34*b* показана экспериментальная индикатриса и теоретические из разных областей доверительного интервала (индикатрисы умножены на весовую функцию (2)). Одна из них описывает экспериментальный сигнал лучше, но всё же не идеально.

Эффект разделения доверительного интервала на две области может быть связан с экспериментальным шумом. Однако, если обрабатывать с помощью базы данных теоретически насчитанные индикатрисы сфероидов с добавленным шумом, даже очень

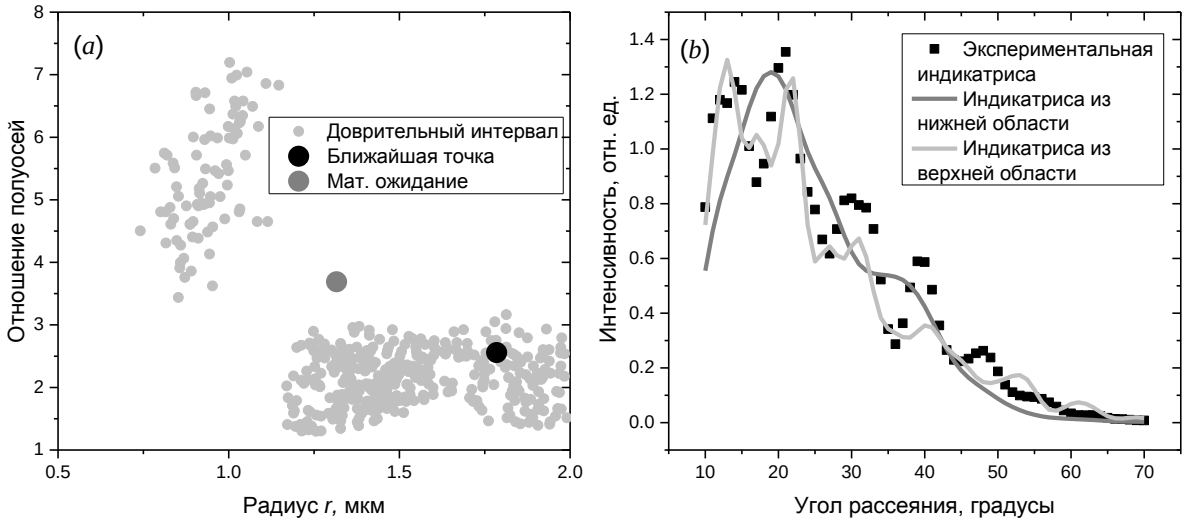

Рис. 34. Доверительный интервал при подгонке индикатрисы тромбоцита, измеренной на длине волны 405 нм (справа), а также сама экспериментальная индикатриса и две теоретических из разных мест доверительного интервала (слева).

большим, то доверительные интервалы получаются в основном из одной области, либо второй минимум гораздо менее глубокий. Поэтому было высказано предположение, что эффект связан с ошибкой модели, которая не чувствуется на длине волны 660 нм, но начинает проявляться на 405 нм.

Наиболее вероятным отклонением формы тромбоцитов от сфероидальной является частичная активация, при которой периферическое кольцо микротрубочек перестаёт быть плоским, немного загибаясь (см. раздел 1.2). При этом форма клетки будет напоминать седловидную и не будет обладать аксиальной симметрией. Однако в качестве первого шага была выбрана модель изогнутого тромбоцита, обладающего осью симметрии. Контур такой формы был задан вручную, а получившаяся модель показана на Рис. 35.

Индикатрисы для этой частицы были посчитаны для длин волн 405 и 660 нм, а затем они обрабатывались с помощью соответствующей базы данных. Ближайшие индикатрисы и доверительные интервалы показаны на Рис. 36. Для длины волны 660 нм совпадение индикатрис хорошее, а доверительный интервал состоит из одной точки. В то же время на длине волны 405 нм доверительный интервал распадается на несколько кучек, хотя одна из них (соответствующая настоящим параметрам) и остается более глубокой. Можно сделать вывод, что наблюдаемый в эксперименте эффект связан с подобным искажением формы тромбоцита. При учёте отсутствия оси симметрии (моделировании настоящей формы с учётом изгиба кольца микротрубочек)

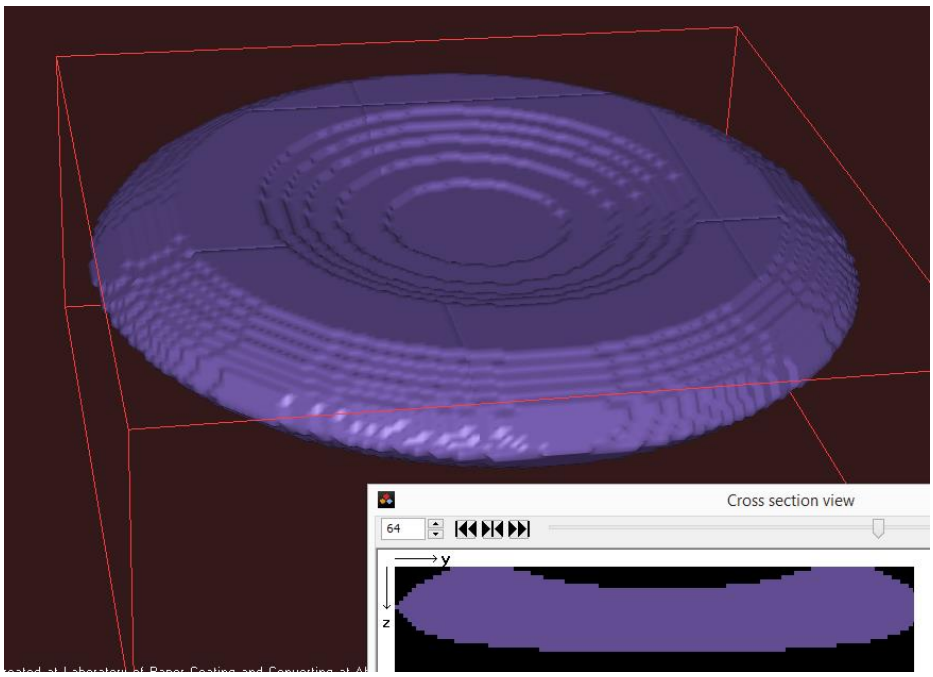

Рис. 35 Искривлённая форма тромбоцита, использованная для моделирования влияния искажений формы на индикатрису светорассеяния на разных длинах волн.

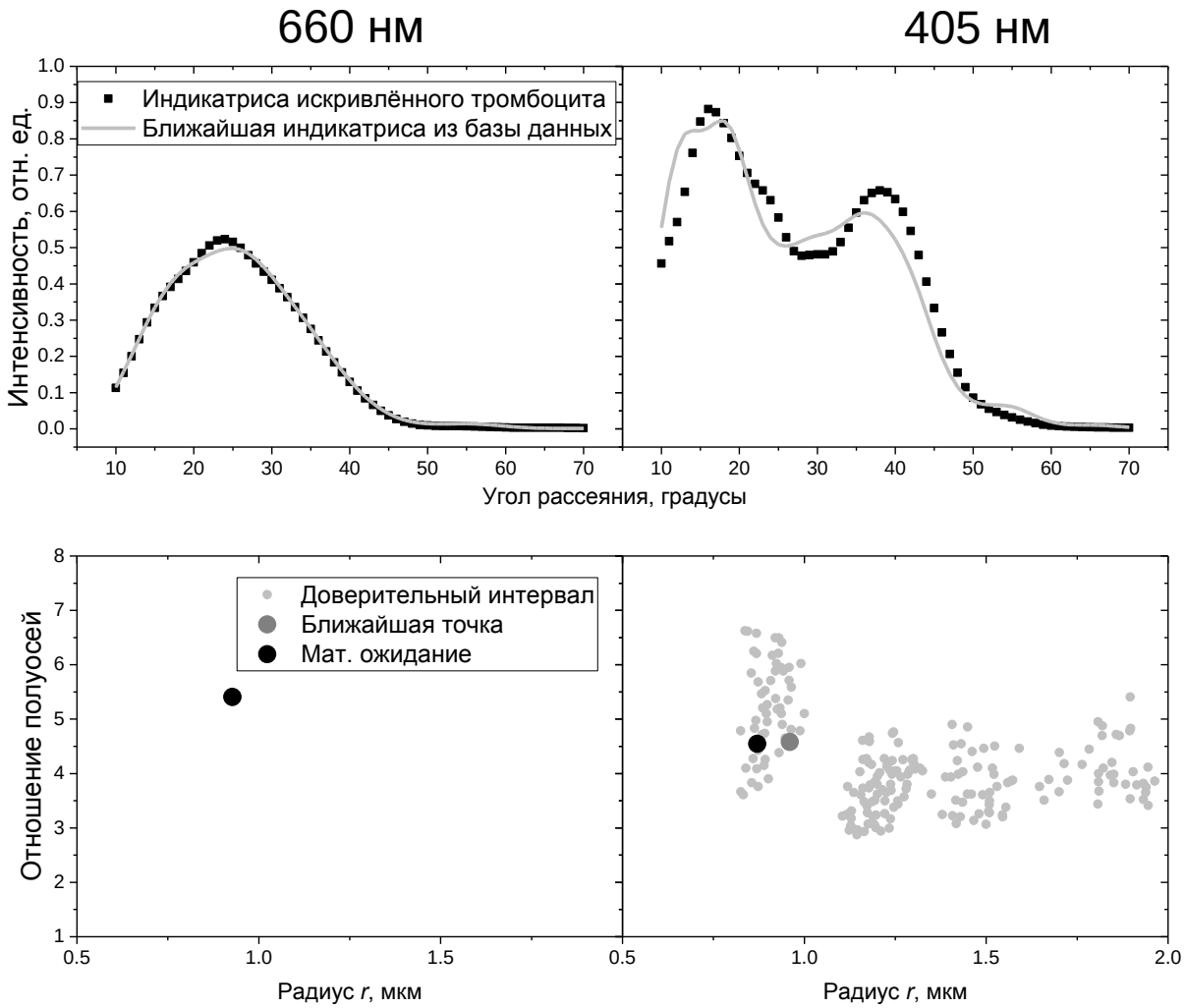

Рис. 36. Ближайшие индикатрисы из базы данных и доверительные интервалы при подгонке индикатрисы искривлённого тромбоцита на разных длинах волн. Индикатрисы умножены на весовую функцию (2).

результаты, вероятно, будут ещё более похожими на эксперимент.

Полученные результаты позволяют утверждать, что использование лазера с длиной волны 405 нм даст возможность зарегистрировать отличие геометрии тромбоцитов от сплюснутого сфероида. Это необходимо для детального исследования особенностей цитоскелета данных клеток, для понимания механизмов поддержания дисковидной формы и её быстрого изменения при активации.

4.3. Активация тромбоцитов

4.3.1. Изменение формы

Принципиально новой информацией, которую позволяет получить разработанный метод характеризации тромбоцитов, является распределение клеток по форме (отношению полуосей). Форма является важным маркером активации

тромбоцита [12,105]. Для оценки потенциала новой информации были проведены эксперименты с активацией тромбоцитов на СПЦ, в которых использовались два активатора: коллаген в концентрации 2.2 мг/мл и АДФ в концентрации 0.2–40 мкмоль/л. На Рис. 37 приведены результаты экспериментов для 6 доноров.

Распределение по отношению полуосей нативных тромбоцитов (показаны жирной линией на Рис. 37) обычно является бимодальным, что связано с гетерогенностью популяции тромбоцитов – в пробе крови присутствуют как активированные, так и покоящиеся тромбоциты [106]. Неактивированным тромбоцитам соответствует отношение полуосей в районе 3–8, а активированным – более сферическая форма (левый пик). После стимуляции хорошо виден рост фракции клеток с отношением полуосей 1–2. Минимальная концентрация АДФ (0.2 мкмоль/л) вызывает сравнительно небольшое увеличение пика, а с повышением концентрации его высота

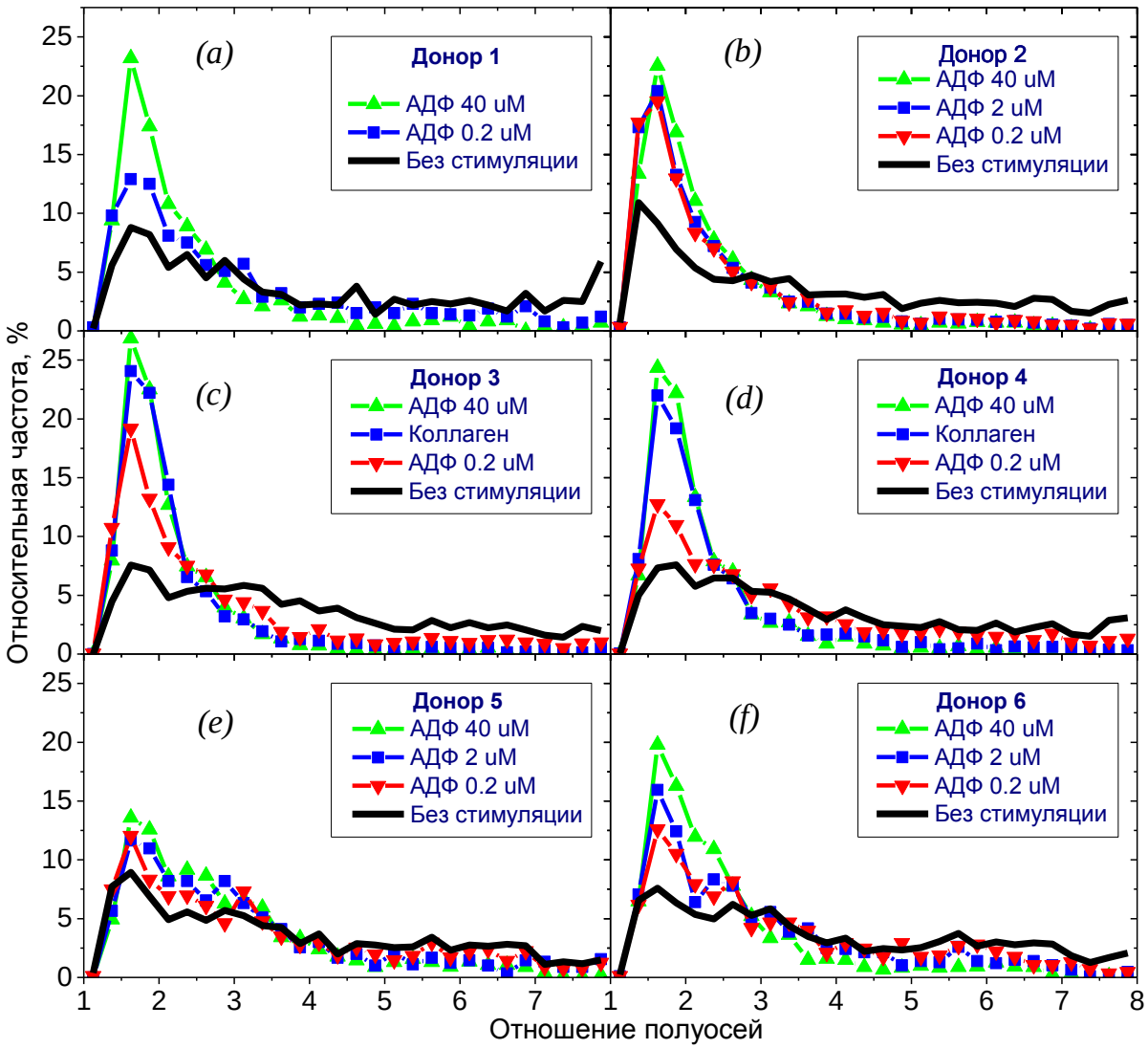

Рис. 37 Активация тромбоцитов в ответ на различные концентрации АДФ и коллагена для шести доноров.

монотонно растёт. Донор 2 (Рис. 37*b*), перенёсший инфаркт миокарда, имеет большее количество активированных тромбоцитов в нативной (нестимулированной) пробе, а также более сильный ответ даже на минимальную концентрацию АДФ, что показывает возможность использования метода в диагностике. Пониженный ответ тромбоцитов на стимуляцию наблюдается у донора 5 (Рис. 37*e*), однако подобной прямой связи с диагнозом не прослеживается.

Активация тромбоцитов коллагеном также хорошо видна на распределении клеток по отношению полуосей (Рис. 37*c,d*). В физиологических условиях коллаген находится снаружи кровеносных сосудов, поэтому он считается более сильным активатором, чем АДФ. Все тромбоциты, встретившиеся с коллагеном в физиологической концентрации, должны в конечном итоге перейти в активированное состояние, так как коллаген встречается только вне кровотока. С другой стороны, АДФ присутствует в кровотоке, поэтому его наличие может активировать не все тромбоциты. Это же приводит к тому, что при воздействии АДФ активация происходит быстрее (раздел 4.3.2) – клетка должна успеть изменить форму за время прохождения мимо поврежденной зоны сосуда.

Полученная гетерогенность популяции тромбоцитов по отношению полуосей, с одной стороны, подтверждает уже известные литературные данные. С другой стороны, точность и быстродействие метода позволяет выполнять анализы, которые ранее были принципиально невозможны. В частности, это открывает путь для исследования реакции тромбоцитов на различные стимулы в реальном времени, что необходимо для поиска новых путей терапевтического влияния на систему гемостаза.

4.3.2. Кинетика активации

Так как измерения отношения полуосей тромбоцитов на СПЦ не требуют какой-либо длительной пробоподготовки (как, например, присоединение меченных флюоресцентным красителем антител в стандартном методе детекции активированных тромбоцитов на проточных цитометрах), с помощью предложенного метода можно изучать изменение формы клеток во времени после активации. Для таких экспериментов по измерению кинетики изменения формы единственным ограничением является задержка между добавлением активатора и началом измерения, обусловленная системой подачи пробы. В случае стандартной системы подачи пробы задержка составляет 35 с. Тем не менее, в проведённых экспериментах в некоторых случаях видно, как меняется среднее отношение полуосей клеток. Например, в случае коллагена на Рис. 38*a* видно, как с течением времени уменьшается отношение полуосей (показано

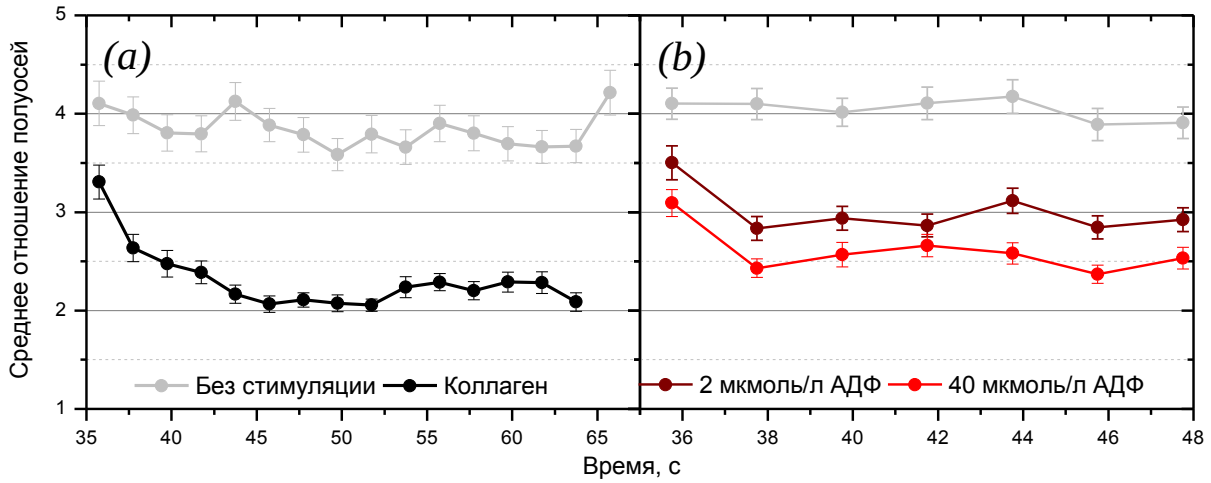

Рис. 38 Временно́й ход изменения формы при активации (*a*) коллагеном и (*b*) АДФ. Использованы данные для доноров 3 и 6 соответственно.

среднее отношение полуосей за каждые 2 с). Также можно увидеть, что кривая достигает минимума около 45–50 с, а затем снова идёт вверх, что может быть связано со спадом концентрации внутриклеточных ионов кальция (раздел 1.2). В других экспериментах среднее отношение полуосей возвращалось к начальному значению уже через 2–3 минуты после активации коллагеном (данные не приведены). Согласно литературным данным, максимальная концентрация внутриклеточных ионов кальция для коллагена достигается около 1 минуты после стимуляции, а затем начинается её уменьшение [107]. Для сравнения показано также среднее отношение полуосей для пробы без стимуляции.

На Рис. 38*b* показано среднее отношение полуосей тромбоцитов после стимуляции АДФ. Здесь кинетика заметна только в самом начале. Согласно литературным данным, при активации АДФ максимальная концентрация внутриклеточных ионов кальция наблюдается через 35–40 с [36], поэтому задержка в 35 с в данном случае является критичной.

Полученные данные косвенно доказывают связь между концентрацией ионов кальция внутри клетки и её формой. Выяснение механизмов этой связи и построение модели, описывающей влияние ионов кальция на цитоскелет, не только является интересной биофизической задачей, но и поможет найти новые способы терапевтического влияния на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз. Кроме того, подобные механизмы должны работать и в других биологических клетках, исследование которых затруднено в силу более сложного строения или наличия ядра. Для детального изучения механики изменения формы необходимо измерять кинетику на более ранних стадиях процесса, а также проводить одновременное измерение концентрации ионов кальция с помощью флуоресцентных зондов. Уже начата

разработка новой системы подачи пробы СПЦ, которая позволит сократить задержку между добавлением активатора и измерением индикатрис.

4.3.3. Объём и площадь поверхности при активации

При активации тромбоцитов меняется форма клетки, что выражается в изменении распределения клеток по отношению полуосей. При этом в литературе нет согласия, сопровождается ли активация изменением объёма или форма меняется с его сохранением. Согласно данным, полученным методом Култера, объём клетки при активации растёт [12]. Однако измеряемая в этом случае величина (амплитуда импульса напряжения при прохождении клетки через канал с электролитом) зависит не только от объёма, но и от формы клетки [18]. Согласно исследованиям с помощью фазово-контрастного микроскопа [26], средний объём тромбоцитов уменьшается, а по данным, полученным с помощью осаждения тромбоцитов на центрифуге – не меняется [30].

Полученные нашим методом среднее отношение полуосей тромбоцитов $\langle\varepsilon\rangle$, средний объём $\langle V\rangle$ и площадь поверхности $\langle S\rangle$ до активации и после стимуляции 40 мкМ АДФ для шести доноров приведено в Таблице 4 (показаны средние значения ± стандартное отклонение; в каждом случае было измерено не менее 10^3 клеток). Отношение полуосей до стимуляции для всех доноров находится в очень узком диапазоне, что говорит о фундаментальных причинах плоской формы тромбоцитов. Такая форма действительно необходима для поддержания гемостаза, пациенты со сферическими тромбоцитами подвержены частым кровотечениям [46]. В процессе активации $\langle\varepsilon\rangle$ уменьшилось на 22–42%, средний объём также уменьшился, но незначительно – на 0–12%, а средняя площадь поверхности стала существенно меньше – на 13–18%.

Таким образом, изменение формы происходит за счёт уменьшения площади поверхности при практически постоянном объёме. Можно предположить, что площадь поверхности тромбоцита при активации меняется за счёт образования складок из-за натяжения актин-миозин-спектриновой сетки [47]. К дополнительному натяжению может приводить как активация взаимодействия актина и миозина (раздел 1.2), так и внешнее давление, препятствующее изменению объёма клетки. Помимо небольших складок, образуются также псевдоподии (выросты мембраны) длиной до нескольких микрон. Как складки, так и псевдоподии не дают вклада в определяемую площадь поверхности, так как не учитываются в оптической модели (раздел 3.1.1). Незначительное уменьшение объёма может быть связано с тем, что часть вещества переходит в псевдоподии, а также выделяется в виде гранул.

4.3.4. Изучение активации с использованием флуоресцентных меток

Для независимой оценки активации тромбоцитов на СПЦ использовались антитела к поверхностному рецептору CD62p (P-селектин), меченные изотиоцианатом флуоресцеина (ФИТЦ). Данный рецептор у покоящихся тромбоцитов находится на внутренней поверхности мембраны гранул, которая при высвобождении последних

Таблица 4. Результаты характеризации тромбоцитов шести доноров до и после стимуляции 40 мкмоль/л АДФ. Показаны средние значения ± стандартное отклонение.

		До стимуляции	**После стимуляции**
Донор 1	$\langle\varepsilon\rangle$	**3.9** ± 2.1	**2.5** ± 1.3
	$\langle V\rangle$	10.6 ± 8.3	9.5 ± 5.9
	$\langle S\rangle$	**30.4** ± 18.0	**25.3** ± 11.3
Донор 2	$\langle\varepsilon\rangle$	**3.7** ± 2.0	**2.4** ± 1.2
	$\langle V\rangle$	11.2 ± 7.2	10.8 ± 6.4
	$\langle S\rangle$	**31.6** ± 13.7	**27.4** ± 11.5
Донор 3	$\langle\varepsilon\rangle$	**3.8** ± 1.8	**2.2** ± 1.0
	$\langle V\rangle$	9.3 ± 6.6	9.3 ± 6.0
	$\langle S\rangle$	**28.5** ± 13.3	**24.3** ± 11.0
Донор 4	$\langle\varepsilon\rangle$	**3.8** ± 1.9	**2.3** ± 1.0
	$\langle V\rangle$	8.8 ± 6.6	8.1 ± 5.6
	$\langle S\rangle$	**26.9** ± 13.4	**22.5** ± 11.3
Донор 5	$\langle\varepsilon\rangle$	**3.7** ± 1.9	**2.9** ± 1.4
	$\langle V\rangle$	13.0 ± 7.7	12.0 ± 7.1
	$\langle S\rangle$	**35.2** ± 14.3	**31.2** ± 13.5
Донор 6	$\langle\varepsilon\rangle$	**3.8** ± 1.9	**2.7** ± 1.3
	$\langle V\rangle$	13.9 ± 7.9	12.2 ± 7.0
	$\langle S\rangle$	**37.7** ± 15.4	**30.9** ± 12.7

сливается с плазматической мембраной. Таким образом, P-селектин появляется только на поверхности активированных тромбоцитов и является стандартной меткой для их обнаружения на проточных цитометрах [4,108,109]. Однако экспрессия поверхностных рецепторов не связана напрямую с изменением формы. Так, «слабые» активаторы, такие как АДФ и адреналин, могут вызывать изменение формы без высвобождения гранул, в то время как коллаген и тромбин всегда вызывают их выделение. Кроме того, с течением времени после активации форма тромбоцита может вернуться к исходной [106], а количество молекул P-селектина может уменьшиться [110].

Для точной идентификации активированных тромбоцитов с помощью флуоресцентных меток необходимо по измеренному сигналу оценивать количество рецепторов на поверхности клетки. Эта задача обычно решается с помощью калибровки канала флуоресценции с использованием полистирольных микросфер, содержащих известное количество молекул красителя, таких как BD QuantiBRITE™. Однако подход с использованием калибровки предполагает, что реакция присоединения антител к рецептору достигла равновесия, а антитела находятся в избытке. Недостаточное выполнение этих предположений, а также другие неточности приводят к тому, что определяемое количество рецепторов зависит от конкретного используемого красителя и прибора, а также набора микросфер для калибровки [111].

Другим подходом для оценки количества рецепторов на клетке является анализ временно́й эволюции функции распределения клеток по сигналу флуоресценции [112], который был применён для определения количества рецепторов CD16b на нейтрофилах человека [113] и CD8 на лимфоцитах человека [114]. В данном подходе измеряется интенсивность флуоресценции в зависимости от времени, прошедшего с момента добавления антител к суспензии клеток, в отличие от стандартных протоколов, которые предполагают измерение только в одной точке (20 минут). Однако непосредственное применение данного подхода к исследованию активации тромбоцитов затруднено малым количеством рецепторов, что приводит к низкой интенсивности сигнала флуоресценции. Поэтому обычно доля активированных тромбоцитов рассчитывается исходя из сравнения с контрольным образцом [108]: выбирается такое значение сигнала, чтобы доля тромбоцитов с большей флуоресценцией в контрольной пробе составляла 0.5%.

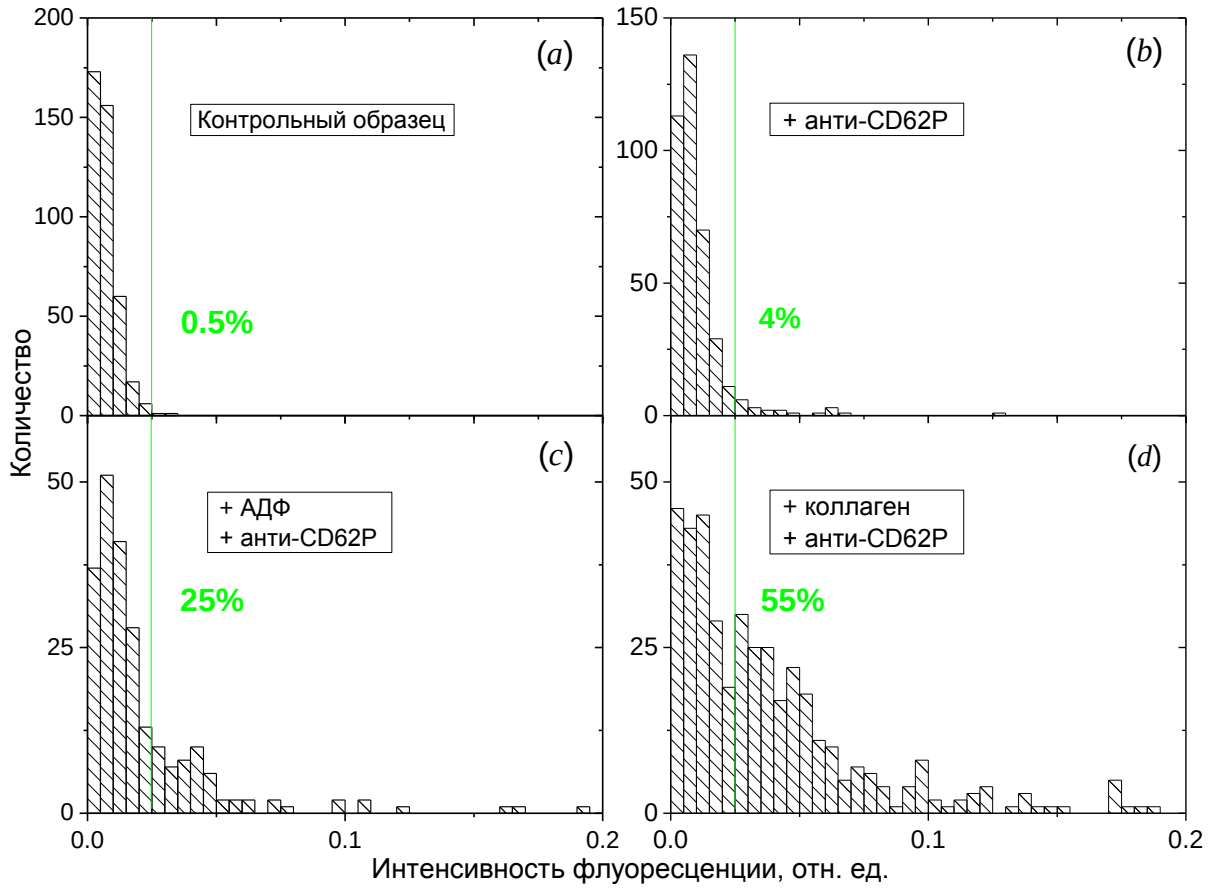

Рис. 39 Распределение тромбоцитов по интенсивности флуоресценции после добавления антител к CD62p, меченных ФИТЦ.

Результаты измерений флуоресценции на СПЦ показаны на Рис. 39. Контрольный образец (*a*) – нативные тромбоциты без добавления антител (для определения уровня шума в канале). Распределение нативных тромбоцитов по интенсивности флуоресценции после добавления антител показано на Рис. 39*b*. Видно небольшое количество (4%) клеток, для которых интенсивность превышает порог. Это не согласуется с распределением нативных тромбоцитов по форме на Рис. 37, где в область активированных клеток (левый пик) попадает существенная часть измеренных частиц. Такое расхождение, очевидно, связано с тем, что после активации *in vivo* тромбоциты теряют поверхностный P-селектин [110]. После добавления АДФ доля клеток с флуоресценцией, превышающей порог, растёт до 25% (Рис. 39*c*), хотя распределение по форме показывает, что активирована бóльшая часть клеток (Рис. 37). Это подтверждает известный факт, что стимуляция АДФ может приводить к изменению формы тромбоцита, не приводя к выделению гранул. Коллаген, напротив, вызывает выделение гранул, поэтому доля клеток с положительным сигналом флуоресценции после стимуляции коллагеном выше – 55% (Рис. 39*d*). Это уже находится в качественном согласии с результатами измерения формы тромбоцитов

непосредственно после активации. Однако после инкубации с антителами корреляции отношения полуосей и интенсивности флуоресценции не наблюдалось как для одиночных клеток, так и для всей популяции, что может быть связано с обратным изменением формы за время инкубации, которое составляло 20 минут (см. раздел 4.3.2).

4.4. Влияние антикоагулянтов на форму тромбоцитов

Для нескольких доноров были проведены эксперименты для изучения влияния различных антикоагулянтов на тромбоциты. В стандартной методике анализа тромбоцитов в качестве антикоагулянта используется цитрат натрия, так как он приводит к минимальным искажениям их формы и объёма. Так, известно, что ЭДТА в течение 40 минут приводит к сферизации тромбоцитов [115], которая сопровождается их «надуванием» [116,117].

Результаты воздействия ЭДТА на тромбоциты изучались для двух доноров (Таблица 5; показаны средние значения ± стандартное отклонение, в каждом случае было измерено не менее 10^3 клеток). На Рис. 40*a* показано распределение тромбоцитов по форме в ЭДТА и сравнение с контрольным образцом, взятым одновременно у того же донора (донор 3 на Рис. 37). Видно, что клетки действительно стали более близкими к шару, как при активации. Более того, распределение тромбоцитов по форме сдвинулось даже левее: так, количество клеток с отношением полуосей менее 1.5 в ЭДТА составило 22% и 24% для доноров 3 и 4, а после активации 40 мкмоль/л АДФ – только 7% и 8%, соответственно. Кроме того, в отличие от активации, при «надувании» в ЭДТА объём тромбоцитов увеличился на 11-15%. Исходя из результатов данного эксперимента, можно сделать вывод, что при активации форма клеток отличается от сферической за счёт влияния периферического кольца микротрубочек (раздел 1.2), на

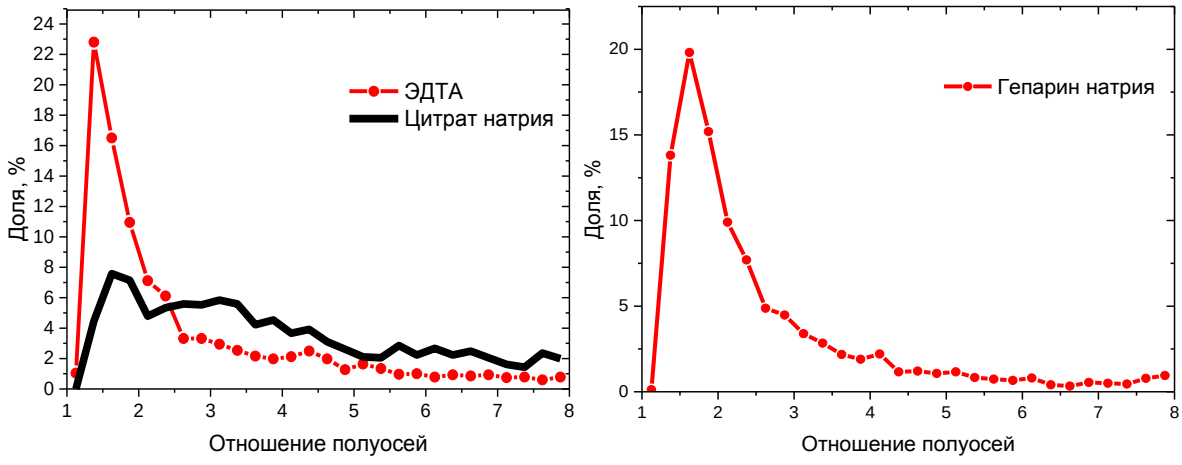

Рис. 40 Распределение тромбоцитов по форме в различных антикоагулянтах. Слева: ЭДТА и сравнение с контрольным образцом в цитрате натрия. Справа: гепарин натрия.

Таблица 5. Влияние антикоагулянтов на форму тромбоцитов.

		Цитрат натрия	**ЭДТА**	**Гепарин натрия**
Донор 3	<ε>	**3.8** ± 1.8	**2.7** ± 1.6	
	<*V*>	**9.3** ± 6.6	**10.3** ± 7.1	
Донор 4	<ε>	**3.8** ± 1.9	**2.8** ± 1.7	
	<*V*>	**8.8** ± 6.6	**10.1** ± 7.0	
Другой донор	<ε>			**2.6** ± 1.4
	<*V*>			8.4 ± 6.1

которое мембрана вынуждена «натягиваться». При увеличении объёма тромбоцита кольцо остаётся внутри клетки и перестаёт влиять на её форму, что и приводит к форме с минимальной площадью поверхности при заданном объёме – шару.

Также были проведены измерения тромбоцитов с использованием гепарина натрия в качестве антикоагулянта. Распределение тромбоцитов по форме смещено в область сферизованных клеток (Рис. 40*b*) так же, как при активации. Гепарин может связываться с рецепторами тромбоцитов и, хотя не вызывает активацию сам по себе, увеличивает чувствительность тромбоцитов к малым дозам АДФ. В силу того, что небольшая концентрация АДФ всегда присутствует в крови, наблюдаемая активация существенной доли тромбоцитов представляется возможной. К сожалению, для данного донора не было взято контрольного образца с цитратом натрия, что не позволяет судить об изменении объёма, но малое значение <*V*> указывает скорее на уменьшение, чем на увеличение (Таблица 5).

4.5. Агрегация тромбоцитов

При изучении агрегации тромбоцитов на СПЦ измерялись индикатрисы частиц в ходе процесса агрегации (раздел 4.1). При этом в зависимости от времени, прошедшего с момента запуска реакции, в пробе преобладали одиночные тромбоциты или их агрегаты. Важнейшей задачей, решение которой позволит пролить свет на фундаментальные свойства агрегации тромбоцитов, является измерение доли мономеров в ходе агрегации, что требует идентификации мономеров. В силу того, что морфология мономеров существенно отличается от морфологии агрегатов, можно было бы ожидать возможности идентификации мономеров по индикатрисам светорассеяния. Однако сигналы светорассеяния, измеренные в эксперименте в различные моменты времени после начала агрегации, имеют одинаковую структуру, а отличие в интенсивности не позволяет разделить их на два класса. Так, на Рис. 41a,b показаны типичные сигналы светорассеяния через 1 и 5 минут (показано по два сигнала для того, чтобы отразить разброс по интенсивности). Положения максимумов и минимумов совпадают, а максимальный сигнал в момент 1 мин больше, чем минимальный сигнал в момент 5 мин. Через 10 минут после начала агрегации появляются высокоинтенсивные сигналы, которые, очевидно, относятся к агрегатам (Рис. 41c), однако и у них положения максимумов и минимумов сохраняются.

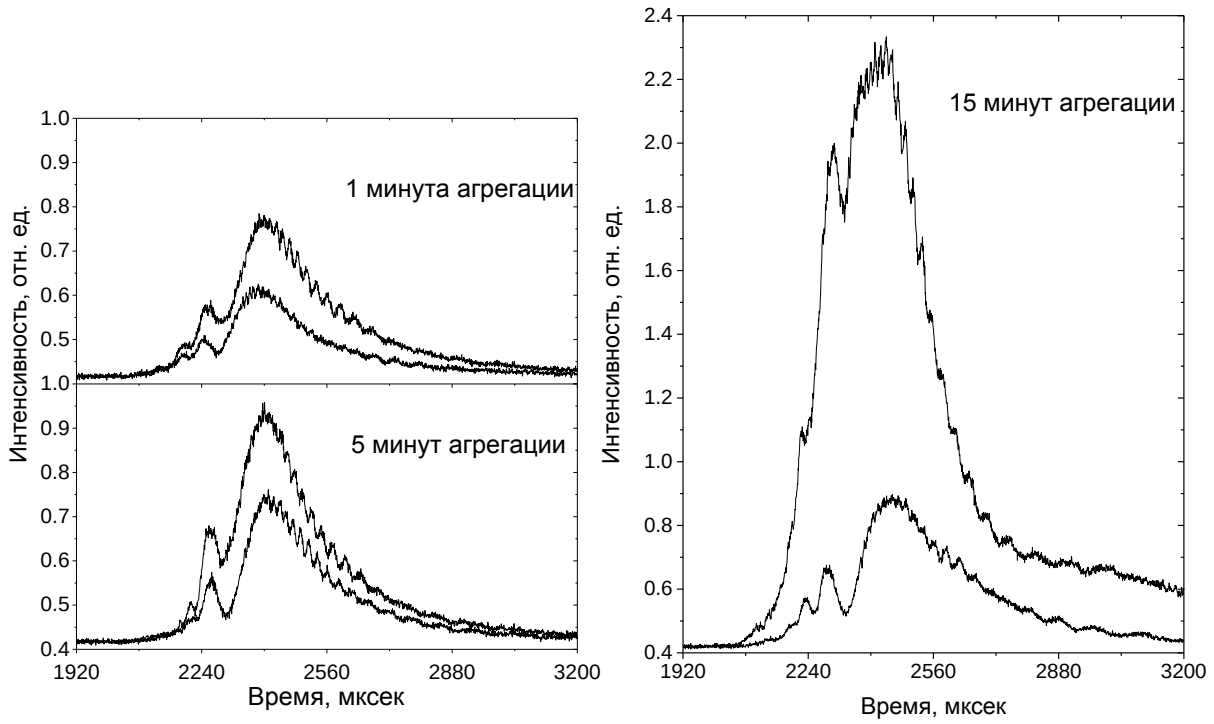

Рис. 41. Изменение сигналов светорассеяния в ходе агрегации тромбоцитов. На каждом графике показано два сигнала, чтобы отразить разброс по интенсивности. В среднем интенсивность растёт, а контрастность понижается.

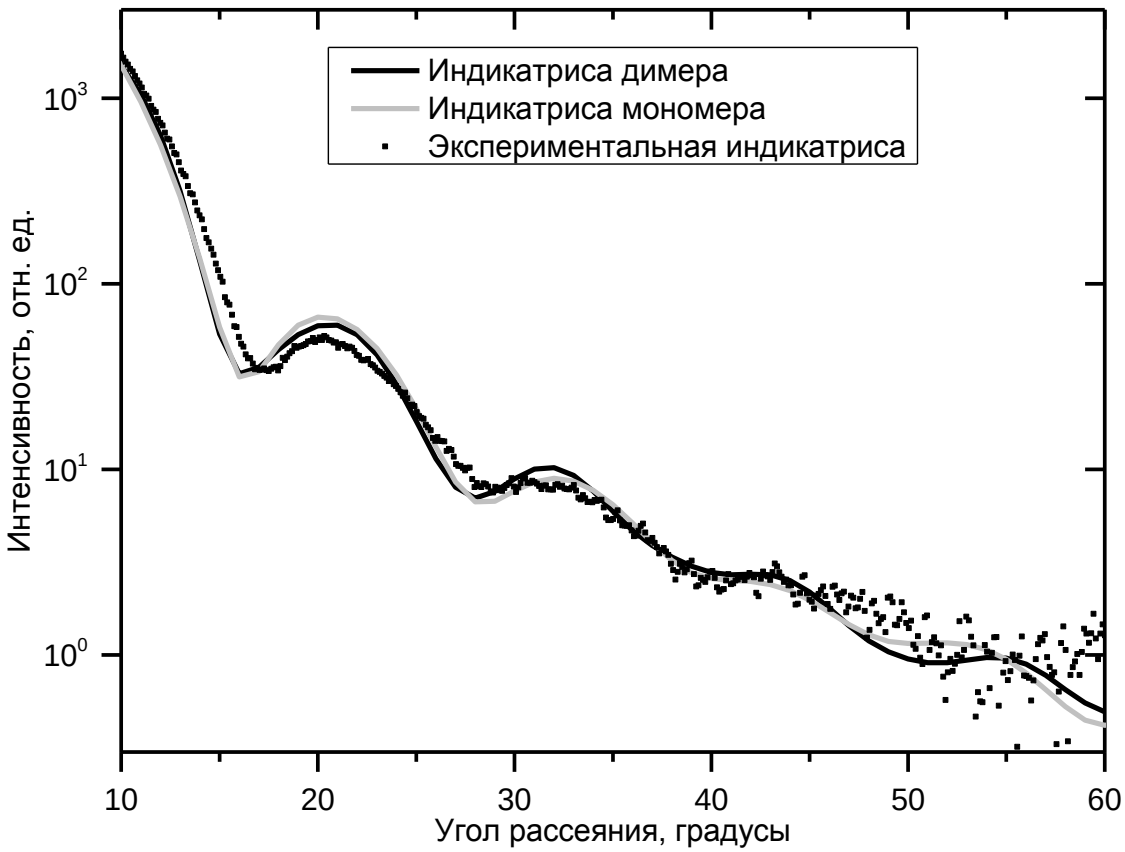

Рис. 42. Одна из экспериментальных индикатрис, измеренная в первые минуты после запуска агрегации, хорошо описывается индикатрисами мономера и димера, приведёнными на Рис. 24(*c*).

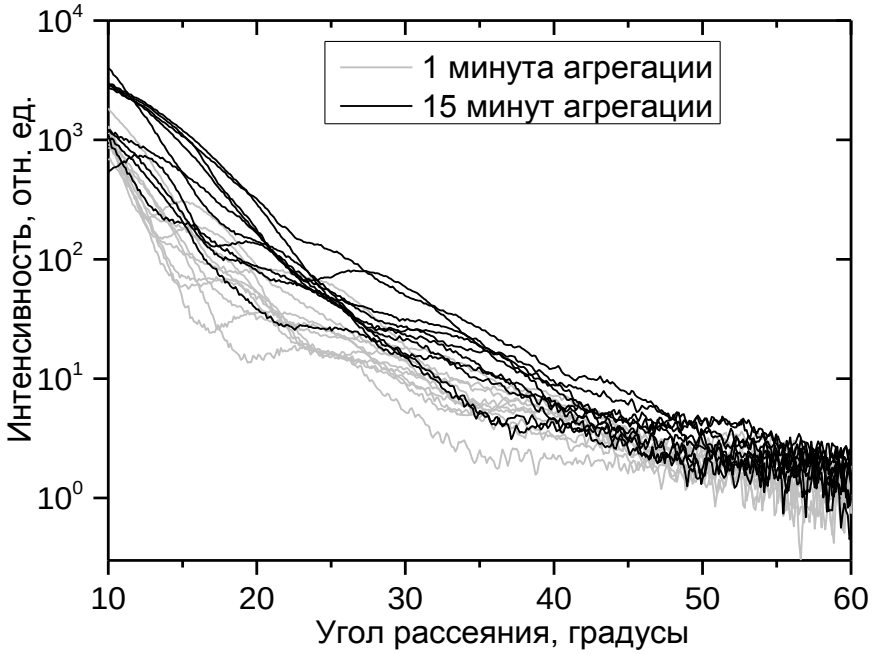

Рис. 43. Экспериментальные индикатрисы через 1 и 15 минут агрегации. В каждом случае показаны первые 10 индикатрис. Сравните с Рис. 23

Данный феномен является следствием эффекта аддитивности индикатрис светорассеяния мономеров, составляющих агрегат, рассмотренного в разделе 3.2.5. Моделирование светорассеяния агрегатами, проведённое в разделе 3.2.7, показало, что по сравнению с индикатрисами мономеров индикатрисы агрегатов более интенсивные, но менее контрастные. Для сравнения с результатами моделирования (Рис. 23) на Рис. 43 приведено по 10 индикатрис, измеренных через 1 и 15 минут после агрегации. Виден рост интенсивности и понижение контраста. Это можно использовать для отделения мономеров от больших агрегатов, однако разделение мономеров и димеров представляется невозможным. Более того, в силу высокой биологической вариабельности тромбоцитов для димера можно подобрать такой мономер, который будет иметь такую же индикатрису. На Рис. 42 показана одна из экспериментальных индикатрис, измеренная через 1 минуту после запуска агрегации, а также индикатрисы димера и мономера, которые одинаково хорошо её описывают (те же, что и на Рис. 24).

* * *

В данной главе приведены экспериментальные исследования, в которых используются инструментальные и теоретические подходы, развитые в настоящей диссертации. Показано, что использование априорной информации о показателе преломления тромбоцитов позволяет улучшить точность решения обратной задачи светорассеяния и приводит к разумным результатам. Результаты экспериментов находятся в хорошем согласии с известными данными. В частности, распределение тромбоцитов по форме в результате стимуляции активаторами сдвигается в область сферических клеток, а под воздействием ЭДТА также увеличивается объём тромбоцитов. Предложенный метод количественно совпадает с методом Култера, а также качественно согласуется с методом детекции активированных тромбоцитов на основе флуоресцентных меток. Кинетика формы тромбоцитов в процессе активации была измерена впервые.

Помимо верификации разработанных подходов, проведённые исследования позволяют сделать несколько биологических выводов. В частности, показана гетерогенность популяции тромбоцитов по отношению полуосей. Это говорит о том, что тромбоцит переходит из покоящейся формы в активированную ступенчато, не задерживаясь в промежуточном состоянии. Кроме того, показано, что реальная форма тромбоцитов отличается от сфероидальной, что заметно при использовании лазера с длиной волны 405 нм, но не влияет на индикатрису на длине волны 660 нм. Таким

образом, с использованием коротковолнового лазера можно изучать реальную форму тромбоцитов, что позволит детально исследовать динамику цитоскелета данных клеток. Также показано, что динамика формы тромбоцитов коррелирует с динамикой внутриклеточной концентрации ионов кальция. Выяснение механизмов данной взаимосвязи представляется важной биофизической задачей. Эта задача может быть решена экспериментально с использованием СПЦ и флуоресцентных зондов, позволяющих измерить концентрацию ионов кальция внутри тромбоцита.

Экспериментальные данные для агрегатов тромбоцитов полностью подтверждают результаты численного моделирования (раздел 3.2.4). Показано, что существуют экспериментальные индикатрисы, одинаково хорошо совпадающие с как с индикатрисой мономера, так и с индикатрисой димера. Таким образом, для идентификации мономеров тромбоцитов в присутствии их димеров измерение индикатрисы светорассеяния в диапазоне углов 10º–70º недостаточно. Для решения данной задачи необходимо дальнейшее развитие СПЦ для измерения дополнительной информации.

Заключение

В диссертационной работе разработан метод характеризации тромбоцитов крови человека с использованием сканирующего проточного цитометра. Данный метод позволяет выявлять активацию тромбоцитов на основе измерения их формы. Кроме того, было проведено моделирование индикатрис светорассеяния агрегатами тромбоцитов, что позволило выявить особенности рассеяния света агрегатами, а также предложить возможные подходы для инструментального решения задачи идентификации димеров тромбоцитов. Можно выделить следующие основные результаты работы:

1. Разработан метод характеризации тромбоцитов крови человека по индикатрисе светорассеяния с помощью базы данных предварительно насчитанных модельных индикатрис, включая оценку погрешностей решения обратной задачи светорассеяния. Наряду с распределением клеток по объёму, метод позволяет получить распределение по форме, что является новой информацией с потенциально высокой диагностической значимостью. Данный метод включает в себя процедуры и подходы, применимые для баз данных любой структуры, что позволяет использовать его в смежных областях науки.
2. Показано, что популяяция тромбоцитов является гетерогенной по отношению полуосей. В результате стимуляции тромбоцитов аденозиндифосфатом и коллагеном, которые приводят к их активации, распределение по форме меняется за счёт роста доли клеток с более сферической формой. Так, среднее отношение полуосей клеток в нативной пробе составило 3.7–3.9, а после стимуляции 40 мкМ АДФ – 2.2–2.9 (приведён разброс для шести доноров). Это согласуется с широко известным явлением изменения формы тромбоцитов при активации. Кроме того, предложенный метод позволяет обнаружить изменение объёма и формы тромбоцитов под воздействием этилендиаминтетрауксусной кислоты.
3. Показано, что динамика формы тромбоцитов в процессе активации коррелирует с динамикой внутриклеточной концентрации кальция. Реальная форма клеток отличается от сплюснутого сфероида, и её можно изучать с использованием коротковолнового лазера.
4. В результате моделирования светорассеяния агрегатами тромбоцитов показано, что в большинстве случаев рассеяние можно считать однократным. Данный вывод применим не только к тромбоцитам, но и ко многим другим биологическим клеткам и частицам с небольшим контрастом показателя преломления. Также

аналитически показано, что интегрирование по азимутальному углу рассеяния зануляет интерференционную структуру, что приводит к аддитивности индикатрис частиц, составляющих агрегат. Показано, что задача идентификации димеров тромбоцитов не может быть решена с использованием стандартной индикатрисы светорассеяния, измеряемой на СПЦ, в силу аддитивности индикатрис и высокой биологической вариабельности тромбоцитов. Предложено несколько подходов для решения данной задачи путём измерения дополнительной информации.

Основные результаты работы докладывались на:

1. 48-й и 50-й Международных научных студенческих конференциях «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 10-14 апреля 2010 г., 13-19 апреля 2012 г.);
2. XXVII, XXVIII, XXIX и XXX конгрессах Международного общества развития цитометрии (Лейпциг, Германия, 23-27 июня 2012 г.; Сан-Диего, США, 19-22 мая 2013 г.; Форт Лодердейл, США, 17-21 мая 2014 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. XIV и XV Международных конференциях «Electromagnetic and Light Scattering» (Лилль, Франция, 17-21 июня 2013 г.; 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. Международном семинаре «Workshop "Scattering by Aggregates (on Surfaces)"», Бремен, Германия, 24-25 марта 2014 г;
7. Научных семинарах в институте Химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, институте Биофизики СО РАН и Ягеллонском университете г. Кракова в Польше.

Опубликованы в следующих статьях:

1. A.E. Moskalensky, M.A. Yurkin, A.I. Konokhova, D.I. Strokotov, V.M. Nekrasov, A.V. Chernyshev, G.A. Tsvetovskaya, E.D. Chikova, V.P. Maltsev, “Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering,” Journal of Biomedical Optics 18(1), 17001 (2013), doi: 10.1117/1.JBO.18.1.017001

2. A.E. Moskalensky, D.I. Strokotov, A.V. Chernyshev, V.P. Maltsev, M.A. Yurkin, “Additivity of light-scattering patterns of aggregated biological particles,” Journal of Biomedical Optics 08/2014; 19(8):85004, doi: 10.1117/1.JBO.19.8.085004
3. A.E. Moskalensky, A.V. Chernyshev, M.A. Yurkin, V.M. Nekrasov, A.A. Polshchitsin, D.R. Parks, W.A. Moore, A. Filatenkov, V.P. Maltsev, D.Yu. Orlova, “Dynamic quantification of antigen molecules with flow cytometry,” J. Immunol. Methods (2015), doi: 10.1016/j.jim.2015.02.001.
4. D.I. Strokotov, A.E. Moskalensky, V.M. Nekrasov, and V.P. Maltsev, “Polarized light-scattering profile - advanced characterization of nonspherical particles with scanning flow cytometry,” Cytometry A 79A, 570–579 (2011), doi: 10.1002/cyto.a.21074

И опубликованы в следующих тезисах конференций:

1. Moskalensky A.E., Frolov L.B., Yurkin M.A., and Maltsev V.P. Identification of blood platelets aggregates with angle-resolved light scattering in backward hemisphere, *Electromagnetic and Light Scattering XV*, 21–26 June 2015, Leipzig, Germany, paper 53.
2. Litvinenko A.L., Moskalensky A.E., Nekrasov V.M., Strokotov D.I., and Maltsev V.P. Real-Time Measurement of Platelet Shape Distribution with the Scanning Flow Cytometry, *CYTO 2015 – 30th Congress of ISAC*, 26–30 June 2015, Glasgow, UK, p. 185.
3. Moskalensky A.E., Frolov L.B., Yurkin M.A., and Maltsev V.P. Measurement of light scattering in backward hemisphere: a new way for the study of platelet aggregation with scanning flow cytometry, *CYTO 2015 – 30th Congress of ISAC*, 26–30 June 2015, Glasgow, UK, p. 104.
4. Moskalensky A.E., Yurkin M.A., and Maltsev V.P. Aggregates of biological cells: surprising features in light scattering, *Workshop "Scattering by Aggregates (on Surfaces)"*, 24–25 March 2014, Bremen, Germany, pp. 58–61
5. Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Strokotov D.I., and Maltsev V.P. A shape-based study of platelet activation with the scanning flow cytometry, *ISAC XXIX International Congress*, 17–21 May 2014, Ft. Lauderdale, USA, p. 157.
6. Moskalensky A.E., Strokotov D.I., Yurkin M.A., and Maltsev V.P. Characterization of blood platelets solving the inverse light-scattering problem with pre-computed interpolating set, *International conference “Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology” (MM-HPC-BBB-2014)*, 24–27 June 2014, Novosibirsk, Russia, p. 58.
7. A. E. Moskalensky, D. I. Strokotov, V. M. Nekrasov, M.A. Yurkin, A.V. Chernyshev, and V. P. Maltsev. Simultaneous determination of size and shape of human blood

platelets using light-scattering flow cytometry. *ISAC XXVII International Congress*, 23–27 June 2012, Leipzig, Germany, p. 177.

8. Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Konokhova A.I., Strokotov D.I., Nekrasov V.M., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. A label-free shape-based detection of activated platelets with scanning flow cytometry. ISAC XXVIII International Congress, 19–22 may 2013, San Diego, USA, p.127
9. Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Konokhova A.I., Strokotov D.I., and Maltsev V.P. Application of the scanning flow cytometry for characterization of blood platelets, Electromagnetic and Light Scattering XIV, 17-21 June 2013, Lille, France, Paper 50. http://www-loa.univ-lille1.fr/ELS-XIV/documents/abstracts/ELSXIV_abs50.pdf
10. Юркин М.А., Гилев К.В., Строкотов Д.И., Москаленский А.Е., Конохова А.И. и В. П. Мальцев. «Решение обратной задачи светорассеяния для определения морфологических характеристик биологических частиц с помощью сканирующего проточного цитометра. *Тезисы докладов международной конференции «Обратные и некорректные задачи математической физики»,* 5–12 августа 2012г., Новосибирск, с.257.
11. Москаленский А.Е., Конохова А.И., Юркин М.А., Некрасов В.М., Чернышев А.В. и Мальцев В.П. Определение характеристик тромбоцитов крови человека в модели сплюснутого сфероида по индикатрисам светорассеяния, измеренным с помощью сканирующего проточного цитометра. *Тезисы докладов IV Международной молодежной школы-конференции «Теория и численные методы решения обратных и некорректных задач»,* 5–15 августа 2012г., Новосибирск, с.86.
12. Москаленский А.Е. Измерение объема и формы тромбоцитов крови человека с помощью сканирующего проточного цитометра. *Материалы 50й юбилейной международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: физические методы в естественных науках,* 13-19 апреля 2012 г., Новосибирск, с. 19
13. Москаленский А.Е. Исследование агрегации частиц с помощью светорассеяния. *Материалы 48й международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: физика,* 10-14 апреля 2010 г., Новосибирск, с. 19

Список литературы

1. Сердечно-сосудистые заболевания. Информационный бюллетень N°317. ВОЗ, 2015.
2. Paulus J. Platelet size in man // Blood. 1975. Vol. 46, № 5. P. 321–336.
3. Born G.V.R. Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal // Nature. 1962. Vol. 194, № 4832. P. 927–929.
4. Shattil S.J., Cunningham M., Hoxie J.A. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry // Blood. 1987. Vol. 70, № 1. P. 307–315.
5. Maltsev V.P. Scanning flow cytometry for individual particle analysis // Review of Scientific Instruments. 2000. Vol. 71, № 1. P. 243–255.
6. Strokotov D.I. et al. Polarized light-scattering profile - advanced characterization of nonspherical particles with scanning flow cytometry // Cytometry A. 2011. Vol. 79A, № 7. P. 570–579.
7. Maltsev V.P., Lopatin V.N. Parametric solution of the inverse light-scattering problem for individual spherical particles // Appl. Opt. 1997. Vol. 36, № 24. P. 6102–6108.
8. Strokotov D.I. et al. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? // J Biomed Opt. 2009. Vol. 14, № 6. P. 064036.
9. Konokhova A.I. et al. High-precision characterization of individual E. coli cell morphology by scanning flow cytometry // Cytometry A. 2013. Vol. 83, № 6. P. 568–575.
10. 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.
11. Колесникова И.В. et al. Определение динамических характеристик тромбоцитов по начальной стадии их агрегации // Вестник НГУ, сер. Физика. 4. № 2. P. 2009.
12. Gear A.R.L., Polanowska-Grabowska R.K. The platelet shape change // Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders / ed. Gresele P. et al. Cambridge University Press, 2002. P. 319–337.
13. David-Ferreira J.F. The blood platelet: electron microscopic studies // Int. Rev. Cytol. 1964. Vol. 17. P. 99–148.
14. Frojmovic M.M., Milton J.G. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease // Physiol. Rev. 1982. Vol. 62, № 1. P. 185–261.
15. Frojmovic M.M., Panjwani R. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. // Biophys J. 1976. Vol. 16, № 9. P. 1071–1089.
16. Mathur A., Martin J.F. Platelet heterogeneity: physiology and pathological consequences // Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders / ed. Gresele P. et al. Cambridge University Press, 2002. P. 70–79.
17. Eastham R.D. Rapid whole-blood platelet counting using an electronic particle counter // J Clin Pathol. 1963. № 16. P. 168–169.
18. Grover N.B. et al. Electrical Sizing of Particles in Suspensions // Biophys J. 1969. Vol. 9, № 11. P. 1398–1414.
19. Kim K.Y., Kim K.E., Kim K.H. Mean platelet volume in the normal state and in various clinical disorders // Yonsei Med. J. 1986. Vol. 27, № 3. P. 219–226.
20. Dachary-Prigent J. et al. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups // Blood. 1993. Vol. 81, № 10. P. 2554–2565.
21. Pearson L. et al. A rapid flow cytometric technique for the detection of platelet-monocyte complexes, activated platelets and platelet-derived microparticles // International journal of laboratory hematology. 2009. Vol. 31, № 4. P. 430–439.

22. Baker L.C. et al. Flow cytometric assays to detect platelet activation and aggregation in device-implanted calves // Journal of Biomedical Material Research. 1998. № 41(2). P. 312–321.
23. Maurer-Spurej E., Chipperfield K. Past and Future Approaches to Assess the Quality of Platelets for Transfusion // Transfusion Medicine Reviews. 2007. Vol. 21, № 4. P. 295–306.
24. Allen R.D. et al. Transformation and motility of human platelets: details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy. // The Journal of cell biology. 1979. Vol. 83, № 1. P. 126–142.
25. Kolesnikova I.V. et al. Determination of volume, shape and refractive index of individual blood platelets // J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer. 2006. Vol. 102, № 1. P. 37–45.
26. Milton J.G., Frojmovic M.M. Turbidometric evaluations of platelet activation: relative contributions of measured shape change, volume, and early aggregation // J Pharmacol Methods. 1983. Vol. 9, № 2. P. 101–115.
27. Born G.V. et al. Quantification of the morphological reaction of platelets to aggregating agents and of its reversal by aggregation inhibitors // J. Physiol. (Lond.). 1978. Vol. 280. P. 193–212.
28. Allen R.D. et al. Transformation and motility of human platelets: details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy. // The Journal of cell biology. 1979. Vol. 83, № 1. P. 126–142.
29. Mustard J.F., Kinlough-Rathbone R.L., Packham M.A. History of platelets // Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders. Cambridge University Press, 2002.
30. Born G.V.R. Observations on the Change in Shape of Blood Platelets Brought About by Adenosine Diphosphate // J Physiol. 1970. Vol. 209, № 2. P. 487–511.
31. Barnhart M.I., Walsh R.T., Robinson J.A. A three-dimensional view of platelet responses to chemical stimuli* // Annals of the New York Academy of Sciences. 1972. Vol. 201, № 1. P. 360–390.
32. Zucker M.B., Borrelli J. Reversible Alterations in Platelet Morphology Produced by Anticoagulants and by Cold // Blood. 1954. Vol. 9, № 6. P. 602–608.
33. 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.
34. Rosado J.A., Sage S.O. Platelet signalling: calcium // Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders. Cambridge University Press, 2002.
35. Varga-Szabo D., Braun A., Nieswandt B. Calcium signaling in platelets // J. Thromb. Haemost. 2009. Vol. 7, № 7. P. 1057–1066.
36. Purvis J.E. et al. A molecular signaling model of platelet phosphoinositide and calcium regulation during homeostasis and P2Y1 activation // Blood. 2008. Vol. 112, № 10. P. 4069–4079.
37. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments // J Cell Biol. 1991. Vol. 112, № 3. P. 407–425.
38. White J.G., Rao G.H. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape // Am. J. Pathol. 1998. Vol. 152, № 2. P. 597–609.
39. Kiuru S. et al. Altered platelet shape change in hereditary gelsolin Asp187Asn-related amyloidosis // Thromb. Haemost. 2000. Vol. 83, № 3. P. 491–495.
40. Casella J.F., Flanagan M.D., Lin S. Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change // Nature. 1981. Vol. 293, № 5830. P. 302–305.

41. Winokur R., Hartwig J.H. Mechanism of shape change in chilled human platelets // Blood. 1995. Vol. 85, № 7. P. 1796–1804.
42. Daniel J.L. et al. Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259, № 15. P. 9826–9831.
43. Fox J.E. The platelet cytoskeleton // Thromb. Haemost. 1993. Vol. 70, № 6. P. 884–893.
44. Diagouraga B. et al. Motor-driven marginal band coiling promotes cell shape change during platelet activation // J Cell Biol. 2014. Vol. 204, № 2. P. 177–185.
45. Italiano J.E. et al. Mechanisms and implications of platelet discoid shape // Blood. 2003. Vol. 101, № 12. P. 4789–4796.
46. White J.G., de Alarcon P.A. Platelet spherocytosis: a new bleeding disorder // Am. J. Hematol. 2002. Vol. 70, № 2. P. 158–166.
47. Thon J.N. et al. Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production // Nat Commun. 2012. Vol. 3. P. 852.
48. Patel-Hett S. et al. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules // Blood. 2008. Vol. 111, № 9. P. 4605–4616.
49. Steiner M., Ikeda Y. Quantitative assessment of polymerized and depolymerized platelet microtubules // J Clin Invest. 1979. Vol. 63, № 3. P. 443–448.
50. White J.G., Krivit W. An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling // Blood. 1967. Vol. 30, № 5. P. 625–635.
51. White J.G. Fine Structural Alterations Induced in Platelets by Adenosine Diphosphate // Blood. 1968. Vol. 31, № 5. P. 604–622.
52. Karr T.L., Kristofferson D., Purich D.L. Calcium ion induces endwise depolymerization of bovine brain microtubules // J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255, № 24. P. 11853–11856.
53. O'Brien E.T., Salmon E.D., Erickson H.P. How calcium causes microtubule depolymerization // Cell Motil. Cytoskeleton. 1997. Vol. 36, № 2. P. 125–135.
54. White J.G., Rao G.H. Influence of a microtubule stabilizing agent on platelet structural physiology // Am. J. Pathol. 1983. Vol. 112, № 2. P. 207–217.
55. Macey M.G. et al. Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 haematology system // Cytometry. 1999. Vol. 38, № 5. P. 250–255.
56. Ahnadi C.E. et al. Assessment of platelet activation in several different anticoagulants by the Advia® 120 Hematology System, fluorescence flow cytometry, and electron microscopy // Thrombosis and Haemostasis. 2003.
57. Van de Hulst H.C. Light Scattering by Small Particles. New York: Dover, 1981. 479 p.
58. Streekstra G.J. et al. Light scattering by red blood cells in ektacytometry: Fraunhofer versus anomalous diffraction // Appl. Opt. 1993. Vol. 32, № 13. P. 2266–2272.
59. Streekstra G.J., Hoekstra A.G., Heethaar R.M. Anomalous diffraction by arbitrarily oriented ellipsoids: applications in ektacytometry // Applied optics. 1994. Vol. 33, № 31. P. 7288–7296.
60. Mishchenko M.I., Travis L.D., Mackowski D.W. T-matrix computations of light scattering by nonspherical particles: A review // J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer. 1996. Vol. 55, № 5. P. 535–575.
61. Doicu A., Wriedt T., Eremin Y.A. Light scattering by systems of particles: null-field method with discrete sources : theory and programs. Berlin: Springer, 2006. 333 p.
62. Hellmers J., Schmidt V., Wriedt T. Improving the numerical stability of T-matrix light scattering calculations for extreme particle shapes using the nullfield method with discrete sources // J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer. 2011. Vol. 112, № 11. P. 1679–1686.
63. Yurkin M.A., Hoekstra A.G. The discrete dipole approximation: an overview and recent developments // J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer. 2007. Vol. 106, № 1-3. P. 558–589.

64. 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.
65. Fulwyler M.J. Electronic separation of biological cells by volume // Science. 1965. Vol. 150, № 3698. P. 910–911.
66. Kaye P.H. Spatial light-scattering analysis as a means of characterizing and classifying non-spherical particles // Meas. Sci. Technol. 1998. Vol. 9, № 2. P. 141.
67. Semyanov K.A. et al. Single-particle sizing from light scattering by spectral decomposition // Appl. Opt. 2004. Vol. 43, № 26. P. 5110–5115.
68. Dyatlov G.V. et al. An optimization method with precomputed starting points for solving the inverse Mie problem // Inverse Problems. 2012. Vol. 28, № 4. P. 045012.
69. Gilev K.V. et al. An optimization method for solving the inverse Mie problem based on adaptive algorithm for construction of interpolating database // Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. 2013. Vol. 131. P. 202–214.
70. Москаленский А.Е. Использование светорассеяния для анализа агрегатов частиц. Диплом на соискание степени бакалавра физики. Новосибирск: Новосибирский Государственный Университет, 2010.
71. Юркин М.А. Моделирование светорассеяния клетками крови с помощью метода дискретных диполей. Диссертация на соискание степени кандидата физ.-мат. наук. 2008.
72. Köylü Ü.Ö. et al. Fractal and projected structure properties of soot aggregates // Combustion and Flame. 1995. Vol. 100, № 4. P. 621–633.
73. Lodish H. et al. Molecular Cell Biology. 5th ed. WHFreeman, 2004.
74. Mishchenko M.I., Mackowski D.W., Travis L.D. Scattering of light by bispheres with touching and separated components // Appl. Opt. 1995. Vol. 34, № 21. P. 4589–4599.
75. 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.
76. Xu Y. Scattering Mueller matrix of an ensemble of variously shaped small particles // J. Opt. Soc. Am. A. 2003. Vol. 20, № 11. P. 2093–2105.
77. Doicu A., Wreidt T., Eremin Y. Light Scattering by Systems of Particles - Null-Field Method with Discrete Sources: Theory and Programs. Springer, 2006. 324 p.
78. Yurkin M.A., Hoekstra A.G. The discrete dipole approximation: An overview and recent developments // Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. 2007. Vol. 106, № 1–3. P. 558–589.
79. Taflove A., Hagness S.C. Computational electrodynamics: the finite-difference time-domain method. Boston: Artech House, 2005.
80. Mackowski D.W. Analysis of Radiative Scattering for Multiple Sphere Configurations // Proc. R. Soc. Lond. A. 1991. Vol. 433, № 1889. P. 599–614.
81. Xu Y. Electromagnetic scattering by an aggregate of spheres // Appl. Opt. 1995. Vol. 34, № 21. P. 4573–4588.
82. Lin M.Y. et al. Universality in colloid aggregation // Nature. 1989. Vol. 339, № 6223. P. 360–362.
83. Wang G., Sorensen C.M. Experimental test of the Rayleigh-Debye-Gans theory for light scattering by fractal aggregates // Appl Opt. 2002. Vol. 41, № 22. P. 4645–4651.
84. Sorensen C.M. Light Scattering by Fractal Aggregates: A Review // Aerosol Science and Technology. 2001. Vol. 35, № 2. P. 648–687.
85. Mishchenko M.I., Travis L.D., Lacis A.A. Scattering, absorption, and emission of light by small particles. Cambridge; New York: Cambridge University Press, 2002.
86. 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. 1355–1365.

87. 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. 2010. Vol. 18, № 6. P. 5681–5690.
88. Bi L., Yang P. Modeling of light scattering by biconcave and deformed red blood cells with the invariant imbedding T-matrix method // J Biomed Opt. 2013. Vol. 18, № 5. P. 55001.
89. Yurkin M.A. Symmetry relations for the Mueller scattering matrix integrated over the azimuthal angle // Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. 2013. Vol. 131. P. 82–87.
90. Bohren C.F., Huffman D.R. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. New York: Wiley, 1983. 544 p.
91. Strokotov D.I. et al. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? // J. Biomed. Opt. 2009. Vol. 14, № 6. P. 064036.
92. Mercer W.B. Calibration of Coulter Counters for Particles ~1 μ in Diameter // Review of Scientific Instruments. 1966. № 11. P. 1515–1520.
93. Keij J.F. et al. Coincidence in high-speed flow cytometry: Models and measurements // Cytometry. 1991. Vol. 12, № 5. P. 398–404.
94. Мальцев В.П. Сканирующая проточная цитометрия. Диссертация на соискание степени доктора физ.-мат. наук. 2000.
95. 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.
96. Shepelevich N.V. et al. Extrema in the light-scattering indicatrix of a homogeneous sphere // J. Opt. A. 1999. Vol. 1, № 4. P. 448–453.
97. Wiscombe W.J. Improved Mie scattering algorithms // Appl. Opt. 1980. Vol. 19, № 9. P. 1505–1509.
98. Konokhova A.I. et al. Light-scattering flow cytometry for identification and characterization of blood microparticles // Journal of Biomedical Optics. 2012. Vol. 17, № 5. P. 057006.
99. Sharma S.K., Somerford D.J. Light scattering by optically soft particles: theory and applications. Berlin: Springer–Verlag, 2006. 195 p.
100. Mackowski D.W., Mishchenko M.I. A multiple sphere T-matrix Fortran code for use on parallel computer clusters // Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. 2011. Vol. 112, № 13. P. 2182–2192.
101. Karpatkin S., Charmatz A. Heterogeneity of human Platelets // J Clin Invest. 1969. Vol. 48, № 6. P. 1073–1082.
102. LiteBil [Electronic resource]. 2010. URL: http://albin.abo.fi/~jkniivil/litebil (accessed: 30.03.2010).
103. Dyatlov G.V. et al. The scanning flow cytometer modified for measurement of two-dimensional light-scattering pattern of individual particles // Meas. Sci. Technol. 2008. Vol. 19, № 1. P. 015408.
104. 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.
105. Ruf A., Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression // Semin. Thromb. Hemost. 1995. Vol. 21, № 2. P. 146–151.
106. Lippi G. et al. Sample collection and platelet function testing: influence of vacuum or aspiration principle on PFA-100 test results // Blood Coagul. Fibrinolysis. 2013. Vol. 24, № 6. P. 666–669.
107. Roberts D.E., McNicol A., Bose R. Mechanism of Collagen Activation in Human Platelets // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, № 19. P. 19421–19430.

108. Curvers J. et al. Flow cytometric measurement of CD62P (P-selectin) expression on platelets: a multicenter optimization and standardization effort // Transfusion. 2008. Vol. 48, № 7. P. 1439–1446.
109. Leytin V. et al. Flow Cytometric Parameters for Characterizing Platelet Activation by Measuring P-Selectin (CD62) Expression: Theoretical Consideration and Evaluation in Thrombin-Treated Platelet Populations // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000. Vol. 269, № 1. P. 85–90.
110. Michelson A.D. et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. // Proc Natl Acad Sci U S A. 1996. Vol. 93, № 21. P. 11877–11882.
111. Serke S., van Lessen A., Huhn D. Quantitative fluorescence flow cytometry: a comparison of the three techniques for direct and indirect immunofluorescence // Cytometry. 1998. Vol. 33, № 2. P. 179–187.
112. Surovtsev I.V. et al. Mathematical modeling the kinetics of cell distribution in the process of ligand-receptor binding // J. Theor. Biol. 2000. Vol. 206, № 3. P. 407–417.
113. Orlova D.Y. et al. Distribution function approach to the study of the kinetics of IgM antibody binding to FcγRIIIb (CD16b) receptors on neutrophils by flow cytometry // J. Theor. Biol. 2011. Vol. 290. P. 1–6.
114. Moskalensky A.E. et al. Dynamic quantification of antigen molecules with flow cytometry // J. Immunol. Methods. 2015.
115. White J.G. Effects of ethylenediamine tetracetic acid (EDTA) on platelet structure // Scand J Haematol. 1968. Vol. 5, № 4. P. 241–254.
116. Gear A.R. Preaggregation reactions of platelets // Blood. 1981. Vol. 58, № 3. P. 477–490.
117. Dastjerdi M.S. et al. Mean platelet volume measurement, EDTA or citrate? // Hematology. 2006. Vol. 11, № 5. P. 317–319.