На правах рукописи

Конохова Анастасия Игоревна

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

03.01.02 – Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН), г. Новосибирск

Научный руководитель:	**Мальцев Валерий Павлович** доктор физико-математических наук, профессор
Официальные оппоненты:	**Боровой Анатолий Георгиевич,** доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт оптики атмосферы им. В.Е. Зуева Сибирского отделения Российской академии наук (ИОА СО РАН), г. Томск, главный научный сотрудник, исполняющий обязанности заведующего группой теории рассеяния оптических волн. **Зырянов Виктор Яковлевич,** доктор физико-математических наук, профессор, Институт физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения Российской академии наук (ИФ СО РАН) – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН), г. Красноярск, заведующий лабораторией молекулярной спектроскопии
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» (НИИМББ), г. Новосибирск

Защита состоится «19» декабря 2017 года в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.075.04 на базе ФИЦ КНЦ СО РАН по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН и на сайте http://www.ibp.ru.

Автореферат разослан « » октября 2017 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Е.Н. Есимбекова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Среды, содержащие разнородные популяции клеток и частиц биологического происхождения, широко распространены в природе. К ним относятся биологические жидкости человека (кровь, плазма, лимфа), природные среды, содержащие разнородные клеточные популяции, различные суспензии (культуры бактерий) и эмульсии (взвесь жировых частиц в молоке). Актуальность разработки методов характеризации подобных биологических полидисперсных системы определяется широким спектром связанных с ними научных фундаментальных и прикладных задач в медицине, биотехнологии, биофизике и других смежных областях науки.

В основе анализа многих биологических дисперсных систем зачастую лежит необходимость детальной характеризации морфологии имеющихся в них объектов с целью их классификации (идентификация отдельных субпопуляций клеток и частиц, детекция примесей), изучения динамики изменений их характеристик (количественные биофизические исследования) и анализа отклонений характеристик от нормы (клиническая диагностика). Существует множество методов исследования дисперсных систем, среди которых особое место занимают оптические неинвазивные методы, включая методы, основанные на измерении светорассеяния, распределение интенсивности которого несет в себе большой объем информации о рассеивающем объекте. Данные методы могут быть разделены на два класса: методы, анализирующие свойства системы в результате измерений, проводимых на ансамбле частиц, и методы, основанные на анализе одиночных частиц; и только последние применимы для характеризации сложносоставных сред, содержащих разнородные популяции клеток и частиц. При этом, для получения статистически достоверных результатов анализа зачастую требуется проведение измерений с большим накоплением данных ввиду большого разнообразия характеристик биологических объектов даже в пределах отдельного класса, а также при наличии редких субпопуляций, составляющих лишь небольшую долю от всех частиц рассматриваемой среды.

В настоящее время решение данной задачи в основном достигается за счет использования автоматических анализаторов одиночных частиц, в основе работы которых лежит принцип проточной цитометрии. Но лишь единичные технологии из существующих совмещают в себе все необходимые качества, включая высокую скорость, точность и информативность анализа. В частности, проточные цитометры стандартной конфигурации, хоть и обладают высокой скоростью анализа, но, как правило, позволяют решать только задачи идентификации и классификации отдельных субпопуляций на основании результатов флуоресцентного анализа, и практически не используют потенциал светорассеяния, поскольку стандартно измеряемые ими сигналы рассеяния в двух фиксированных телесных углах не несут

достаточного объема информации для определения формы, размера и других характеристик частиц. Это ограничение частично снимается при совмещении технологии проточной цитометрии с оптической и флуоресцентной микроскопией, но и она имеет фундаментальное ограничение по точности и чувствительности, что, в частности, ограничивает ее применимость для исследований биологических объектов в субмикронном диапазоне размеров.

Технология сканирующей проточной цитометрии (СПЦ), основанная на измерении угловой зависимости интенсивности рассеянного излучения, или индикатрисы светорассеяния, в большей мере реализует потенциал применения светорассеяния для характеризации одиночных клеток и частиц. Данная технология обеспечивает не только статистическую точность анализа благодаря высокой скорости измерений (порядка 10^2 частиц в секунду), но также, благодаря большому объему измеряемой информации, содержащейся в каждой индикатрисе, позволяет восстанавливать морфологические характеристики частиц (размер, форму и показатель преломления) в результате решения обратной задачи светорассеяния.

Потенциал СПЦ был успешно продемонстрирован для характеризации лимфоцитов, тромбоцитов и эритроцитов, т.е. преимущественно для анализа однокомпонентных полидисперсных систем, содержащих определенную популяцию частиц, размер которых составляет от нескольких длин волн, а форма может быть описана некоторой общей оптической моделью.

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

Задачами данной работы являются:

1. Разработать метод определения угловых диапазонов сбора интегральных сигналов рассеяния вперед и бокового светорассеяния, регистрируемых триггерной системой СПЦ, и оценить границу чувствительности прибора для детекции одиночных сферических субмикронных частиц в параметрах размера и показателя преломления частиц.

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

3. Исследовать влияние искажений, возникающих при измерении индикатрис светорассеяния в связи с отклонением траектории пролета частиц от оптической оси СПЦ, на точность решения обратной задачи светорассеяния. Предложить возможные подходы для повышения точности оценки характеристик

частиц при наличии неслучайных ошибок измерений и экспериментально проверить их эффективность, в т.ч. в сравнении с результатами, полученными с помощью других методов (оптическая и электронная микроскопия).

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

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

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

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

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

характеристик частиц, что является дополнительным обоснованием необходимости измерения большого объема оптической информации для характеризации морфологии частиц по светорассеянию.

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

На защиту выносятся следующие положения:

1. Обратная задача светорассеяния, заключающаяся в определении размера d и показателя преломления n сферических субмикронных частиц ($d \in [0.1, 1.5]$ мкм и $n \in [1.35, 1.7]$) по двум интегральным сигналам рассеяния, измеренным в фиксированных телесных углах, имеет единственное решение в ограниченном диапазоне параметров частиц.
2. Использование положения спектрального максимума индикатрисы светорассеяния и амплитуд сигналов рассеяния вперед и бокового рассеяния в качестве дополнительной информации при решении обратной задачи светорассеяния позволяет повысить точность характеризации сферических и сфероидальных частиц с небольшим отношением полуосей (<1.4) при наличии неслучайных искажений в измерении индикатрис светорассеяния.
3. Предложенные в работе методы характеризации сферических и сфероидальных клеток и частиц биологического происхождения по светорассеянию, измеряемому с помощью СПЦ, позволяют определять их размер с точностью до 70 нм и измерять показатель преломления с точностью 0.003–0.02 (приведен разброс медианных погрешностей).
4. Показатель преломления субмикронных частиц в плазме крови, сданной через 3 часа после приема пищи, имеет в среднем более высокое значение (1.486–1.518) по сравнению с показателем преломления микрочастиц в плазме, сданной натощак (1.443–1.461) (приведен разброс для трех доноров).

Апробация работы. Содержание диссертации докладывалось на конгрессах международного общества развития цитометрии ISAC в 2012 (Германия), 2013 (США) и 2015 г. (Великобритания), международной конференции «Electromagnetic and Light Scattering - XV» в 2015 г. (Германия), научной школе-конференции «Теория и численные методы решения обратных и некорректных задач» в 2012 г.

(Новосибирск, Россия), международной конференции «Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology» в 2014 г. (Россия), а также на научных студенческих конференциях «Студент и научно-технический прогресс» в 2011 и 2013 гг. (Новосибирск, Россия), на научных семинарах в Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН и в Ягеллонском университете г. Кракова (Польша).

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

Личный вклад. Все приведённые в работе результаты получены либо самим автором, либо при его непосредственном участии.

Структура диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 289 наименований. Диссертация изложена на 154 страницах, включает 14 таблиц и 59 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, определены цели и задачи работы, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, и дано краткое описание диссертации по главам.

Первая глава представляет собой литературный обзор, в котором рассмотрены клетки и частицы, выступавшие в качестве основных объектов исследования в данной диссертации, различные методы исследования биологических дисперсных систем, методы измерения и моделирования светорассеяния и существующие подходы к решению обратной задачи светорассеяния.

В разделе 1.1 дана общая характеристика исследуемых в работе популяций клеток и частиц (бактерий, жировых частиц молока, внеклеточных микровезикул и хиломикронов в плазме крови). Рассмотрены наиболее актуальные задачи, связанные с идентификацией и характеризацией данных объектов в различных биологических средах, и существующие методы их решения. Основную сложность в анализе многокомпонентных биологических сред представляет разнородность и полидисперсность входящих в их состав популяций клеток и частиц. Поэтому среди существующих методов исследования дисперсных систем наиболее подходящими являются технологии, работающие в режиме анализа одиночных частиц и представленные, главным образом, технологиями, основанными на принципе проточной цитометрии, рассмотрению которых посвящен раздел 1.2. Среди них особое место занимают оптические неивазивные методы, и, в частности, методы, позволяющие анализировать одиночные частицы по светорассеянию. Рассмотрены существующие подходы к измерению разрешенного по углу светорассеяния на одиночных частицах, и показано преимущество используемой в работе технологии сканирующей проточной цитометрии.

В разделе 1.3 рассмотрены методы решения прямой задачи светорассеяния, и их применимость для моделирования светорассеяния от исследуемых в работе клеток и частиц с учетом специфики их форм и размеров. Описаны существующие подходы к решению обратной задачи светорассеяния, включая параметрические подходы, подходы, использующие методы автоматического обучения, и подходы, основанные на нелинейной регрессии, т.е. прямой подгонке экспериментальных данных результатами моделирования с помощью глобальной оптимизации (для простых форм клеток и частиц) и с использованием предварительно насчитанных баз данных (для более сложных моделей).

Вторая глава посвящена инструментальному аспекту работы, а именно описанию сканирующего проточного цитометра (СПЦ), с помощью которого проводились экспериментальные исследования в настоящей диссертации.

В разделе 2.1 описана оптическая схема СПЦ. Измерения светорассеяния, осуществляемые для одиночных частиц в потоке, включают измерение

- угловой зависимости интенсивности рассеянного излучения (индикатрисы светорассеяния), в которой содержится вся основная информация, необходимая для характеризации частиц:

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

  где S_{11} и S_{14} – это элементы матрицы Мюллера, θ и φ – полярный и азимутальный углы рассеяния;
- двух интегральных сигналов рассеяния в фиксированных телесных углах, рассеяния вперед (FSC) и бокового рассеяния (SSC), которые используются в качестве триггерных сигналов:

$$I^{\mathrm{SSC/FSC}}=k_{\mathrm{SSC/FSC}}\iint_{\Omega_{\mathrm{SSC?FSC}}}d\theta\,d\varphi\sin\theta\left[S_{11}(\theta,\varphi)-S_{12}(\theta,\varphi)\cos(2\varphi)-S_{13}(\theta,\varphi)\sin(2\varphi)\right]. \qquad (2)$$

В отличие от индикатрисы, информации о светорассеянии, содержащейся в этих сигналах не достаточно для описания морфологии частиц, но ее можно использовать для повышения точности характеризации частиц по индикатрисе (данные вопросы детально рассмотрены в Главе 3). Для расчета амплитуд сигналов рассеяния вперед и бокового светорассеяния согласно (2) необходимо знать коэффициенты $k_{\mathrm{FSC/SSC}}$, зависящие от чувствительности ФЭУ и усиления электронной схемы СПЦ, и телесные углы сбора $\Omega_{\mathrm{FSC/SSC}}$ соответствующих апертур объективов.

В разделе 2.2 предлагается метод определения данных параметров на основании измерений сигналов FSC и SSC для смеси монодисперсных полистирольных микросфер с известным размером (результаты электронного микроскопирования) и показателем преломления (значение для полистирола на длине волны 488 нм). Обратная задача при этом сводится к нелинейной регрессии

измеренных амплитуд сигналов расчетами по теории Ми с учетом дисперсии частиц по размеру. С помощью данного подхода с точностью до десятых долей градуса было установлено, что для оптической конфигурации СПЦ рассеяние вперед собирается по кольцевой апертуре в углах от 14.2° до 23°, а боковое рассеяние собирается по круговой апертуре в углах 90° ± 18.3°.

На основании данных оценок в разделе 2.3 была определена граница детекции СПЦ. Показано, что рассеяние вперед в качестве триггерного сигнала позволяет детектировать субмикронные частицы в более широком диапазоне размеров и показателей преломления по сравнению с боковым рассеянием. Область детекции СПЦ полностью покрывает диапазон характеристик жировых частиц и бактерий и частично захватывает диапазон размеров и показателей преломления субмикронных частиц плазмы.

Третья глава посвящена развитию методов идентификации и характеризации клеток и частиц различной формы и размеров по индикатрисам светорассеяния, измеряемым на СПЦ. Предложены способы повышения точности определения морфологических характеристик клеток и частиц (форма, размер, показатель преломления) при наличии экспериментальных искажений. Рассмотрены различные подходы к решению задач идентификации и классификации субпопуляций клеток и частиц в многокомпонентных средах по результатам характеризации одиночных частиц и непосредственно по их индикатрисам с помощью статистических критериев сравнения регрессионных моделей и машинного обучения.

В разделе 3.1 представлены оптические модели исследуемых в работе клеток и частиц и описаны методы расчета светорассеяния для сферических и несферических частиц.

Раздел 3.2 посвящен решению обратной задачи светорассеяния. Прежде, чем перейти к рассмотрению общей задачи характеризации частиц по индикатрисе светорассеяния, исследуется возможность определения размера и показателя преломления сферических частиц (частиц ($d \in [0.1, 1.5]$ мкм и $n \in [1.35, 1.7]$) по двум интегральным сигналам рассеяния в передние и боковые углы (FSC и SSC), измеряемым на проточных цитометрах стандартной конфигурации. В результате было показано, что данная задача неоднозначна, имеет единственное решение только в ограниченном диапазоне параметров и становится неразрешимой при приближении к рэлеевскому пределу (Рис. 1). Точное определение характеристик сферических частиц, а также принципиальная возможность характеризации несферических объектов требуют измерения бо́льшего количества информации о светорассеянии. Эта информация заключена в индикатрисах светорассеяния, измеряемых на СПЦ.

Задача восстановления формы, размера и показателя преломления частиц по индикатрисе решается методом наименьших квадратов, т.е. минимизацией

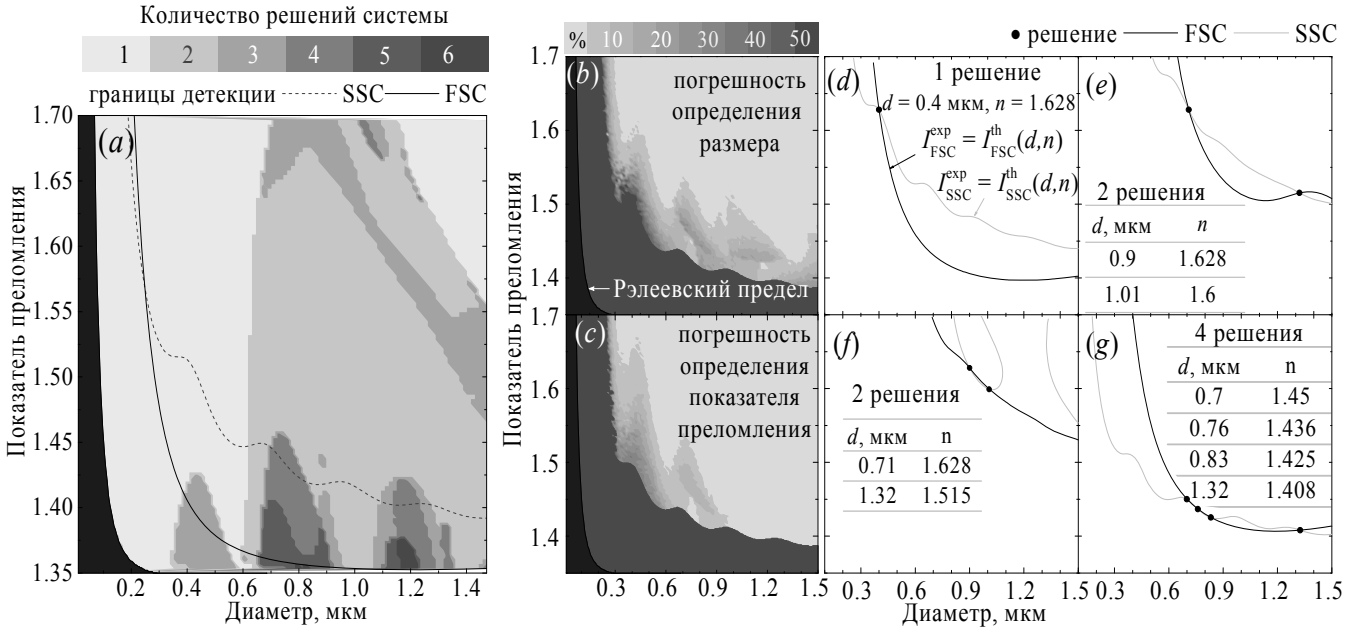

Рис. 1. (*a*) Области неоднозначности решения обратной задачи для сферических частиц и точности определения их размера (*b*) и показателя преломления (*c*) по измерению бокового рассеяния (SSC) и рассеяния вперед (FSC). (*d*-*g*) Характерные случаи нахождения 1, 2 и 4 решений при характеризации сферических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

взвешенной суммы квадратов отклонений между теоретическим и экспериментальным сигналами:

$$S(\mathbf{Q}) = \sum_{i=1}^{N} \varepsilon_i^2,\ \varepsilon_i = w(\theta_i)(I_{th}(\theta_i, \mathbf{Q}) - I_{\exp}(\theta_i)), \tag{3}$$

где $\mathbf{Q}$ – вектор параметров модели, $I(\mathbf{Q})$ и $I_{\exp}$ – теоретическая и экспериментальная индикатрисы, соответственно, N – количество точек в индикатрисе, $w(\theta)$ – весовая функция. Задача минимизации решалась методами глобальной оптимизации с помощью алгоритма DiRect и прямых расчетов по теории Ми для сферических частиц и интерполяцией методом ближайшего соседа с использованием предварительно насчитанных баз теоретических индикатрис для несферических частиц.

Преимущество данных подходов заключается в полном описании поверхности $S(\mathbf{Q})$ для каждой частицы, имея которое и используя Байесовский подход, можно рассчитать распределение плотности вероятности характеристик частицы на всем пространстве параметров и оценить погрешность их определения, рассчитав для них математическое ожидание μ, стандартное отклонение σ, ширины доверительных интервалов и другие оценки точности. Большие погрешности могут быть вызваны наличием искажений в измеренных индикатрисах, которые в свою очередь могут возникать в результате неидеальной настройки СПЦ или соответствовать сильному отклонению реальной формы измеренной частицы от используемой оптической модели.

Раздел 3.3 посвящен рассмотрению влияния неслучайных ошибок измерений индикатрис на точность характеризации частиц и поиску способов ее повышения. Одним из наиболее вероятных источников экспериментальных искажений при измерении индикатрисы является отклонение траектории пролета частицы от оптической оси СПЦ. В результате моделирования было показано, что оно может приводить как к систематическому сдвигу оценок характеристик частиц, так и увеличению погрешности их определения, степень которых зависит от размера объекта. Для повышения точности и состоятельности оценок характеристик частиц было предложено несколько подходов, заключающихся в использовании измеряемых параметров светорассеяния, инвариантных к источнику этих искажений, и модификации процедуры нелинейной регрессии. В качестве таких параметров выступают амплитуды сигналов рассеяния вперед I_{FSC} и бокового рассеяния $I_{\mathrm{SSC}}(2)$ и положение основного пика в Фурье спектре индикатрисы, L, использование которых при решении обратной задачи приводит целевую функцию $S(\mathbf{Q})$ (3) соответственно к одному из двух видов:

$$S(\mathbf{Q}) = \sum_{i=1}^{N} [w(\theta_i)]^2 \left[\frac{I_{\mathrm{LSP}}^{\mathrm{exp}}(\theta_i) - \alpha I_{\mathrm{LSP}}^{\mathrm{th}}(\theta_i, \mathbf{Q})}{\sigma_{\mathrm{LSP}}} \right]^2 + \left[\frac{I_{\mathrm{SSC}}^{\mathrm{exp}} - I_{\mathrm{SSC}}^{\mathrm{th}}(\mathbf{Q})}{\sigma_{\mathrm{SSC}}} \right]^2 + \left[\frac{I_{\mathrm{FSC}}^{\mathrm{exp}} - I_{\mathrm{FSC}}^{\mathrm{th}}(\mathbf{Q})}{\sigma_{\mathrm{FSC}}} \right]^2, \quad (4)$$

$$S(\mathbf{Q}) = \sum_{i=1}^{N} \left[w(\theta_i)(I_{th}(\theta_i, \mathbf{Q}) - I_{\mathrm{exp}}(\theta_i)) \right]^2 + \gamma \left[L_{\mathrm{th}}(\mathbf{Q}) - L_{\mathrm{exp}} \right]^2, \quad (5)$$

Важно отметить, что подход, заключающийся в использовании амплитуд сигналов FSC и SSC, применим для повышения точности характеризации только сферически симметричных объектов, для которых интенсивность рассеяния в боковые и передние углы зависит только от характеристик частицы и не зависят от ее ориентации. Для несферических частиц имеется дополнительная зависимость от угла ориентации по отношению к поляризации лазера триггерного канала. Применимость подхода, основанного на использовании Фурье-параметров индикатрисы, ограничивается формой и размером частиц (сферические и сфероидальные частицы с небольшим отношением полуосей и размером > 1.5 мкм). Для несферических частиц наиболее оптимальным способом уменьшения влияния систематических искажений индикатрисы на эффективность оценки их характеристик, является модификация процедуры нелинейной регрессии с помощью обобщенного метода наименьших квадратов (ОМНК).

Эффективность данных подходов была проверена экспериментально. В частности, повышение точности характеризации субмикронных сферических частиц при использовании сигналов FSC и SSC в решении обратной задачи было продемонстрировано на измерениях полистирольных микросфер диаметром 0.4, 0.7 и 0.9 мкм, а полученные результаты сравнивались с результатами электронного микроскопирования (Рис. 2). Была достигнута точность определения размера от 5 до 18 нм, для показателя преломления погрешность одиночного измерения составила 0.008 (Таблица 1).

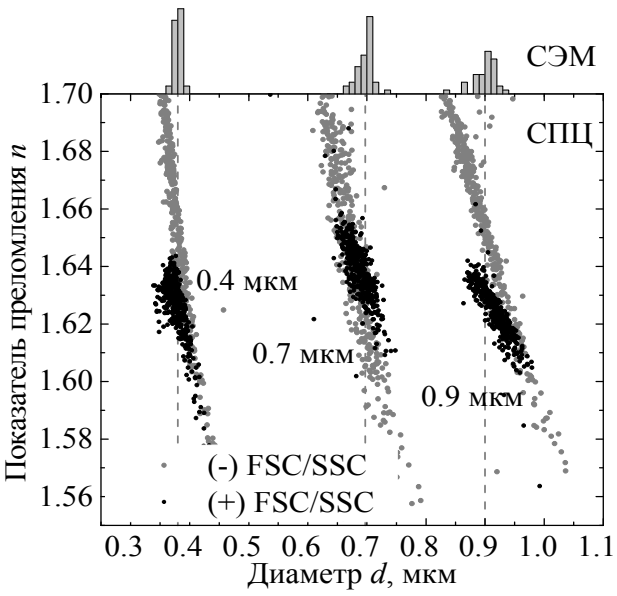

Таблица 1

Тип частиц		ПЭМ	Размер (мкм)		Показатель преломления	
			(-) FSC/SSC	(+) FSC/SSC	(-) FSC/SSC	(+) FSC/SSC
0.4	**μ**	**0.380**	0.376	**0.379**	1.666	1.625
	σ	**0.006**	0.049	**0.023**	0.038	0.013
	$\delta_{мед}$		0.006	0.005	0.011	0.008
0.7	**μ**	**0.697**	0.67	**0.687**	1.65	1.638
	σ	**0.013**	0.03	**0.022**	0.04	0.011
	$\delta_{мед}$		0.04	0.012	0.05	0.008
0.9	**μ**	**0.908**	0.89	**0.915**	1.661	1.625
	σ	**0.019**	0.05	**0.023**	0.032	0.008
	$\delta_{мед}$		0.03	0.018	0.025	0.007

μ - среднее значение, **σ** - стандартное отклонение, **$\delta_{мед}$** - медиана погрешности одиночных измерений

Рис. 2. Сравнение результатов характеризации микросфер 0.4, 0.7 и 0.9 мкм по диаметру и показателю преломления с использованием дополнительной информации о рассеянии вперед FSC и боковом рассеянии SSC (черные точки) и без нее (серые точки). Распределения частиц по размеру, приведенные в верхней части графика, соответствуют результатам электронного микроскопирования (ПЭМ, просвечивающая электронная микроскопия). Параметры всех представленных распределений частиц приведены в Таблице 1 справа.

Эффективность использования Фурье-параметров индикатрисы была продемонстрирована на примере характеризации жировых частиц молока: точность определения размера повысилась практически в два раза для сферических частиц и на 10% для сфероидальной модели.

Использование ОМНК вместо стандартной процедуры регрессии рассматривалось на примере характеризации двух штаммов палочковидных бактерий *E.coli*. При этом точность определения длины и диаметра клеток составила 325 и 40 нм, соответственно, против 525 и 60 нм, полученных с помощью обычного МНК, а распределения длины и диаметра, измеренные на СПЦ, показали хорошее согласие с измерениями, полученными на оптическом микроскопе.

В разделе 3.4 рассматриваются методы сравнения регрессионных моделей, кластеризации данных и машинного обучения, использующиеся в работе для идентификации и классификации разнородных субпопуляций клеток и частиц в многокомпонентных средах.

Четвертая глава посвящена разработке метода характеризации жировых частиц молока (ЖЧМ) с помощью СПЦ.

В разделе 4.1 рассматривается оптическая модель ЖЧМ. Стандартной моделью, использующейся для характеризации ЖЧМ по светорассеянию, в т.ч. методами голографической микроскопии и малоуглового рассеяния, является модель гомогенной сферы. Но на основании имеющихся в литературе сведений о форме жировых частиц и по результатам анализа представленных в ней микроскопических снимков, в данной работе было выдвинуто предположение, что

для более точной характеризации по крайне мере некоторой доли ЖЧМ целесообразно использовать сфероидальную модель с небольшим отношением полуосей (< 1.4).

Качественное подтверждение данного предположения было получено при сравнении теоретически рассчитанных индикатрис сфероидов с индикатрисами светорассеяния одиночных ЖЧМ, измеренными на СПЦ. Было показано, что при увеличении отношения полуосей ε амплитуда колебаний индикатрис сфероидов уменьшается, особенно в интервале углов от 30° до 50°, причем подобная структура сигнала наблюдается и для существенной доли измеренных сигналов.

Разделы 4.2 и 4.3 включают описание методов решения обратной задачи, экспериментальных методов и исследуемых образцов.

Измерения ЖЧМ проводились в трех образцах молока, включая натуральное молоко, не прошедшее технологической обработки, и два промышленных образца, полученных от различных коммерческих производителей.

Форма каждой измеренной частицы и ее характеристики определялись в результате решения обратной задачи светорассеяния методом наименьших квадратов с целевой функцией, определенной согласно (5), при одновременном использовании моделей сферы (глобальная оптимизация алгоритмом DIRect и теория Ми) и сфероида (интерполяция методом ближайшего соседа с использованием регулярной базы данных индикатрис сфероидов, насчитанных в диапазоне характеристик ЖЧМ методом дискретных диполей). Наиболее реалистичная модель формы частицы выбиралась на основании сравнения результатов регрессии с помощью критерия Фишера (критерий сравнения вложенных регрессионных моделей).

Результаты измерений и характеризации одиночных жировых частиц и их популяций в различных образцах молока представлены в разделе 4.4. Результаты обработки экспериментальных индикатрис с помощью сферической и сфероидальной модели (Рис. 3) не только качественно, но количественно подтверждают преимущество использования альтернативной модели благодаря повышению точности определения размера одиночных ЖЧМ (Рис. 3*b*,*d*). В результате сравнения оптических моделей было уставлено, что среди ЖЧМ натурального молока по крайней мере 29% частиц лучше описываются моделью сфероида, чем моделью сферы. При этом медиана погрешности определения размера одиночных ЖЧМ по популяции составляет 74 нм при использовании комбинированной оптической модели, и 80 и 104 нм при использовании только сферической или сфероидальной модели, соответственно. Точность определения показателя для одиночных частиц составила 0.009.

Существенное различие параметров распределений ЖЧМ по размеру, площади поверхности и показателю преломления, полученных для натурального

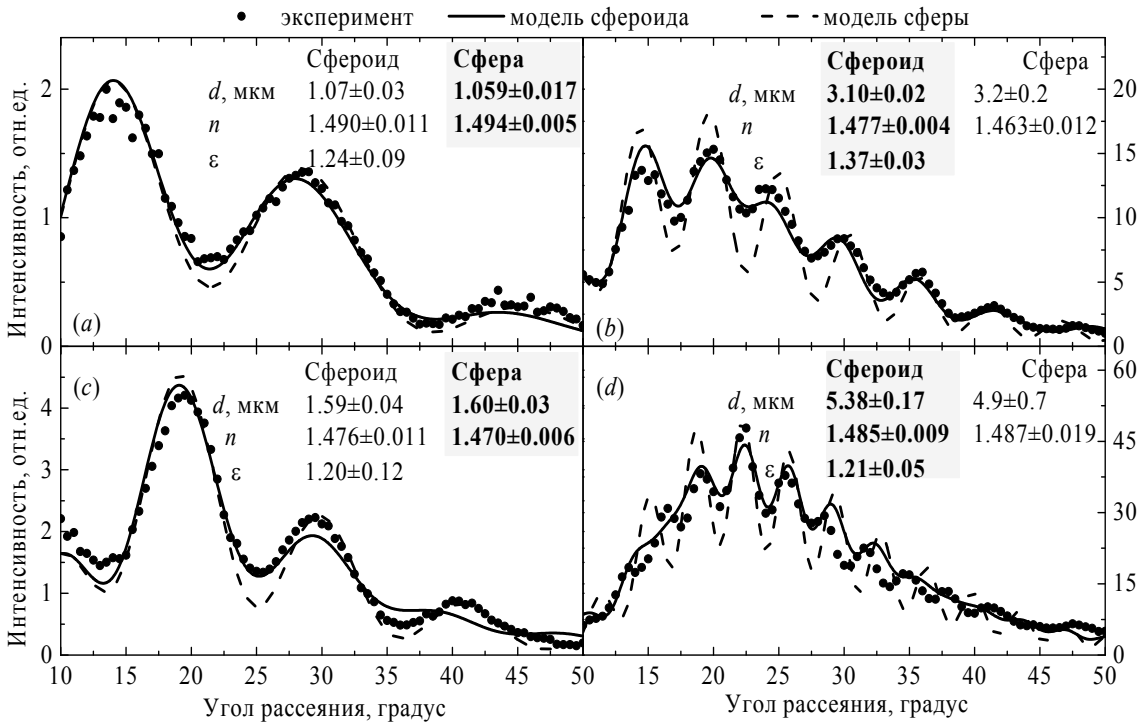

Рис. 3. Типичные экспериментальные и ближайшие теоретические индикатрисы жировых частиц молока, полученные в результате глобальной оптимизации с использованием сферической и сфероидальной модели. Для каждой частицы выделены параметры, соответствующие наиболее оптимальной модели, выбранной по критерию Фишера.

молока и промышленных образцов, отражает чувствительность данных характеристик к степени обработки молока (Рис. 4).

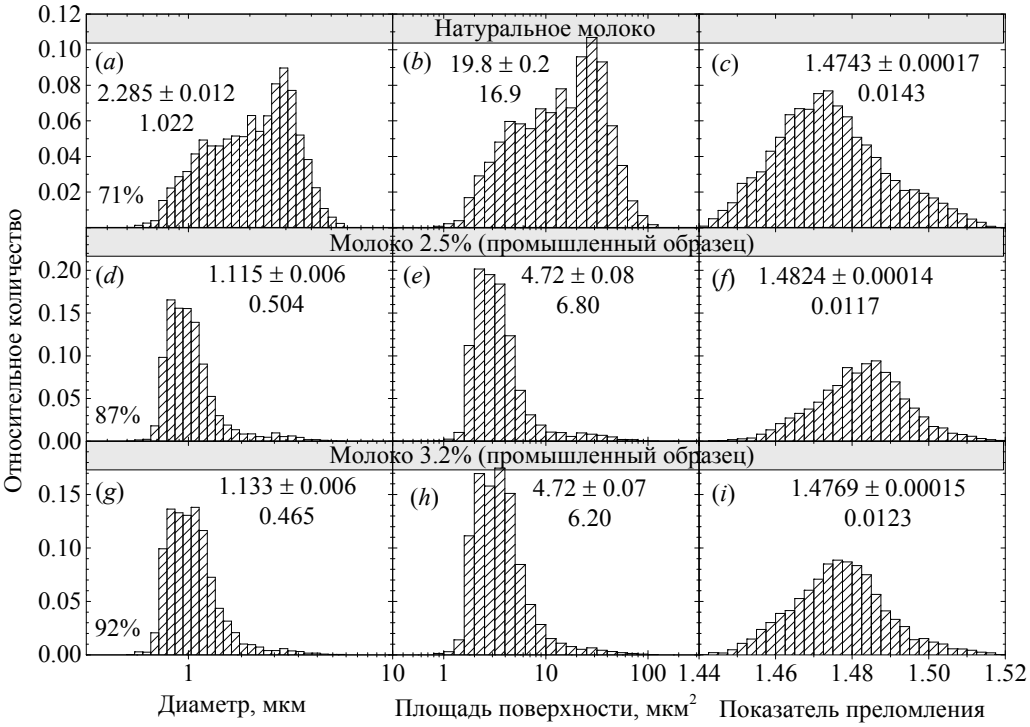

Рис. 4. Распределение жировых частиц молока по диаметру, площади поверхности и показателю преломления для натурального молока и двух промышленных образцов, прошедших технологическую обработку. Для всех распределений приведены среднее ± ошибка среднего и дисперсия. На графиках распределений по размеру также приведена доля сферических ЖЧМ (%).

Различие промышленных образцов молока, полученных от разных коммерческих производителей, выражается в небольших различиях ЖЧМ по размеру и показателю преломления.

Пятая глава посвящена разработке метода морфологической характеризации шаровидных и палочковидных бактерий и исследованию возможности идентификации и классификации разнородных популяций бактерий в смешанных культурах с помощью СПЦ.

В разделе 5.1 рассматриваются основные формы бактерий и предлагаются оптические модели для моделирования светорассеяния палочковидных и простых шаровидных клеток (микрококки, диплококки). Диапазоны варьирования параметров моделей и параметры баз данных, насчитанных для решения обратной задачи светорассеяния, приведены в разделе 5.2.

Раздел 5.3 включает описание экспериментальных методов и объектов исследований данной главы. Исследования проводились на 6 культурах бактерий, включая 4 штамма грамположительных сферических бактерий *Micrococcus spp.* (штаммы 386, 387, 389, 392) и 2 вида грамотрицательных палочковидных бактерий, включая небольшие, не образующие спор бактерии *Ochrobactrum sp*. штамм 1326 и более крупные палочки вида *Bacillus subtilis* штамм 1327. При рассмотрении вопроса классификации разнородных культур также использовались результаты измерений двух штаммов *Escherichia coli* XL2-Blue и XL10-GOLD, приведенные ранее в разделе 3.3. Одновременно с измерениями на СПЦ морфология клеток бактерий в исследуемых культурах анализировалась на оптическом микроскопе с последующей автоматической обработкой полученных микрофотографий для определения длины и диаметра палочковидных бактерий и диаметра сферических бактерий.

В разделе 5.4 предлагаются и экспериментально проверяются алгоритмы статической характеризации палочковидных и шаровидных бактерий. Характеризация палочковидных бактерий по измеренным индикатрисам осуществлялась, используя стандартный подход к решению обратной задачи светорассеяния для несферических частиц с использованием базы данных. Для шаровидных бактерий предложен двухступенчатый алгоритм характеризации, включающий разделение клеток на сферы (кокки) и несферы (диплококки) по результатам характеризации с использованием теории Ми (первый этап) и характеризацию выделенной несферическая фракции частиц диплококков с использованием модели димера (второй этап).

В результате характеризации были измерены длины и диаметры одиночных палочковидных бактерий, диаметры и показатели преломления шаровидных клеток. Распределения всех измеренных культур по морфологическим характеристикам приведены на Рис. 6 и Рис. 5 в сравнении с микроскопическими измерениями.

Полученное согласие между измерениями на СПЦ и микроскопе является убедительным доказательством адекватности предложенных алгоритмов, а согласие распределений по диаметру и показателю преломления шаровидных клеток в форме одиночных кокков и в составе диплококков (Рис. 5) подтверждает надежность методов характеризации, используемых как для сферических, так и для несферических объектов. При этом медианная погрешность измерения морфологических характеристик клеток составила соответственно: 20 нм и 0.003 для размера и показателя преломления одиночных кокков; 55 нм и 0.008 для размера и показателя преломления диплококков; 400 и 40 нм для длины и диаметра палочковидных бактерий.

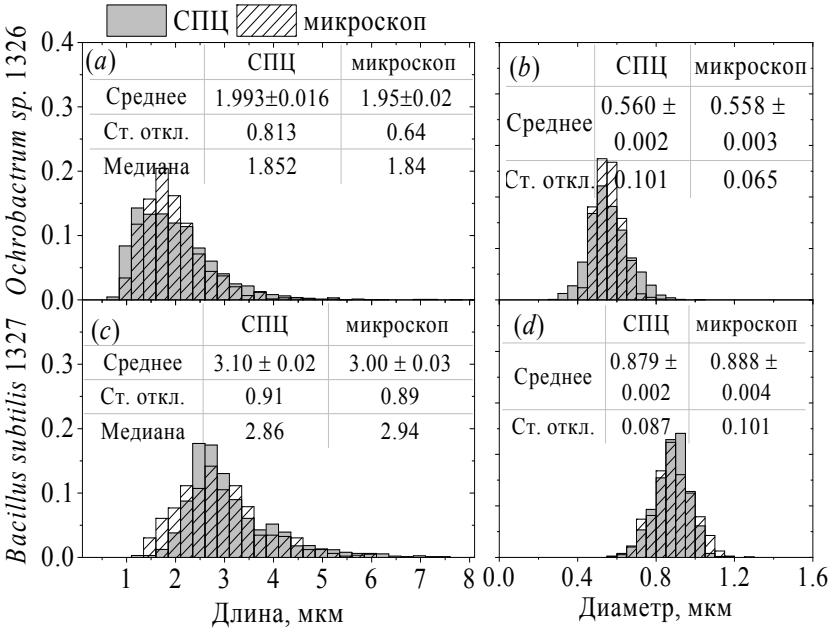

Рис. 6. Результаты характеризации популяций клеток *Ochrobactrum sp.* 1326 и *Bacillus subtilis* 1327 по длине и диаметру в сравнении с микроскопическими измерениями.

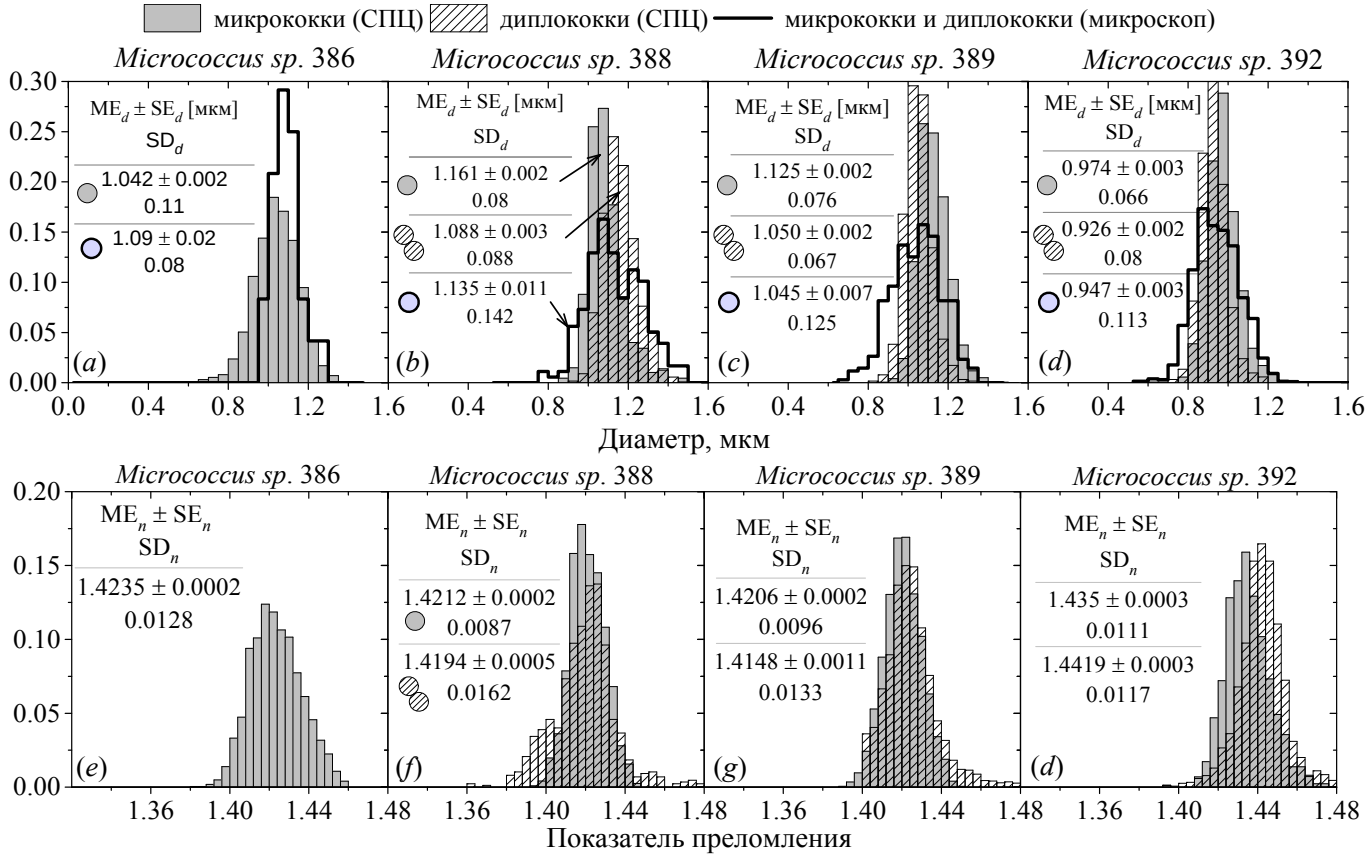

Рис. 5. Распределения диаметра и показателя преломления одиночных микрококков и диплококков, полученные в результате характеризации шаровидных бактерий *Micrococcus spp*. (штаммы 386, 388, 389 и 392). Для сравнения также показаны результаты микроскопических измерений.

В разделе 5.5 исследовалась возможность идентификации и классификации бактерий в смешанных культурах, содержащих как сходные, так и различающиеся по морфологии субпопуляции клеток, с помощью СПЦ. Для классификации бактерий по результатам решения обратной задачи светорассеяния было предложено использовать метод кластеризации распределений морфологических характеристик клеток. Наилучшая точность идентификации в смешанной культуре палочковидных и шаровидных бактерий была достигнута для одиночных кокков (97%), точность классификации несферических частиц на палочки и диплококки составила только 80%. Точность идентификации бактерий внутри одного класса формы, определялась степенью перекрытия распределений характеристик отдельных субпопуляций. Так, например, точность классификации трех видов палочковидных бактерий *Escherichia coli* XL2-Blue, *Bacillus subtilis* 1327 и *Ochrobactrum sp.* 1325 по длине и диаметру клеток составила 88%, в то время как попытки разделить отдельные штаммы бактерий *E. coli* (XL2-Blue и XL10-GOLD) и штаммы шаровидных бактерий *Micrococcus spp.* (386, 388, 389 и 392) по размеру и показателю преломления не привели к желаемым результатам из-за значительного перекрытия их морфологических характеристик. Потенциальным решением проблемы классификации бактерий в подобных случаях может послужить переход от статической к динамической характеризации культур.

Также, в разделе была рассмотрена принципиальная возможность разделения субпопуляций бактерий без решения обратной задачи, т.е. только на основании уникальной формы измеряемых индикатрис светорассеяния, с использованием алгоритмов машинного обучения. Были рассмотрены два способа обучения, на теоретических и экспериментальных индикатрисах, с использованием двух алгоритмов: метода опорных векторов и random forest. Экспериментальная проверка показала, что точность классификации различных штаммов бактерий как со схожей, так и с различающейся морфологией, с помощью автоматического обучения оказалась в среднем на 15% выше по сравнению с результатами, полученными с помощью кластеризации распределений морфологических характеристик, определенных в результате решения обратной задачи светорассеяния с использование различных оптических моделей клеток. Также автоматическое обучение оказалось более эффективным при разделении смешанных культур, содержащих более трех классов частиц. Но эффективность данного подхода продемонстрирована только при обучении на экспериментальных сигналах чистых культур клеток, поэтому его использование в будущем требует накопления больших баз данных сигналов. В целом, в результате данного исследования было показано, что простой сигнал СПЦ может успешно применяться для классификации бактерий, в частности, для экспресс-идентификации субпопуляций бактерий в смешанных культурах в реальном времени, а также при исследования культур, содержащих бактерии, сложная форма которых не позволяет точно характеризовать их в

результате решения обратной задачи светорассеяния, но дальнейшее развитие данного направления требует более углубленного изучения.

В разделе 5.6 представлены первые результаты по применению метода для динамической характеризации бактериальных культур, полученные при исследовании роста культуры клеток *E. coli B*. Эти результаты показали, что средний объём бактерий является чувствительным индикатором фазы роста культуры, кроме того, динамика изменения функции распределения по объёму показала наличие двух субпопуляций в исследуемой пробе.

Шестая глава посвящена развитию метода СПЦ для исследования клеточных микровезикул и хиломикронов (ХМ), которые являются самими маленькими (0,1 - 1 мкм) детектируемыми по светорассеянию элементами в крови и при этом наименее доступными для изучения методами обычной проточной цитометрии, что обусловлено их ограниченным пределом детекции и невозможностью дифференцировать субпопуляций микровезикул и ХМ на фоне шума и других компонент плазмы, включая небольшие тромбоциты и иммунные комплексы, как по стандартно измеряемым сигналам рассеяния вперед и бокового рассеяния, так и по флуоресценции, ввиду отсутствия меток, специфичных для всех типов микровезикул.

В разделе 6.1 представлены имеющиеся в литературе сведения о форме микровезикул и ХМ, согласно которым в качестве оптической модели данных частиц можно рассматривать простую сферическую модель. Несмотря на сходную морфологию и перекрывающийся диапазон размеров, микровезикулы и ХМ различаются по составу и плотности, а потому имеется предположение, что субпопуляции данных частиц характеризуются разным показателем преломления и могут быть идентифицированы на основании этих различий.

Методы выделения образцов плазмы и схема экспериментальных исследований данной главы описаны в разделе 6.2.

Идентификация и характеризация микровезикул и ХМ осуществлялась в плазме крови, сданной условно здоровыми донорами натощак и через 3 часа после еды, что в норме соответствует минимальному и максимальному уровню ХМ в крови. В разделе 6.3 описаны два альтернативных способа дифференциации имеющихся в плазме популяций частиц на основании различий их формы.

Первый способ представляет собой двухэтапный алгоритм, позволяющий идентифицировать и характеризовать и тромбоциты, и сферические субмикронные частицы на основании решения обратной задачи светорассеяния с использованием расширенной базы данных тромбоцитов (модель сплюснутого сфероида) и теории Ми. На первом этапе, в результате обработки всех измеренных сигналов частиц плазмы моделью сфероида, в параметрах объема частиц и интеграла от индикатрисы светорассеяния идентифицируется область тромбоцитов; идентификация

микровезикул и ХМ среди частиц, не попавших в эту область, осуществляется по результатам характеризации с использованием теории Ми на втором этапе.

Второй предлагаемый подход исключает этап характеризации тромбоцитов и основан на изначальном разделении всех частиц плазмы на фракции сферических и несферических частиц по степени согласия их индикатрис с подгонкой по теории Ми. Количественными мерами описания согласия выступали три величины: взвешенная сумма квадратов отклонений (СКО), определённая согласно (3), количество серий k (критерий серий Вальда-Вольфовитца или количество пересечений между экспериментальной и теоретической кривой) и коэффициент автокорреляции регрессионных остатков ρ_1; а разделение субпопуляций частиц автоматически осуществлялось по всем трем параметрам методом EM-кластеризации. Адекватность работы предложенных алгоритмов и согласие полученных с их помощью результатов разделения частиц были подтверждены при сравнительном анализе образцов плазмы крови, полученных у одного и того же донора натощак и через 3 часа после еды, включая образцы с плазмой, выделенной естественным осаждением и с помощью центрифугирования (Рис. 7).

В разделе 6.4 представлены основные результаты экспериментальных исследований данной главы.

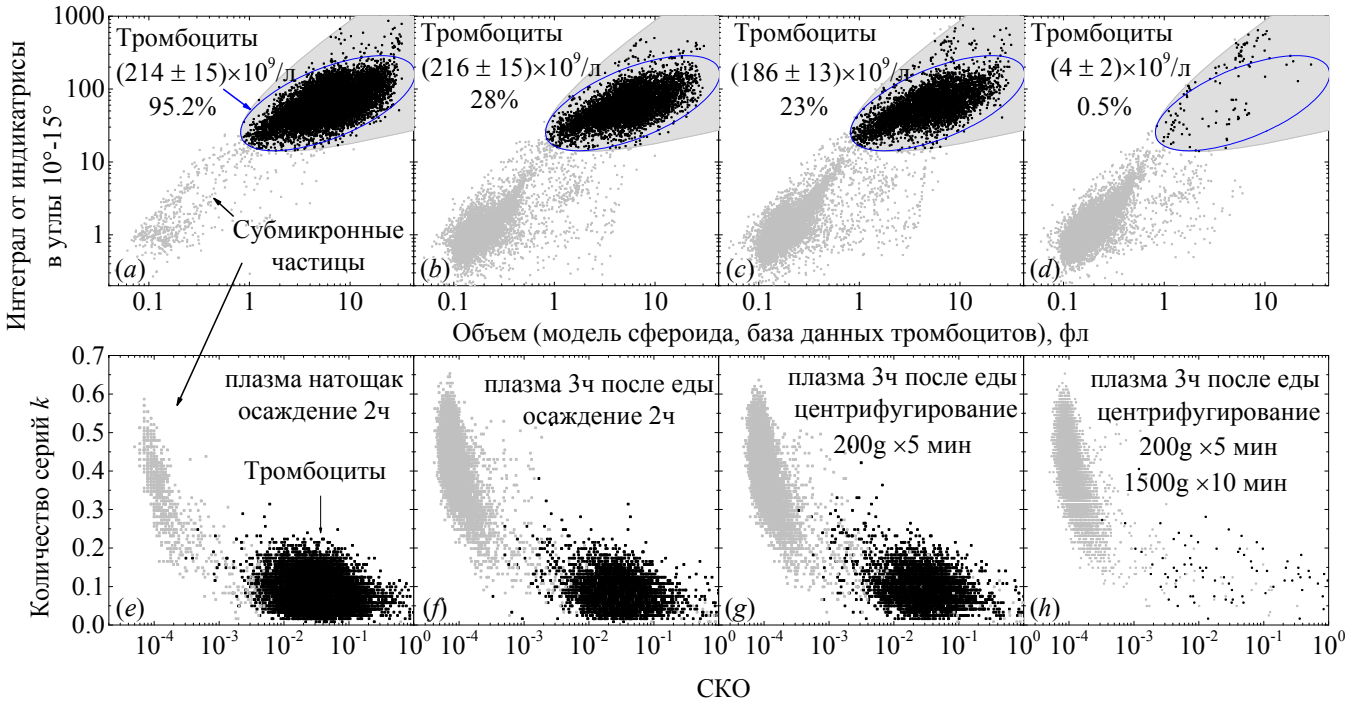

Рис. 7. Разделение тромбоцитов и субмикронных частиц в плазме по результатам характеризации частиц с использованием расширенной базы данных тромбоцитов (сверху). Соответствующие субпопуляции тромбоцитов и других частиц плазмы представлены в параметрах СКО и количества серий k, используемых для разделения сферических и несферических частиц по результатам обработки с помощью теории Ми (снизу). Слева направо представлены результаты разделения частиц в контрольном образце (плазма крови, сданная натощак) (a,e) и плазме крове, сданной через 3 часа после приема пищи, выделенной естественным осаждением (b,f) и с помощью центрифугирования: изначально при 200g в течение 5 мин (c,d) и дополнительно при 1500g в течение 10 мин.

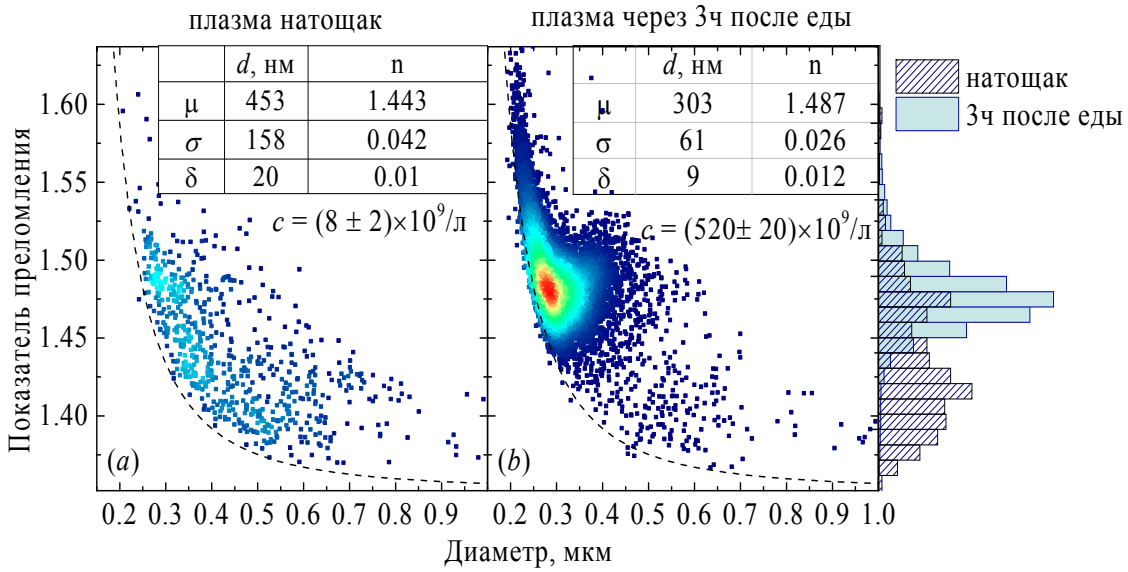

Рис. 8. Карта плотности распределения сферических субмикронных частиц по диаметру и показателю преломления в плазме крови, сданной натощак (a) и через 3 часа после еды (b). Пунктирная линия описывает границу детекции частиц. Для размера *d* и показателя преломления *n* в таблицах приведены средние значения, стандартные отклонения и медианная погрешность одиночных измерений, *c* - концентрация частиц в плазме.

В результате сравнения распределений характеристик субмикронных частиц в контрольном образце плазмы (сданная натощак), и в плазме, сданной через 3ч после приема пищи, было отмечено различие средних значений показателя преломления частиц (Рис. 8). Частицы с меньшим показателем преломления были отнесены к микровезикулам, а существенный прирост частиц с показателем преломления 1.487 ± 0.048 (среднее ± стандартное отклонение) во втором образце был связан с выбросом ХМ в кровь после еды.

Данные выводы также были экспериментально подтверждены в результате 6-часового наблюдения постпрандиальной динамики распределений характеристик субмикронных частиц плазмы и сопоставления полученных результатов с измерениями уровня триглицеридов (ТГ) в крови, который определялся с помощью стандартного клинического колориметрического теста. В частности, было показано, что, во-первых, рост концентрации частиц со средним показателем преломления 1.49-1.5 действительно отражает имеющиеся в литературе сведения о динамике метаболизма ХМ в организме человека: появление в течение часа после еды, пик накопления к 3 часам с последующим уменьшением и выходом на нормальный уровень после 5 часов., в то время как динамика уровня ТГ отражает динамику ХМ в меньшей степени, поскольку не делает различий между ними и другими классами липопротеиновых частиц.

По результатам исследования субмикроных частиц в плазме крови до и после in vitro активации тромбоцитов с помощью коллагена и АДФ, было показано, что:

(a) коллаген не подходит в качестве активирующего агента при исследовании микровезикул тромбоцитарного происхождения, поскольку его раствор

содержит мицеллы, размер и показатель преломления которых сильно перекрываются с характеристиками микровезикул;

(b) добавление АДФ приводит к увеличению количества субмикронных частиц со средним показателем преломления 1.44 в два раза через 5 мин после активации и практически в 6 раз через час.

В результате исследования плазмы крови доноров с риском атеросклероза было обнаружено повышенное содержание субмикронных частиц в их плазме, (860 - 1550)$\times 10^9$/л (разброс по 3 пациентам) по сравнению с контрольной группой, (8 - 54)$\times 10^9$/л (разброс по трем донорам). Согласно значениям показателя преломления, данные частицы были отнесены к фракции ХМ, что свидетельствует об их замедленном выведении из организма у данной группы пациентов. Данные результаты подтверждают диагностическую ценность метода, а также открывают возможности для углубленного изучения роли ХМ в патогенезе атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

ВЫВОДЫ

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

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Konokhova A.I., Yurkin M.A., Moskalensky A.E., Chernyshev A.V., Tsvetovskaya G.A., Chikova E.D., Maltsev V.P. Light-scattering flow cytometry for identification and characterization of blood microparticles // J. Biomed. Opt.–2012–Vol. 17, № 5–P. 057006.
2. Konokhova A.I., Gelash A.A., Yurkin M.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. High-precision characterization of individual *E. coli* cell morphology by scanning flow cytometry // Cytometry A–2013–Vol. 83A, № 6–P. 568–575.
3. Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Konokhova A.I., Strokotov D.I., Nekrasov V.M., Chernyshev A.V., Tsvetovskaya G.A., Chikova E.D., Maltsev V.P. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering // J. Biomed. Opt. –2013–Vol. 18, № 1–P. 17001.
4. Konokhova A.I., Rodionov A.A., Gilev K.V., Mikhaelis I.M., Strokotov D.I., Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Enhanced characterisation of milk fat globules by their size, shape and refractive index with scanning flow cytometry // Int. Dairy J.–2014–Vol. 39, № 2–P. 316–323.
5. Konokhova A.I., Chernova D.N., Moskalensky A.E., Strokotov D.I., Yurkin M.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Super-resolved calibration-free flow cytometric characterization of platelets and cell-derived microparticles in platelet-rich plasma // Cytometry A–2016–Vol. 89, № 2–P. 159–168.
6. Konokhova A.I., Chernova D.N., Strokotov D.I., Karpenko A.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P., Yurkin M.A. Light-scattering gating and characterization of plasma microparticles // J. Biomed. Opt.–2016–Vol. 21, № 11–P. 115003–115003.
7. Litvinenko A. l., Moskalensky A.E., Karmadonova N.A., Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Konokhova A.I., Yurkin M.A., Pokushalov E.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Fluorescence-free flow cytometry for measurement of shape index distribution of resting, partially activated, and fully activated platelets // Cytometry A–2016–Vol. 89, № 11–P. 1010–1016.
8. Romanov A.V., Konokhova A.I., Yastrebova E.S., Gilev K.V., Strokotov D.I., Chernyshev A.V., Maltsev V.P., Yurkin M.A. Spectral solution of the inverse Mie problem // J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer–2017–Vol. 200–P. 280–294.