На правах рукописи

Москаленский Александр Ефимович

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

03.01.02 – биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2015

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

Научный руководитель:	кандидат физико-математических наук **Юркин Максим Александрович**
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук профессор **Омельянчук Леонид Владимирович**
	кандидат физико-математических наук **Постникова Полина Владимировна**
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт оптики атмосферы им. В.Е. Зуева Сибирского отделения РАН (г. Томск)

Защита состоится “15” декабря 2015 г. на заседании диссертационного совета Д 003.007.01 при Федеральном государственном учреждении науки Институт Биофизики Сибирского отделения РАН по адресу: 660036, Красноярск, Академгородок, д. 50 стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки Институт Биофизики Сибирского отделения РАН.

Автореферат разослан “03” ноября 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук Т.А. Зотина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания, в основном ишемическая болезнь сердца и инсульты, являются главной причиной смерти во всем мире. 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. Исследования агрегации тромбоцитов проводятся с помощью агрегометрии – метода, основанного на измерении оптической плотности богатой тромбоцитами плазмы в процессе агрегации. 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. 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. 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. 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. 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.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые сканирующая проточная цитометрия применена для характеризации морфологии тромбоцитов с субдифракционной точностью. Это позволило не только получить новые знания о форме тромбоцитов, но и исследовать её изменение в процессе активации и показать возможность идентификации активированных клеток. Кроме того, теоретически показана возможность идентификации агрегатов тромбоцитов при измерении индикатрисы в расширенном угловом диапазоне.

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.

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°.

Апробация работы. Результаты работы опубликованы в четырёх статьях в международных журналах, включённых в прилагаемый перечень. 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).

Публикации. Основное содержание изложено в 4-х статьях в рецензируемых журналах и в тезисах международных конференций.

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

Структура диссертационной работы. 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

Первая глава представляет собой общий литературный обзор, в котором рассмотрено строение и морфология тромбоцитов, методы измерения и моделирования светорассеяния и существующие подходы к решению обратной задачи светорассеяния.

В разделе 1.1 приведены известные сведения о форме и размере тромбоцитов, а также об изменении формы при активации. Также рассмотрены существующие методы измерения характеристик тромбоцитов.

В разделе 1.2 описан механизм перестройки цитоскелета, который лежит в основе изменения формы. Наряду с известными фактами указаны вопросы, до сих пор открытые в литературе. В частности, не ясен механизм, приводящий к искривлению периферического кольца микротрубочек при повышении внутриклеточной концентрации ионов кальция.

В разделе 1.3 рассмотрены методы решения прямой задачи светорассеяния для моделирования индикатрис тромбоцитов. Показано, что аппроксимационные методы, такие как приближение Рэлея-Ганса-Дебая и аномальной дифракции, не всегда дают правильные результаты. Необходимо использовать численно точные методы, такие как метод дискретных диполей. 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.

В разделе 1.4 описаны существующие подходы к решению обратной задачи светорассеяния. 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 Данные методы уже используются в других работах.

В разделе 1.5 обсуждаются особенности рассеяния света агрегатами тромбоцитов. Сложность понимания этого процесса обусловлена взаимодействием составляющих агрегат 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.

Вторая глава посвящена модернизации существующего прототипа сканирующего проточного цитометра. В результате модернизации 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.

В разделе 2.1 приведены характеристики прибора, в частности, зависимость амплитуды экспериментального шума от угла рассеяния, которая в дальнейшем используется как весовая функция при сравнении экспериментальных индикатрис с теоретическими.

В разделе 2.2 описаны основные процедуры считывания и обработки данных, которые позволили повысить частоту измерений. Показано, что дальнейшее повышения количества измеряемых в единицу времени частиц ограничивается появлением совпадающих (кратных) событий. Выведена

формула для количества кратных событий в зависимости от скорости измерения. 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.

Третья глава посвящена развитию методов решения прямой и обратной задач светорассеяния для тромбоцитов и их агрегатов.

В первом разделе предложена оптическая модель тромбоцита, произведено тестирование различных методов расчёта светорассеяния и выбран метод дискретных диполей как наиболее надёжный и точный. Затем описан способ расчёта базы данных теоретических индикатрис. С использованием базы данных был разработан общий метод решения обратной задачи светорассеяния для несферических частиц, описываемых несколькими параметрами. В методе используются идеи, изначально опубликованные ранее (Strokotov et al, JBO, 2009).

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

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

где $\boldsymbol{\beta}$ – вектор параметров модели, $I(\boldsymbol{\beta})$ и $I_{\exp}$ – теоретическая и экспериментальная индикатрисы, соответственно, k – количество точек в индикатрисе, $w(\theta)$ – весовая функция. Уравнение (1) также задает норму, или расстояние, в k-мерном пространстве индикатрис.

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 $p_i = 1/N$. 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 (1). 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 $\{S(\boldsymbol{\beta}_i)\}$.

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 $\boldsymbol{\beta}$:

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

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

Функция $P(\boldsymbol{\beta})$ содержит всю информацию, которая может быть извлечена из экспериментальной индикатрисы. В частности, возможно рассчитать математическое ожидание любой функции $f(\boldsymbol{\beta})$:

$$\langle f(\boldsymbol{\beta}) \rangle = \int_{\mathbf{B}} f(\boldsymbol{\beta}) P(\boldsymbol{\beta}) d\boldsymbol{\beta}. \quad (3)$$

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:

$$\langle f(\boldsymbol{\beta}) \rangle \approx \overline{g}/\overline{h}, \quad \overline{x} \equiv \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i, \quad g_i = f(\boldsymbol{\beta}_i) h_i, \quad h_i = N p_i S(\boldsymbol{\beta}_i)^{-k_{\mathrm{eff}}/2}, \quad (4)$$

что верно для любого распределения параметров в базе данных. Последовательность $h = \{h_i\}$ содержит всю информацию о $P(\boldsymbol{\beta})$, а $\overline{h}$ является оценкой $1/\kappa$. Можно оценить погрешность формулы (4), воспользовавшись стандартными формулами статистики:

$$\mathrm{Var}[x] = \frac{\mathrm{Var}[x]}{N} \approx \frac{\mathrm{SV}[x]}{N}, \quad \mathrm{SV}[x] = \frac{1}{N-1}\sum_{i=1}^{N}(x_i - \overline{x})^2, \quad (5)$$

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

$$\frac{\mathrm{Var}[\langle f(\boldsymbol{\beta}) \rangle]}{\langle f(\boldsymbol{\beta}) \rangle^2} = \frac{1}{N}\left(\frac{\mathrm{SV}[g]}{\overline{g}^2} + \frac{\mathrm{SV}[h]}{\overline{h}^2}\right), \quad (6)$$

Согласно уравнению (3) 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:

$$\alpha = \int_{\mathbf{R}(P_0)} P(\boldsymbol{\beta}) \mathrm{d}\boldsymbol{\beta} \approx \kappa \sum_{\boldsymbol{\beta}_i \in \mathbf{R}(P_0)} p_i S(\boldsymbol{\beta})^{-k_{\mathrm{eff}}/2}. \quad (7)$$

Чтобы проверить применимость подхода базы данных для решения задачи, было проведено тестирование базы данных на 1000 теоретических дополнительно насчитанных индикатрисах. Было обнаружено, что во многих случаях существует компенсация параметров. В частности, если ось симметрии тромбоцита близка к направлению падающего излучения, то рассеяние света хорошо описывается теорией аномальной дифракции, в которую входит набег фазы, а не отдельно показатель преломления и толщина частицы (рис. 1).

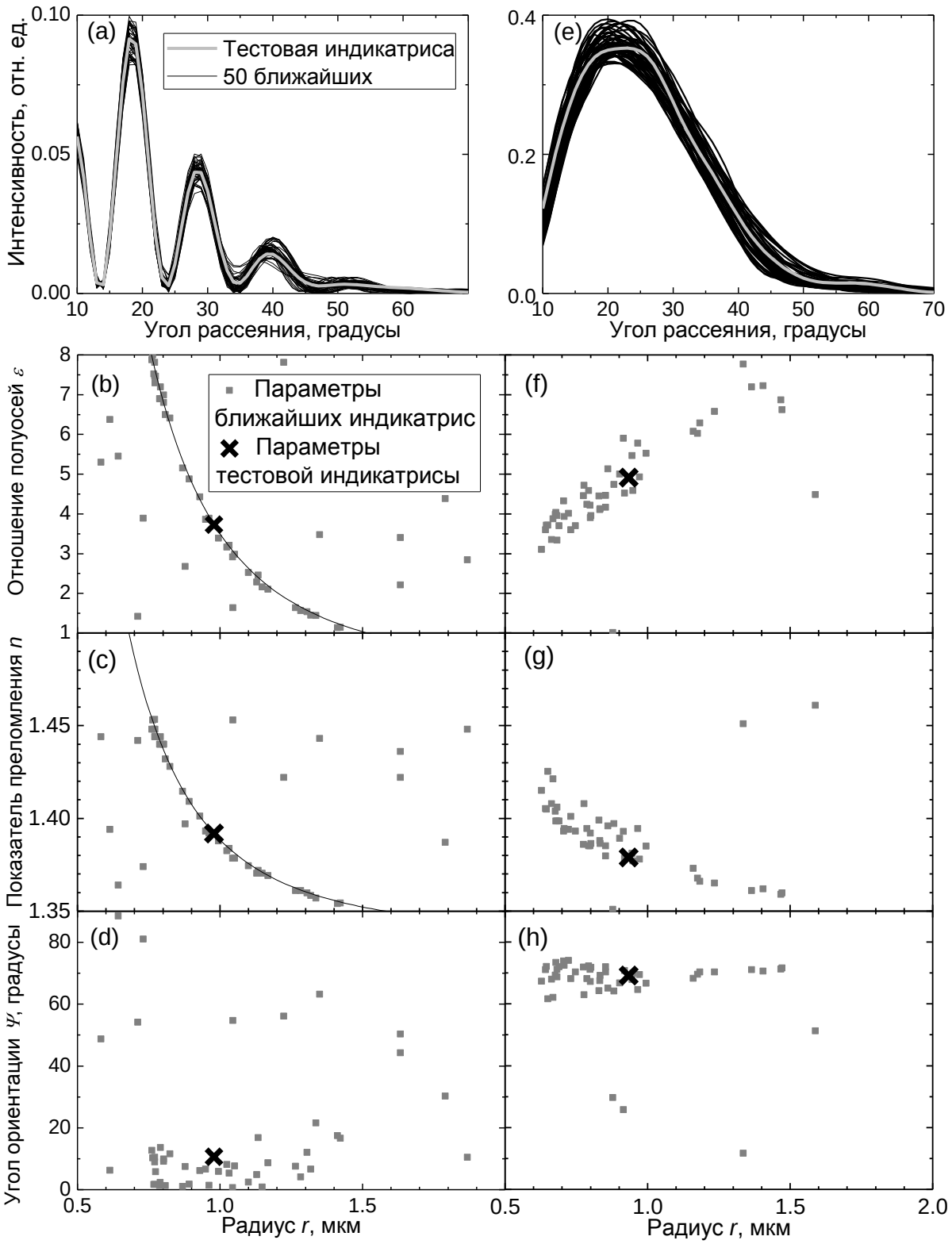

Рис. 1. (a,e): тестовые индикатрисы (серые линии) и 50 ближайших из базы данных (черные линии); (b-d и f-h): проекции параметров 50 ближайших индикатрис из базы данных (серые точки). Черными крестами отмечены истинные параметры тестовых индикатрис. Линии на (b) и (c) – кривые const$\times r^{-3}$, которые соответствуют приближению аномальной диффракции.

В связи с обнаруженной неоднозначностью для решения обратной задачи светорассеяния была использована дополнительная априорная информация о показателе преломления тромбоцитов, взятая из литературных данных

В разделе 3.2 описаны особенности рассеяния света агрегатами тромбоцитов. Целью данного раздела являлось показать возможные пути для разделения мономеров и димеров тромбоцитов по индикатрисе светорассеяния.

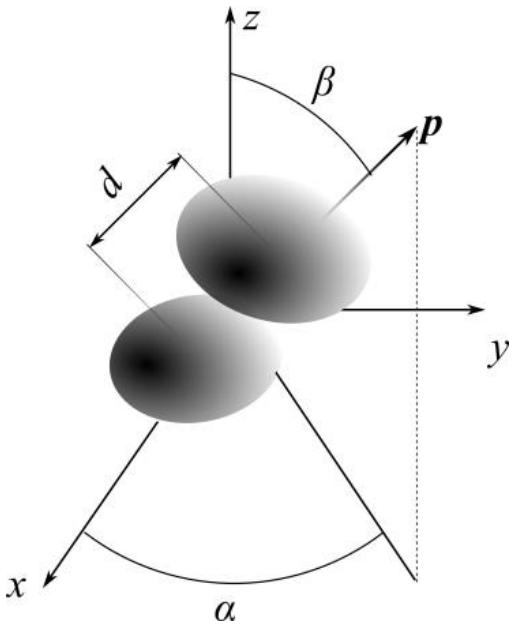

Рис. 2. Геометрия задачи рассеяния света для агрегата из двух частиц.

Рассмотрим агрегат из двух частиц. 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:

$$\Delta(\theta,\varphi) = kd\left(\cos\beta\cos\theta + \sin\beta\sin\theta\cos(\alpha-\varphi)\right). \tag{8}$$

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

$$\mathbf{E}^{\text{sca}} = \mathbf{E}_1^{\text{sca}} + \mathbf{E}_2^{\text{sca}} e^{\text{i}\Delta}, \tag{9}$$

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

$$I(\theta,\varphi) = \left|\mathbf{E}^{\text{sca}}\right|^2 = I_1 + I_2 + \mathbf{E}_1^{\text{sca}} \cdot \overline{\mathbf{E}_2^{\text{sca}} e^{\text{i}\Delta}} + \overline{\mathbf{E}_1^{\text{sca}}} \cdot \mathbf{E}_2^{\text{sca}} e^{\text{i}\Delta} = I_1 + I_2 + 2\,\text{Re}\left[\mathbf{E}_1^{\text{sca}} \cdot \overline{\mathbf{E}_2^{\text{sca}} e^{\text{i}\Delta}}\right], \tag{10}$$

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.

Индикатриса светорассеяния, измеряемая на сканирующем проточном цитометре – это интенсивность, проинтегрированная по азимутальному углу. Рассмотрим, к чему приводит интегрирование по углу φ в предположениях однократного рассеяния. Рассмотрим сначала случай агрегата, состоящего из двух одинаковых сфер. Тогда уравнение (10) можно упросить:

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

что после интегрирования по φ даёт:

$$I(\theta)=\frac{1}{2\pi}\int_0^{2\pi}S_{11}(\theta,\varphi)\mathrm{d}\varphi=2S_{11}^{(1)}(\theta)\left(1+\frac{1}{2\pi}\int_0^{2\pi}\cos\big(\Delta(\theta,\varphi)\big)\mathrm{d}\varphi\right). \qquad (12)$$

Последний интеграл равен

$$\int_0^{2\pi}\cos\big(\Delta(\theta,\varphi)\big)\mathrm{d}\varphi=\cos\tau\int_0^{2\pi}\cos\big(\rho\cos\varphi\big)\mathrm{d}\varphi=2\pi\cos(\tau)J_0\big(\rho\big),$$
$$\tau\equiv kd\cos\beta\cos\theta,\quad \rho\equiv kd\sin\beta\sin\theta, \qquad (13)$$

где J_0 – функция Бесселя нулевого порядка. Выражение (13) 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 (13) 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 (12) принимает более сложный вид:

$$I(\theta)=I_1(\theta)+I_2(\theta)+2\,\mathrm{Re}\left[\exp(-\mathrm{i}\tau)\int_0^{2\pi}f(\theta,\varphi)\exp(-\mathrm{i}\rho\cos\varphi)\mathrm{d}\varphi\right], \qquad (14)$$

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 (14), но с другими функциями f (которые всегда квадратично зависят от элементов амплитудной матрицы рассеяния).

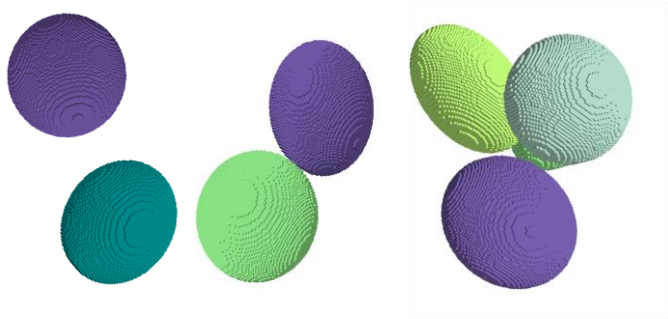

Рис. 3. Примеры полученных конфигураций диполей для моделирования светорассеяния агрегатами тромбоцитов.

Полученные выводы были продемонстрированы экспериментально и с помощью моделирования индикатрис димеров полистирольных микросфер, а также агрегатов тромбоцитов. Показано, что для индикатрис светорассеяния приближение независимого рассеяния выполняется в случае, если одна частица не сильно заслоняет вторую.

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 увеличивается в интенсивности при увеличении показателя преломления, приблизительно сохраняя структуру. Таким образом, можно подобрать такой

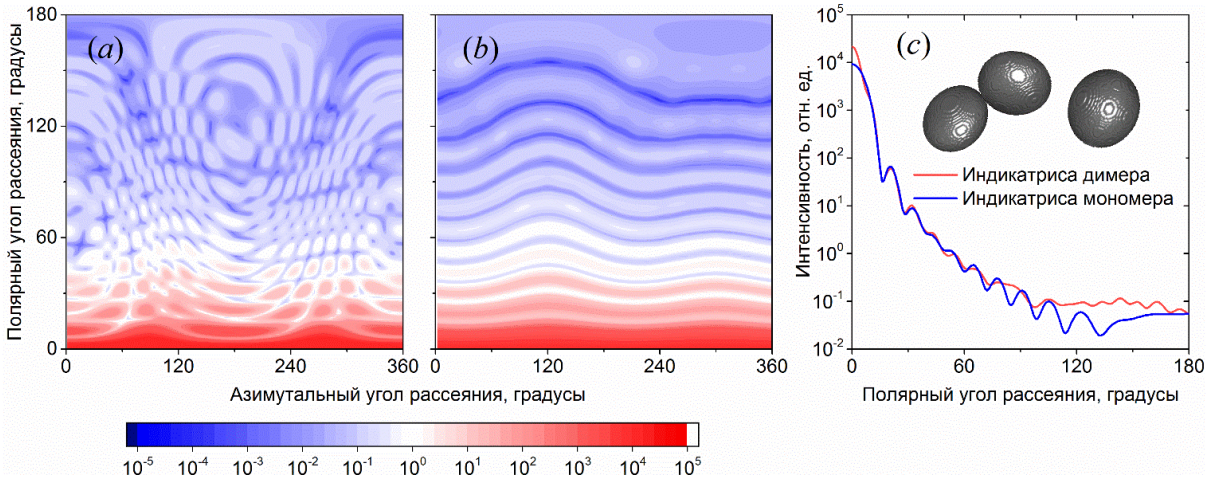

Рис. 4. Рассеяние света димером и мономером: двумерные распределения интенсивности сильно различаются – (*a*) и (*b*) соответственно, но после усреднения по углу φ индикатрисы светорассеяния совпадают в передней полусфере (с). Димер и мономер показаны в масштабе на (*c*), показатель преломления последнего 1.035, а частиц в димере – 1.028 и 1.031.

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. 4. 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 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. 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.

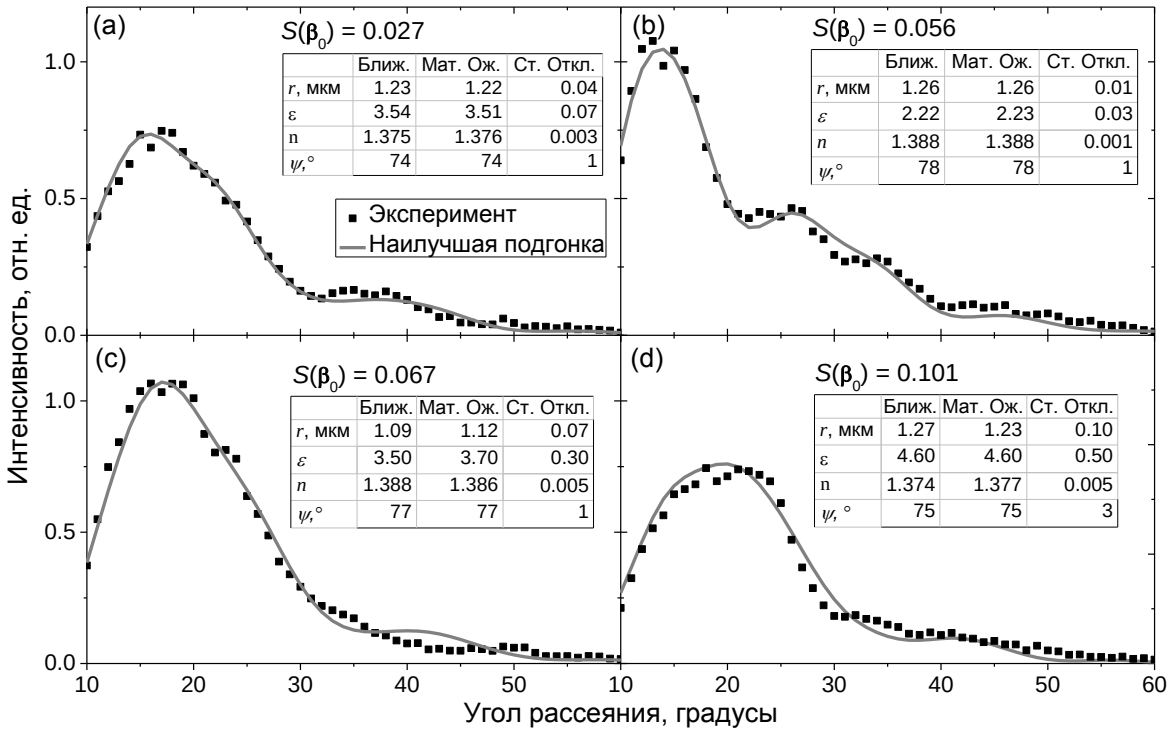

Рис. 5 Типичные экспериментальные и ближайшие теоретические индикатрисы, полученные в результате глобальной оптимизации с использованием базы данных с ограниченным показателем преломления.

Третья глава посвящена экспериментальным исследованиям.

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 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 сканирующем проточном цитометре, 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 путём добавления аденозиндифосфата (АДФ) (от 0.2 до 40 мкмоль/л) или коллагена (2.2 мг/мл) и последующего анализа.

На рис. 5 показаны типичные экспериментальные индикатрисы тромбоцитов и ближайшие к ним теоретические, полученные в результате глобальной оптимизации с использованием базы данных. Также приведены параметры теоретической индикатрисы, математическое ожидание и стандартное отклонение характеристик тромбоцита. При этом для каждой клетки определяется не только размер, но и форма (отношение полуосей), что является новым диагностически значимым параметром. Необходимо

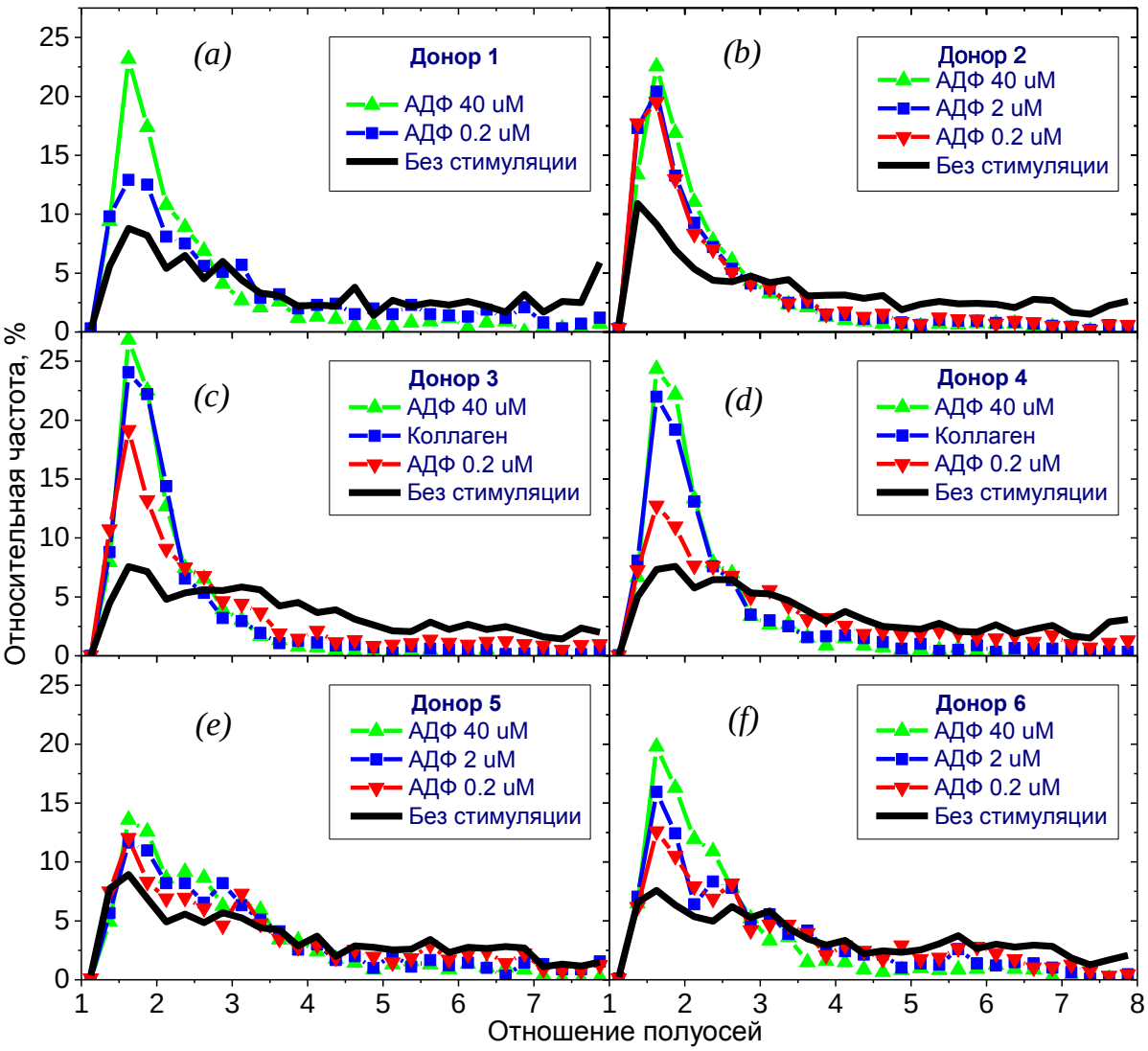

Рис. 6 Активация тромбоцитов в ответ на различные концентрации АДФ и коллагена для шести доноров.

подчеркнуть, что точность определения размеров тромбоцитов в некоторых случаях достигает 10 нм, что беспрецедентно для оптических методов. Распределение тромбоцитов по объёму хорошо совпало с данными метода Култера.

Полученное распределение тромбоцитов по форме также соответствует литературным данным. На рис. 6 показаны распределения клеток по отношению полуосей для шести доноров до и после стимуляции АДФ и коллагеном. Без стимуляции большая часть клеток имеет отношение полуосей в области 3-8, в то время как после активации клетки перемещаются в область отношения полуосей меньше 3, что указывает на их сферизацию. Данный результат можно использовать для бесфлуоресцентной детекции активированных тромбоцитов, что открывает новые возможности в медицинской диагностике. Кроме того, так как не требуется подготовка пробы, метод можно использовать для исследования изменения формы тромбоцитов в процессе активации в реальном времени. В частности, на Рис. 7 показано, как среднее отношение полуосей уменьшается после добавления АДФ и коллагена.

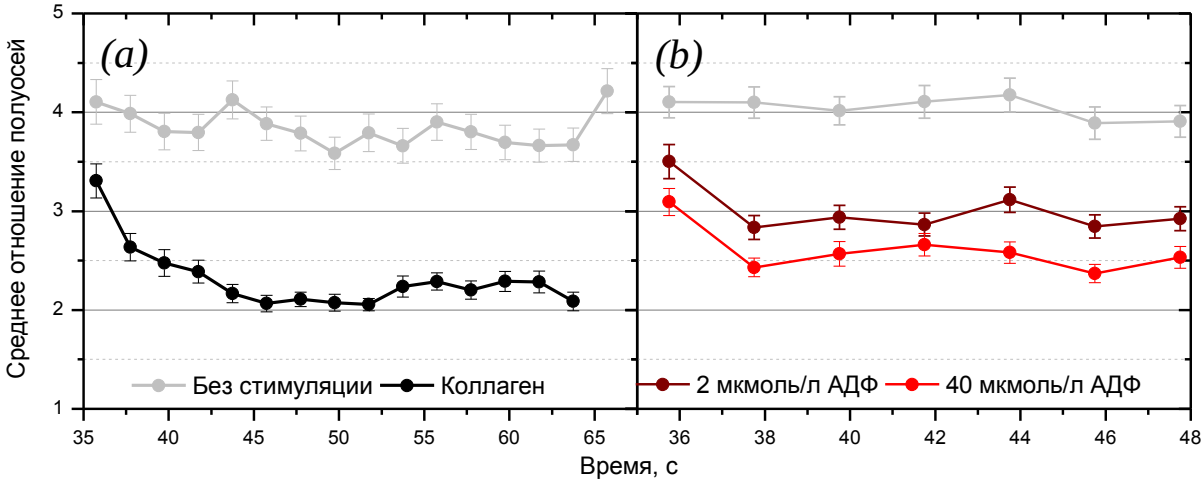

Рис. 7 Временно́й ход изменения формы при активации (*a*) коллагеном и (*b*) АДФ.

В таблице 1 приведены данные характеризации тромбоцитов 6 доноров. Отношение полуосей до стимуляции для всех доноров находится в узком диапазоне, что говорит о фундаментальных причинах плоской формы тромбоцитов. В процессе активации отношение полуосей уменьшилось на 22–42%. Средний объём также незначительно уменьшился – на 0–12%, а средняя площадь поверхности стала существенно меньше – на 13–18%.

Таблица 1. 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

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 популяция 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 диссертации 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)

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.

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).

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).