



Строкотов Дмитрий Игоревич

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК,
В ТОМ ЧИСЛЕ НАХОДЯЩИХСЯ В ПРОЦЕССЕ АПОПТОЗА,
С ЦЕЛЬЮ ИХ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ХАРАКТЕРИЗАЦИИ
ПО СВЕТОРАССЕЯНИЮ**

03.01.02 – биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Красноярск – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте химической кинетики и горения Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск)

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук
Юркин Максим Александрович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
профессор
Омельянчук Леонид Владимирович

доктор физико-математических наук
профессор
Белобров Пётр Иванович

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт оптики атмосферы им. Зуева Сибирского Отделения РАН (г. Томск)

Защита состоится "29" ноября 2011 г. В 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 003.007.01 при Учреждении Российской академии наук Институте Биофизики Сибирского отделения РАН по адресу: 660036, Красноярск, Академгородок, д. 50 стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института Биофизики Сибирского отделения РАН.

Автореферат разослан "21" октября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Л.А. Франк

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В составе крови человека имеется большое количество клеток, однако решающую роль для иммунитета среди них играют Т-, В- и недифференцированные лимфоциты. В частности, Т-лимфоциты способны отличать клетки своего организма от чужеродных, после чего они координируют действие других клеток крови для реализации иммунного ответа, то есть для защиты организма от микробных и других повреждающих факторов.

За последние 50 лет наблюдается неуклонное возрастание частоты врожденных и приобретенных иммунодефицитных состояний, чему способствует глобальное распространение некоторых вирусных инфекций и серьезное ухудшение экологической ситуации. Большинство иммунодефицитов связано с нарушением деятельности иммунокомпетентных клеток крови, и особенно Т-лимфоцитов. По мере прогрессирования иммунодефицитного заболевания, качество Т-лимфоцитов в крови неуклонно снижается, и их количество меняется. Вследствие всего этого организм постепенно утрачивает способность защищаться от окружающих его микроорганизмов, вызывающих воспаление, последствия которого могут быть фатальными. Решение задач идентификации и характеристики лимфоцитов обеспечит оценку количественных показателей клеточного иммунитета у больных, которая при динамическом наблюдении в процессе терапии может быть использована для определения возможных вариантов течения заболевания и, в последующем, подбора оптимальных иммунокорректирующих средств.

Воссоздание новых клеток крови и других специализированных клеток тканей организма, например, клеток печени, мозга, нервной ткани, происходит благодаря стволовым клеткам. Самое существенное свойство стволовых клеток заключается в том, что они могут самоподдерживаться в течение длительного времени и при этом производить дифференцированные клетки, которые выполняют в организме специфические функции. Таким образом, все клетки нашего организма возникают из стволовых клеток. Стволовые клетки обновляют и замещают клетки, утраченные в результате каких-либо повреждений во всех органах и тканях. Детальное изучение стволовых клеток, включающее в себя решение задач идентификации и характеристики, даст возможность применять эти клетки не только для развития методов клеточной терапии, но и для изучения действия новых лекарств и изучения механизмов возникновения дефектов и аномалий развития человека.

Все вышеописанные клетки являются мононуклеарными, т.е. имеют одно ядро. Для идентификации и характеристики таких клеток широко используются оптические методы, поскольку они неинвазивны и обладают высокой скоростью анализа. Наиболее важными среди них являются методы, основанные на измерении светорассеяния и флуоресценции. Классическим оптическим методом изучения морфологии клеток является микроскоп, но он обладает низким быстродействием и малой точностью определения параметров, поэтому для идентификации и характеристики мононуклеарных клеток широко применяются проточные цитометры, которые позволяют одновременно измерять сигналы светорассеяния и флуоресценции от одиночных клеток со скоростью десятков тысяч частиц в секунду.

Методы, основанные на светорассеянии, быстро развивались в 1980-х. Но в начале 1990-х многоцветный флуоресцентный анализ перехватил инициативу и в

дальнейшем определял развитие проточной цитометрии. Флуоресцентные метки позволяют быстро и достоверно решить задачу идентификации, а именно разделять и подсчитывать любые субпопуляции клеток крови, но не решают задач характеристики их морфологии, т.к. флуоресцентные метки используются для изучения химической структуры клетки в масштабе нанометров, поэтому они не предоставляют никакой информации о морфологии клетки, т.е. об её размере и форме, ядре и других элементах внутренней структуры. Они определяют лишь наличие определённых макромолекул на поверхности или внутри клетки, тем самым разделяя «положительные» и «отрицательные» клетки, т.е. клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют эти макромолекулы. Кроме того, мечение занимает некоторое время (обычно полчаса) и может модифицировать живые клетки. Это особенно важно для кинетических исследований, например апоптоза, когда требуется отслеживать состояние системы в определённые моменты времени в течение биологического процесса. Более того, одним из важнейших медицинских приложений данных методов является рутинный анализ крови. При этом актуальной проблемой становится дороговизна флуоресцентных меток. Их цена добавляется к себестоимости каждого анализа крови, в то время как методы, основанные на светорассеянии, требуют только определённого количества электричества и воды для каждого анализа.

Светорассеяние определяется распределением показателя преломления внутри клетки, которое в свою очередь напрямую связано с её морфологией. В обычных проточных цитометрах регистрируется весьма скудная информация о светорассеянии для решения задачи идентификации и характеристики клеток: можно получить лишь неточную оценку объёма клетки и идентифицировать только основные типы клеток крови.

Сканирующий проточный цитометр (СПЦ) позволяет измерять индикатрису светорассеяния одиночных частиц, которая содержит информацию, потенциально достаточную для характеристики 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 характеристика требует решения обратной задачи светорассеяния (ОЗС), т.е. определения характеристик частицы из данных о светорассеянии, что нетривиально даже для простейших форм частицы.

Целью данной диссертационной работы является развитие методов характеристики мононуклеарных клеток и их применение для исследования клеток крови, в том числе находящихся в процессе апоптоза, с помощью сканирующего проточного цитометра. Для достижения этой цели были сформулированы следующие задачи:

1. Модифицировать сканирующий проточный цитометр для измерения принципиально нового сигнала – поляризационной индикатрисы светорассеяния, и разработать метод характеристики димеров микросфер с использованием этого измеряемого сигнала.
2. Разработать методы характеристики мононуклеарных клеток по индикатрисе светорассеяния с помощью модели двухслойного шара и применить их к эмбриональным стволовым клеткам и лимфоцитам крови человека.

3. Разработать метод определения доли Т-лимфоцитов относительно всех лимфоцитов в крови человека.
4. Исследовать различия между морфологическими характеристиками Т- и В-лимфоцитов в пробах крови нескольких доноров.
5. Разработать метод определения новых параметров апоптоза лимфоцитов крови человека.

Научная новизна работы определяется следующими наиболее значимыми результатами:

Впервые введен поляризационный канал в оптическую схему сканирующего проточного цитометра, что позволило решить обратную задачу рассеяния для бисфер, оптические свойства которых описываются шестью характеристиками. В настоящее время это максимально возможное число характеристик частицы, которые можно восстановить по светорассеянию.

Разработан метод характеристики бисфер с использованием поляризационной индикатрисы. Погрешность определения размеров составляет от 8 до 88 нм.

Разработан метод определения доли Т-лимфоцитов в крови человека, благодаря которому впервые продемонстрирована возможность определения доли Т-лимфоцитов в пробе по светорассеянию без использования дорогостоящих флуоресцентных меток. Метод обеспечивает определение доли Т-лимфоцитов в крови с ошибкой не хуже чем 4.5% (абсолют.).

Впервые разработан метод характеристики мононуклеарных клеток и применён для:

- 1) Модели двухслойного шара с неоднородностью ядра (показана адекватность погрешностей определения параметров);
- 2) Нормальных лимфоцитов крови человека (средние по пробе диаметры В-лимфоцитов на 0.3 мкм больше чем у Т-лимфоцитов);
- 3) Лимфоцитов в апоптозе и некрозе.

Практическая ценность работы связана с развитием потенциала сканирующего проточного цитометра для проведения общего гематологического анализа. Это развитие обусловлено с одной стороны измерением дополнительной информации (поляризационной индикатрисы светорассеяния), а с другой – новыми методами характеристики. В частности, эти методы позволяют определять новые параметры клеток крови, которые потенциально являются диагностически важными. Более того, использование поляризационного сигнала позволяет приблизиться к характеристике нативных эритроцитов. Это позволит исключить процедуру сферизации эритроцитов из гематологического анализа, которая в данный момент и приводит к значительной систематической ошибке определяемых характеристик эритроцитов. Также использование новых методов характеристики открывает возможности для изучения апоптоза под действием различных факторов, таких как онколитические вирусные препараты. Таким образом, разработанные методы позволяют проводить более полную характеристику клеток крови, в том числе и получать новые параметры апоптоза мононуклеарных клеток.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Точность определения размеров микросфер в бисфере с использованием поляризационной индикатрисы светорассеяния составляет от 8 до 88нм.

2. Средние по пробе диаметры В-лимфоцитов достоверно больше чем у Т-лимфоцитов. Различие между средними диаметрами составляет от 0.25 до 0.32 мкм в пробах крови 2 доноров.
3. Уменьшение объема клетки на ранней стадии апоптоза лимфоцитов крови человека составляет 29% в пробе крови условно здорового донора.

Апробация работы. Основные результаты диссертации представлены в 4 публикациях, включенных в прилагаемый перечень. Содержание диссертации докладывалось на международной конференции «Оптика биологических частиц» (Новосибирск, 3-6 октября 2005 г.), на международном симпозиуме «Прогресс в электромагнитных исследованиях», PIERS (Москва, 18-21 августа 2009 г.), на XXV конгрессе международного общества развития цитометрии, ISAC (Сиэтл, США, 8-12 мая 2010 г.), на международных конференциях «Атомные и молекулярные импульсные лазеры» (Томск, 10-14 сентября 2007 г., 14-18 сентября 2009 г.), на международных научных студенческих конференциях «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 3-6 октября 2005 г., 26-30 апреля 2008 г., 11-15 апреля 2009 г.), на молодежных конкурс-конференциях «Фотоника и оптические технологии» (Новосибирск, 10-12 февраля 2010 г., 9-11 февраля 2011 г.), на III Евразийском конгрессе по медицинской физике и инженерии "МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА – 2010" (Москва, 21-25 июня 2010 г.), а также на научных семинарах в Институте химической кинетики и горения СО РАН.

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 176 наименований. Диссертация изложена на 100 страницах, включает 9 таблиц и 36 рисунков.

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 рассмотрены мононуклеарные клетки крови, эмбриональные стволовые клетки мыши, методы измерения и моделирования светорассеяния и существующие подходы к решению обратной задачи светорассеяния. В первом разделе описаны некоторые важнейшие для человека мононуклеарные клетки (эмбриональные стволовые клетки, Т- и В-лимфоциты), описаны их основные функции и важность определения морфологических параметров этих клеток. В частности, известно, что показатель преломления цитоплазмы циркулирующих лимфоцитов повышается у пациентов со злокачественной опухолью, а в процессе дифференцировки ЭСК изменяются размеры и форма клеток, в том числе и ядерно-цитоплазматическое соотношение.

Кроме того, описан апоптоз лимфоцитов крови человека и методы его изучения. К характерным признакам апоптоза принято относить: дегидратационное сжатие

клеток, утрату межклеточных контактов, сморщивание цитоплазматической мембраны, разрушение цитоскелета, конденсацию хроматина, фрагментацию ядер и деградацию ДНК. Методы изучения апоптоза достаточно разнообразны, и чрезвычайно удобным и информативным является метод, при котором регистрируется ранний признак апоптоза – экспрессия на поверхности клеток фосфатидилсерина. Для обнаружения этой экспрессии используют конъюгат аннексина V, который обладает сродством к фосфатидилсерину, с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ).

В разделе 1.2 описаны неполяризационные и поляризационные экспериментальные методы измерения светорассеяния моноклеарных клеток, которыми являются, в частности, эмбриональные стволовые клетки, T- и B-лимфоциты. Благодаря внедрению сканирующей проточной цитометрии к настоящему моменту достигнуты значительные успехи в изучении оптических характеристик клеток крови. Применение данной технологии расширило понимание оптических характеристик красных кровяных клеток, тромбоцитов, лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов человека, а результатом исследования стала разработка оптической клеточной модели, позволившей решить задачу характеризации, т.е. обратную задачу светорассеяния. Но разработанные оптические модели довольно просты и не могут надлежащим образом описывать сложные формы и внутренние структуры клетки. Поэтому для характеризации клеток со сложной формой и внутренней структурой необходимо вместе с измерением угловой зависимости элемента S_{11} для матрицы Мюллера измерять также и другие элементы этой матрицы или их комбинации.

Раздел 1.3 посвящён обзору существующих методов моделирования светорассеяния, которые можно разделить на строгие и приближённые. К последним относятся приближения Рэлея, Рэлея-Дебая-Ганса (РДГ) и Вентцеля-Крамерса-Бриллюена (ВКБ), аномальная дифракция (АД) и геометрическая оптика. Приближённые теории обладают быстротой и простотой, однако границы их применимости не определены чётко, так как их точность сильно зависит от формы частицы и от того, какую именно величину требуется вычислить. Клетки крови лишь частично попадают в область применимости РДГ, АД и ВКБ. Строгие методы, в свою очередь, удобно разделить на аналитические, частично аналитические и численные. К аналитическим методам относятся различные варианты метода разделения переменных (МРП), которые практически применимы только к шарам и сфероидам, возможно многослойным. Частично аналитические методы базируются на разложении решения дифференциального уравнения для электрического поля в частотной области в ряд по собственным функциям этого уравнения. К ним относятся обобщённый МРП, дискретизированный формализм Ми, метод согласования в конечном числе точек и метод расширенных граничных условий. Все эти методы позволяют вычислить T-матрицу, содержащую всю необходимую информацию для быстрого моделирования светорассеяния частицей в любой ориентации или для усреднения по ориентации. Они существенно упрощаются для осесимметричных частиц, в этом случае они быстры и точны. Однако, если осесимметричная частица имеет вогнутости, применение вышеописанных методов сильно осложняется. Существуют частично аналитические методы, применимые к таким задачам, например, метод дискретных источников

(МДИ) и программа на основе нескольких мультиполей, хотя они и не вычисляют Т-матрицу. В принципе, некоторые поверхностные методы применимы к однородным частицам произвольной формы, но тогда их быстродействие сравнимо с численными методами. Неоднородные частицы произвольной формы составляют область применения численных методов, которые напрямую дискретизируют дифференциальные или интегральные уравнения для электромагнитного поля. К ним относятся метод конечных разностей во временной области (КРВО), метод конечных элементов, метод моментов (ММ) и метод дискретных диполей (МДД).

В данной диссертации объектами исследования являются моонуклеарные клетки, описываемые моделью двухслойного шара, димеры шаров (осевая симметрия) и модель двухслойного шара с неоднородностью в ядре. Для сферически-симметричных частиц быстрым и надёжным методом является теория Ми, в частности программа Борена-Хаффмана. Для касающихся димеров шаров надёжным методом является метод Т-матриц, в частности программа Мищенко. Для моделирования светорассеяния неоднородной моделью выбран МДД, в частности программа ADDA. Одним из факторов в пользу данного метода является то, что МДД показал себя намного быстрее чем КРВО для моделирования светорассеяния биологическими объектами в жидкости.

В разделе 1.4 описаны существующие подходы к решению обратной задачи светорассеяния. Для анализа одиночных частиц в реальном времени наиболее предпочтительны эмпирические или приближённые методы, которые обычно основаны на сжатии информации, содержащейся в индикатрисе, до нескольких специально подобранных параметров, которые получаются либо напрямую из индикатрисы, либо из её спектра Гегенбауэра или Фурье. При этом многомерное отображение параметров частицы (размер, показатель преломления и т.д.) в параметры индикатрисы обращается приближённо. Обобщением этого подхода является нейронная сеть, которая автоматически обращает многомерное отображение, – в настоящее время эта область быстро развивается, но для характеристики одиночных частиц нейронные сети применялись пока только для шаров. Эффективность сильно зависит от используемых параметров индикатрисы, которые подбираются вручную.

Методологически самым простым способом решения обратной задачи светорассеяния является прямая подгонка экспериментальной индикатрисы по результатам решения прямой задачи для многих наборов параметров. В данной диссертации обратная задача светорассеяния решается для моонуклеарных клеток, моделируемых двухслойным шаром, и для димеров полистирольных микросфер. В обоих случаях основой алгоритма, посредством которого решалась обратная задача, является глобальная оптимизация с помощью алгоритма DiRect. При этом для оценки погрешностей определения характеристик клеток используется оригинальный алгоритм, основанный на анализе поверхности суммы квадратов, как функции характеристик клетки, описанной в процессе работы DiRect.

Вторая глава посвящена модернизации существующего проточного цитометра для получения дополнительной информации о структуре поля рассеяния, возникающего в результате взаимодействия лазерного излучения с клетками крови. В частности, разработаны принципы измерения поляризационной индикатрисы светорассеяния, изготовлен и установлен в блок измерения цитометра поляризационный канал, создано математическое обеспечение для визуализации и обработки результатов измерения поляризационной индикатрисы светорассеяния.

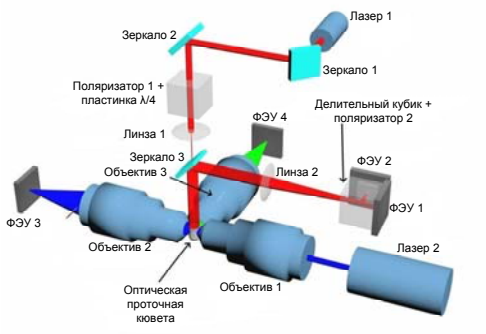


Рис. 1. Схема оптической системы усовершенствованного сканирующего проточного цитометра.

В первом разделе описана оптическая схема поляризационного сканирующего проточного цитометра (рис. 1). Модернизированная установка позволяет измерять одновременно регулярные и поляризационные индикатрисы одиночных частиц с угловым разрешением не хуже 0.4° .

В разделе 2.2 оптическая передаточная функция современной измерительной системы поляризационного сканирующего проточного цитометра, включающей лазеры, поляризаторы, фазовые детекторы, частицы, кюветы и фотодетекторы, описывается в формализме матриц Мюллера. Модернизированный сканирующий проточный цитометр позволяет измерять две независимые комбинации элементов матрицы Мюллера:

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

$$I_p(\theta) = \int_0^{2\pi} [(S_{21}(\theta, \varphi) + S_{24}(\theta, \varphi)) \cos(2\varphi) - (S_{31}(\theta, \varphi) + S_{34}(\theta, \varphi)) \sin(2\varphi)] d\varphi.$$

Нужно отметить, что $\int_0^{2\pi} S_{14}(\theta, \varphi) d\varphi = 0$ для частиц, имеющих ось симметрии бесконечного порядка. При измерении светорассеяния сферических частиц проявляется важная особенность сканирующего проточного цитометра: элементы матрицы рассеяния не зависят от азимутального угла φ и элемент $S_{14} \equiv 0$ для сферической частицы, из чего следует, что

$$I_r(\theta) \propto S_{11} \quad (2)$$

$$I_p(\theta) = 0$$

В разделе 2.3 представлен блок приёма данных сканирующего проточного цитометра. Оптическая система сканирующего проточного цитометра предполагает измерение с помощью фотосенсорных модулей четырех сигналов: импульсов

запуска и флуоресценции, регулярных и поляризационных сигналов светорассеяния. Модули включают усилители и фильтры нижних частот третьего порядка с пределом верхней частоты 4 МГц. Сигналы далее усиливаются и дополнительно фильтруются фильтром нижних частот второго порядка с той же частотой. Все сигналы ФЭУ оцифровываются отдельным 14-битовым аналого-цифровым преобразователем. Сбор данных запускается с помощью компьютерной программы. На первом этапе мы получаем регулярный сигнал светорассеяния, где интенсивность светорассеяния – функция отсчетов аналого-цифрового преобразователя. Далее сигнал светорассеяния преобразуется в индикатрису умножением на коэффициент нормализации сканирующего

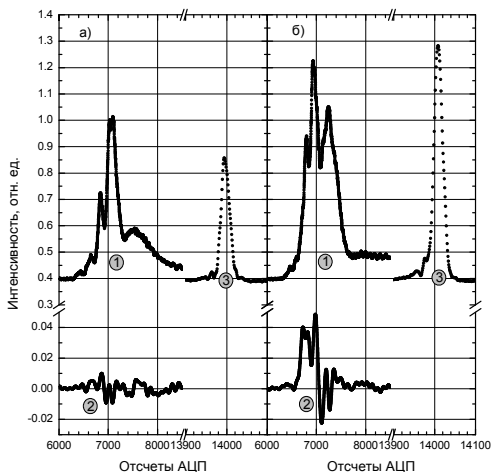


Рис. 2. Сигналы светорассеяния и флуоресценции от шара (а) и от бисферы (б), измеренные сканирующим проточным цитометром. Цифры соответствуют: 1 – регулярному сигналу светорассеяния; 2 – поляризационному сигналу светорассеяния; 3 – импульсу флуоресценции.

проточного цитометра и преобразованием отсчётов аналого-цифрового преобразователя в углы рассеяния. После этого индикатрису модифицируется умножением весовой функции, что дает взвешенную индикатрису светорассеяния. Весовая функция является приблизительным выражением нормирующего коэффициента аппаратной функции сканирующего проточного цитометра. Фактически весовая функция обеспечивает корректное отношение сигнал/шум в области углов соответствующим измеряемым экспериментальным данным. Такие преобразования применялись и к регулярному, и к поляризационному сигналам светорассеяния.

В разделе 2.4 описана проверка настройки поляризационного сканирующего проточного цитометра. Обнаружено полное соответствие между экспериментальными измерениями и теоретическим моделированием для шара в диапазоне углов от 10° до 70° . В соответствии с утверждением (2) выполнена точная юстировка лазерного луча и траектории частиц с помощью измерения сигнала светорассеяния шаров. Точность настройки сканирующего проточного цитометра контролировалась по поляризационному сигналу светорассеяния от шаров. Естественно, что поляризационный сигнал светорассеяния от шаров колеблется около нуля, что соответствует $I_p(\theta)$ из уравнения (2). Данный факт служит индикатором правильной настройки оптической и гидродинамической систем сканирующего проточного цитометра.

Стандартный сигнал от димера шаров представлен на рис. 2(б). Также показаны: регулярный сигнал светорассеяния – 1, поляризационный сигнал светорассеяния – 2 и импульс флуоресценции – 3. Поляризационный сигнал светорассеяния димеров значительно превосходит уровень шума, а структура регулярного сигнала

светорассеяния от димеров была более сложной в сравнении с регулярным сигналом светорассеяния от отдельных шаров.

Поляризационный канал сканирующего проточного цитометра предполагает дополнительную проверку соответствия экспериментальных данных и теории Ми. Были измерены те же шары без четвертьволновой пластинки в оптической системе сканирующего проточного цитометра, чему соответствует линейная поляризация падающего излучения. В этом случае также наблюдается хорошее соответствие между экспериментальными и теоретическими данными.

Третья глава посвящена развитию методов решения обратной задачи светорассеяния. Предложена оптическая модель лимфоцитов, а также развиты спектральный метод, метод глобальной оптимизации Левенберга-Марквардта в режиме мультистарта и метод глобальной оптимизации с использованием алгоритма DiRect. Также предложен метод характеристики димеров сферических микрочастиц, использующий поляризационную индикатрису светорассеяния.

В первом разделе предложена оптическая модель лимфоцитов. Лимфоцит имеет почти сферическую форму и одно ядро. Конфокальный микроскоп Carl Zeiss LSM 510 META использовался для разработки оптической модели лимфоцитов. 3D изображения нескольких клеток получены конфокальной микроскопией, и сечение одного из них представлено на левой части рис. 3. Можно увидеть, что двухслойный шар – это адекватная модель первого порядка, и данная модель использовалась для решения обратной задачи светорассеяния. Очевидно, что ядро не абсолютно однородно, поэтому для изучения влияния такой неоднородности ядра на светорассеяние была усовершенствована оптическая модель добавлением сплюснутого сфероида в ядро (рис. 3 справа). Также данная модель использовалась для проверки результатов алгоритмов глобальной оптимизации при наличии модельных ошибок. Таким образом, глобальная оптимизация в нашем случае основывается на более простой модели двухслойного шара, в то время как более сложная модель использовалась только для нескольких случаев моделирования.

В разделе 3.2 развит спектральный метод характеристики. В данной работе используется Фурье-спектр индикатрисы, который использовался ранее для однородных шаров, но уже для определения характерных размеров двухслойного концентрического шара. Для двухслойного шара имеется четыре характерных размера (диаметр клетки D_c , ядерно-цитоплазматическое отношение D_n/D_c , показатель преломления цитоплазмы m_c и показатель преломления ядра m_n), а спектр индикатрисы такой частицы содержит четыре пика. Положение этих пиков пропорционально соответствующим характерным размерам, что, позволило построить алгоритм определения обоих диаметров по положениям пиков в спектре.

В разделе 3.3 представлено развитие метода глобальной оптимизации Левенберга-Марквардта в режиме мультистарта. Суть этого метода заключается в

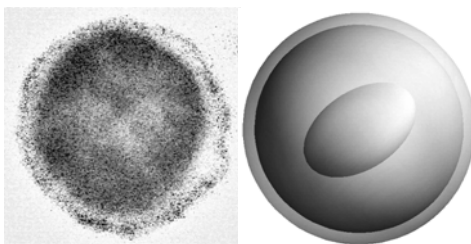


Рис. 3. Сечение конфокального изображения (слева) и (усовершенствованная) оптическая модель (справа) лимфоцита.

поиске наилучших параметров модели концентрического двухслойного шара из заданного интервала. При разработке методов глобальной оптимизации в первую очередь учитывают свойства целевой функции и допустимого множества рассматриваемого класса систем, для которых разрабатывается метод. Одним из возможных подходов в отсутствии априорной информации о минимизируемой функции является метод мултистарта. В нашем случае целевой функцией является среднеквадратичное отклонение (СКО) десятичного логарифма модельной индикатрисы, вычисленной по теории Ми, от логарифма индикатрисы частицы. В качестве алгоритма регрессии (поиска локального минимума) был использован метод Левенберга-Марквардта, который превосходит по производительности метод наискорейшего спуска и другие методы сопряженных градиентов в различных задачах.

В разделе 3.4 предложен метод характеристики, использующий алгоритм DiRect. Решение обратной задачи выполнено методом наименьших квадратов, т.е. минимизацией взвешенной суммы квадратов:

$$S(\boldsymbol{\beta}) = \sum_{i=1}^N z_i^2, \quad z_i = w(\theta_i)(I_{th}(\theta_i, \boldsymbol{\beta}) - I_{exp}(\theta_i)), \quad (3)$$

где $\boldsymbol{\beta}$ – это вектор p параметров модели, а I_{th} и I_{exp} – это теоретические и экспериментальные индикатрисы соответственно. Для лимфоцитов индикатриса, рассчитанная из ур. (1), характеризуется осцилляторной структурой, поэтому функция $S(\boldsymbol{\beta})$ имеет разные локальные минимумы, что может представлять проблему для прямых (локальных) алгоритмов оптимизации. Для решения данной проблемы мы используем алгоритм DiRect, что обеспечивает всесторонность исследования пространства параметров, описанного 4-размерным прямоугольным параллелепипедом \mathbf{B} . Этот алгоритм требует большого количества расчетного времени (несколько минут на лимфоцит). Однако в дополнение к обнаружению глобального минимума $S(\boldsymbol{\beta})$, т.е. лучшей оценки $\boldsymbol{\beta}_0$, приблизительно описывается вся поверхность наименьших квадратов, что далее используется для оценки ошибок параметров.

Варируются следующие клеточные характеристики: диаметр клетки D_c , соотношение диаметра ядра к диаметру клетки D_n/D_c , коэффициенты преломления цитоплазмы m_c и ядра m_n . Область \mathbf{B} определяется их граничными значениями: $D_c \in [4.5, 10]$ мкм, $D_n/D_c \in [0.7, 0.95]$, $m_c \in [1.34, 1.41]$, $m_n \in [1.41, 1.58]$, перекрывающими диапазон морфологических характеристик лимфоцита.

Предложенный метод характеристики позволяет определить ошибки определения параметров. В нашем случае существует значительная зависимость между отклонениями z_i , которая может характеризоваться модельной автокорреляционной функцией ρ_k . Существуют точные методы работы с коррелированными экспериментальными ошибками, однако они являются довольно трудоемкими. В данной диссертации используется намного более простой метод. Известно, что сумма квадратов случайно распределенных зависимых случайных величин может быть приблизительно описана распределением χ^2 , если зависимость между случайными величинами может быть описана стационарным гауссовским процессом, т.е. если он полностью характеризуется ρ_k . Количество эффективных степеней свободы результирующего распределения χ^2 :

$$n = \frac{N^2}{N + 2 \sum_{k=1}^{N-1} (N-k) \rho_k^2}, \quad (4)$$

Далее мы применяем Байесовский подход: $P(\sigma; \boldsymbol{\beta}) \sim \sigma^{-1}$. Постериорная плотность вероятности $\boldsymbol{\beta}$ в экспериментальной индикатрисе определяется таким образом: $P(\boldsymbol{\beta} | I_{\text{exp}}) = \kappa [S(\boldsymbol{\beta})]^{-n/2}$, где κ – это нормирующая константа:

$$\kappa = \left(\int_{\mathbf{B}} [S(\boldsymbol{\beta})]^{-n/2} d\boldsymbol{\beta} \right)^{-1}, \quad (5)$$

Для расчета интегралов, включающих $[S(\boldsymbol{\beta})]^{-n/2}$, по \mathbf{B} используется результат алгоритма DiRect – деление \mathbf{B} на M ($\sim 10^4$) частей с объемами V_i и центрами $\boldsymbol{\beta}_i$; с величинами $S_i = S(\boldsymbol{\beta}_i)$, которые также известны. Среднее $f(\boldsymbol{\beta})$ рассчитывается следующим образом:

$$\langle f(\boldsymbol{\beta}) \rangle = \kappa \int_{\mathbf{B}} f(\boldsymbol{\beta}) [S(\boldsymbol{\beta})]^{-n/2} d\boldsymbol{\beta} = \kappa \sum_{i=1}^M f(\boldsymbol{\beta}_i) S_i^{-n/2} V_i, \quad \kappa = \left(\sum_{i=1}^M S_i^{-n/2} V_i \right)^{-1}. \quad (6)$$

Поскольку мы знаем полное распределение вероятности параметров любой измеренной частицы, то можем найти любые статистические характеристики данного распределения. В настоящей работе мы рассчитываем математическое ожидание $\boldsymbol{\mu} = \langle \boldsymbol{\beta} \rangle$ и матрицу ковариаций $\mathbf{C} = \langle (\boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\mu})(\boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\mu})^T \rangle$, используя ур. (6), поскольку в большинстве случаев распределение вероятности хорошо описывается многомерным нормальным распределением.

По известным характеристикам для каждого лимфоцита с известными ошибками определения этих характеристик (т.е. $\boldsymbol{\mu}_i$ и \mathbf{C}_i , $i = 1, \dots, N_s$, N_s – количество анализируемых клеток), предложен метод оценки среднего и биологической вариабельности для всей пробы. Преимущество данной процедуры – автоматическое снижение относительного веса измерений с большими ошибками. Поэтому мы можем естественным образом включить все измерения в оценку характеристики клеток, даже те, которые кажутся ненадежными из-за больших сумм квадратов и/или стандартных отклонений характеристик.

В разделе 3.4 предложен метод характеристики димеров сферических частиц с помощью поляризационного сканирующего проточного цитометра.

Мы характеризуем бисферу по размерным параметрам $x_{1,2} = \pi d_{1,2} n_0 / \lambda$, где $d_{1,2}$ – размеры шаров, составляющих димер, λ – длина волны падающего лазерного луча, n_0 – коэффициент преломления окружающей среды; относительные коэффициенты преломления $m_{1,2} = n_{1,2} / n_0$, где $n_{1,2}$ – коэффициенты преломления шаров, составляющих димер. Углы Эйлера таковы: угол β – это угол между направлением оси симметрии димера и направлением распространения лазерного луча (осью z), а угол α – это угол между проекцией оси симметрии димера в плоскости x, y и осью x , соответствующий направлению детекторного поляризатора оптической системы сканирующего проточного цитометра (Поляризатор 2 на рис. 1). Мы применяли алгоритм DiRect, используя метод Т-матриц для решения прямой задачи для бисферы, характеристики которой варьировались в следующих диапазонах: размерный параметр и относительный коэффициент преломления шаров,

составляющих димер от 12 до 14 и от 1.12 до 1.24, соответственно; углы α и β от 0° до 180° и от 0° до 90° соответственно. Для одновременного использования независимой информации, содержащейся в регулярной и поляризационной взвешенных индикатрисах, алгоритм реализовывался в три этапа. На первом этапе алгоритм DiRect применялся к регулярной взвешенной индикатрисе, варьировались $x_{1,2}$, $m_{1,2}$ и угол β , поскольку регулярная взвешенная индикатриса не зависит от угла α . Четыре характеристики бисферы и угол β получались на первом этапе решения обратной задачи светорассеяния. Далее мы применяли алгоритм DiRect к поляризационной взвешенной индикатрисе, варьируя углы Эйлера и фиксируя характеристики бисферы, полученные на первом этапе. Второй этап дал нам откорректированные углы α и β . Также рассчитано СКО регулярных и поляризационных экспериментальных взвешенных индикатрис от теоретических, найденных методом глобальной оптимизации. Экспериментальные точки поляризационной взвешенной индикатрисы умножили на коэффициент, чтобы уравнивать СКО, рассчитанные на предыдущих двух этапах. На третьем этапе решения регулярная и домноженная на коэффициент поляризационная взвешенные индикатрисы были объединены, и алгоритм DiRect применялся для “сшитой” взвешенной индикатрисы при варьировании всех 6 характеристик. Таким образом, решение обратной задачи светорассеяния для одиночной бисферы позволяет определить четыре характеристики бисферы и углы Эйлера.

В четвёртой главе представлены результаты проведенных исследований модельных систем (полимерные микросферы и их димеры) с одновременным измерением основной и поляризационных индикатрис светорассеяния. Продемонстрированы возможности светорассеяния в определении доли Т-лимфоцитов в периферийной крови человека. Представлены экспериментальные результаты характеризации эмбриональных стволовых клеток, Т- и В-лимфоцитов крови человека и экспериментальное исследование апоптоза лимфоцитов крови человека. Первый раздел посвящён измерению бисфер. Мы использовали микросферы, поверхность которых модифицирована карбоксильными группами. Такие микросферы самопроизвольно агрегируют, образуя бисферы. Проба, содержащая мономеры и димеры шаров, измерена поляризационным сканирующим проточным цитометром.

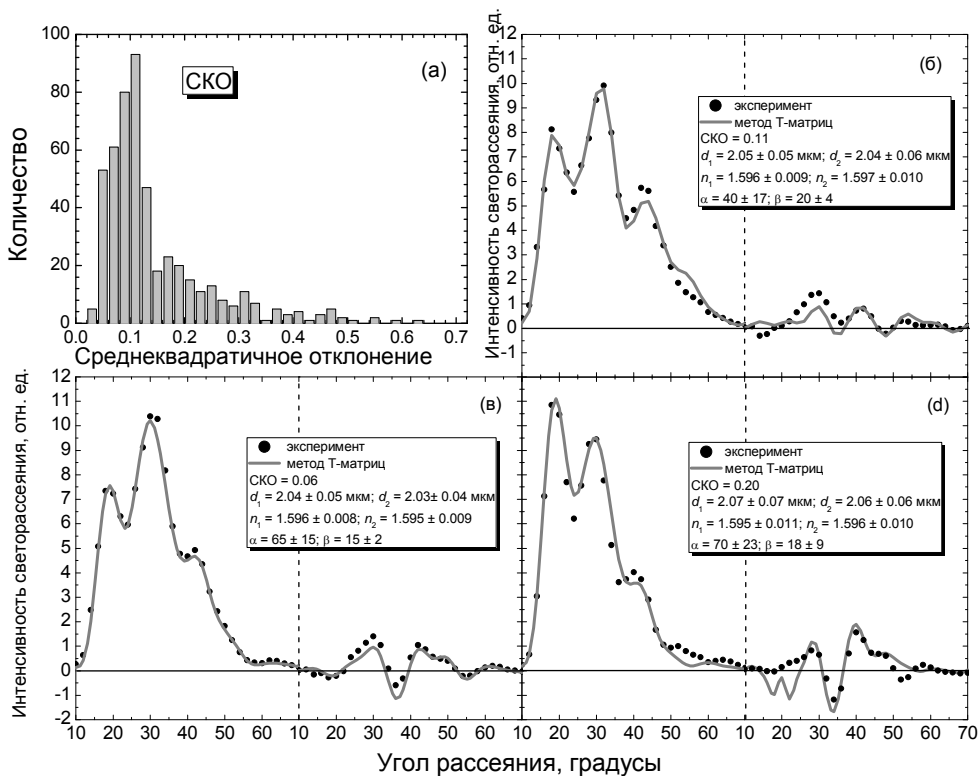


Рис. 4. Распределение среднеквадратичного отклонения регулярных и поляризационных взвешенных индикатрис бисфер от теоретических, полученных в результате глобальной оптимизации – (а). Результаты глобальной оптимизации применительно к сшитой регулярной и поляризационной взвешенным индикатрисам бисфер – (б), (в), (г).

Мы проанализировали 500 бисфер и получили распределение SKO (рис. 4(а)). Результаты решения ОЗС для трех бисфер с разными SKO показаны на рис. 4(б)-(г). Также на рис. 4(б)-(г) приведены теоретические взвешенные индикатрисы, полученные методом наименьших квадратов и рассчитанные методом Т-матриц. Кроме того, приведены характеристики бисферы и углы Эйлера для каждого шара с ошибками определения этих характеристик и углов.

Основная проблема при измерении поляризационной индикатрисы – это относительно слабый сигнал. К счастью, мы добились 1% соотношения сигнал/шум для поляризационного сигнала в сравнении с регулярным, а поляризационная индикатриса светорассеяния показала хорошее соответствие с теорией Ми в двух сериях экспериментов.

Дополнительные данные о светорассеянии, т.е. о поляризационной индикатрисе, позволили решить обратную задачу светорассеяния для бисферы, результатом чего явилась подробная характеристика пробы (таблица 1). Средний размер шаров в димерах рассчитывался путем усреднения размеров шаров, составляющих димер в пробе. Также приведены средние значения и их стандартные отклонения для

размера, коэффициента преломления и углов Эйлера. Статистические результаты, приведенные в таблице 1, демонстрируют абсолютное соответствие характеристик шаров, полученных из двух разных решений обратной задачи светорассеяния. При этом важно, что эти решения основаны на двух разных методах решения прямой задачи светорассеяния – теории Ми и метода Т-матриц. Размер шара в мономерах определялся со средней погрешностью в 13 нм, в то время как в димерах – 49 нм.

В разделе 4.2 представлены результаты характеристики мышинных эмбриональных стволовых клеток спектральным методом и методом Левенберга-Марквардта в режиме мультистарта (таблица 2). Для каждого алгоритма показана доля успешно обработанных клеток и результаты определения параметров клеток в формате «среднее ± дисперсия» (по всей пробе).

В разделе 4.3 представлены первые экспериментальные измерения абсолютного дифференциального сечения светорассеяния лимфоцитов крови человека. Дифференциальное сечение рассчитывалось по следующей формуле:

$$\frac{d\sigma}{d\theta} = I(\theta) \left(\frac{\lambda}{2\pi m_0} \right)^2, \quad (7)$$

где I – это индикатриса СПЦ [ур. (1)], λ – это длина волны падающего света, m_0 – это коэффициент преломления окружающей среды.

Метод проточной цитометрии уже ранее применялся для изучения субпопуляций лимфоцитов. Однако возможность определения доли Т-лимфоцитов в крови этим методом в данном разделе диссертации демонстрируется впервые. Анализ лимфоцитов проводился на сканирующем проточном цитометре с одновременным измерением светорассеяния и специфической флуоресценции одиночных клеток. Флуоресценция была вызвана излучением флуорохрома, связанного с моноклональным антителом, специфичным к определенному типу лимфоцитов. Анализ особенностей светорассеяния лимфоцитами различных типов позволил выявить зависимость асимметрии распределения параметров светорассеяния лимфоцитов от доли Т-лимфоцитов в пробе. Метод обеспечил определение доли Т-лимфоцитов в крови с ошибкой не хуже чем 4.5% (абсолют.). Анализ по предложенной нами методике занимает 10-15 минут, в то время как иммунофлуоресцентный анализ занимает десятки минут. Кроме того, современные методы количественного анализа

Таблица 1 Характеристики мономеров и шаров в димерах, полученные в результате решения ОЗС, используя одновременно регулярные и поляризационные индикатрисы.

Характеристики		Мономеры шаров	Шары в димерах
Средний размер, мкм	Ср. зн.	2.049±0.001	2.050±0.002
	Ст. откл.	0.043	0.066
Коэффициент преломления	Ср. зн.	1.5975±0.0004	1.5975±0.0005
	Ст. откл.	0.014	0.016
Угол Эйлера α , градус			Равномерное распределение от 0 до 180
Угол Эйлера β , градус	Ср. зн.	–	18.4±0.4
	Ст. откл.	–	9

Таблица 2 Результаты характеристики эмбриональных стволовых клеток

Параметр	Спектрал.	Глоб. оптим.
Доля обраб.	35%	28%
D_c	11.0 ± 4.7 мкм	10.7 ± 1.1 мкм
D_n/D_c	0.85 ± 0.04	0.82 ± 0.04
m_c	–	1.38 ± 0.05
m_n	–	1.43 ± 0.01

субпопуляций лимфоцитов очень дорогостоящи по сравнению с нашим методом. Таким образом, разработана сравнительно дешевая методика определения доли Т-лимфоцитов среди всех лимфоцитов по рассеянному ими свету, и эта доля является важной характеристикой иммунного статуса человека.

Также в данном разделе представлены результаты апробации разработанных методов характеристики на Т- и В-лимфоцитах (таблица 3). Как было обнаружено, основная разница в морфологии Т- и В-лимфоцитов – это большие средние диаметры последних. Однако эта разница меньше естественной биологической вариабельности одиночной клетки. Полагаем, что неоднородность ядра – это возможная причина отклонения измеренных индикатрис реальных лимфоцитов от рассчитанных для модели двухслойного шара.

Также выполнено предварительное моделирование с использованием более сложной модели, полученной на основе анализа конфокальных изображений реальных лимфоцитов. Из результатов характеристики можно предположить, что отклонения индикатрис реальных лимфоцитов от наиболее точно соответствующих индикатрис двухслойных шаров может быть вызвано неоднородностью ядра. Более того, такая неоднородность, возможно, немного менее выражена для В-, чем для Т-лимфоцитов, что приводит, в основном, к меньшим ошибкам в оценках параметров первого из двух. Однако гораздо более подробное исследование требуется для любого определенного вывода о точной форме неоднородности ядра лимфоцитов и его воздействии на их индикатрисы.

В настоящее время обработка одной индикатрисы предполагаемым методом занимает приблизительно 150 секунд с помощью современного компьютера (1.8 ГГц). На поверхности наименьших квадратов в зависимости от конкретной индикатрисы было выявлено до пяти локальных минимумов. На настоящий момент мы сконцентрировали внимание на надежности алгоритма (достигая глобальных минимумов и достаточно детального описания поверхности наименьших квадратов) и не занимались его вычислительной эффективностью. Для возможности включения данного метода в стандартный анализ клеток крови требуется уменьшение времени обработки на два порядка. Это важная цель для будущего исследования.

В разделе 4.4 представлен альтернативный подход к исследованию начальных стадий апоптоза на основе измерения морфологических изменений клеток. Основная проблема в таком исследовании состоит в том, что на

Таблица 3 Сравнение модельных характеристик Т- и В-лимфоцитов двух доноров. $\langle \cdot \rangle$, $\sigma(\cdot)$, и $\sigma(\langle \cdot \rangle)$ обозначают оценочное среднее, стандартное отклонение и стандартную ошибку среднего соответственно.

	Донор 1		Донор 6	
	Т	В	Т	В
Размер выборки	225	146	330	86
$\langle D_c \rangle$, мкм	6.31	6.63	6.38	6.63
$\sigma(D_c)$, мкм	0.50	0.65	0.57	0.73
$\sigma(\langle D_c \rangle)$, мкм	0.04	0.06	0.04	0.09
$\langle D_n/D_c \rangle$	0.901	0.904	0.903	0.905
$\sigma(D_n/D_c)$	0.005	0.007	0.005	0.008
$\sigma(\langle D_n/D_c \rangle)$	0.001	0.001	0.001	0.001
$\langle m_c \rangle$	1.3759	1.3766	1.3765	1.3766
$\sigma(m_c)$	0.0026	0.0024	0.0026	0.0027
$\sigma(\langle m_c \rangle)$	0.0005	0.0006	0.0004	0.0008
$\langle m_n \rangle$	1.4479	1.4502	1.4476	1.4490
$\sigma(m_n)$	0.0080	0.0086	0.0080	0.0094
$\sigma(\langle m_n \rangle)$	0.0007	0.0009	0.0006	0.0013

начальной стадии апоптоза в клетке происходят только небольшие морфологические изменения, которые сложно зарегистрировать существующей экспериментальной техникой с достаточной точностью.

Сканирующий проточный цитометр собирает большой объем информации о каждой клетке, и, используя эту информацию, разработанный в данной диссертации метод характеристики обеспечил чрезвычайно высокую (для оптических методов) точность определения параметров лимфоцитов как до индукции апоптоза, так и после. Результаты характеристики, касающиеся размеров клетки и ядра, показаны на рис. 5. Таким образом, получены принципиально новые параметры апоптоза, причем использование данного подхода возможно и для изучения апоптоза под действием онколитических вирусных препаратов.

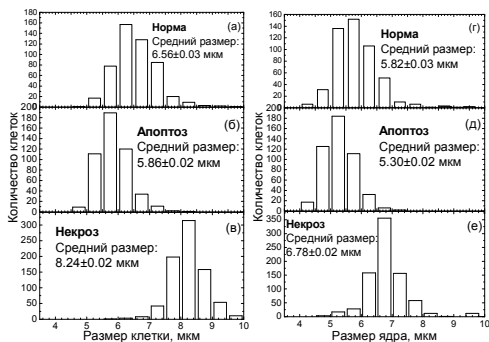


Рис. 5. Распределения по размеру лимфоцитов (слева) и их ядер (справа), полученные в результате характеристики нормальных лимфоцитов (а), (г), лимфоцитов с индуцированным процессом апоптоза (б), (д) и лимфоцитов в некрозе (в), (е). Также показаны средние размеры клеток и их ядер вместе с ошибкой среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ.

1. Модернизирован сканирующий проточный цитометр для измерения поляризационной индикатрисы светорассеяния одиночных частиц. Уровень шума составляет не более 1% от общей интенсивности рассеяния.
2. Разработан метод характеристики бисфер с использованием поляризационной индикатрисы. Погрешность определения размеров составляет от 8 до 88 нм.
3. Разработан метод определения доли Т-лимфоцитов в крови человека. Метод обеспечивает определение доли Т-лимфоцитов в крови с ошибкой не хуже чем 4.5% (абсолют.).
4. Разработан метод характеристики мононуклеарных клеток и применён для:
 - a. Модели двухслойного шара с неоднородностью ядра. Показана адекватность погрешностей определения параметров. Установлено, что неоднородность ядра (с объемной долей 10%) сильно искажает индикатрису и потенциально может объяснить отличие экспериментальных индикатрис от идеальной модели двухслойного шара;
 - b. Эмбриональных стволовых клеток и нормальных лимфоцитов крови человека. Средние по пробе диаметры В-лимфоцитов на 0.3 мкм больше чем у Т-лимфоцитов, однако эта разница меньше естественной биологической вариабельности одиночной клетки;
 - c. Лимфоцитов в апоптозе и некрозе. Уменьшение объёма при апоптозе составляет в среднем 29% за 6 часов и сопровождается соответствующим увеличением показателя преломления. При некрозе происходят обратные изменения.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Strokotov D.I., Yurkin M.A., Gilev K.V., van Bockstaele D.R., Hoekstra A.G., Rubtsov N.B., Maltsev V.P. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? // J. Biomed. Opt. – 2009. – V.14. – P.064036-12.
2. Strokotov D.I., Moskalensky A.E., Nekrasov V.M., and Maltsev V.P. Polarizing light-scattering profile – advanced characterization of non-spherical particles with the scanning flow cytometry. // Cytometry – 2011. – V.79. – P.570–579.
3. Строкотов Д.И., Мун В.И., Семьянов К.А., Мальцев В.П. Определение доли Т-лимфоцитов в крови по светорассеянию. // Вестник НГУ, серия: Физика – 2008. – Т.3. – С.53-58.
4. Строкотов Д.И., Пичугин Ю.Г., Юркин М.А., Гридина М.М., Серов О.Л., Мальцев В.П. Использование решения обратной задачи светорассеяния для характеристики моноклеарных клеток. // Вестник НГУ, серия: Физика – 2009. – Т.2. – С.61-68.

Автореф. дисс. на соискание ученой степени кандидата физико–математических наук

Подписано в печать 18.10.2011. Заказ № 105.
Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз.
Типография Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН