

П.А. Авроров¹, А.В. Клишкин², В.П. Мальцев^{1,3},
К.А. Семьянов¹, П.А. Тарасов¹

Определение размерных параметров одиночных микрочастиц по индикатрисе светорассеяния

¹ Институт химической кинетики и горения СО РАН, г. Новосибирск

² Институт оптики атмосферы СО РАН, г. Томск

³ Новосибирский государственный университет

Поступила в редакцию 8.12.2005 г.

Сканирующий проточный цитометр позволяет измерять непрерывную угловую зависимость интенсивности светорассеяния одиночных микрочастиц в диапазоне от 10 до 70°. Основным применением цитометра к настоящему времени является характеристика клеток и бактерий в водной среде. Диапазон размеров измеряемых объектов составляет от долей микрометра до десятков микрон, а показателей преломления от 1,37 до 1,7. Рассмотрен простой способ определения параметров микрочастиц на основе анализа Фурье-образа модифицированной индикатрисы светорассеяния. Пики в Фурье-образе ассоциируются с резонансами на характерных размерах микрочастиц, что в случае гомогенных сфер позволяет определять диаметр частиц с высокой точностью. Приводятся результаты применения данного подхода к характеристике несферических объектов — клеток крови: тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов.

Сканирующий проточный цитометр

Сканирующий проточный цитометр (СПЦ) является оригинальной отечественной разработкой [1] и в отличие от цитометров стандартной конфигурации позволяет измерять непрерывную угловую зависимость интенсивности светорассеяния одиночных микрочастиц в диапазоне углов от 10 до 70° (далее — индикатрису).

Принцип действия данного прибора заключается в следующем. Гидрофокусирующая головка СПЦ создает два concentрических потока жидкости: внутренний (диаметр около 10 мкм), в котором движутся анализируемые частицы, и внешний (250 мкм, равный диаметру капилляра), очищенный от частиц с помощью мембранного фильтра (диаметр пор фильтра — 0,2 мкм). Основное лазерное излучение фокусируется через оптическое окно в кювету. Направление распространения излучения — от точки 0 к 1, 2.

Фокусировка лазерного луча в оптической кювете обеспечивает постоянную освещенность движущейся частицы во время измерения индикатрисы. При любом расположении частицы внутри измерительной зоны сферическим зеркалом (радиус ~3 мм) параллельно оси потока отразится свет, рассеянный частицей только под определенным углом θ . Например, углы θ_1 и θ_2 соответствуют положению частицы в точках 1 и 2 (рис. 1). При движении частицы внутри зоны регистрации оптической кюветы величина угла, образованного направлением падающего луча и рассеянным лучом, который отражается параллельно оси потока, непрерывно изменяется от θ_1 до θ_2 .

Параллельные лучи, выходящие из оптической кюветы, отражаются зеркалом под углом 45° (не

показано) и фокусируются линзой на диафрагму, расположенную на входном окне фотоумножителя. Зависимость напряжения на фотоумножителе от времени преобразуется в зависимость интенсивности светорассеяния от угла, в качестве привязки используется дополнительный сигнал от пересечения частицей «триггерного» луча (точка 0 на рис. 1).

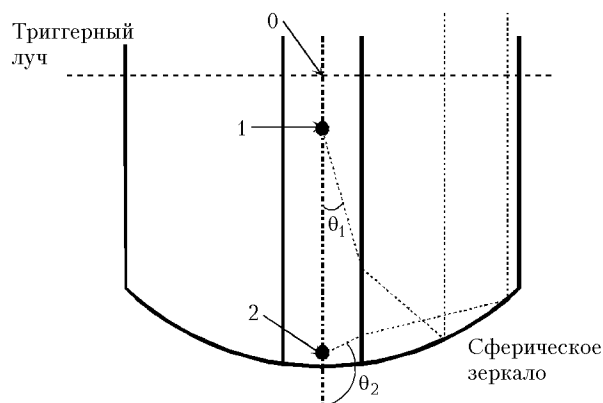


Рис. 1. Упрощенная схема функционирования оптической кюветы. Основной и триггерный лучи, а также лучи рассеяния показаны штриховыми линиями

В настоящее время принцип СПЦ используется для измерения параметров частиц в водной среде. Длина волны излучения лазера соответствует видимой области спектра. Диапазон размеров измеряемых объектов составляет от долей микрометра до десятков микрон, а показателей преломления — от 1,36 до 1,7.

Для получения информации о морфологии клетки необходимо решать обратную задачу светорассеяния, в то время как даже расчет прямой за-

дачи для частиц произвольной морфологии в общем случае требует больших вычислительных затрат.

При поиске простых методов решения обратной задачи было найдено, что разложение в спектр индикатрисы светорассеяния дает наглядную информацию о характерных размерах сферической частицы.

Принцип измерения размеров

В алгоритме определения размеров по индикатрисе имеются три существенных аспекта, требующих пояснения: 1) модификация индикатрисы для выделения пиков в ее частотном спектре, 2) связь положения этих пиков с размерными параметрами, 3) способ нахождения в спектре «последнего» значащего пика, амплитуда которого может быть невелика.

Модификация индикатрисы состоит в перемножении расшифрованной угловой зависимости светорассеяния с «пиковой» функцией $F(\theta)$, определяемой как

$$F(\theta) = \sin^2\left(\pi \frac{\theta - 10^\circ}{70^\circ - 10^\circ}\right). \quad (1)$$

Данное перемножение соответствует процедуре фильтрации окном Ханнинга и убирает разрывы на границах измеряемого сигнала. Кроме того, «пиковая» функция на качественном уровне совпадает с передаточной функцией СПЦ, делая оптимальным анализ полученных сигналов с точки зрения отношения сигнал-шум. Ниже все индикатрисы представлены в модифицированной форме.

Фурье-спектр модифицированной индикатрисы светорассеяния гомогенной сферической частицы содержит хорошо выраженный пик. В работе [2] для гомогенной сферической частицы было получено уравнение, связывающее положение пика в спектре индикатрисы и размерного параметра:

$$\alpha = 189,12P_f, \quad (2)$$

где $\alpha = m_0\pi d/\lambda$, d — диаметр частицы, m_0 — коэффициент преломления среды, λ — длина волны падающего излучения; P_f — положение спектрального пика. Уравнение (2) имеет 3%-ю точность для сферических частиц с размерными параметрами от 8 до 100 и коэффициентами преломления в водной среде от 1,37 до 1,70 без поглощения при длине волны излучения в области видимого спектра. Этот диапазон полностью перекрывает коэффициенты преломления частиц, встречающиеся в биологии. Спектр полученной таким образом индикатрисы сферической частицы с двумя слоями имеет четыре пика [3], положение последнего соответствует наибольшему размеру частицы. В широком диапазоне значений размеров и показателей преломления спектр индикатрисы сферы из n слоев содержит n^2 пиков, характеризующих резонансы на соответствующих парах слоев. Положение «последнего» пика соответствует наибольшему размеру частицы [3]. Для несферических частиц можно предположить существование аналогичной зависимости.

Определение размерных параметров одиночных микрочастиц по индикатрисе светорассеяния

В реальном эксперименте необходимо исключить влияние шумов. Шум используемого лазера (мощность 20 мВт, длина волны 632,8 нм) в интересующем нас диапазоне частот составляет 0,5% от полной мощности. Затем для слабых сигналов становится существенным шум АЦП. Он может быть измерен в отсутствие сигнала светорассеяния (составляет 0,0006 в произвольных единицах измерения). Затем уровень шума может быть рассчитан как $L = 0,005M + 0,0006$, где M — максимальное значение измеряемого сигнала. Последний значащий пик может быть определен как последний пик, превосходящий уровень шума L .

Измерение объема (гомогенные сплюснутые сфероиды)

Тромбоциты являются самыми малыми по размеру клетками крови. В норме их концентрация в крови составляет $\sim 3 \cdot 10^8$ мл⁻¹ и уступает лишь концентрации эритроцитов, превосходя на порядок концентрацию остальных клеток. Форма покоящегося тромбоцита близка к сплюснутому сфероиду. Поскольку основная роль тромбоцитов — свертывание крови, в их задачу входят активация и, как следствие, изменение формы в ответ на изменение состава окружающей среды. Именно поэтому, в зависимости от способа подготовки пробы вне организма, форма измеряемых тромбоцитов может различаться. В данной работе в качестве антикоагулянта использовалась этилендиаминтетрауксусная кислота (распространенный способ в подготовке крови для гематологического анализа, хотя и затрагивающий морфологию тромбоцитов [4, 5]).

На рис. 2 показаны типичная индикатриса светорассеяния тромбоцита и ее спектр. Положение максимального по амплитуде пика использовалось в уравнении (2) для вычисления диаметра d сферы эквивалентного объема: $V = \pi d^3/6$.

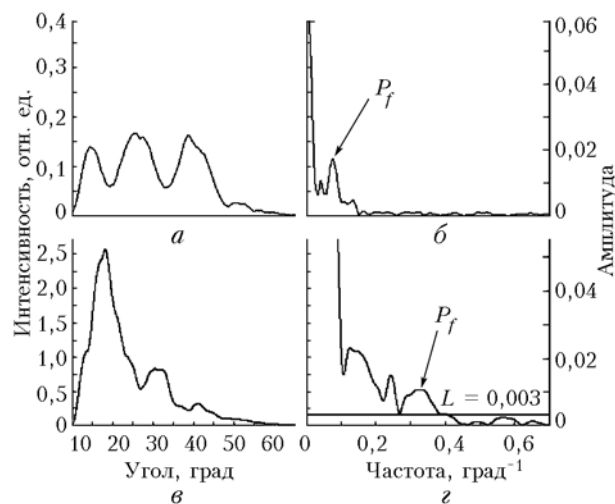


Рис. 2. Примеры модифицированных индикатрис тромбоцита (а) и ее частотного спектра (б), эритроцита (в, з). Уровень шумов L , использующийся для нахождения последнего значащего пика в частотном спектре, показан горизонтальной линией. P_f — положение пика, по которому определяется размер частицы

Распределение по объему тромбоцитов этой же пробы измерялось также на гематологическом анализаторе Coulter MAXM (пунктирная линия, рис. 3).

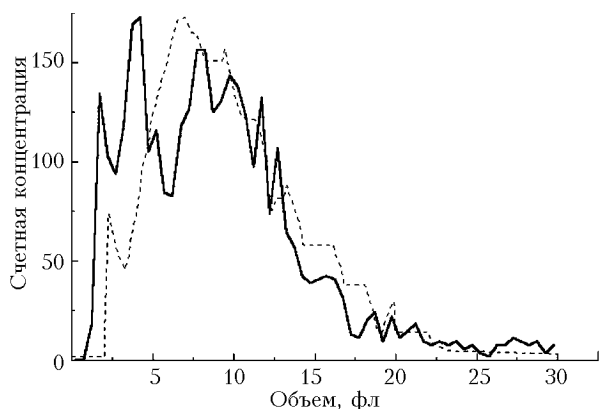


Рис. 3. Сравнение распределений по объему тромбоцитов, полученных на СПЦ (сплошная линия) и на Coulter MAXM (штриховая линия). Полученные средние значения равны 10,3 и 9,4 фл соответственно

Результаты сравнения двух методов измерений представлены на рис. 3. Можно увидеть согласие между двумя методами во всем диапазоне объемов за исключением малых.

Измерение размеров эритроцитов (крупные гомогенные двояковогнутые диски)

В крови человека корпускулярный объем эритроцитов составляет около 50% (концентрация $\sim 5 \cdot 10^9 \text{ мл}^{-1}$). Нормальные эритроциты человека имеют форму двояковогнутого диска. В отличие от большинства других клеток эритроциты млекопитающих лишены ядра. В отличие от тромбоцитов, также не имеющих ядра, эритроциты более устойчивы к внешним воздействиям. Трудности при определении параметров данных клеток связаны с большими вычислительными затратами при расчете прямой задачи светорассеяния на столь крупном и несферическом объекте.

Из предварительного моделирования в приближении дискретных диполей было найдено, что спектр эритроцитов может иметь от одного до трех пиков. При этом положение последнего пика соответствует диаметру двояковогнутого диска. При моделировании эритроциты считались ориентированными «ребром» по отношению к падающему излучению (или, что то же самое, по оси потока). Ориентационный эффект связан с особенностями работы гидрофокусирующей системы прибора, и оценочный разброс по ориентациям эритроцитов лежит в пределах нескольких градусов.

На рис. 2, в, г представлен пример индикатрисы светорассеяния эритроцита и ее спектра. Положение последнего значащего пика определялось с учетом величины шумов L и подставлялось в уравнение (2) для вычисления эффективного диаметра эритроцита d . Среднее значение полученного в результате распределения (не показано) по диаметру

составило 6,7 мкм, величина стандартного отклонения — 1,1 мкм, что находится в рамках значений, известных из литературы.

Измерение размеров лейкоцитов (клетки с формой, близкой к сферической, и сложной структурой)

Концентрация лейкоцитов (белых кровяных телец) в крови на порядок меньше, чем у эритроцитов и тромбоцитов, но именно эти клетки наиболее важны в диагностике. Наиболее высокую концентрацию в организме имеют нейтрофилы (60–80% лейкоцитов), лимфоциты (20–40%) и моноциты (0–10%). Известно, что на данные подклассы лейкоциты легко разделить по светорассеянию.

Все лейкоциты содержат ядро. Морфология лимфоцита наиболее проста: крупное ядро с формой, близкой к сферической, и небольшой слой относительно прозрачной цитоплазмы вокруг него. У моноцита ядро имеет уже более сложную, «бобовидную» форму, окружающая его цитоплазма оптически более плотная, чем у лимфоцита, и обычно содержит гранулы. Наиболее оптически сложная структура у нейтрофила. Его ядро состоит из 2–5 достаточно далеко отстоящих крупных долей произвольной формы и размера. Цитоплазма относительно прозрачна, но содержит большое количество микрогранул.

Разделение лейкоцитов на классы производилось по карте «интеграл × размер», показанной на рис. 4, где представлен интеграл модифицированной индикатрисы светорассеяния от 10 до 70°,

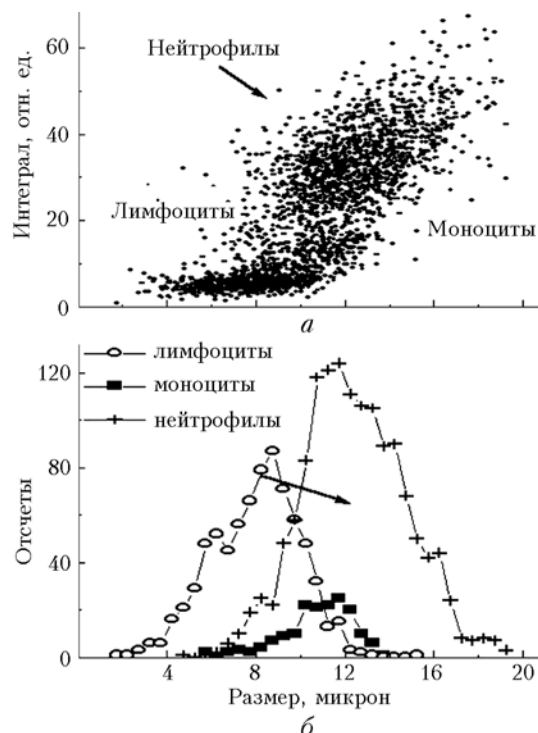


Рис. 4. Карта «интеграл × размер» (а) и распределения лейкоцитов по размерам (б)

а размер определяется по формуле (2). Данный прием аналогичен хорошо известному в традиционной цитометрии [6] эмпирическому разделению по карте «рассеяние в малые углы» × «рассеяние под 90°».

Положение последнего значащего пика (аналогично рис. 2,з) использовалось в уравнении (2) для вычисления размеров лейкоцитов. Полученные распределения по размерам представлены на рис. 4,б. Значения средних размеров и стандартных отклонений составили: $d = 8,0$ мкм и $\sigma = 2,0$ мкм для лимфоцитов, $d = 10,8$ мкм и $\sigma = 1,5$ мкм для моноцитов, $d = 12,4$ мкм и $\sigma = 2,3$ мкм для нейтрофилов, что согласуется с литературными данными.

Таким образом, продемонстрирован простой алгоритм определения размеров неоднородных и несферических частиц. Суть предложенного подхода состоит в анализе положения пиков в спектральном разложении модифицированной индикатрисы светорассеяния одиночных микрочастиц. Таким способом измерены объемы тромбоцитов, диаметры эритроцитов, размеры лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов.

Заключение

Практическим результатом данной работы является разработка алгоритмов анализа популяций клеток крови человека для гематологического анализатора на базе сканирующего проточного цитометра, выпуск первого прототипа которого планируется в течение года. И хотя представленные формулы для определения размеров тромбоцитов и эритроцитов в ближайшее время будут заменены более сложными алгоритмами решения обратной

задачи на основе точного моделирования светорассеяния на этих объектах, представленный подход весьма информативен, так как в определенных случаях позволяет получать размерные параметры частицы без точного знания ее формы. А для такого сложного объекта, как нейтрофил, где даже адекватная постановка прямой задачи моделирования светорассеяния достаточно сложна, экспериментально найденный параметр индикатрисы, описывающий размер данной частицы, особенно важен.

1. *Maltsev V.P.* Scanning flow cytometry for individual particle analysis // *Rev. Sci. Instrum.* 2000. V. 71. P. 243–255.
2. *Semyanov K.A., Tarasov P.A., Zharinov A.E., Chernyshev A.V., Hoekstra A.G., Maltsev V.P.* Single-particle sizing from light scattering by spectral decomposition // *Appl. Opt.* 2004. V. 43. N 26. P. 5110–5115.
3. *Maltsev V.P., Semyanov K.A.* Characterisation of Bio-Particles from Light Scattering. Netherlands: Vista Sci. Press, 2004. 132 p.
4. *Deranleau D.A., Dubler D., Rothen C., Luscher E.F.* Transient kinetics of the rapid shape change of unstirred human blood platelets stimulated with ADP // *Proc. of the National Academy of Science of the United States of America.* 1982. V. 79. N 23. P. 7297–7301.
5. *Saving K., Aldag J., Jennings D., Caughey B., Regan M., Powers W.* Electron microscopic characterization of neonatal platelet ultrastructure: effect of sampling techniques // *Tromb. Res.* 1991. V. 61. P. 65–80.
6. *Salzman G.L., Crowell J.M., Martin J.C., Trujillo T.T., Romero A., Mullaney P.F., LaBauve P.M.* Cell classification by laser light scattering: Identification and separation of unstained leukocytes // *Acta Cytol.* 1975. V. 19. P. 374–377.

P.A. Avrorov, A.V. Klimkin, V.P. Maltsev, K.A. Semyanov, P.A. Tarasov. **Determination of size parameters of individual microparticles from light scattering phase function.**

Scanning flow cytometer allows one to measure continuous angular dependence of light scattering pattern of individual microparticles in the range from 10 to 70 degrees with respect to incident radiation. At present, the main application of SFC is a characterization of biological cells and bacteria disposed in water. Typical range of sizes is from 0.5 to tens of micrometers, and refractive indices – from 1.37 to 1.7. A simple method to determine parameters of a microparticle, based on analysis of Fourier spectrum of modified scattering phase function, is considered. Position of peaks in Fourier spectrum is related to resonance on characteristic dimensions of particles. For the case of homogeneous spheres this method allows a precise determination of the diameter. We suggest to use a similar approach to characterize particles with arbitrary shapes. Results for blood cells: platelets, erythrocytes, and leukocytes are presented.