

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

ИНСТИТУТ АВТОМАТИКИ И ЭЛЕКТРОМЕТРИИ

На правах рукописи

Швалов Александр Николаевич

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕТОРАССЕИВАЮЩИХ СВОЙСТВ
НЕСФЕРИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ
ЦИТОМЕТРИИ.

01.04.05 “Оптика”

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук.

Научный руководитель
кандидат физико-математических наук
Мальцев В.П.

Новосибирск – 2000

ВВЕДЕНИЕ.	3
1 СКАНИРУЮЩИЙ ПРОТОЧНЫЙ ЦИТОМЕТР.	9
1.1 Методы определения параметров сканирующего проточного цитометра в одноканальной конфигурации.	9
1.2 Программное обеспечение сканирующего проточного цитометра	14
1.2.1 Управление системой сбора данных сканирующего проточного цитометра.	14
1.2.2 Обработка результатов измерений сканирующего проточного цитометра.	18
1.3 Ориентация несферических частиц в гидродинамической системе цитометра.	21
1.3.1 Параболический профиль скоростей.	23
1.3.2 Сужающаяся (расширяющаяся) труба	28
2 РАСЧЕТЫ ПОЛЯ РАССЕЯНИЯ И РЕШЕНИЕ ОБРАТНОЙ ЗАДАЧИ СВЕТОРАССЕЯНИЯ ДЛЯ НЕСФЕРИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ.	34
2.1 Особенности формирования индикатрисы одиночной несферической частицы.	34
2.1.1 Использование ВКБ приближения для расчета индикатрис рассеяния одиночными двояковогнутыми дисками в произвольной ориентации.	37
2.1.2 Расчет индикатрис светорассеяния для вытянутых сфероидов вращения методом Т-матриц.	47
2.2 Обратная задача светорассеяния для ориентированных сфероидов вращения.	52
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕТОРАССЕИВАЮЩИХ СВОЙСТВ НЕСФЕРИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ	60
3.1 Классификация латексных частиц на сканирующем проточном цитометре.	60
3.2 Рассеяние света эритроцитами человека.	67
3.3 Рассеяние света бактериями <i>E.coli</i>	70
3.3.1 Параметризация обратной задачи светорассеяния для сфероидальных частиц.	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	78
ПРИЛОЖЕНИЕ.	81
ЛИТЕРАТУРА	94

Введение.

Дисперсные системы широко распространены как в живой, так и в неживой природе. Существует два принципиально разных подхода при исследовании дисперсных систем: исследование системы как целого, и изучение отдельных составляющих. При относительной простоте проведения исследований дисперсионной системы как целого, интерпретация результатов, полученных при таком подходе, является сложной задачей. Исследование же отдельных составляющих частей системы дает наиболее полную информацию о системе.

Например, анализ изображения в микроскопии позволяет не только классифицировать его, но и определить множество физических параметров (размеры, внутреннюю структуру, показатели преломления составляющих и т.д.). С другой стороны микроскопические методы позволяют лишь исследовать небольшие количества частиц дисперсной среды, и с их помощью невозможно накопить данные в статистически надежных количествах при исследовании редких событий. Кроме того, микроскопические исследования являются довольно трудоемким процессом.

С бурным развитием лазерной техники, систем автоматизации исследований и методов обработки данных стали стремительно развиваться методы исследования отдельных составляющих дисперсных системы. Среди них широкое распространение получили два метода, позволяющих исследовать систему частиц с большой статистической точностью, а именно, проточная цитометрия [1] и метод Култера [2]. Благодаря большой скорости регистрации параметров одиночных частиц (до 10^5 сек⁻¹), эти методы представляют огромный шаг вперед по сравнению с микроскопическими методами.

До недавнего времени, количество измерений одной частицы, регистрируемых на проточных цитометрах, ограничивалось сигналами рассеяния в два телесных угла и сигналами флуоресценции на различных длинах волн. При таких методах регистрации стало возможным произвести классификацию составляющих дисперсной системы на подсистемы. Однако, определение же морфологических параметров той или иной подсистемы с использованием стандартного проточного цитометра, даже в простейшем

случае, гомогенной сферической частицы, представляют собой сложнейшие процедуры с тщательной калибровкой системы [3].

Развитие быстрых методов определения морфологических параметров несферических объектов очень важно для медицины, биологических исследований, и т.д. Цитометрия, например, позволяет значительно ускорить изучение влияния антибиотиков на рост популяции клеток [4, 5].

Однако, как и при классификации, так и при определении параметров частиц, форма которых отлична от сферической, возникают большие дополнительные трудности. Кроме роста числа определяемых параметров, появляются сложности, связанные с ориентацией объекта относительно направления подающего излучения. При исследовании несферических частиц возможно лишь определение некоторых, усредненных по множеству частиц, параметров. Такой подход возможен лишь в том случае, когда *a priori* известно, что разброс в морфологии частиц лежит в узких пределах, что далеко не всегда выполняется.

Например, в 1972 году Кроссом [6] впервые была измерена угловая зависимость интенсивности рассеянного на взвеси клеток *Escherichia coli* света. При интерпретации результатов использовалось приближение Релея – Ганса – Дебая, в котором использовались значения объема частиц, измеренные с помощью Култер метода.

Позднее группой Бронка исследовались поляризационные свойства взвесей палочкообразных бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus Subtilis*. Экспериментально измеренное положение второго максимума в комбинации элементов матрицы Мюллера $\frac{S_{34} + S_{14}}{S_{11} + S_{13}}$ использовалось [7, 8] для определения усредненного диаметра частиц взвеси. Связь этой комбинации элементов матрицы Мюллера и параметров частиц определялась из сопоставления с данными микроскопии [8] и результатов расчета методом связанных диполей [9].

Де Гроссом [10, 11] на примере исследования белых кровяных телец было показано, что применение поляризационных измерений позволяют значительно повысить классификационные свойства проточной цитометрии.

Кроме бактериальных клеток, широко исследуемым несферическим объектом является взвесь нормальных эритроцитов человека. В работе Стейнке [12] при исследовании сферизованных и несферизованных эритроцитов было обнаружено, что сечение рассеяния пропорционально объему. Позднее различными авторами были проверены применимости различных приближений при интерпретации сигналов рассеяния на взвеси эритроцитов: аномальной дифракции [13], приближения Релея-Ганса-Дебая [14] и метод интегральных уравнений [15]. При этом форма эритроцита моделировалась сплюснутым сфероидом вращения.

Другой метод определения параметров отдельных составляющих дисперсной системы, впервые был продемонстрирован Гукером и Эганом [16] в 1961 году. Ими была предложена схема установки, регистрирующей картину рассеяния (индикатрису) в широком диапазоне углов и измерена индикатриса от одиночной частицы – 1.45 мкм сферической частицы из диотилфтолата. Частица фиксировалась в пространстве электрическим полем, и индикатриса светорассеяния сканировалась перемещением фотоприемника. Из полученной индикатрисы, по данным подгонки методом наименьших квадратов рассчитанных по теории Ми индикатрис к экспериментальной, были определены параметры частицы, т.е. решена обратная задача светорассеяния. Позднее Вяттом та же методика применялась и для негомогенных сферических объектов – различных спор и бактерий [17, 18, 19].

Такой метод определения параметров частицы, по всей картине рассеяния, является очень многообещающим, так как даже оптическая микроскопия является частным его случаем – в этом случае регистрируется рассеяние в передние углы при малой длине волны по сравнению с деталями объекта.

Однако техника регистрации (с пространственной фиксацией частицы в луче лазера), и медленный метод обработки, не позволяли проведение статистических исследований суспензий.

Появление техники сканирующей проточной цитометрии [20] и развитие метода пролетной индикатрисы [42] для определения параметров гомогенных сферических объектов диапазона 1 мкм – 10 мкм позволило совместить скорость проточной

цитометрии (1000 сек^{-1}) с точностью электронной микроскопии ($\sim 30 \text{ нм}$). С ее помощью были проведены эксперименты по определению жирности молока, количества гемоглобина в сферизованных эритроцитах человека, а так же исследован процесс дисперсионной полимеризации [21, 22].

Систематических исследований несферических объектов с использованием проточной цитометрии практически не проводилось, и данная работа является первой попыткой проведения таких исследований.

Целью данной работы было исследование возможности использования техники сканирующей проточной цитометрии и ее развитие для регистрации рассеяния от несферических частиц и определения их параметров.

В диссертационной работе впервые:

1. Описана одностриггерная схема сканирующего проточного цитометра (СПЦ).
2. В приближении Венцеля – Крамерса – Бриллюэна промоделировано светорассеяние от двояковогнутых дисков, формы, которую имеют недеформированные нормальные эритроциты человека и исследована зависимость параметров индикатрисы светорассеяния от ориентации относительно падающего излучения.
3. С помощью сканирующего проточного цитометра измерены индикатрисы светорассеяния от одиночных эритроцитов человека.
4. Получено параметрическое решение обратной задачи светорассеяния для несферических частиц – вытянутых сфероидов вращения, ориентированных вдоль падающего излучения.
5. Предложен метод классификации латексных частиц по исходным сигналам сканирующего проточного цитометра.
6. Показана возможность определения параметров вытянутых сфероидов в сканирующем проточном цитометре.
7. Измерено дифференциальное сечение рассеяния от одиночных клеток *E.coli*.

Практическая ценность настоящей работы определяется использованием результатов при:

- Проведении исследовании параметров несферических частиц с использованием цитометров стандартной конфигурации и на сканирующем проточном цитометре;

- Решении обратной задачи по сигналу светорассеяния для ориентированных сфероидов;
- Разработке проточных цитометров стандартной конфигурации для классификации латексных частиц или клеток *E.coli*;
- Проведении кинетических исследований роста популяции бактериальных клеток.

Диссертация состоит из трех глав.

Первая глава посвящена развитию техники сканирующей проточной цитометрии.

В первом разделе описан модифицированный сканирующий проточный цитометр для проведения экспериментов с объектами, размеры которых сравнимы с длиной волны.

Во втором разделе описана структура программного обеспечения сканирующего проточного цитометра.

В третьем разделе исследован вопрос ориентации несферических частиц в гидродинамической системе сканирующего проточного цитометра.

Во второй главе диссертации рассмотрено влияние ориентации несферических объектов на картину светорассеяния и проведена параметризация обратной задачи для частного случая ориентации вытянутых сфероидов осью симметрии параллельно направлению распространения падающего излучения.

В первом разделе с помощью приближения ВКБ для двояковогнутых дисков и с использованием теории Т-матриц для вытянутых сфероидов вращения исследована зависимость картины светорассеяния в зависимости от ориентации частиц.

Во втором разделе проведена параметризация обратной задачи светорассеяния для сфероидов вращения, ориентированных вдоль падающего излучения.

Третья глава посвящена экспериментальным работам, проведенным на сканирующем проточном цитометре.

В первой части предложен и апробирован метод классификации латексных частиц на классы, дающий лучшее, по сравнению с методом пролетной индикатрисы, разделение латексных частиц с разными размерами.

Во второй части представлены результаты экспериментального исследования нормальных эритроцитов человека.

В третьей части исследовано светорассеяние бактериальных клеток *E.coli* и применено параметрическое решение обратной задачи для ориентированных сфероидов вращения.

В приложение включена библиотека SFC_ADC.DLL, написанная на языке Delphi для работы с СПЦ через универсальную плату DAQ1201 фирмы Quatech.

На защиту выносятся следующие положения:

- Параметры частиц с длиной от 0.5 мкм до 3.5 мкм, диаметром от 0.5 мкм до 1.5 мкм и коэффициентом преломления от 1.35 до 1.45 определяются с использованием проведенного параметрического решения обратной задачи светорассеяния, при этом погрешность определения параметров $\sim 2\%$ для размеров и $\sim 0.2\%$ для показателя преломления.
- Для определения параметров клеток *E.coli* на СПЦ, а также для регистрации сигнала светорассеяния от нормальных эритроцитов человека толщина рабочей струи проточного цитометра должна быть не более 4 мкм.
- Дифференциальное сечение рассеяния клеток *E.coli* изменяется в пределах от $3 \times 10^{-8} \text{ см}^2$ до 10^{-10} см^2 при изменении угла рассеяния от 15° до 60° .

Основные результаты диссертации представлены в 5 публикациях, включенных в прилагаемый перечень. Содержание диссертации докладывалось на XXXV Международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (г.Новосибирск, 1997г.), на 7-ом европейском симпозиуме “Классификация частиц” (Нюрнберг, 10-12 марта 1998), на международном симпозиуме “Оценка биологических проектов России на пороге нового тысячелетия” (2-4 сентября, 1999 Новосибирск), международной конференции “Новые разработки в биомедицинской оптической спектроскопии, распознавании образов и диагностике” (Мюнхен, 13-17 июня 1999), а также на научных семинарах в Институте химической кинетики и горения СО РАН (Новосибирск, 1996-2000 гг.), в Институте автоматизации и электротехники СО РАН (Новосибирск, 2000 г.), и на отделении медицинской физики университета г. Турку (Финляндия, 1998 г.)

1 Сканирующий проточный цитометр.

1.1 Методы определения параметров сканирующего проточного цитометра в одностриггерной конфигурации.

Ранее [23], при исследовании светорассеяния от изучаемых объектов на сканирующем проточном цитометре (СПЦ), для контроля скорости объекта использовался последовательно регистрируемый сигнал светорассеяния в передние углы, возникающий при пересечении частицей двух триггерных лучей. Из-за относительно большого диаметра перетяжек лазерных лучей в зоне регистрации – 30 мкм – для качественного контроля скорости частицы, необходимое расстояние между двумя триггерными лучами должно быть не менее 100 мкм. Кроме того, микроскопный способ определения, который использовался для нахождения расстояния между триггерными лучами, также вносил погрешность в определение скорости частицы.

Также, из-за сложностей, возникающих при регистрации сигнала от частицы в точках, разнесенных в пространстве, и из-за неизбежного рассеяния излучения лазера на границах *воздух - кварцевое стекло* и *кварцевое стекло - вода* отношение сигнал/шум оставляли желать лучшего. Это не позволяло регистрацию сигналов от частиц, с малым рассеянием вперед. Это, например, частицы, размеры которых сравнимы с длиной волны (0.5 мкм – 1.2 мкм). В этот класс частиц входят, например, бактерии.

Для преодоления трудностей двухтриггерной системы была разработана одностриггерная конфигурация сканирующего проточного цитометра.

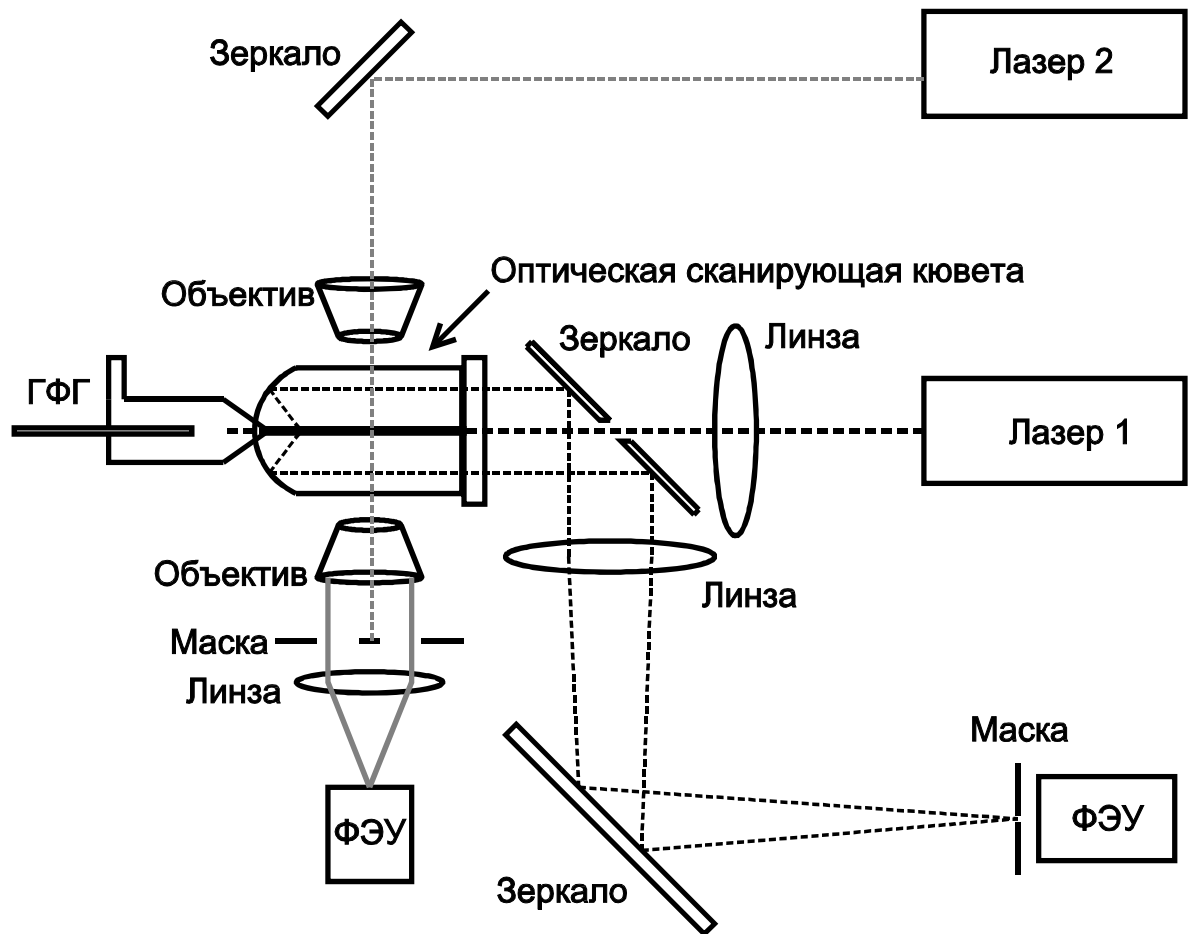


Рис. 1.1. Оптическая схема сканирующего проточного цитометра в одностриггерной конфигурации

Схема сканирующего проточного цитометра (СПЦ) в одготриггерной конфигурации представлена на Рис. 1.1. Здесь используется два лазера. В качестве лазера 1, который освещает движущуюся в канале частицу, может быть использован или He-Ne лазер длиной волны генерируемого излучения 632.8 нм, или аргоновый лазер, работающий на 488 нм. Излучение лазера 1 направляется коаксиально потоку через отверстие в зеркале. Гидрофокусирующая система (на Рис. 1.1 ГФГ-гидрофокусирующая головка) формирует два концентрических потока: внешний, не содержащий частиц, и рабочий поток, несущий исследуемые частицы. Скорость внешнего потока устанавливается с помощью воздушного дифференциального редуктора. Типичное значение диаметра внутреннего рабочего потока – 10 мкм, скорость частиц – 1 м/с. Гидродинамически фокусируемые потоки направляются в капилляр оптической кюветы. Проба отводится из кюветы через канал, выгравированный на торце кюветы. Излучение лазера 1 вводится в канал кюветы через оптическое кварцевое окно.

Второй лазер - He-Ne - формирует триггерный луч, используемый для процедуры определения скорости потока, и для привязки положения частицы внутри зоны регистрации. Луч лазера 2 фокусируется в рабочий поток объективом. Рассеянный при пересечении частицей луча свет собирается и фокусируется линзой на пространственный фильтр (маску), расположенный перед фотоумножителем (ФЭУ). Импульс, возникающий при пересечении частицей триггерного луча системы, используются программным обеспечением СПЦ для определения скорости потока и пространственного положения частицы в регистрационной зоне прибора. При одготриггерной конфигурации СПЦ АЦП работает в непрерывном режиме, а триггерный сигнал сигнализирует о завершении процесс измерения индикатрисы.

Основная особенность одготриггерной конфигурации сканирующего проточного цитометра заключается в том, что скорость частицы не измеряется для каждого из регистрируемых объектов, а определяется средняя скорость потока.

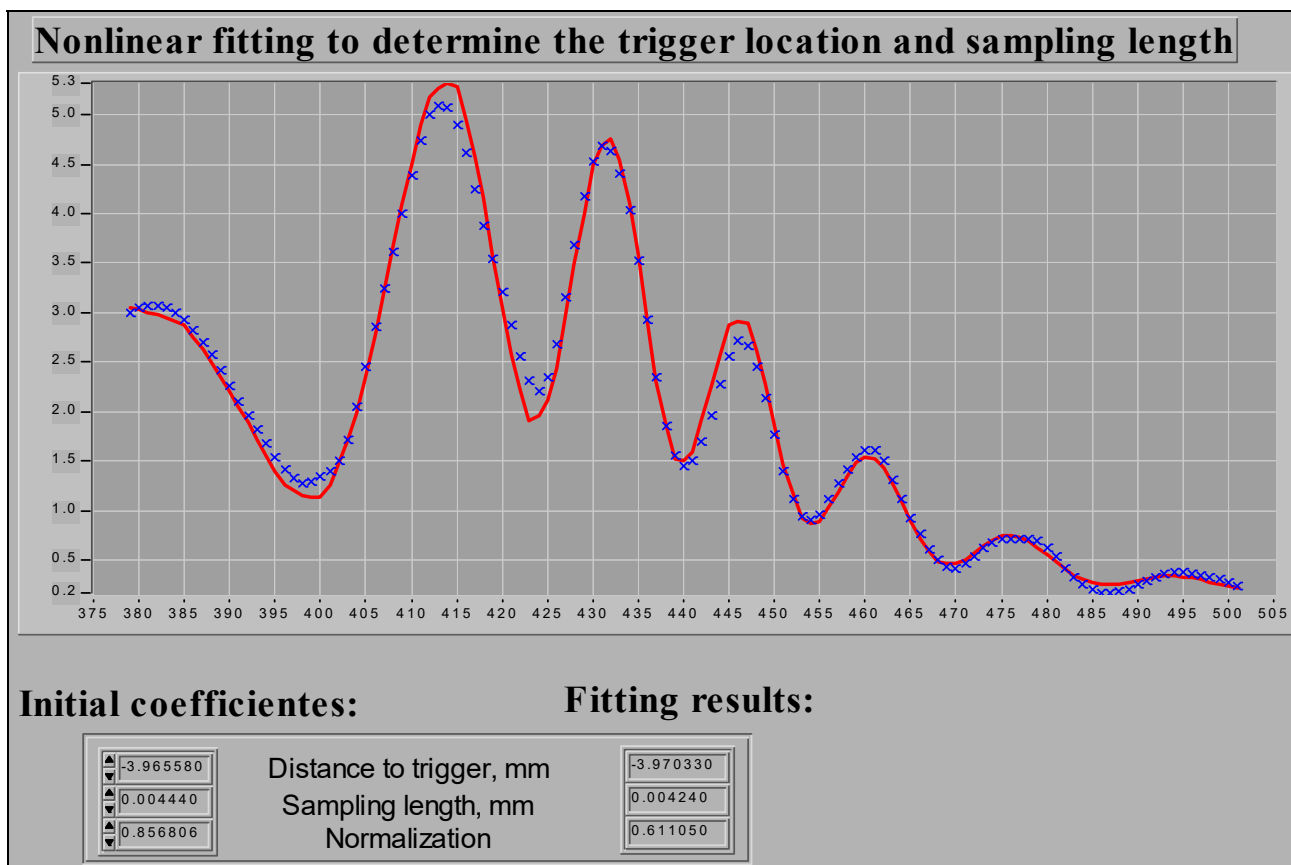


Рис. 1.2. Определение положения триггера, расстояния, проходимого за 1 отчет АЦП и нормировочного коэффициента по подгонке методом наименьших квадратов экспериментального сигнала полистирольного латекса ($d=3.06$ мкм, $n=1.60$) к расчетному

Процедура определения параметров рабочей струи проводится с использованием полистирольных латексных частиц известного размера. Так как нам известна передаточная функция сферического зеркала, то при известных параметрах частицы и длине волны можно рассчитать вид исходного сигнала, который будет регистрироваться СПЦ от этой частицы. Таким образом, процедура определения скорости частиц и положения триггера при одготриггерной конфигурации сводится к подгонке методом наименьших квадратов экспериментального и расчетного сигнала (Рис. 1.2). При этом варьируются следующие параметры: расстояние от входа в систему (края сферического зеркала), расстояние, проходимое частицей за время 1 счета АЦП и нормировка оптической системы регистрации СПЦ.

При регистрации светорассеяния на сканирующем проточном цитометре необходимо, чтобы центр рабочей внутренней струи находился как можно ближе к оси симметрии капилляра, что, как будет показано в разделе 1.3, особенно важно при исследовании несферических частиц. Кроме этого необходимо определение толщины рабочей струи. В одно-частичном режиме, котором работает СПЦ, такой контроль невозможно выполнять при помощи микроскопии.

Для контроля этих параметров было разработано программное обеспечение на языке LabView. Метод определения параметров рабочей струи основан на свойствах пуазейлевского профиля скоростей, существующего в зоне регистрации.

При движении частицы на расстоянии x от оси капилляра, она имеет скорость

$$V = V_0 \left(1 - \left(\frac{x}{r_0} \right)^2 \right), \quad (1.1.1)$$

где r_0 - радиус капилляра, V_0 - скорость жидкости на оси капилляра.

При известном разбросе скоростей частиц ΔV максимальное расстояние от частицы до оси капилляра будет:

$$x_{\max} = \frac{r_0 \cdot \Delta V}{2 \cdot V_0 \cdot \sqrt{1 - \frac{V}{V_0}}}. \quad (1.1.2)$$

Здесь скорости определяются методом, описанным выше, и в качестве V_0 используется максимальное значение.

Значение x_{\max} в реальной системе, где всегда имеется некоторый разброс по характеристикам калибровочных частиц, является оценкой сверху для величины толщины струи. Однако реально превышение величины x_{\max} над реальной толщиной лежит в пределах 1 мкм и является постоянной величиной для каждого из имеющихся калибровочных наборов.

При сохранении толщины внутренней струи и минимально возможном значении x_{\max} ось внутреннего потока совпадает с осью симметрии капилляра.

Таким образом, одотриггерная схема сканирующего проточного цитометра, описанная в этом разделе, позволяет улучшить чувствительность триггерного канала по сравнению с двухтриггерной. При этом определение параметров рабочей струи проводится по латексным частицам с известными параметрами.

1.2 Программное обеспечение сканирующего проточного цитометра

1.2.1 Управление системой сбора данных сканирующего проточного цитометра.

Скорость регистрации частиц в сканирующем проточном цитометре на данный момент может достигать 300 частиц в секунду. При этом на одну частицу приходится порядка 1000 отсчетов АЦП, что, в конечном счете, приводит к скорости потока данных порядка 600 килобайт в секунду. Нами была разработана и создана система сбора и обработки данных, позволяющая работу сканирующего проточного цитометра в режиме реального времени при таких потоках данных.

Для упрощения обработки сигналов, поступающих со сканирующего проточного цитометра, сигнал индикатрисного канала суммировался с сигналом триггерной системы в аналоговом виде. Суммарный сигнал поступал на плату АЦП в таком виде, что сигнал рассеяния и сигнал триггера имели разную полярность (Рис. 1.3).

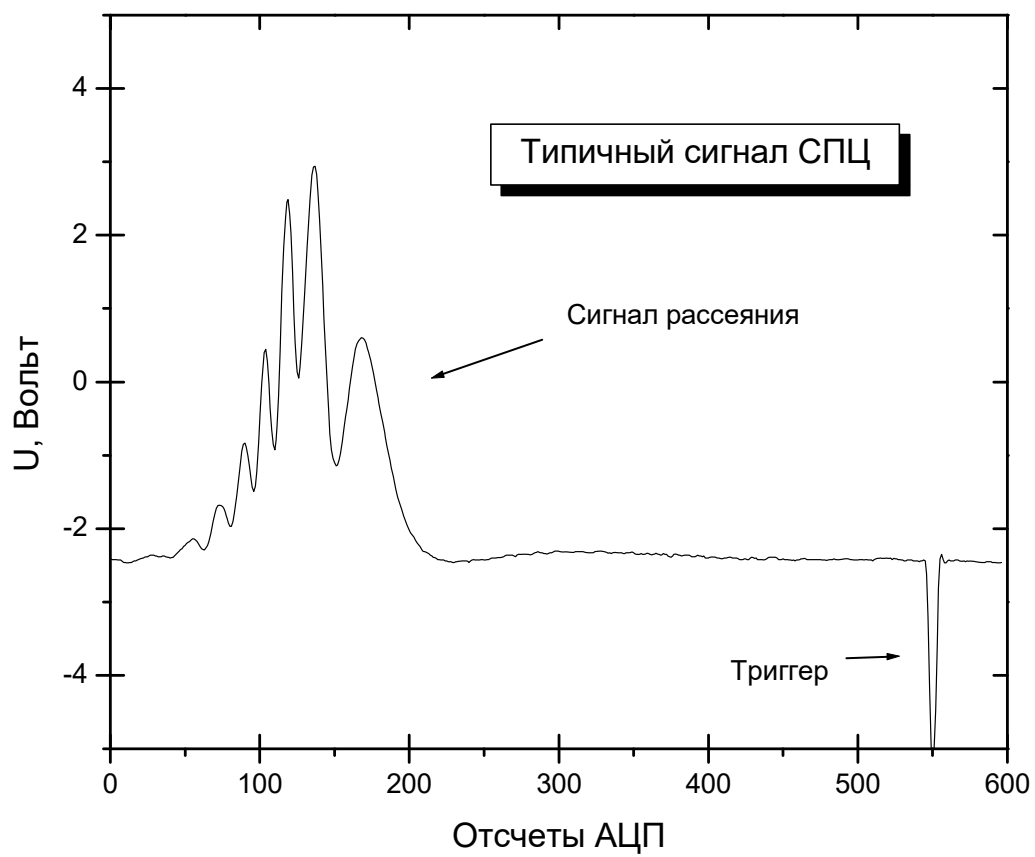


Рис. 1.3. Сигнал сканирующего проточного цитометра

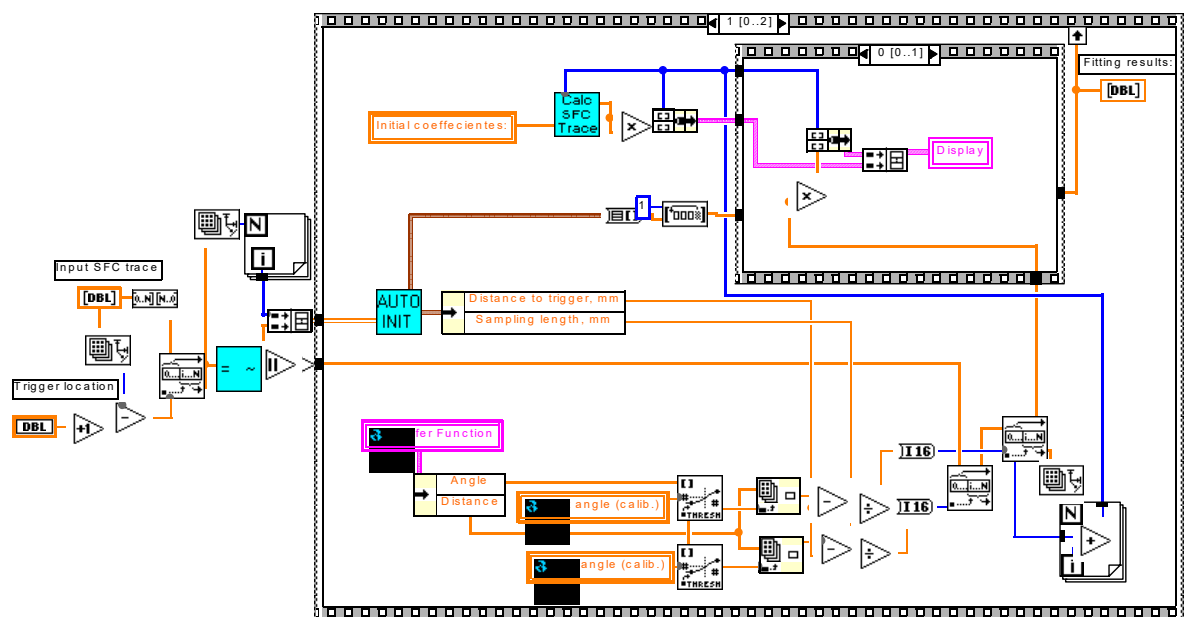


Рис. 1.4. Пример программы на языке LabView (определение параметров СПЦ в однотриггерной конфигурации)

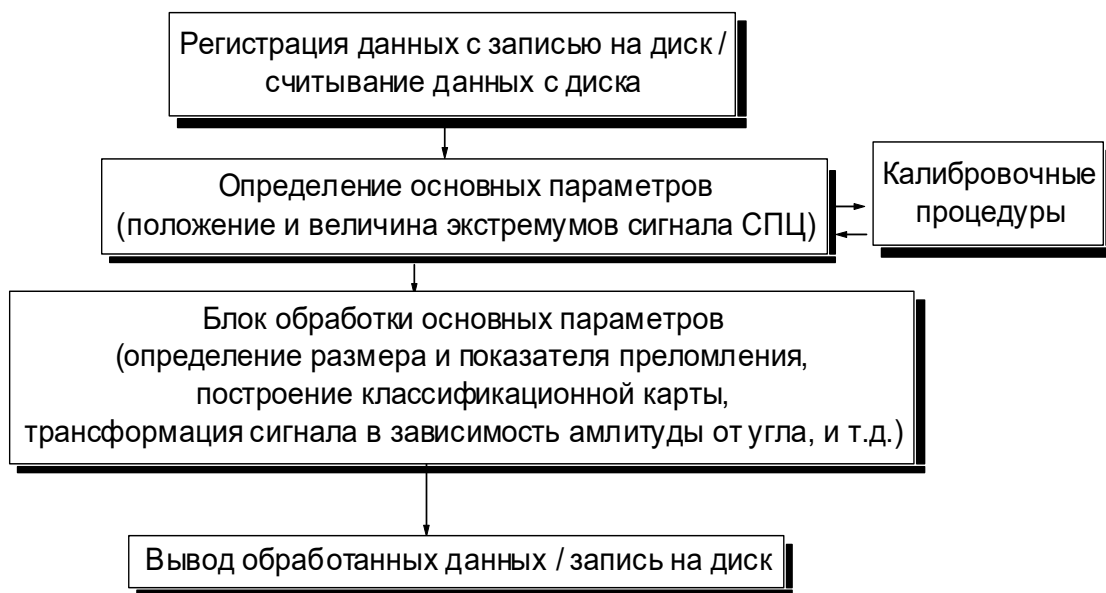


Рис. 1.5. Схема программного обеспечения сканирующего проточного цитометра

Программная часть системы *регистрации данных* сканирующего проточного цитометра была реализована в виде динамически подключаемой библиотеки (Dynamically Linked Library - DLL) SFC_ADC.DLL на языке Delphi с использованием языка Ассемблер. В дальнейшем эта библиотека использовалась в пользовательской оболочке, реализованной на языке графического программирования LabView под ОС Windows95 (Рис. 1.4). Для регистрации сигналов, поступающих с СПЦ, использована плата АЦП DAQ1201b с интерфейсом ISA фирмы Quatech. Плата представляет собой комбинированную плату 12-битного АЦП с 8 дифференциальными/ или 16 недифференциальными каналами и 12 – битного ЦАП. Максимальная частота дискретизации – 500 кГц. На плате имеется буфер FIFO размером 512 байт.

Библиотека SFC_ADC.DLL содержит в себе 3 функции:

InitADC – InitADC производит выбор режима работы АЦП и выставляет частоту дискретизации АЦП.

StartADC – Производит выбор канала АЦП для регистрации и запуск регистрации АЦП.

ReadADC – Записывает данные с АЦП в буфер произвольного заданного размера (обычно порядка 1000 отсчетов АЦП) для временного хранения данных и по триггерному сигналу передает в блок обработки данные сигнала рассеяния одной частицы, зарегистрированного СПЦ. При этом положение сигнала триггера фиксировано относительно начала массива данных в пределах 3 квантов АЦП.

Использование в блоке регистрации программного обеспечения, в котором критические участки были реализованы на языке низкого уровня, позволило избежать потери данных при регистрации.

После регистрации, данные, полученные с СПЦ, передавались в блок обработки.

1.2.2 Обработка результатов измерений сканирующего проточного цитометра.

На данный момент сканирующая проточная цитометрия является динамично развивающейся областью, постоянно появляются новые направления исследований.

При этом возникают все новые требования к программному обеспечению. Для возможности быстрой доработки программного обеспечения к текущим требованиям была разработана блочная структура, схема которой изображена на Рис. 1.5.

В режиме измерения, первый блок – блок чтения данных – получает с АЦП при помощи библиотеки SFC_ADC.DLL необработанные данные, регистрирует время события, и, с возможностью записи на диск, посылает их дальше, в блок первичной обработки. В режиме обработки ранее сохраненных на диск данных, в блок первичной обработки поступают данные, считанные с диска. Из-за больших потоков информации, данные сохраняются на диск в бинарном виде, и содержат сигналы, регистрируемые СПЦ, время события и разделительную последовательность байт.

Для ускорения обработки данных рассеяния при решении обратной задачи светорассеяния от сферических частиц методом пролетной индикатрисы [42], в блоке предварительной обработки используется то свойство метода, что для определения параметров частицы необходимы положения и амплитуды всего лишь трех экстремумов индикатрисы.

На сигнале рассеяния СПЦ определяется положение граничного угла – 15 градусов, и за ним, в сторону больших углов на индикатрисе, определяются положения и величины экстремумов – двух минимумов и максимума. Из-за нелинейности передаточной функции, эти величины не переходят напрямую в величины на индикатрисе светорассеяния. Для определения из этих значений положений и величин экстремумов на индикатрисе светорассеяния, трансформированной в зависимость интенсивности рассеяния от угла, использовались следующие выражения, полученные из разложения сигнала СПЦ и передаточной функции в ряд Тейлора до второй производной:

Положение i -того экстремума после преобразования сигнала, в отсчетах АЦП:

$$I_i = I(x_i) + \Delta x_i = I(x_i) + \frac{-I(x_i) J'(x_i)}{I''(x_i) J(x_i) + J''(x_i) I(x_i)}, \quad (1.2.1)$$

где $I(x)$ – амплитуда сигнала СПЦ до трансформации, $J(x)$ - передаточная функция оптической кюветы.

Величина сигнала в экстремуме индикатрисы светорассеяния до трансформации рассчитывается по формуле:

$$A_i = I_i + \frac{(\Delta x_i)^2}{2} I_i'' . \quad (1.2.2)$$

Далее, для определения параметров частицы методом пролетной индикатрисы, и методом, описанным в главе 2.2, используются эти шесть величин.

Такой подход в обработке данных позволил значительно (~ в 10 раз) повысить скорость обработки, и избежать потерь данных при регистрации с обработкой в режиме реального времени.

Эти значения, плюс значение времени регистрации события, уже не требуют значительных объемов памяти, и, практически всегда, могут храниться в оперативной памяти компьютера. Далее, или по требованию пользователя, или автоматически, через заданные интервалы, они попадают в блок обработки основных параметров.

Так как для трансформации положений минимумов на исходном сигнале СПЦ в положение минимумов на индикатрисе рассеяния требуется знание о скорости частицы и о положении триггерного луча в измерительной системе, то для их определения, перед началом эксперимента необходимо выполнение процедур, описанных в главе 1.1.

Блок основной обработки данных выполняется или по требованию пользователя, или автоматически, через заданные интервалы. В нем, в зависимости от эксперимента, может выполняться одна из следующих процедур:

- 1) Вывод на экран последнего сигнала СПЦ, пришедшего из блока чтения данных.
- 2) Преобразование последнего сигнала СПЦ, пришедшего из блока чтения данных, в зависимость интенсивности рассеяния от угла, с возможным выполнением подгонки методом наименьших квадратов индикатрисы

рассеяния, рассчитанной по теории Ми. Варьирование происходит по размеру и показателю преломления частицы.

- 3) Определение диаметров и показателей преломления по накопленным данным при регистрации сферических частиц методом пролетной индикатрисы и вывод карты размер – показатель преломления.
- 4) Вывод распределения частиц по размерам, рассчитанным по методу пролетной индикатрисы, и аппроксимация гистограммы логнормальным или нормальным распределением.
- 5) Определение жирности молока; размеры жировых шариков определяются с использованием метода пролетной индикатрисы.
- 6) Определение концентрации гемоглобина в сферизованных эритроцитах человека.
- 7) Построение временной зависимости размера частиц, используемое при полимеризационных исследованиях.
- 8) Определение длин, диаметров и показателей преломления по накопленным данным при регистрации частиц, имеющих форму сфероидов вращения методом пролетной индикатрисы и вывод двумерных карт.

Кроме этого существуют процедуры обработки данных флуоресцентного канала при работе цитометра в режиме регистрации флуоресценции одновременно с сигналом рассеяния.

В результате, описанное в данном разделе программное обеспечение позволило сканирующему проточному цитометру стать мощным инструментом исследований дисперсионных сред.

1.3 Ориентация несферических частиц в гидродинамической системе цитометра.

Так, как процесс регистрации светорассеяния в СПЦ происходит с перемещением частицы, для корректного измерения индикатрисы светорассеяния необходимо, чтобы

за время измерения индикатрисы несферическая частица не успевала повернуться на угол, при повороте на который, происходит заметное изменение исследуемых параметров индикатрисы. При исследовании светорассеяния на цитометрах стандартной конфигурации такой проблемы не существует, так, как измерения проводятся практически мгновенно – при пересечении частицей луча лазера. Кроме того, в цитометрах стандартной конфигурации нет необходимости в установлении скорости движения частицы, а в СПЦ это необходимо для возможности трансформации зависимости сигнала от времени в зависимость интенсивности рассеяния от угла.

Рассмотрим гидродинамическую систему проточного цитометра. Гидродинамическая система состоит из двух частей: гидрофокусирующая система и зона регистрации, в которой поток воды имеет пуазейлевский профиль скоростей.

Движение жидкости описывается уравнением Навье-Стокса:

$$\rho(\vec{V} \cdot \nabla \vec{V}) + \mu \nabla^2 \vec{V} = \nabla p. \quad (1.3.1)$$

Отношение инерционных сил к вязкостным характеризуется безразмерным параметром $N_{Re} = \frac{lV\rho}{\mu}$ - числом Рейнольдса. В нашем случае частица движется вместе со средой, при этом скорость относительного движения среды на масштабах частицы ($l=10\mu\text{м}$), находящейся возле оси потока, принимает небольшие значения $V \approx 1\text{см/сек}$. При такой постановке задачи, число Рейнольдса $N_{Re} \approx 0.1$, и в уравнении Навье-Стокса можно пренебречь [24] инерционными членами $\rho(\vec{V} \cdot \nabla \vec{V})$ по сравнению с вязкостными $\mu \nabla^2 \vec{V}$. Это приводит к так называемым уравнениям ползущего течения (creeping flow), или уравнению Стокса:

$$\mu \nabla^2 \vec{V} = \nabla p. \quad (1.3.2)$$

Для изучения особенностей поведения несферической частицы, взвешенной в потоке, рассмотрим в виде модели обтекание эллипсоида вращения. Для момента сил, действующего на неподвижный сплюснутый эллипсоид вращения с главными полуосями a , $b=c=k \cdot a$; $k > 1$, при обтекании произвольным, достаточно ‘гладким’, потоком $\vec{u} = \vec{u}(\vec{r})$, удовлетворяющим уравнениям Стокса, получено выражение [25, 26]:

$$\bar{\mathbf{T}} = \mu \hat{\mathbf{Q}} [(\mathbf{\Pi} \times \bar{\mathbf{u}})_0] = \mu \hat{\mathbf{Q}} a^2 \begin{bmatrix} k^2 \partial_y u_z - k^2 \partial_z u_y \\ k^2 \partial_z u_x - \partial_x u_z \\ \partial_x u_y - k^2 \partial_y u_x \end{bmatrix},$$

где $\mathbf{\Pi}$ - векторный оператор:

$$\mathbf{\Pi} = \bar{\mathbf{i}} \cdot a^2 \frac{\partial}{\partial x} + \bar{\mathbf{j}} \cdot b^2 \frac{\partial}{\partial y} + \bar{\mathbf{k}} \cdot c^2 \frac{\partial}{\partial z}, \quad (\bar{\mathbf{i}}, \bar{\mathbf{j}}, \bar{\mathbf{k}} - \text{единичные векторы, параллельные}$$

главным осям x, y, z эллипсоида.), $\bar{\mathbf{u}}$ - поле скоростей жидкости, а $\hat{\mathbf{Q}}$ - некоторая диагональная матрица.

1.3.1 Параболический профиль скоростей.

Рассчитаем момент сил, действующий на клетку, помещенную в поле скоростей, постоянное вдоль линии тока, и имеющее параболический профиль вида

$$\begin{pmatrix} u_0 - s(y + y_0)^2 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}.$$

Повернем поле скоростей на угол α вокруг оси z относительно системы координат, связанной с клеткой, как показано на Рис. 1.6 и таким образом найдем зависимость момента сил от угла поворота:

$$\bar{\mathbf{T}} = \mu \bar{\mathbf{Q}} a^2 \cdot \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 2s y_0 \cdot (1 + (k^2 - 1) \cdot \cos^2 \alpha) \end{pmatrix}. \quad (1.3.3)$$

Здесь y_0 - координата центра потока, u_0 - скорость в центре капилляра, $s = \frac{u_0}{r_0^2}$ - коэффициент. Заметим, что рассмотрен достаточно частный случай, когда эллипсоид расположен симметрично перпендикулярно плоскости, проходящей через центр потока.

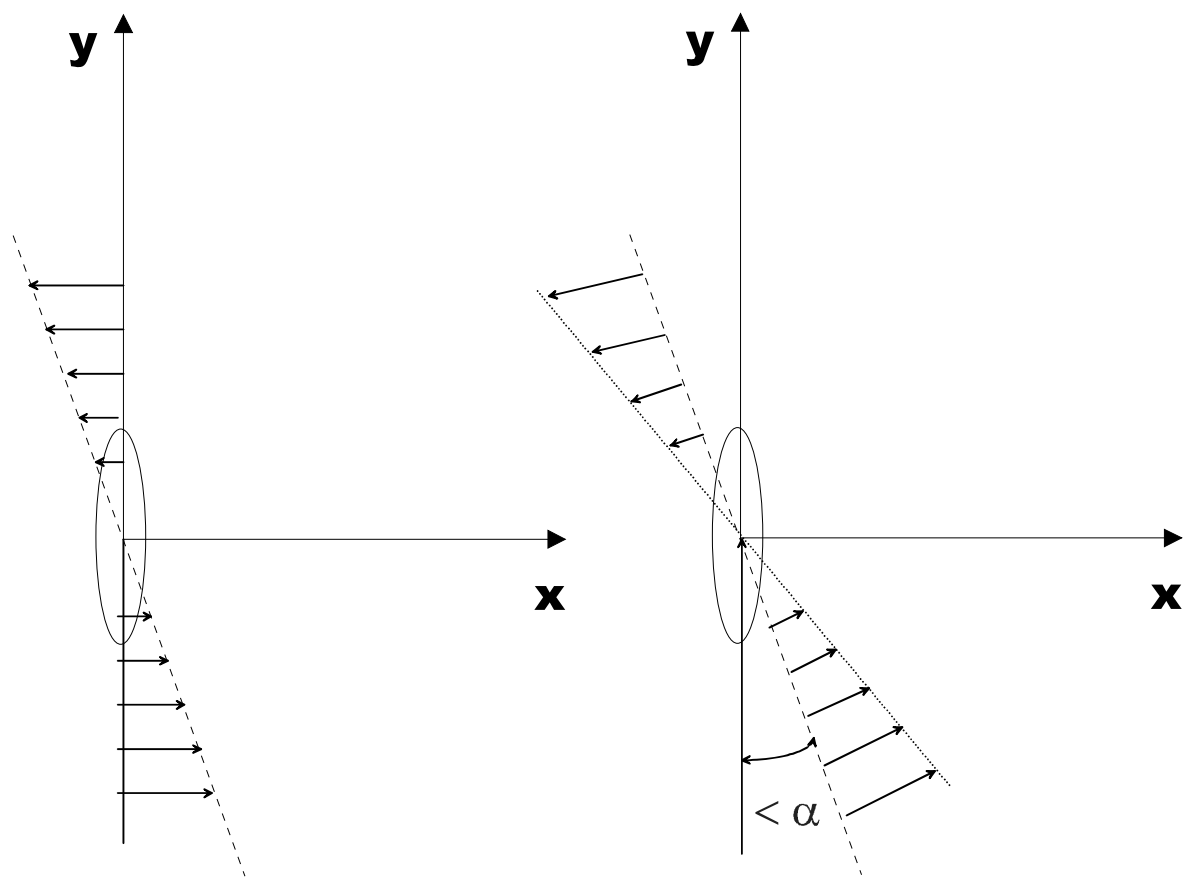


Рис. 1.6. К расчету вращения эллипсоида в потоке

Составим дифференциальное уравнение вращения эллипсоида, расположенного данным образом в пуазейлевском потоке. Уравнение вращения произвольного тела вокруг главной оси инерции с моментом инерции I , относительно которой приложен момент сил T из уравнений Эйлера выглядит следующим образом [27]:

$$I \cdot \frac{d^2 \alpha}{dt^2} = T = T(\alpha) - T\left(\frac{d\alpha}{dt}\right), \quad (1.3.4)$$

где α – угол поворота. Первое слагаемое $-T(\alpha)$ описывает ‘раскручивающий’ момент сил, обусловленный углом поворота в потоке; он был только что вычислен. Из него затем вычитается слагаемое, описывающее ‘торможение’ эллипсоида водой, имеющего в ней ненулевую угловую скорость. Оно вычисляется как момент сил, действующий на эллипсоид, вращающийся в неподвижной жидкости с постоянной угловой скоростью $\omega \equiv \frac{d\alpha}{dt}$, или, что то же самое, при вращении жидкости вокруг эллипсоида, закрепленного неподвижно. Поле скоростей при этом: $u_{x(ж)} = y \cdot \omega$, $u_{y(ж)} = -x \cdot \omega$. Момент сил:

$$\vec{T} = \mu \bar{Q} a^2 \cdot \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ -\omega \cdot (k^2 + 1) \end{pmatrix}, \quad (1.3.5)$$

тогда уравнение движения переписется в виде:

$$I \cdot \frac{d^2 \alpha}{dt^2} = \mu Q_{zz} a^2 \cdot \left(2s y_0 (1 + (k^2 - 1) \cos^2 \alpha) - \frac{d\alpha}{dt} (k^2 + 1) \right). \quad (1.3.6)$$

В уравнении коэффициент (I) при второй производной α по t оказывается на несколько порядков меньше коэффициента при остальных членах, поэтому будем решать его в приближении $I = 0$.

Тогда получим:

$$2s y_0 (1 + (k^2 - 1) \cos^2 \alpha) = \frac{d\alpha}{dt} (k^2 + 1). \quad (1.3.7)$$

Заметим, что в уравнении (1.3.7) при одновременной замене $k \rightarrow \frac{1}{k}$ и $\cos \alpha \rightarrow \sin \alpha$ вид уравнения сохраняется. То есть поведение сплюснутого сфероида с

отношением полуосей k , будет таким же, как и вытянутого сфероида с $k' = \frac{1}{k}$ и начальным углом, сдвинутым на $\frac{\pi}{2}$. После интегрирования получаем:

$$-\frac{k^2 + 1}{2sy_0k} \cdot \operatorname{arctg}(k \cdot \operatorname{ctg}(\alpha)) \Big|_{\alpha_0}^{\alpha} = t \Big|_{t_0}^{t_1} = t. \quad (1.3.8)$$

Откуда зависимость угла от времени:

$$\alpha = \operatorname{arccctg} \left(\frac{\operatorname{tg} \left(\operatorname{arccctg}(k \cdot \operatorname{ctg}(\alpha_0)) - \frac{2sy_0k}{k^2 + 1} \cdot t \right)}{k} \right). \quad (1.3.9)$$

Графически данная зависимость для параметров измерительной системы СПЦ показана на Рис. 1.7 ($\alpha_0 = 0$). Регистрационная зона СПЦ находится на расстоянии 7 мм от гидрофокусирующей. Это связано с необходимостью установления скорости потока.

Для периода вращения получим:

$$\tau = \pi \cdot \frac{k^2 + 1}{sy_0k}. \quad (1.3.10)$$

Из Рис. 1.7 можно сделать вывод, что при толщине рабочей струи менее 4 мкм и соотношении полуосей более 2, отклонение больших полуосей частиц от направления падающего излучения будет не более 6^0 . Для вытянутых сфероидов вращения это означает сохранение ориентации осью симметрии вдоль потока, а для сплюснутых – поперек.

* * *

При толщине рабочей струи ~ 2 мкм в сканирующем проточном цитометре деориентация частиц составит $\sim 6^0$.

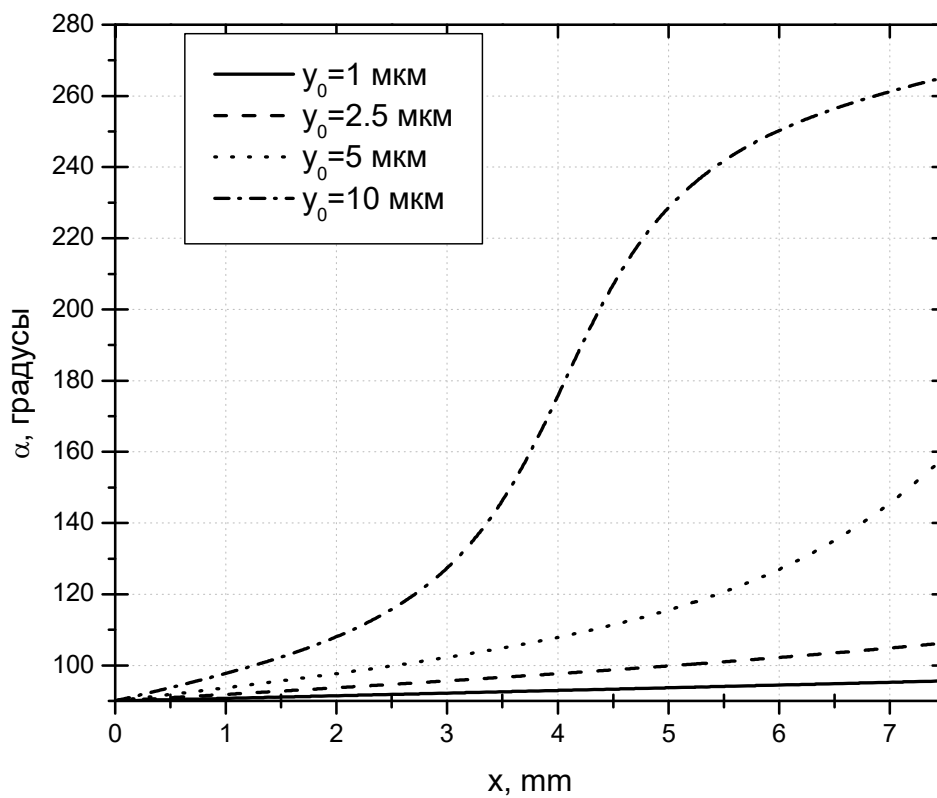


Рис. 1.7. Потеря ориентации частиц при движении в измерительной системе СПЦ

1.3.2 Сужающаяся (расширяющаяся) труба

Рассмотрим теперь вращение частицы в сужающемся (расширяющемся) потоке в трубе. В качестве его модели будем исходить из профиля скоростей около источника (или стока) с координатами $(x_0, y_0, 0)$, помещенного в неограниченную жидкость:

$$u_x = \frac{q}{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2} \cdot \frac{\pm(x-x_0)}{\sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}} \quad (1.3.11)$$
$$u_y = \frac{q}{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2} \cdot \frac{\pm(y-y_0)}{\sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}}.$$

Здесь '+' - для истока, '-' для стока, q - коэффициент, характеризующий 'мощность' источника, деление на квадрат расстояния до источника производится для выполнения закона сохранения потока.

Поместим эллипсоид в начало координат. Без потери общности можно считать, что сток (источник) расположен в точке $(x_0, 0)$ и решать задачу в плоскости $y=0$. Как и в предыдущем случае, будем решать задачу в одной плоскости, без учета прецессии. В этом случае поведение частицы так же зависит только от сечения в плоскости $y=0$. Пусть $k > 1$. Найдем зависимость момента сил, действующего на эллипсоид от угла между длинной полуосью эллипсоида и плоскостью, перпендикулярной линии, соединяющей центр эллипсоида со стоком.

Подразумевая, что момент направлен перпендикулярно плоскости рисунка, тройка векторов – правая, получим:

$$\mathbf{T} = \mu \cdot Q_{zz} a^2 \cdot \frac{3q}{2x_0^3} \cdot (k^2 - 1) \cdot \sin 2\alpha. \quad (1.3.12)$$

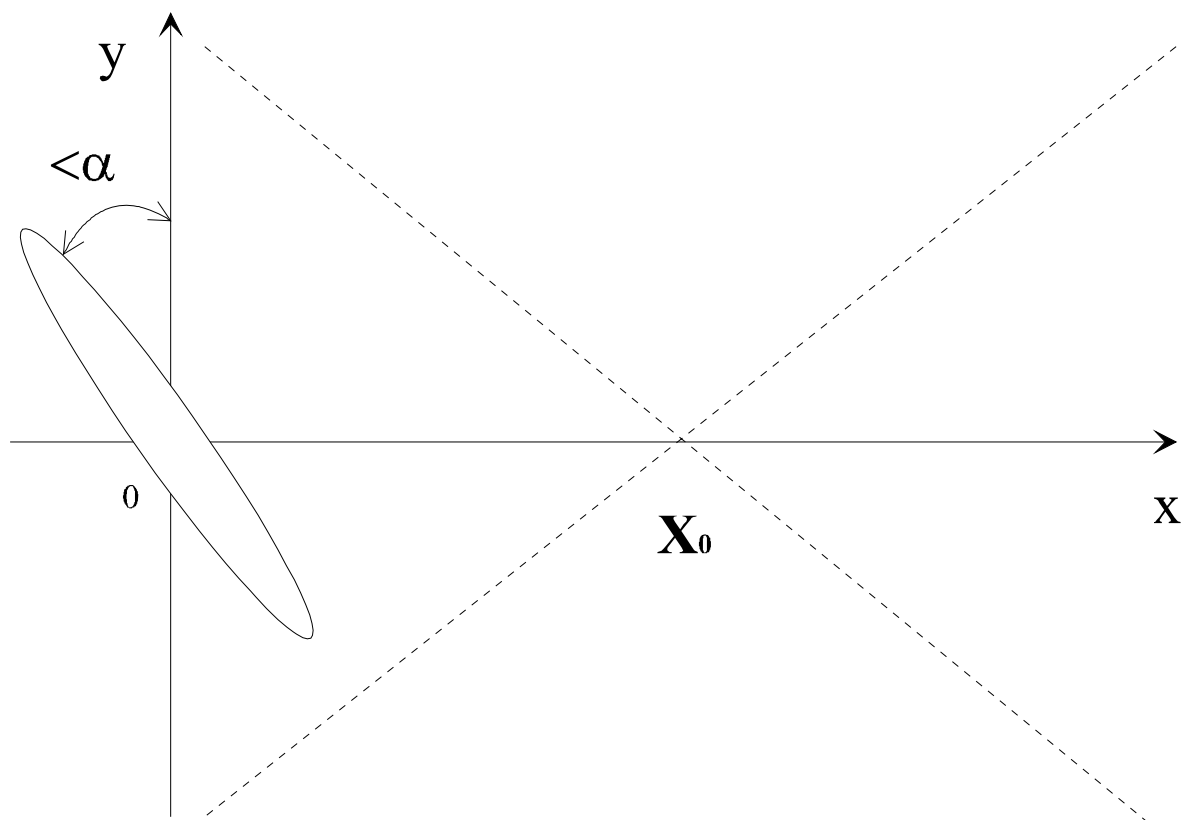


Рис. 1.8 К расчету гидрофокусирующей системы

Составим дифференциальное уравнение:

$$I \cdot \frac{d^2\alpha}{dt^2} = \mu \cdot Q_{zz} a^2 \left((k^2 - 1) \frac{3q \cdot \sin(2\alpha)}{2 \cdot x_{0(t)}^3} - \frac{d\alpha}{dt} (k^2 + 1) \right). \quad (1.3.13)$$

Аналогично предыдущим рассуждениям полагаем $I=0$, $x_{0(t)}^3 = x_{0(t=0)}^3 - 3qt$;

интегрируя, получаем:

$$\operatorname{tg}(\alpha) = \operatorname{tg}(\alpha_0) \left(\frac{x_{0(t)}^3}{x_{0(t=0)}^3} \right)^{\left(\frac{k^2-1}{k^2+1} \right)}. \quad (1.3.14)$$

Значит, если частица в точку $x_{0(t)}^3$ пришла с углом больше α , то в момент времени $t = 0$

она имела угол, больший, чем

$$\alpha_0 = \operatorname{arctg} \left(\operatorname{tg}(\alpha) \left(\frac{x_{0(t)}^3}{x_{0(t=0)}^3} \right)^{\left(\frac{k^2-1}{k^2+1} \right)} \right).$$

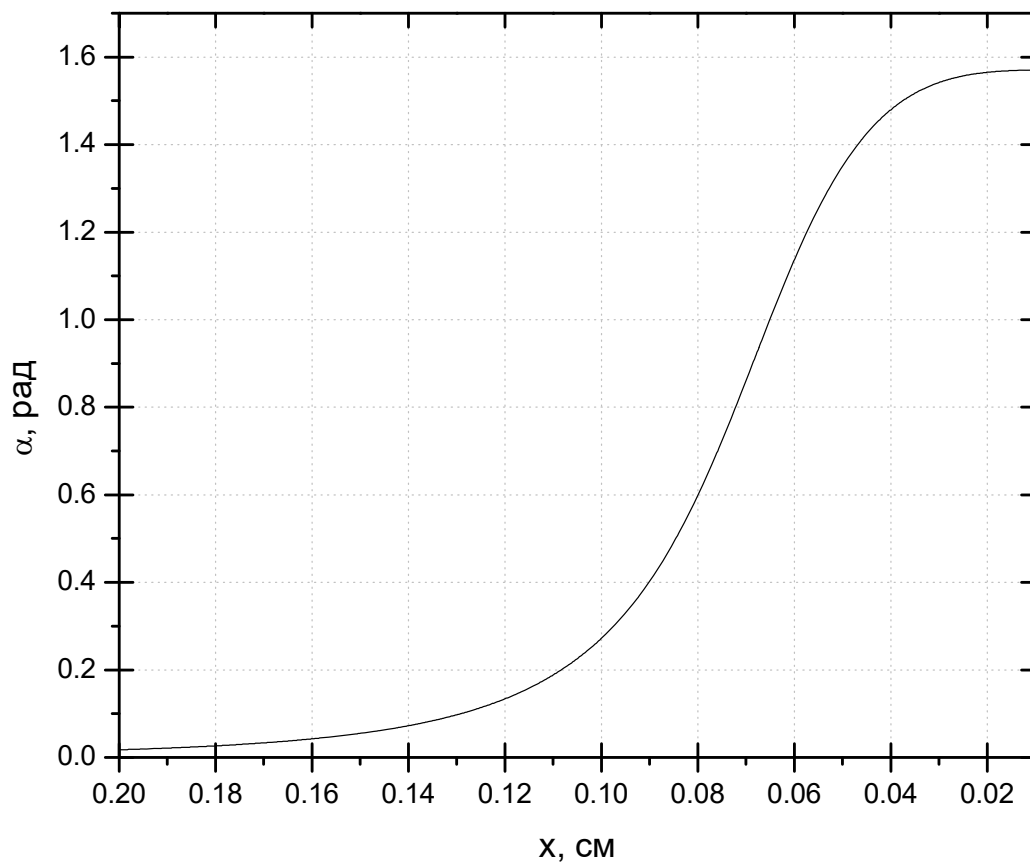


Рис. 1.9/ Зависимость угла α между большой диагональю частицы и направлением потока от расстояния до входа в систему

На Рис. 1.9 отображена зависимость угла поворота эллипсоида, ‘отпущенного’ в 0.2 см от точки стока с начальным углом $\alpha=1^0$.

Доля частиц, вошедших в трубу с углом между направлением потока и длиной диагональю частицы меньше, чем $\Delta\alpha = \frac{\pi}{2} - \alpha$ будет:

$$n(\Delta\alpha) = \frac{\int_{\alpha_0}^{\frac{\pi}{2}} 4\pi \sin\left(\frac{\pi}{2} - \alpha\right) d\alpha}{4\pi} = 1 - \sin(\alpha_0) = 1 - \sin\left(\arctg\left(\tg(\alpha)\left(\frac{x_{0(t)}^3}{x_{0(t=0)}^3}\right)^{\left(\frac{k^2-1}{k^2+1}\right)}\right)\right). \quad (1.3.15)$$

На Рис. 1.10 представлена зависимость доли частиц, ориентированных вдоль потока длинной осью, с отклонением $\Delta\alpha$ меньше 5^0 .

Таким образом, из данных, представленных на Рис. 1.10 видно, что гидрофокусирующая система сканирующего проточного цитометра, имеет хорошие ориентационные свойства, и доля сфероидов, ориентированных длинной полуосью вдоль направления с углом менее 5^0 составляет 95% при отношении осей 2 и растет при увеличении эксцентриситета.

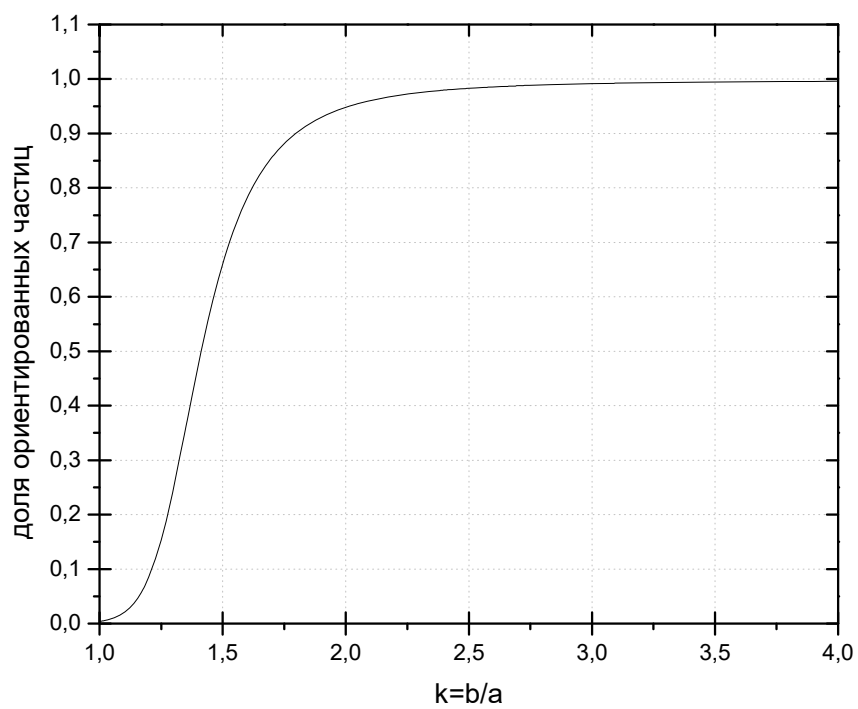


Рис. 1.10. Зависимость доли частиц, ориентированных при выходе из гидрофокусирующей системы лучше 1^0 от коэффициента несферичности

2 Расчеты поля рассеяния и решение обратной задачи светорассеяния для несферических частиц.

2.1 Особенности формирования индикатрисы одиночной несферической частицы.

Картина светорассеяния плоской монохроматической волны на частице в дальней зоне сложнейшим образом зависит от параметров частицы. Даже в простейшем случае – рассеянии на гомогенной сфере она выражается через бесконечную сумму комбинаций сферических функций. Какие-либо свойства формирования картины светорассеяния можно определить в различных предельных случаях, или приближенных методах вычисления индикатрисы. Например, Шепелевичем были определены законы формирования экстремумов индикатрисы рассеяния на гомогенной сфере [41] и ориентированном сфероиде [43]. Нами будет рассмотрено влияние ориентации на картину светорассеяния от двояковогнутого диска (эритроцит человека), и вытянутого сфероида (палочкообразные бактерии).

Рассеяние от объекта в дальней зоне полностью описывается с использованием матричного представления Мюллера [28]:

$$\mathbf{S}(\theta, \varphi) = \begin{pmatrix} I_s \\ Q_s \\ U_s \\ V_s \end{pmatrix} = \frac{1}{k^2 r^2} \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} & S_{13} & S_{14} \\ S_{21} & S_{22} & S_{23} & S_{24} \\ S_{31} & S_{32} & S_{33} & S_{34} \\ S_{41} & S_{42} & S_{43} & S_{44} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_i \\ Q_i \\ U_i \\ V_i \end{pmatrix}. \quad (2.1.1)$$

Для сферической частицы матрица Мюллера имеет простой вид из-за симметрии системы:

$$\mathbf{M}(\theta) = \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} & 0 & 0 \\ S_{12} & S_{22} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & S_{33} & S_{34} \\ 0 & 0 & -S_{34} & S_{44} \end{pmatrix}. \quad (2.1.2)$$

Заметим, что элементы матрицы Мюллера зависят лишь от полярного угла.

Этот вид матрицы рассеяния сохраняется и для осесимметричных рассеивателей в частном случае ориентации - осевой симметрии системы излучатель–объект.

Комбинация элементов матрицы рассеяния, регистрируемая на сканирующем проточном цитометре выглядит следующим образом:

$$I_s = \int_0^{2\pi} I_s(\theta, \varphi) d\varphi = \int_0^{2\pi} I_i \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ S_{21} & S_{22} & S_{23} & S_{24} \\ S_{31} & S_{32} & S_{33} & S_{34} \\ S_{41} & S_{42} & S_{43} & S_{44} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ \cos(2\varphi) \\ \sin(2\varphi) \\ 0 \end{pmatrix} d\varphi, \quad (2.1.3)$$

где $\mathbf{S}_0 = \begin{pmatrix} 1 \\ \cos(2\varphi) \\ \sin(2\varphi) \\ 0 \end{pmatrix}$ - вектор Стокса линейно поляризованной волны с углом φ

между плоскостью поляризации и осью лабораторной системы координат, а $\mathbf{S}_d = (1000)$ – вектор Стокса для фотоприемника, регистрирующий излучение. Интегрирование по углу φ , связано с функциональной особенностью сферического зеркала.

После перемножения и интегрирования получаем выражение:

$$I_s = \int_0^{2\pi} [S_{11}(\theta, \varphi) + S_{12}(\theta, \varphi) \cos(2\varphi) + S_{13}(\theta, \varphi) \sin(2\varphi)] d\varphi. \quad (2.1.4)$$

Элемент S_{11} , рассчитанный при помощи теории Т-матриц для вытянутого сфероида вращения, при наличии угла между осью симметрии и направлением падающего излучения, в полярных углах рассеяния $10^0 - 60^0$, показан на Рис. 2.1 в сферических координатах $(\log(I_s), \theta, \varphi)$. Падающее излучение проходит через центр нижней грани и центр верхней грани координатного куба. Видно, что отклонение направления оси вращения от направления падающего излучения после интегрирования по азимутальному углу приведет к замыванию структуры индикатрисы.

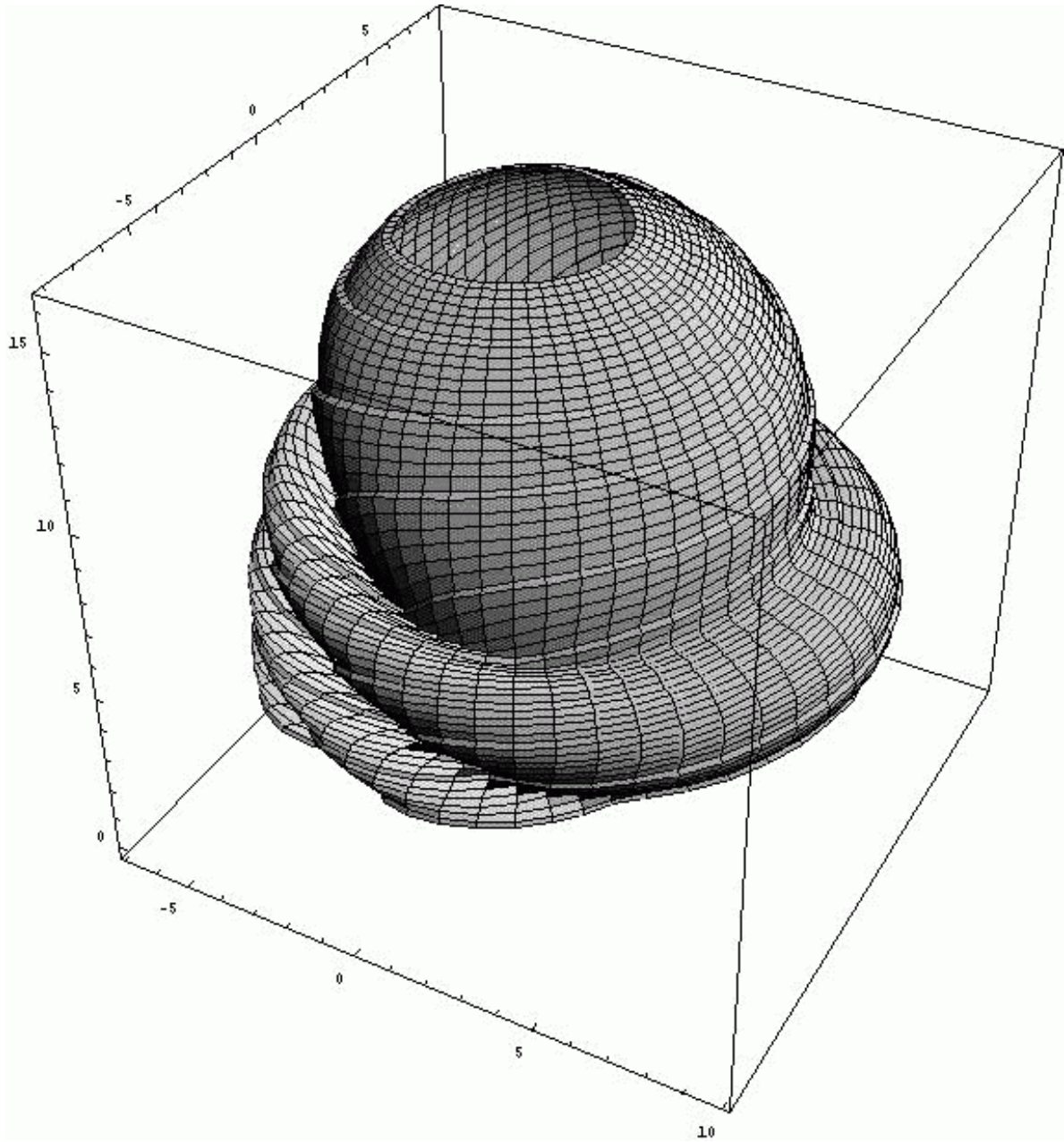


Рис. 2.1. Трехмерное представление индикатрисы вытянутого сфероида в сферических координатах $(\log(I_s), \theta, \varphi)$

Рассмотрим более простой случай, когда ось вращения сфероида совпадает с направлением падающего излучения. В этом случае выполняются следующие соотношения:

$$\int_0^{2\pi} (S_{12} \cos(2\varphi) + S_{13} \sin(2\varphi)) d\varphi = 0 \text{ и } \int_0^{2\pi} S_{11}(\theta, \varphi) d\varphi = 2\pi S_{11},$$

откуда получаем выражение для интенсивности рассеяного света:

$$I_s(\theta) = 2\pi S_{11}(\theta) I_i. \quad (2.1.5)$$

Следовательно, измеренный сигнал на сканирующем проточном цитометре для частицы с осью вращения, совпадающей с направлением падающего излучения, соответствует элементу S_{11} матрицы рассеяния. При этом контрастность сигнала, измеренного на СПЦ максимальна. Кроме того, пропадает пространственная неопределенность положения несферического объекта, что сильнейшим образом упрощает решение обратной задачи светорассеяния.

2.1.1 Использование ВКБ приближения для расчета индикатрис рассеяния одиночными двояковогнутыми дисками в произвольной ориентации.

Эритроциты, как и клетки *E.coli*, являются гомогенными частицами, но имеют более сложную форму двояковогнутого диска (Рис. 2.2). Из-за невыпуклой формы нормального эритроцита человека, моделирование светорассеяния на нем с помощью аппарата Т-матриц затруднено. Кроме того, эритроциты имеют больший размер, при большом коэффициенте несферичности (~ 4). В 1998 году модельный расчет рассеяния на эритроците с помощью Т-матриц был проведен Нильсоном и др. [29]. При этом форма эритроцита моделировалась сплюснутым эллипсоидом вращения, чего явно недостаточно для решения обратной задачи светорассеяния.

Нами было промоделировано светорассеяние на эритроцитах при помощи приближения ВКБ [30].

Форма эритроцита описывается следующим уравнением [31]:

$$z^2=(0.86)^2(1-x^2)(0.01384083+0.2842917x^2+0.01306932x^4). \quad (2.1.6)$$

Уравнение (2.1.6) описывает форму сечения эритроцита в плоскости $y = 0$, где x , y , z – декартовы координаты. Типичный объём эритроцита равен 85 мкм^3 , что соответствует длине 6.5 мкм для длинной оси и размеру перетяжки 1.3 мкм . Относительный коэффициент преломления при наличии гемоглобина в цитоплазме эритроцита является комплексным числом. Реальная часть показателя преломления эритроцита для $\lambda = 0.6328 \text{ мкм}$ лежит между 1.40 и 1.42 , и определяется показателем преломления гемоглобина (1.615) и воды (1.333) [32, 3]. Мнимой частью показателя преломления n_i при расчете рассеяния света с длиной волны 0.6328 мкм можно пренебречь ($n_i \cong 10^{-5}$).

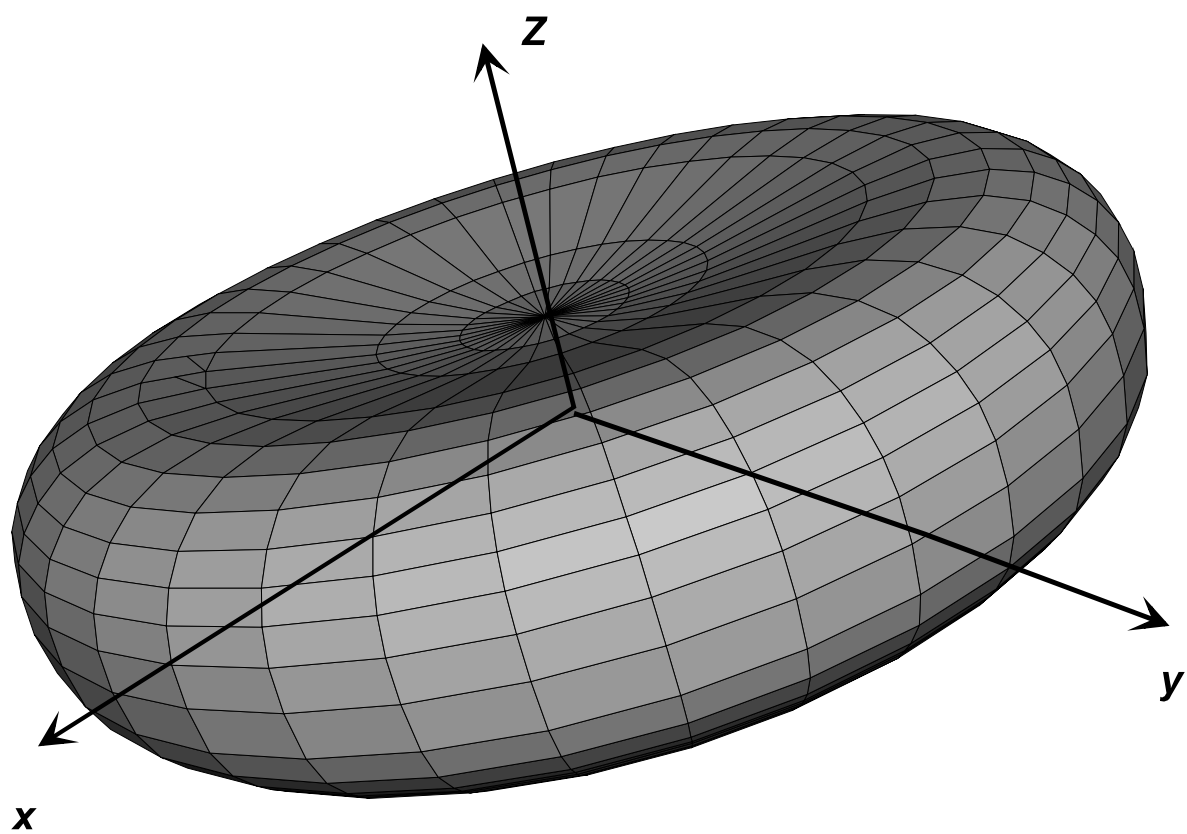


Рис. 2.2. Модель нормального человеческого эритроцита

Так, как реальная часть показателя преломления удовлетворяет условию $|m-1| \ll 1$, для расчета индикатрис светорассеяния эритроцитов возможно применение различных приближений. Нами были опробованы приближения Релея – Ганса – Дебая (РГД) [33], Венцеля – Крамерса – Бриллюэна (ВКБ) [34] и модификация ВКБ – двух-лучевое приближение ВКБ [36].

При применении приближений ВКБ и РГД используется то, что, при известном выражении для величины поля внутри частицы амплитуда поля рассеяной волны в дальней зоне вычисляется точно. Лопатиным [34] было показано, что приближение РГД является частным случаем приближения ВКБ.

Рассмотрим рассеяние плоской монохроматической волны с произвольной поляризацией на однородной немагнитной частице. Пусть плоская электромагнитная волна $\vec{E} = \vec{i} E_0 e^{i(\vec{k}\vec{r})}$ падает на частицу объема V с относительным коэффициентом преломления m . Тогда амплитуду электромагнитной волны, рассеяной частицей в дальней зоне в направлении \vec{o} , можно описать следующим выражениями [35]:

$$\vec{E}^s(\vec{r}) = \vec{f}(\vec{o}, \vec{i}) \frac{e^{i\vec{k}\vec{r}}}{k|\vec{r}|}$$

$$\vec{f}(\vec{o}, \vec{i}) = \frac{k^2}{4\pi} \int_V \{ \vec{o} \times [\vec{o} \times \vec{E}(\vec{r}')] \}_i [m^2(\vec{r}') - 1] e^{-ik(\vec{r}'\vec{o})} dV' \quad (2.1.7)$$

где $\vec{E}(\vec{r}')$ - поле внутри частицы.

В общем случае внутреннее поле $\vec{E}(\vec{r}')$ неизвестно, и нахождение точного выражения для величины $\vec{f}(\vec{i}, \vec{o})$ не представляется возможным. Но довольно часто значение величины поля внутри частицы можно заменить приближенным, вычисленным для различных физических моделей распространения волны внутри частицы.

В приближении РГД поле внутри частицы принимается равным полю падающей волны:

$$\vec{E}(\vec{r}') = \vec{E}_i(\vec{r}'). \quad (2.1.8)$$

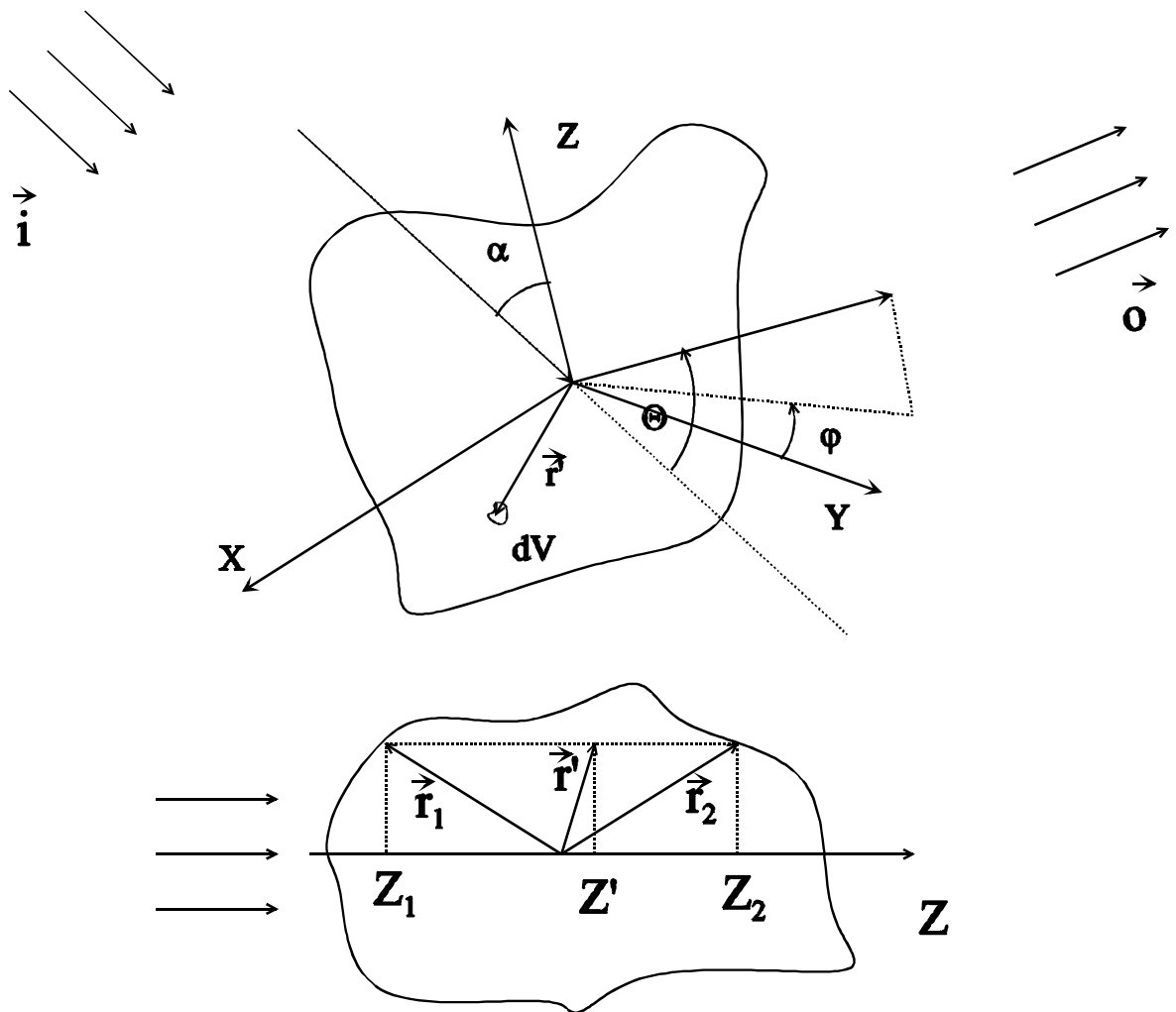


Рис. 2.3. К расчету модели рассеяния света в приближении ВКБ

В ВКБ приближении внутреннее поле частицы заменяется внешним, с учетом набега фазы на прямом отрезке от границы до точки интегрирования по объёму частицы. Направление отрезка совпадает с направлением распространения падающего излучения.

То есть для поля внутри частицы имеем следующее выражение:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}') = \mathbf{e}_i \exp \left\{ ik(\mathbf{r}'\mathbf{i}) + ik \int_{Z_1}^{Z'} m(z') dz' \right\}, \quad (2.1.9)$$

где \mathbf{e}_i – вектор поляризации, $Z_1=(\mathbf{r}_1\mathbf{i})$ – координата точки \mathbf{r}_1 , где падающая волна пересекает границу частицы, $Z'=(\mathbf{r}'\mathbf{i})$. Окончательно для поля рассеяния имеем:

$$f(\mathbf{o}, \mathbf{i}) = \frac{k^2}{4\pi} \left\{ -\mathbf{o} \times [\mathbf{o} \times \mathbf{e}_i] \right\} VF(\mathbf{o}, \mathbf{i}), \quad (2.1.10)$$

$$F(\mathbf{o}, \mathbf{i}) = \frac{1}{V} \int_V [m^2 - 1] \exp(i\mathbf{k}_s \mathbf{r}') \exp \left\{ ik \int_{Z_1}^{Z'} (m - 1) dz' \right\} dV',$$

где $\mathbf{k}_s = k\mathbf{i}_s = k(\mathbf{i} - \mathbf{o})$ – вектор с направлением вдоль биссектрисы комплиментарного угла рассеяния, $|\mathbf{i}_s| = 2\sin(\theta/2)$, θ - угол рассеяния, то есть угол между \mathbf{i} и \mathbf{o} .

Несколько более точные результаты и более широкое диапазоне применимости по сравнению с приближением ВКБ позволяет получить его модификация - двухлучевое ВКБ приближение [36]. В этом приближении, как видно из названия, внутреннее поле частицы представляется как суперпозиция двух плоских волн: падающей и отраженной от границы частицы, распространяющейся в обратном направлении. Обе волны имеют волновые характеристики, соответствующие внутреннему веществу частицы. Амплитуда и фаза "отраженной" волны считаются по формуле, полученной для отражения нормально падающей волны от плоской границы диэлектрик - диэлектрик:

$$\bar{\mathbf{E}} = \bar{\mathbf{E}}^i \frac{2}{m+1} e^{[-i(m-1)\bar{k}\bar{r}_1]} \left[e^{(im\bar{k}\bar{r})} + R \times e^{i\alpha_1} e^{(-im\bar{k}\bar{r})} \right], \quad (2.1.11)$$

где

$$R = \frac{1-m}{1+m} \text{.-коэффициент отражения, а}$$

$$\alpha_1 = 2m\vec{k}(\vec{r}' - \vec{r}_2) \text{-набег фазы отраженной волны в точке } \vec{r}' \text{ .}$$

Для проверки применимости приближений, нами было проведено сравнение индикатрис, рассчитанные разными способами для сферической частицы с размером, сопоставимым с размером эритроцита: по теории Ми, в приближении Релея-Ганса-Дебая, приближениях ВКБ и двухлучевого ВКБ. Расчеты проводились при следующих параметрах: диаметр - 6.3 мкм, показатель преломления сферы - 1.41, длина волны - 632.8 нм, показатель преломления среды - 1.333. Результаты представлены на Рис. 2.4. Индикатриса светорассеяния, рассчитанная в приближении двухлучевого ВКБ совпала с рассчитанной по ВКБ.

Из Рис. 2.4 видно, что в приближении Релея – Ганса – Дебая положения максимумов и минимумов индикатрисы не совпадают с точными. При этом, положения максимумов и минимумов для индикатрисы, рассчитанной по теории Ми, совпадает с индикатрисой рассчитанной по ВКБ приближению, и основное различие между расчетами по теории Ми и ВКБ приближению наблюдается в контрасте индикатрис, причем эта разница увеличивается с ростом угла рассеяния.

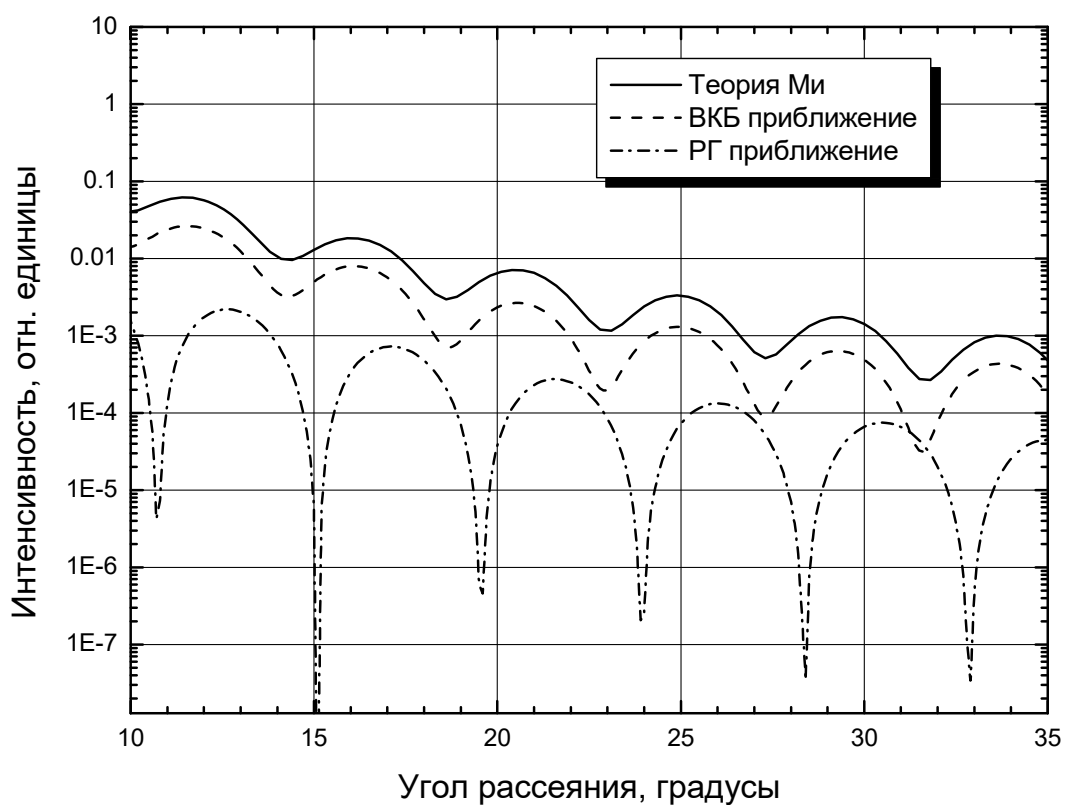


Рис. 2.4. Сравнение методов расчета на примере индикатрисы рассеяния света шаром. $\lambda = 0.6328 \text{ мкм}$, $n_{particle} = 1.41$, $n_{medium} = 1.333$, $D_{sphere} = 6.3 \text{ мкм}$

Таким образом, можно предположить, с использованием приближения ВКБ можно рассчитать истинные положения экстремумов для реального эритроцита. Применение приближения двухлучевого ВКБ для моделирования данной системы неоправданно, так, как оно не дает прироста точности при усложнении расчетов.

Далее в приближении ВКБ нами был проведен теоретический анализ светорассеивающих свойств двояковогнутого диска –формы, которую имеет нормальный эритроцит человека.

В ВКБ приближении были рассчитаны индикатрисы нормальных эритроцитов в углах от 10^0 до 35^0 и проинтегрированные по азимутальному углу. При этом варьировался угол эритроцита относительно направления падения излучения. Индикатрисы при различном значении угла между осью симметрии частицы и направлением падающего излучения β приведены на Рис. 2.5. Угол β изменялся от 0^0 до 90^0 с шагом 10^0 . Для удобства анализа индикатрисы были разнесены по оси u .

Можно заметить, что с ростом угла β контраст индикатрисы падает. Кроме того, при с ростом отклонения оси симметрии эритроцита смещается положение минимумов, а при углах $\beta > 50$ градусов последовательность появления минимумов перестает быть периодической.

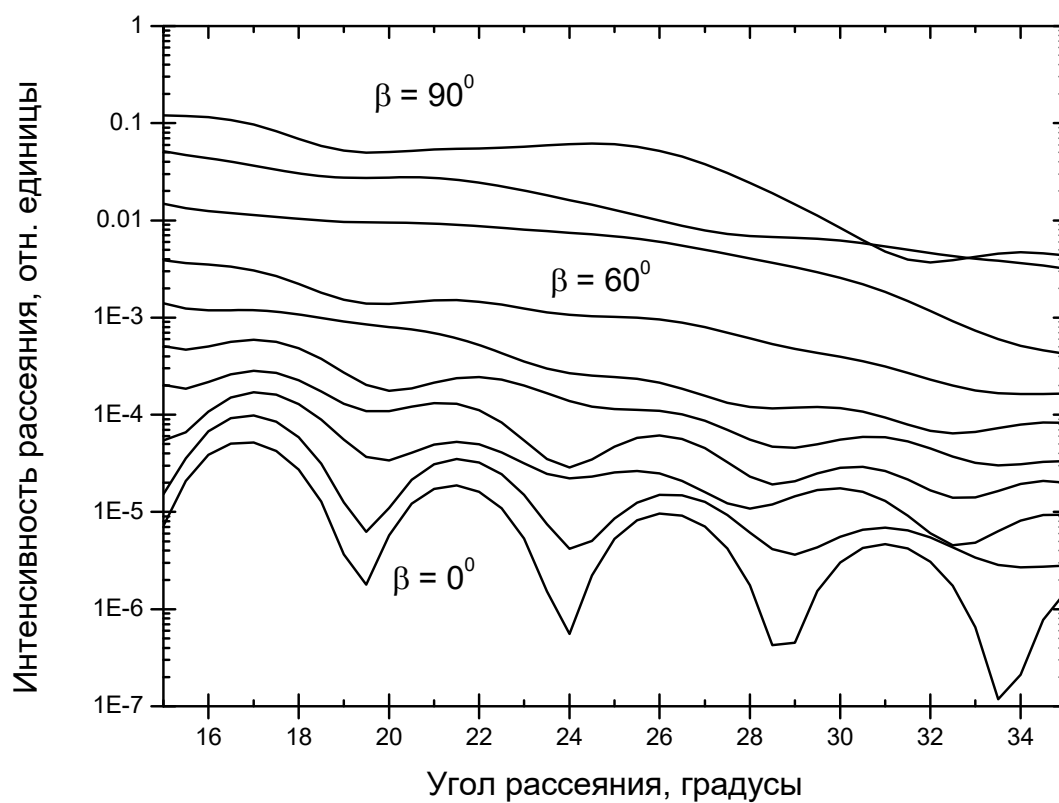


Рис. 2.5. Индикатрисы эритроцита, рассчитанные в ВКБ приближении для различной ориентации эритроцита относительно направления падающего излучения

2.1.2 Расчет индикатрис светорассеяния для вытянутых сфероидов вращения методом T-матриц.

Метод T-матриц широко используется для расчета рассеяния света на несферических гомогенных частицах [37, 38, 39]. В этом методе поле падающей и рассеяной волн представляется в виде бесконечной суммы сферических функций. Затем коэффициенты в разложении рассеяной волны связываются с коэффициентами разложения падающей волны в виде выполнения граничных условий на поверхности рассеивающего объекта. В случае осесимметричного рассеивателя возможно провести разделение переменных в бесконечной системе уравнений, и выразить коэффициенты разложения рассеяной волны в виде

$$\begin{bmatrix} f_v \\ g_v \end{bmatrix} = [B - matrix][A - matrix]^{-1} \begin{bmatrix} a_v \\ b_v \end{bmatrix} = [T - matrix] \begin{bmatrix} a_v \\ b_v \end{bmatrix}, v = 0..∞. \quad (2.1.12)$$

Однако с ростом несферичности метод становится неустойчивым из-за обращения $[A - matrix]^{-1}$, и для расчета рассеяния на сильно несферичных объектах требуются огромные вычислительные ресурсы и жесткие требования на число значащих цифр. Например, для расчета светорассеяния на эритроците в работе [29] при расчетах использовалось представление чисел с 32 значащими цифрами.

Из-за архитектурных ограничений, которые существуют на IBM-совместимых компьютерах максимально возможное количество значащих цифр при расчетах не может быть больше 20 (extended precision).

Для расчетов методом T-матриц нами на языке LabView был реализован алгоритм, описанный в [40] с использованием 20-значной точности при расчетах.

Рассмотрим более детально упомянутую в Гл.2.1 зависимость контрастности индикатрисы от ориентации.

При регистрации светорассеяния от вытянутых сфероидов на СПЦ регистрируется комбинация (2.1.4) элементов матрицы Мюллера. Так, как в выражение (2.1.4) элементы S12 и S13 входят в комбинации с $\sin(2\varphi)$ и $\cos(2\varphi)$, после

интегрирования I_s будет зависеть не только от θ , но и от угла между направлением поляризации подающего излучения и осью симметрии частицы. В тоже время, элемент S11, как известно, описывает рассеяние объектом неполяризованного света, и не зависит от направления поляризации. Кроме того, в случае при малом угле отклонения оси частицы от направления падения излучения, который является наиболее интересным, эти элементы (S12 и S13) много меньше S11. Поэтому исследуем влияние ориентации на

$$I'_s = \int_0^{2\pi} S_{11}(\theta, \varphi) d\varphi \quad (2.1.13)$$

На Рис. 2.6 представлена величина I'_s для эллипсоида вращения с различными углами ориентации ($L=3.49\text{мкм}$, $D=1.17\text{мкм}$, $\lambda=488\text{нм}$, $m = 1.05$, $n_0 = 1.333$).

Из Рис. 2.6 видно, что, как и в случае, рассмотренном в главе 2.1.1, с увеличением отклонения системы излучатель – объект от осесимметричной контраст индикатрисы падает. Однако периодичная структура индикатрисы сохраняется. Так же существует зависимость положения минимумов от ориентации.

$$V_f(\varphi) = \frac{I_{\max} - I_{\min 1}}{I_{\max} + I_{\min 1}}. \quad (2.1.14)$$

Зависимость переднего контраста (2.1.14) и положений первого и второго минимумов от ориентации для такого сфероида представлены на Рис. 2.7. и Рис. 2.8. Из анализа этих данных можно сделать вывод, что наиболее чувствительным к повороту частицы параметром является положение второго минимума.

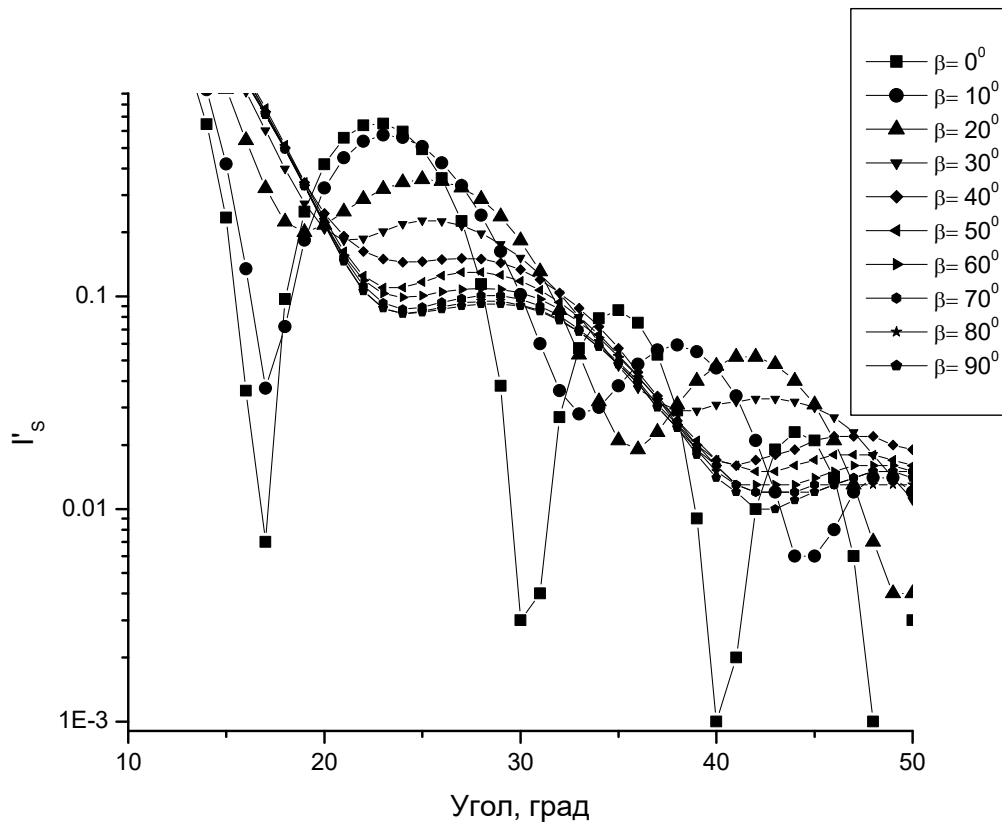


Рис. 2.6. Интеграл элемента S11 матрицы Мюллера для вытянутого эллипсоида с отношением полуосей $\varepsilon = 3$ при различном угле β между осью симметрии и направлением падающего излучения

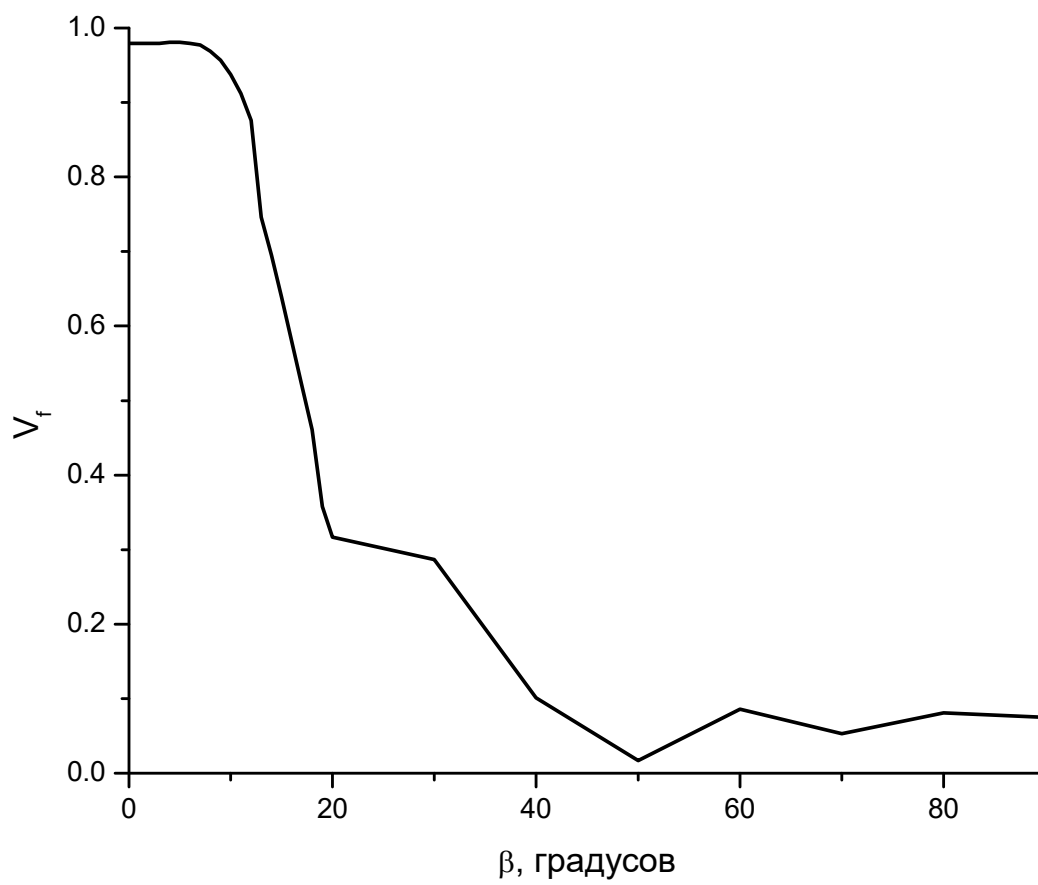


Рис. 2.7. Зависимость переднего контраста от отклонения оси сфероида от направления падающего излучения

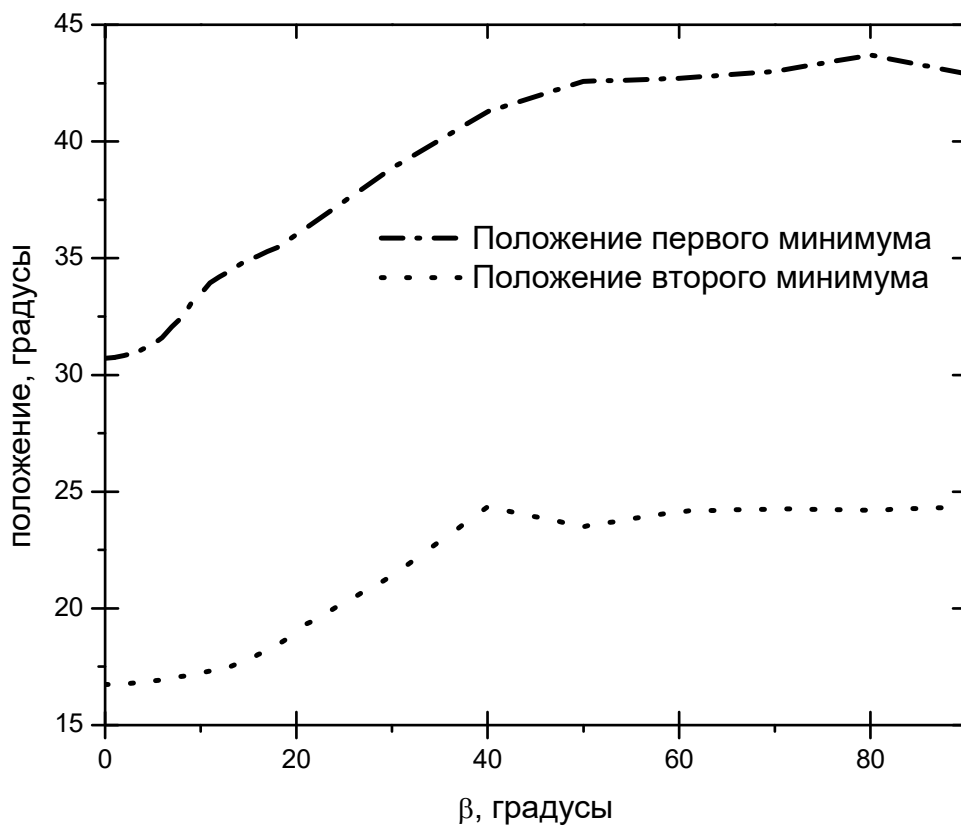


Рис. 2.8. Зависимость положения первого и второго минимумов от отклонения оси сфероида от направления падающего излучения

2.2 Обратная задача светорассеяния для ориентированных сфероидов вращения.

При решении обратной задачи светорассеяния для отдельных несферических частиц необходимо определение не только таких параметров, как размеры и показатель преломления, но и определение ориентации частицы относительно направления падающего излучения и его поляризации. Это значительно усложняет задачу. В этой главе мы рассмотрим случай, когда вытянутая сфероидальная частица ориентирована вдоль направления падения излучения. Как было показано ранее, в измерительной зоне сканирующего проточного цитометра может быть реализован именно такой случай, если толщина внутренней струи порядка 5 мкм. При этом СПЦ регистрируется элемент S_{11} матрицы рассеяния Мюллера.

Так как приближение ВКБ довольно хорошо предсказывает выбор параметров [41] для параметризации обратной задачи светорассеяния, сделанной в работе Мальцева [42] в случае с гомогенными сферическими частицами, можно предположить, что в нашем случае использование параметров, полученных с помощью приближения ВКБ, также приведет к хорошим результатам.

В работе Шепелевича и др. [43] был рассмотрен этот же частный случай с использованием приближения Венцеля – Крамерса - Бриллюэна. При данной постановке задачи в приближении ВКБ картина светорассеяния описывается следующим выражением:

$$\vec{E}^S(\vec{r}) = f(\vec{o}, i) \frac{e^{i\vec{k}\vec{r}}}{|\vec{r}|}, \quad (2.2.1)$$

$$|f(\vec{o}, \vec{i})| = \sin \chi \cdot \frac{k^2}{2\pi} (m-1)G(\theta), \quad (2.2.2)$$

$$G(\theta) = \frac{4\pi a^2}{k(m - \cos(\theta))} \int_0^1 J_0(\rho \cdot \sin(\theta) \cdot \sqrt{1-t^2}) \cdot \sin(\varepsilon \cdot \rho \cdot (m - \cos(\theta)) \cdot t) \cdot t \cdot \exp\left(i \frac{\Delta}{2} t\right) dt, \quad (2.2.3)$$

где \vec{i} – направления падающего излучения, \vec{o} - рассеяного, θ угол между \vec{i} и \vec{o} ,

χ - угол между \vec{b} и \vec{E}^S , $\Delta = \varepsilon\rho(m-1)$ - сдвиг фазы волны, прошедшей через центр частицы, $\varepsilon = \frac{b}{a}$, b - полуось вращения, m - относительный показатель преломления.

Интегрирование (2.2.3) приводит к:

$$\operatorname{Re}[G(\theta)] = \frac{2\pi a^2}{k(m - \cos(\theta))} \left\{ \frac{B_1}{U_1^3} [\sin(U_1) - U_1 \cos(U_1)] - \frac{B_2}{U_2^3} [\sin(U_2) - U_2 \cos(U_2)] \right\}, \quad (2.2.4)$$

$$\operatorname{Im}[G(\theta)] = -\frac{2\pi a^2}{k(m - \cos(\theta))} \left\{ \frac{B_1}{U_1^3} [U_1 \sin(U_1) + \cos(U_1)] + \frac{B_2}{U_2^3} [U_2 \sin(U_2) + \cos(U_2)] \right\}, \quad (2.2.5)$$

где

$$B_1 = \frac{\Delta}{2} + \varepsilon\rho(m - \cos\theta), \quad B_2 = \varepsilon\rho(\cos\theta - 1), \quad (2.2.6)$$

$$U_1 = \sqrt{\rho^2 \sin^2\theta + B_1^2}, \quad U_2 = \sqrt{\rho^2 \sin^2\theta + B_2^2}.$$

В приближении $\rho \gg 1$ имеем $U_1 \gg 1$ и $U_2 \gg 1$, тогда выражение для $G(\theta)$:

$$|G(\theta)|^2 \approx \left(\frac{2\pi a^2}{k(m - \cos(\theta))} \right)^2 \left\{ \left(\frac{B_1}{U_1^2} \right)^2 + \left(\frac{B_2}{U_2^2} \right)^2 - 2 \frac{B_1}{U_1^2} \frac{B_2}{U_2^2} \cos(U_1 + U_2) \right\}, \quad (2.2.7)$$

откуда, в этом приближении имеем условия:

Для минимума ($n > 1$):

$$A = U_1 + U_2 = \pi + 2\pi n. \quad (2.2.8)$$

Для максимума ($n > 1$):

$$A = U_1 + U_2 = 2\pi + 2\pi n. \quad (2.2.9)$$

Отсюда приближенное выражение для положения экстремумов:

$$\theta \cong 2 \arcsin \left(\sqrt{\frac{1 + (A^2 - \Delta^2)^2 (\varepsilon^2 - 1) / (2A\rho)^2 - 1}{2(\varepsilon^2 - 1)}} \right). \quad (2.2.10)$$

Для параметризации обратной задачи светорассеяния были выбраны следующие параметры индикатрисы: положение первого и второго минимума и функция набега фазы ρ .

С целью проведения моделирования рассеяния света на вытянутых сфероидах, была написана программа на языке визуального программирования LabView, использующая теорию Т-матриц. Из-за неустойчивости алгоритма Т-матриц при расчете частиц с формой, сильно отличающейся от сферической, нами было промоделировано светорассеяние для эллипсоидов вращения с более узким диапазоном в разбросе по отношению осей, чем у существующих в природе клеток *E.coli* – с вариацией длины от 0.5 мкм до 4.3 мкм и отношением осей от 1 до 3.6.

Для более точного описания полученных расчетных данных аппроксимационными уравнениями, нами была проведена подгонка выражения (2.2.10) методом наименьших квадратов к данным расчета методом Т-матриц, с вариацией параметра A_i и с введением коэффициента k_i перед Δ_i^2 :

$$\theta_i \cong 2 \arcsin \left(\sqrt{\frac{1 + (A_i^2 - k_i \Delta_i^2)^2 (\varepsilon^2 - 1) / (2A_i \rho)^2 - 1}{2(\varepsilon^2 - 1)}} \right). \quad (2.2.11)$$

Полученные величины k_i и A_i для первых двух минимумов сведены в таблицу:

	Подгонка	ВКБ
A_1	8.78989	9.42478
k_1	0.60335	1
Критерий R^2	0.99873	-
A_2	15.08416	15.70796
k_2	1.25023	1
Критерий R^2	0.99892	-

Ошибка при определении углов из уравнений (2.2.11) в зависимости от угла приведена на Рис. 2.9.

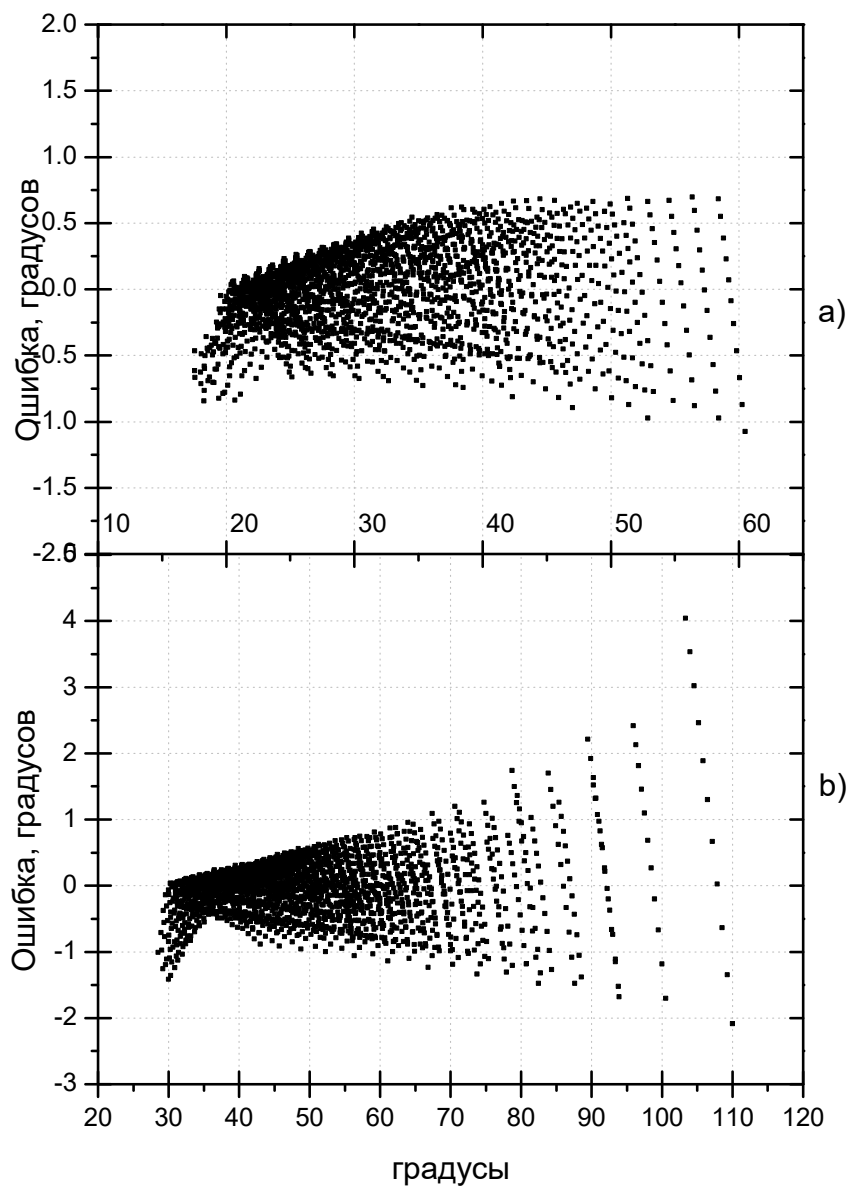


Рис. 2.9. Сопоставление приближенных уравнений с расчетами методом Т-матриц. а) положение первого минимума, б) положение второго минимума

Как было показано в работе [42] для сферических частиц, параметр V_f напрямую связан с величиной набега фазы Δ . Кроме того, из уравнений (2.2.7) и (2.2.6) также видно, что в случае $\rho \gg 1$ параметр Δ будет играть роль параметра разложения, при подсчете V_f из (2.2.7).

Аппроксимационное уравнение искалось в следующем виде:

$$\Delta = a_1 + a_2 \sqrt[3]{V_f + a_3} . \quad (2.2.12)$$

Результаты подгонки методом наименьших квадратов представлены на Рис. 2.10
получены параметры:

$$\Delta = 6.05839 - 5.94714 \cdot \sqrt[3]{V_f - 0.09243} . \quad (2.2.13)$$

Выражения для ε и ρ можно найти из выражения (2.2.10):

$$\varepsilon^2 - 1 = \frac{\sin^2\left(\frac{\theta_2}{2}\right)\left(\frac{A_1^2 - k_1\Delta^2}{2A_1}\right)^2 - \sin^2\left(\frac{\theta_1}{2}\right)\left(\frac{A_2^2 - k_2\Delta^2}{2A_2}\right)^2}{\sin^4\left(\frac{\theta_1}{2}\right)\left(\frac{A_2^2 - k_2\Delta^2}{2A_2}\right)^2 - \sin^4\left(\frac{\theta_2}{2}\right)\left(\frac{A_1^2 - k_1\Delta^2}{2A_1}\right)^2} , \quad (2.2.14)$$

$$\rho^2 = \frac{\sin^4\left(\frac{\theta_1}{2}\right)\left(\frac{A_2^2 - k_2\Delta^2}{2A_2}\right)^2 - \sin^4\left(\frac{\theta_2}{2}\right)\left(\frac{A_1^2 - k_1\Delta^2}{2A_1}\right)^2}{4\sin^2\left(\frac{\theta_2}{2}\right)\sin^2\left(\frac{\theta_1}{2}\right)\left(\sin^2\left(\frac{\theta_1}{2}\right) - \sin^2\left(\frac{\theta_2}{2}\right)\right)} , \quad (2.2.15)$$

где Δ находится из уравнения (2.2.13).

На Рис. 2.11 приведены гистограммы погрешности решения обратной задачи описанного метода в насчитанном диапазоне параметров частиц.

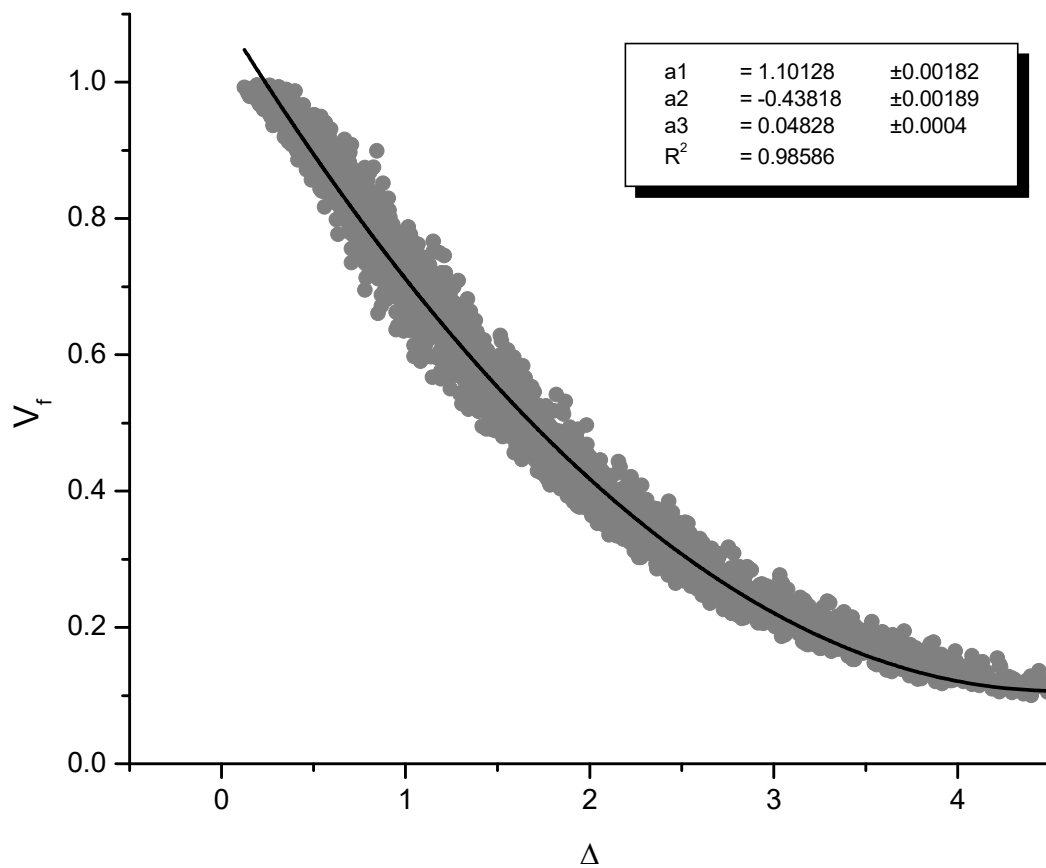


Рис. 2.10. Параметризация зависимости переднего контраста от функции набега фазы уравнением (2.2.12)

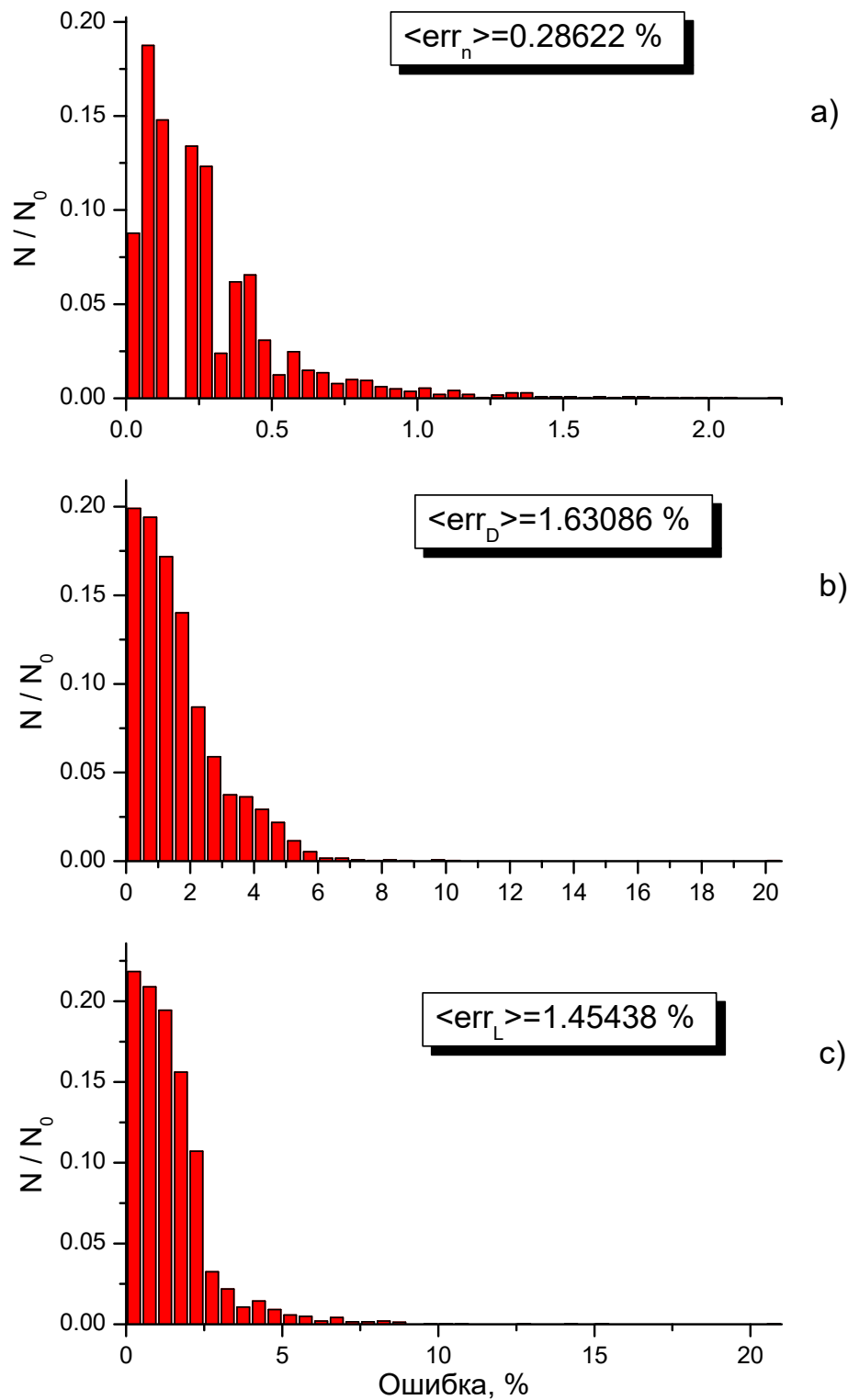


Рис. 2.11. Погрешность параметризации решения обратной задачи светорассеяния для вытянутых сфероидов вращения. а) - по определению показателя преломления; б) - диаметра; в) – длины

* * *

Для вытянутых сфероидов вращения и для двояковогнутых дисков показано, что передний контраст падает при отклонении оси симметрии от направления падения излучения.

Для ориентированных вытянутых сфероидов вращения проведена параметризация обратной задачи светорассеяния для частиц с оптической длиной от 1 до 8, диаметром от 1 до 3 и относительным коэффициентом преломления от 1.01 до 1.08 с погрешностью определения параметров $\sim 2\%$.

3 Экспериментальное исследование светорассеивающих свойств несферических частиц

3.1 Классификация латексных частиц на сканирующем проточном цитометре.

В настоящее время латексные частицы играют важную роль в различных технологиях, особенно в области биологии и медицины. Поэтому представляется важной возможность СПЦ классифицировать латексные частицы, например, при проведении реакции лиганд – рецептор на поверхности смеси латексных частиц, с большой скоростью и высокой точностью определения параметров частиц.

В случае сферических частиц идентификация может быть проведена по размеру и показателю преломления с использованием метода FLSI или с помощью подгонки методом наименьших квадратов измеренных индикатрис к индикатрисам, рассчитанным по теории Ми. В этом случае идентификация частиц не зависит от способа получения сигнала рассеяния. При большой скорости регистрации светорассеяния латексных частиц и использовании метода FLSI [42] возможна классификация частиц по положению на карте *размер – коэффициент преломления*.

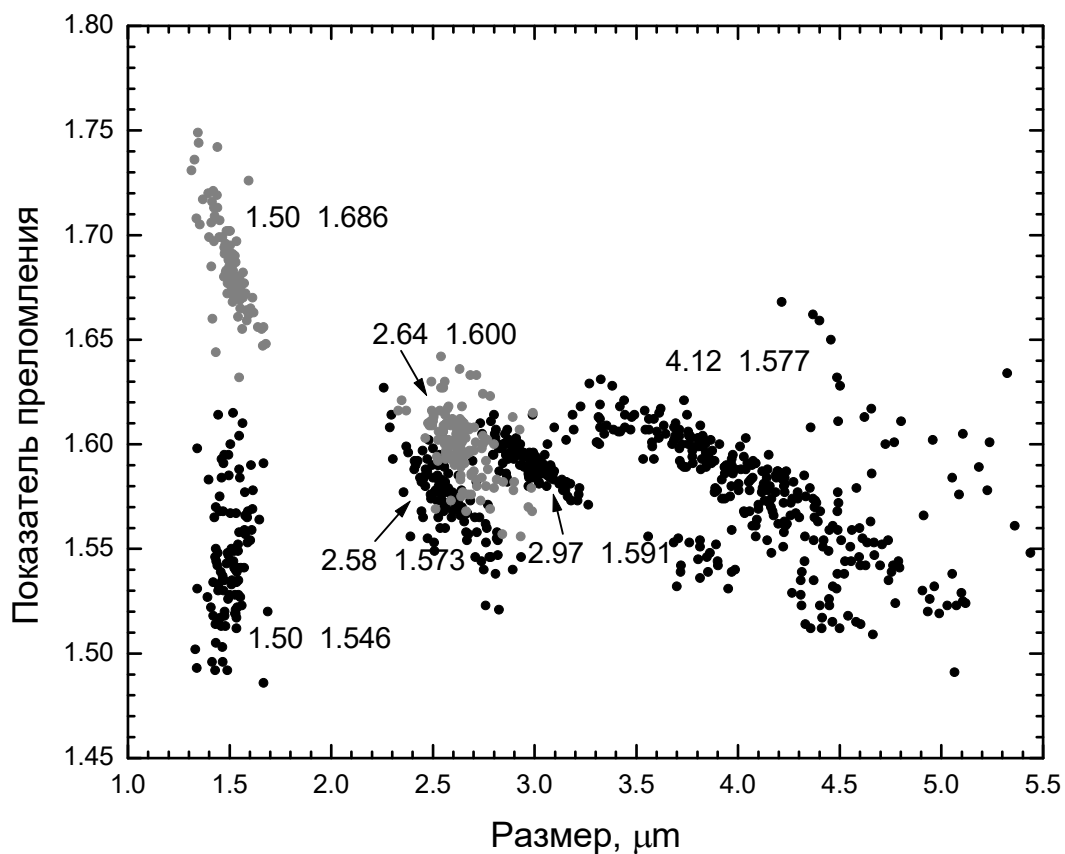


Рис. 3.1. Карта показатель преломления - размер для шести проб полистирольных частиц. Указаны средние величины размера и показателя преломления для каждой из проб

Для демонстрации возможности классификации латексных частиц различных размеров на сканирующем проточном цитометре было измерено 6 проб полистирольных частиц. Все параметры цитометра (скорость потока, положение триггерного луча, усиления электронных трактов) не изменялись между измерениями. С помощью FLSI метода были определены основные параметры каждой пробы. Проба N₁: средний размер (d_{cp}) 1.50 мкм со стандартным отклонением (σ) 0.07 мкм, средний показатель преломления (n_{cp}) 1.546; Проба N₂: $d_{cp} = 1.50$ мкм с $\sigma = 0.08$ мкм, $n_{cp} = 1.686$; Проба N₃): $d_{cp} = 2.58$ мкм с $\sigma = 0.13$ мкм, $n_{cp} = 1.573$; Проба N₄: $d_{cp} = 2.64$ мкм с $\sigma = 0.12$ мкм, $n_{cp} = 1.600$; Проба N₅: $d_{cp} = 2.97$ мкм с $\sigma = 0.11$ мкм, $n_{cp} = 1.597$; Проба N₆: $d_{cp} = 4.12$ мкм с $\sigma = 0.48$ мкм, $n_{cp} = 1.577$. Проба N₂ содержала полистирольные частицы покрытые флуоресцентным красителем, что привело сдвигу при определении показателя преломления для этой пробы. Результаты анализа представлены на Рис. 3.1. Представленные результаты позволяют заключить, что все пробы, за исключением проб N₃ и N₄, можно идентифицировать по размеру и показателю преломления их частиц. Следует отдельно отметить, что пробы N₁ и N₂ хорошо разделились по показателю преломления.

Главным преимуществом идентификации частиц по их параметрам является независимость от настроек СПЦ. Однако при этом точность идентификации уменьшается из-за систематической ошибки FLSI метода в определении размера и показателя преломления частиц.

Для более качественного разделения смеси латексных частиц по классам, был предложен метод классификации по сигналам сканирующего проточного цитометра без преобразования сигнал в зависимость интенсивности рассеяния от угла.

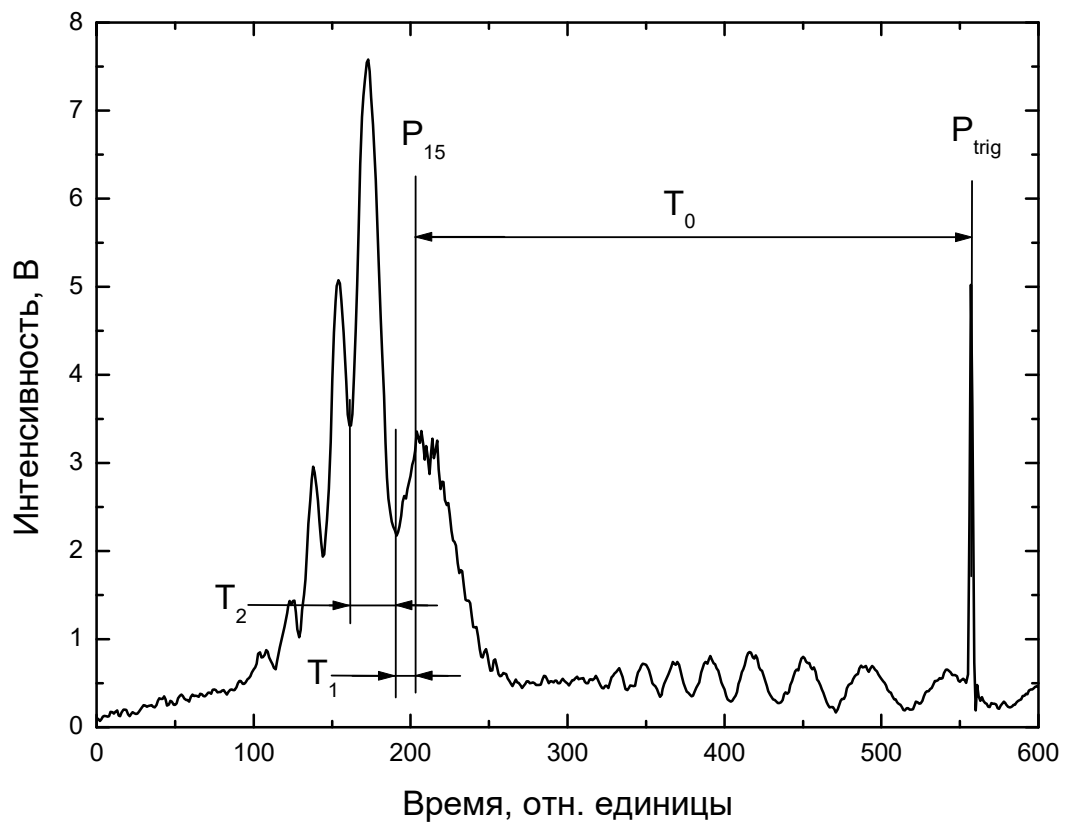


Рис. 3.2. К методу классификации латексных частиц по сигналу сканирующего проточного цитометра

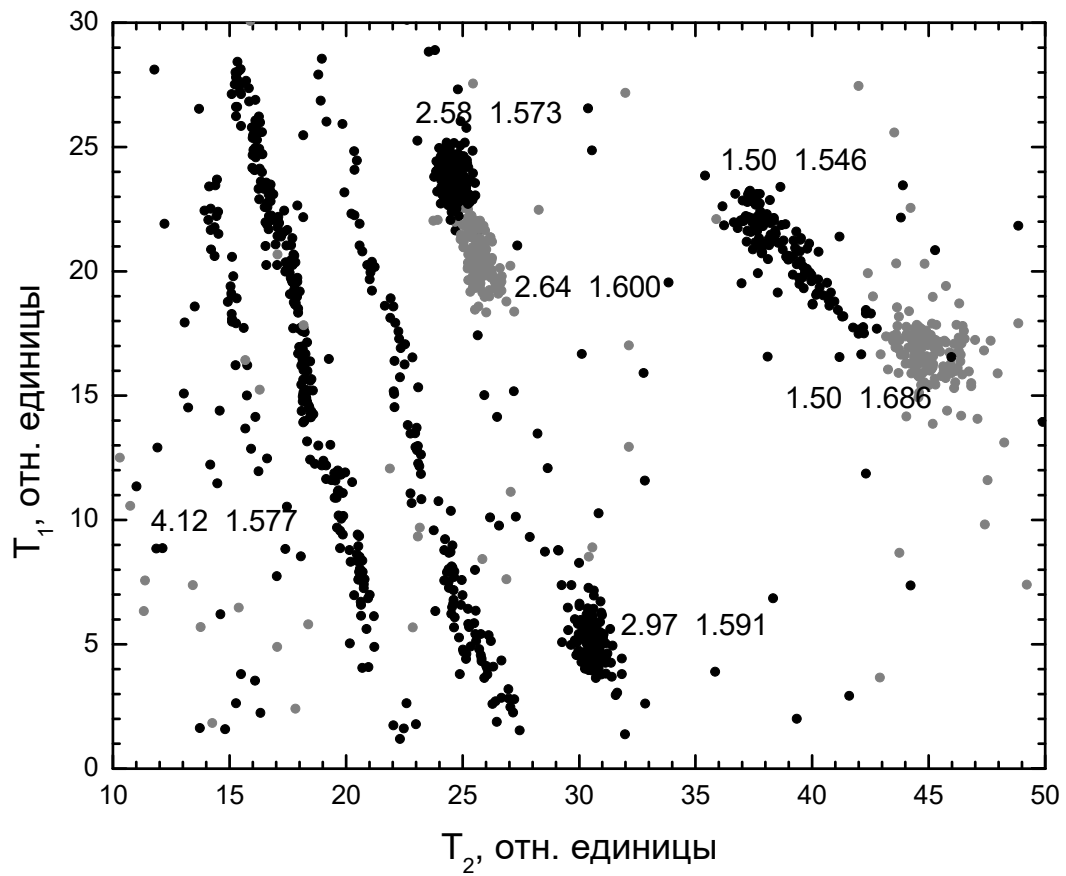


Рис. 3.3. Шесть проб полистирольных частиц идентифицированных по исходному сигналу СПЦ. Числа соответствуют среднему размеру и показателю преломления каждой пробы

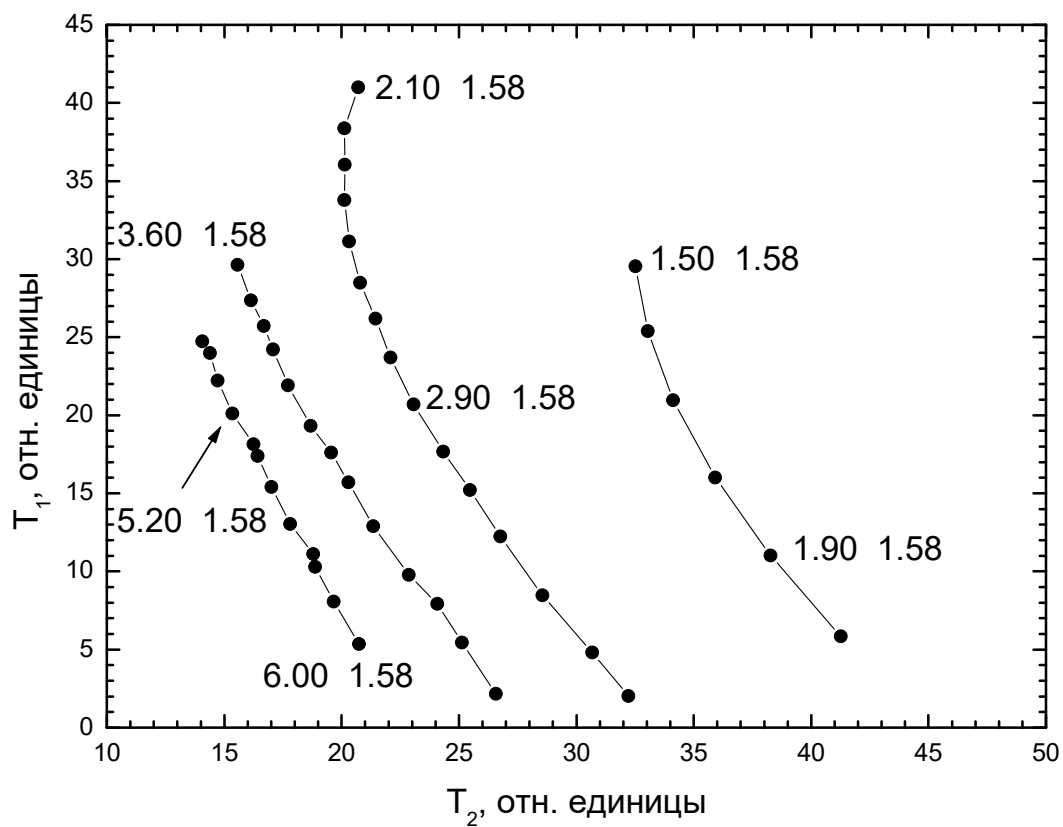


Рис. 3.4. Расчет расположения анализируемых частиц на карте временных интервалов T_1 и T_2 . Числа на карте соответствуют размеру и показателю преломления частицы

Для идентификации частиц по исходным сигналам использовались временные интервалы в сигналах, показанные на Рис. 3.2. Точка P_{15} на сигнале СПЦ определяется из скорости потока и положения триггерного луча P_{trig} , и приблизительно соответствует углу рассеяния 15° . Интервал T_0 - время между точками P_{15} и P_{trig} . Интервалы T_1 и T_2 используются в качестве параметров при идентификации частиц, где T_1 – время от реперной точки до первого минимума индикатрисы, T_2 – время между первым и вторым минимумами.

Карта в координатах параметров T_1 и T_2 для проб, представленных на Рис. 3.1. показана на Рис. 3.3.

Видно, что такой метод классификации латексных частиц по исходным сигналам имеет большую чувствительность к размеру частиц по сравнению с FLSI методом. Например, пробы N_3 и N_4 хорошо разделились по исходным сигналам цитометра.

Для объяснения расположения проб на карте параметров T_1 и T_2 , были рассчитаны индикатрисы по теории Ми для частиц с показателем преломления 1.58 и размерам, изменяющимся от 1.5 мкм до 6 мкм с шагом 0.1 мкм. Рассчитанные индикатрисы были преобразованы в исходные сигналы и интервалы T_1 и T_2 были определены для каждой индикатрисы. Результат расчетов представлен на Рис. 3.4 и качественно соответствует экспериментальным результатам (Рис. 3.3). Разрывы на карте вызваны переходом минимума через точку P_{trig} .

В случае идентификации частиц по исходным сигналам параметры T_0 , T_1 , и T_2 зависят от скорости потока и от положения триггерного луча. Естественно, скорость потока и положение триггера может меняться от эксперимента к эксперименту, поэтому этот метод имеет менее широкую область приложений, чем метод FLSI. Однако, идентификацию частиц можно проводить одновременно предложенным методом и по параметрам частицы, определенным методом FLSI. В этом случае можно реализовать преимущества обоих подходов.

3.2 Рассеяние света эритроцитами человека.

Эритроциты человека, или красные кровяные тельца, являются безъядерными клетками с однородной цитоплазмой и пренебрежимо тонкой (~ 7 нм) мембраной. В состав цитоплазмы входят: вода $\sim 65\%$, гемоглобин $\sim 34\%$, соли $\sim 0.7\%$ и другие органические вещества $\sim 0.2\%$ [2]. *In vivo* здоровый эритроцит имеет форму двояковогнутого диска с диаметром от 5.5 до 7.5 мкм с толщиной в центре порядка 1.3 мкм.

Экспериментально была измерена проба свежей крови, разбавленную в 100 раз и содержащую приблизительно 10^6 клеток. После этого были записаны 443 индикатрисы и некоторые из них показаны на Рис. 3.5. Наблюдалось очень сильное разнообразие в индикатрисах.

Для того чтобы легче наблюдать различие в форме индикатрис, они были смещены относительно друг друга. Наблюдается качественное согласие для индикатрис, измеренных на сканирующем проточном цитометре, и индикатрис, рассчитанных в ВКБ приближении (Рис. 2.5.). Однако необходимо отметить существенные отличия. Во-первых, многообразие экспериментальных индикатрис более широко, что вызвано распределением эритроцитов по размеру. Во вторых, индикатриса с наибольшим контрастом среди экспериментальных индикатрис всегда имеет контраст меньший, чем у рассчитанных. Этот факт находится в согласии с вышеприведенными рассуждениями о том, что точная теория дает меньший контраст индикатрисы по сравнению с ВКБ приближением.

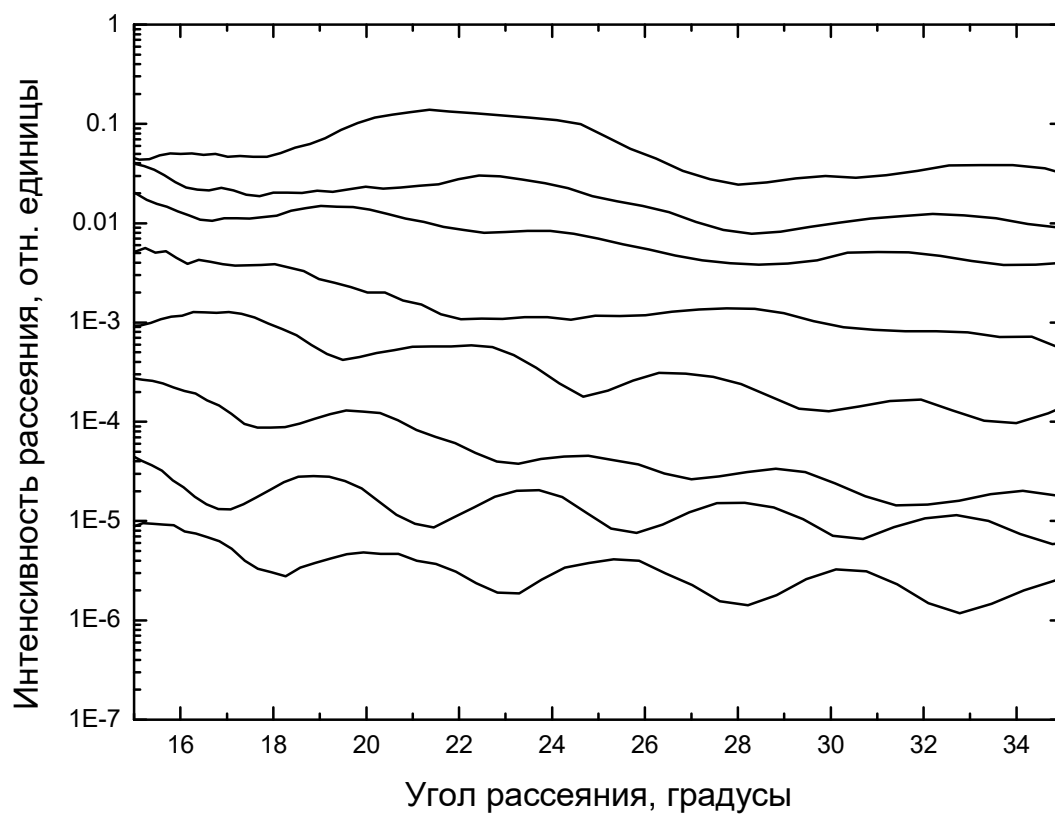


Рис. 3.5. Экспериментальные индикатрисы индивидуальных эритроцитов

К сожалению, полный анализ измеренных индикатрис невозможен в настоящее время из-за сложности расчетов для частиц с формой эритроцита. Таким образом извлечь параметры эритроцита по индикатрисам не представляется возможным. Однако можно сделать некоторые предположения об ориентации эритроцитов в зоне регистрации сканирующего проточного цитометра. Отметим, что только индикатрисы с углом ориентации β равном 0^0 , 10^0 , 20^0 и 30^0 имеют достаточно ясную и осциллирующую структуру (Рис. 2.5). Контраст этих экспериментальных индикатрис меняется от 0.7 до 0.071. В наших экспериментах контраст 208 индикатрис был больше 0.07, что соответствовало 47% от всех измеренных эритроцитов. Это значение можно представить как нижняя оценка количества контрастных индикатрис. То есть количество эритроцитов, с углом менее 30^0 между осью симметрии и направлением падающего излучения было порядка 50 %.

3.3 Рассеяние света бактериями *E.coli*

Вследствие того, что клетки *Escherichia coli* являются безъядерными клетками, они хорошо подходят в качестве объекта исследования с точки зрения светорассеяния. Поэтому в данном направлении существует множество исследований. Наибольшее количество литературы посвящено исследованию именно бактерий *Escherichia coli* – кишечной палочки. Это культура широко используется как в биопромышленности, так и в биологических исследованиях.

Важной абсолютной характеристикой среди свойств, характеризующих светорассеяние частицы, является дифференциальное сечение рассеяния [28]. В эксперименте измерение абсолютных сечений рассеяния связано с большими трудностями при калибровке оптического и электронного трактов установки. В случае использования сканирующего проточного цитометра, мы можем воспользоваться тем, что индикатрисы гомогенных сферических частиц с высокой достоверностью совпадают с рассчитанными по теории Ми. Поэтому для определения дифференциального сечения рассеяния клеток *E.coli* была приготовлена смесь, содержащая бактерии и полистирольные частицы.

В наших экспериментах по исследованию светорассеивающих свойств *E.coli* мы использовали штамм TG-1 [44], полученный из коллекции культур клеток Государственного научного центра "ВЕКТОР".

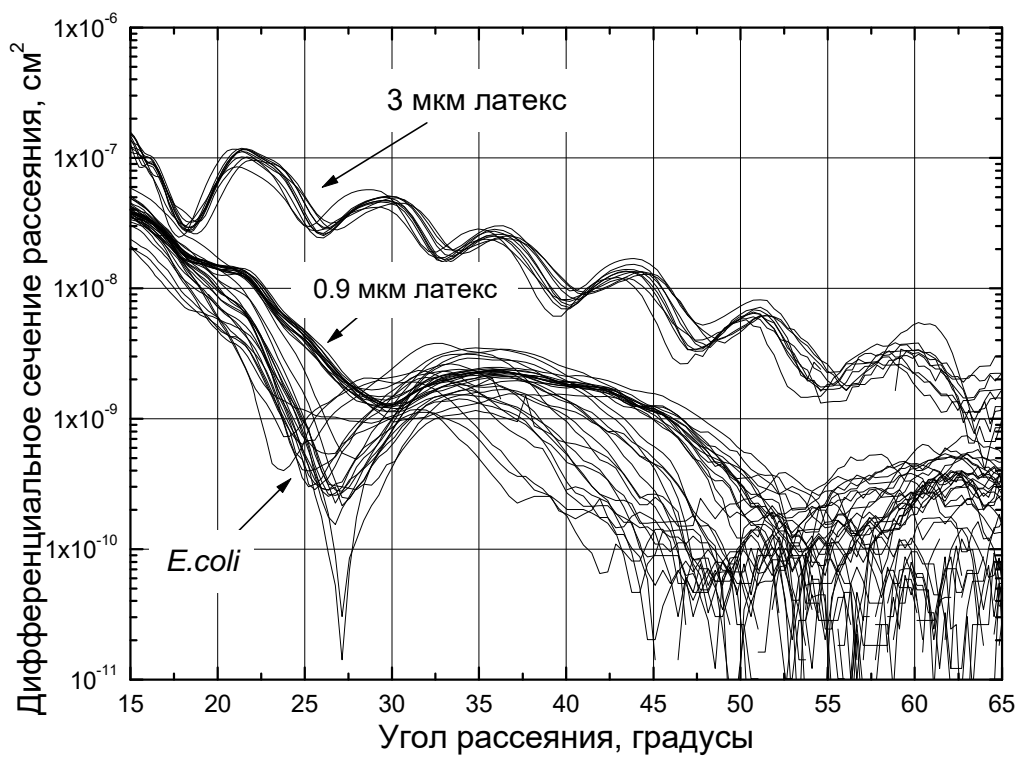


Рис. 3.6. Дифференциальное сечение рассеяния смеси клеток *Escherichia coli* и полистирольных частиц, измеренных на сканирующем проточном цитометре

Культуры бактериальных клеток выращивались в термостате с температурой 37°C при энергичном перемешивании. Выращенные в LB среде (10.0 g NaCl, 10.0 g tryptone "Difco", 5.0 g yeast extract "Difco", pH-7.5) *E.coli* использовались в экспериментах по светорассеянию без какой-либо дополнительной обработки.

На Рис. 3.6 приведен результат измерения смеси бактерий *E.coli* и полистирольных латексных частиц. Шкала дифференциального сечения рассеяния была установлена после процедуры калибровки экспериментальных индикатрис полистирольных частиц по расчетным, полученным по теории Ми. Таким образом, впервые были измерены дифференциальное сечение рассеяния одиночных клеток *E.coli*. Эти данные могут быть использованы при расчете оптических систем, предназначенных для анализа клеток.

Например, рассеяние света от взвеси клеток *E.coli* измерялись на фотометре в углах от 10 до 90° [6]. Для сопоставления экспериментальных данных с теоретическими расчетами использовалось приближение Релея – Ганса – Дебая. При расчетах клетка моделировалась сфероидом вращения с оболочкой. Положения двух минимумов индикатрисы дали хорошее согласие с теоретическим предсказанием. Проточная цитометрия использовалась в работе [45] для выявления *E.coli* в крови. С использованием рассеяния вперед и флуоресценции, было измерена концентрация *E.coli* в крови после проведения лизиса остальных клеток химическими реагентами. Так же для исследований бактерий на проточных цитометрах использовался сигнал флуоресценции от окрашенного красителем ДНК [46, 47]. Поляризационные свойства рассеянного суспензией *E.coli* света исследовались в работе Johnston и др. [48]. Была измерена индикатрисы в углах 10 - 90°, которая обладала характерной для данного вида бактерий структурой. Интенсивно рассеяние на суспензии *E.coli* изучалось Bronk и др. Они предложили измерять комбинацию элементов матрицы рассеяния, что и было реализовано в угловом интервале 30-150° [49]. Сравнение светорассеивающих измерений и данных оптической микроскопии обнаружили строгую зависимость положения пика на индикатрисе от диаметра бактерий. Таким образом можно было

определить средний диаметр клеток с точностью 20 нм. Данный подход получил дальнейшее развитие с привлечением аппроксимации связанных диполей для теоретического расчета светорассеивающих свойств палочкообразных бактерий [50]. Удалось получить хорошее согласие между рассчитанными и измеренными индикатрисами. Определенный из индикатрис диаметр клеток достаточно точно соответствовал диаметру клеток, измеренному на оптическом микроскопе. Недавно этот подход использовался для изучения роста бактерий [51].

По литературным данным, форма бактерии *Escherichia coli* достаточно точно описывается сфероидом вращения диаметром 1 мкм и длиной от 2 мкм в стационарной фазе до 6 мкм в логарифмической фазе. И благодаря тому, что *E.coli* являются вытянутыми сфероидами, как мы видели из гидродинамических расчетов, более устойчивой ориентацией их в зоне регистрации является ориентация осью симметрии вдоль направления падающего излучения. Более того, при удачных начальных условиях и при небольшой толщине внутренней струи отклонение угол между осями лежит в пределах нескольких градусов.

Как было показано в главе 2.1, при несовпадении оси вращения сфероидальной частицы, каковой можно представить *E.coli*, интегрирование по азимутальному углу должно существенно уменьшать контраст индикатрисы. В наших же экспериментах мы наблюдали 95% индикатрис с большим контрастом. Можно сделать заключение, что в эксперименте абсолютное большинство индикатрис принадлежит частицам с ориентацией оси ее вращения по направлению потока, совпадающим с направлением распространения падающего излучения.

Также были проведены исследования светорассеяния от бактерий *E.coli* для разных фаз роста – одна в возрасте 50 мин (логарифмическая фаза), а другая в возрасте 1000 мин (стационарная фаза). На Рис. 3.7 приведены экспериментальные индикатрисы светорассеяния популяций клеток *E.coli* в разных фазах роста. Здесь так же, как и в предыдущем эксперименте по контрасту индикатрис можно говорить об ориентации бактерий вдоль потока.

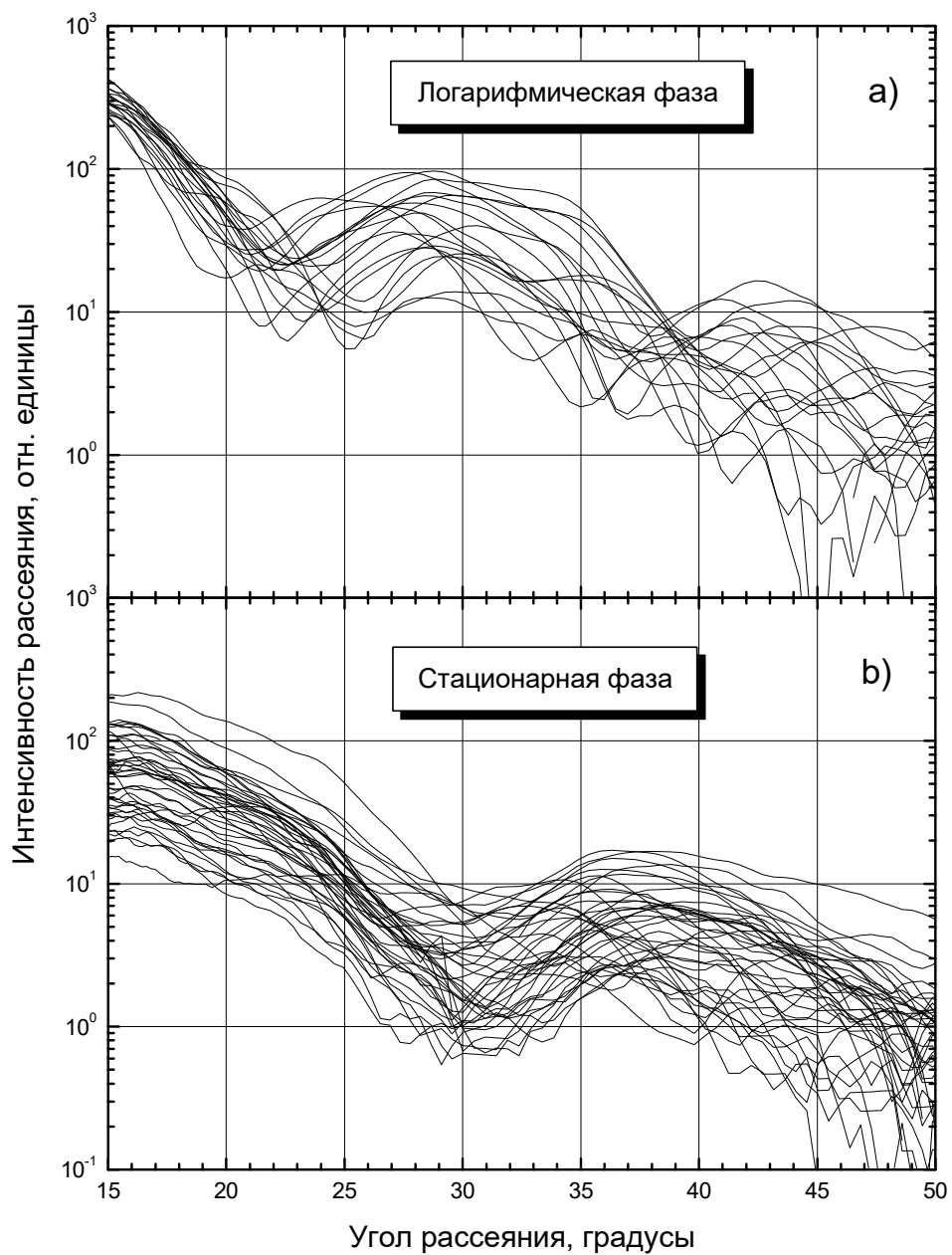


Рис. 3.7. Индикатрисы клеток *E.coli.*, измеренные на СПЦ

a) логарифмическая фаза роста

b) стационарная фаза роста

Кроме того, индикатрисы светорассеяния для разных фаз роста отличаются положением первого минимума и разбросом по абсолютной величине сигнала рассеяния с малые углы. Первое различие можно объяснить тем, что эти две фазы различаются длиной бактерий [49]. Объяснение второго же феномена было найдено в литературе [52] – клетки *E.coli* в стационарной фазе имеют большую концентрацию сухих веществ и ее больший относительный разброс, что влияет на разброс абсолютного значения величины интенсивности рассеяния.

Благодаря тому, что в измерительной зоне СПЦ клетки *E.coli* ориентируются вдоль потока, может быть предпринята попытка параметризация решения обратной задачи светорассеяния, которая и была произведена в главе 2.2.

3.3.1 Параметризация обратной задачи светорассеяния для сфероидальных частиц.

Полученные в главе 2.2 выражения были применены к экспериментально измеренным индикатрисам светорассеяния клеток *E.coli*. На Рис. 3.8 приведены карты *длина – диаметр* и *диаметр – показатель преломления* для клеток *E.coli* в стационарной фазе, индикатрисы которых изображены на Рис. 3.6.

Однако длина частиц, определенная описанным методом является явно заниженным. По-видимому, это связано с сильным влиянием ошибки определения положения второго минимума из-за потери ориентации частицы при движении в пуазейлевском потоке. Как видно из Рис. 1.7, во избежание таких ошибок необходимо приблизить зону регистрации как можно ближе к гидрофокусирующей системе или работать с толщиной рабочей струи порядка 2 мкм.

На Рис. 3.9 приведены экспериментальная и рассчитанная методом Т-матриц индикатрисы светорассеяния. Параметры частицы для расчетов были определены из параметрического решения обратной задачи.

* * *

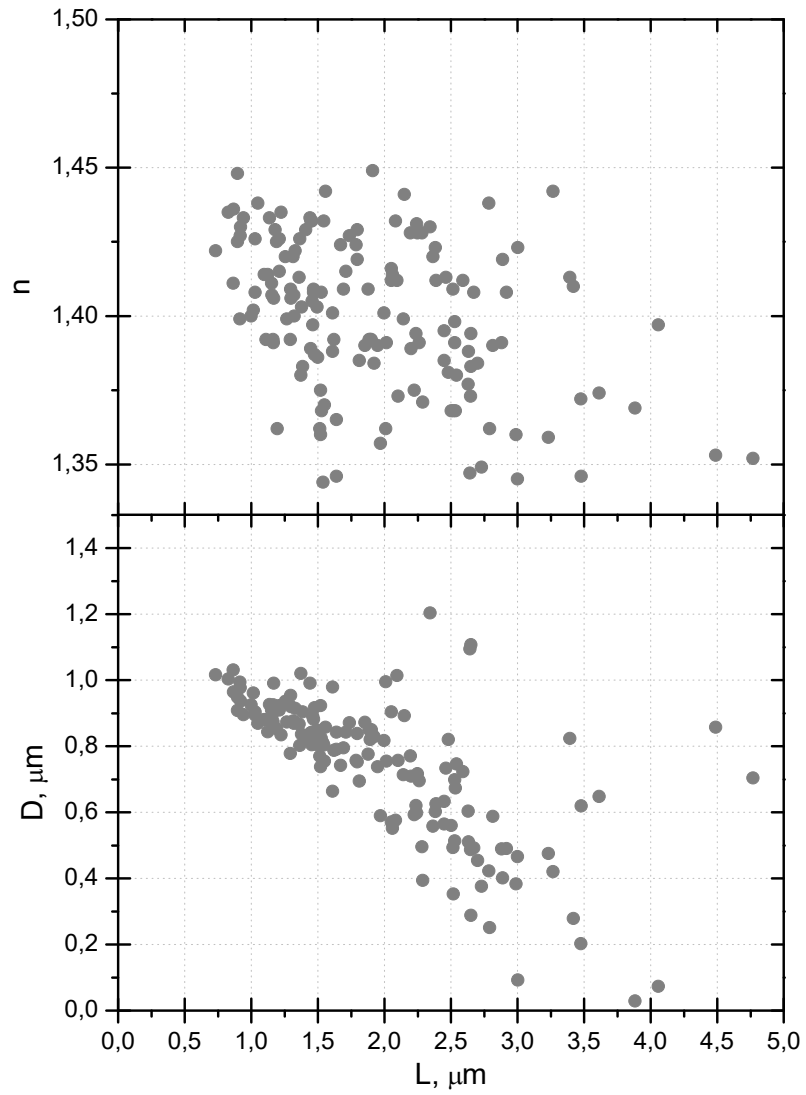


Рис. 3.8. Применение параметрического решения обратной задачи светорассеяния к клеткам *E.coli* в стационарной и логарифмической фазах

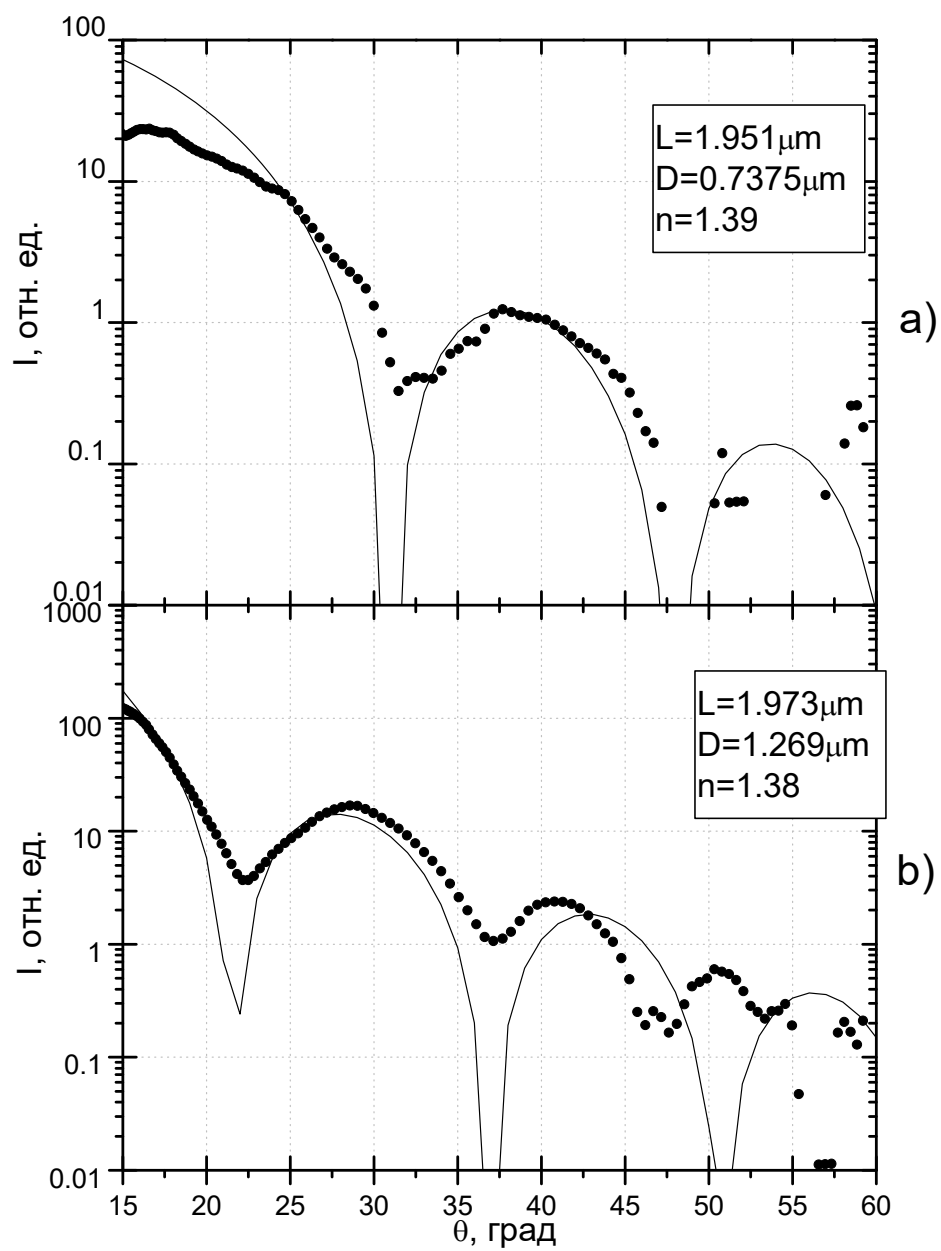


Рис. 3.9. Экспериментальные и рассчитанные по теории Т-матриц индикатрисы светорассеяния от клеток *E.coli*. Использовались параметры частиц, найденные из параметрического решения обратной задачи светорассеяния

Предложен метод классификации латексных частиц на сканирующем проточном цитометре.

Измерено дифференциальное сечение рассеяния на одиночных клетках *E.coli*.

Измерены индикатрисы светорассеяния нормальных эритроцитов человека в различной ориентации.

К сигналам светорассеяния от клеток *E.coli* применено параметрическое решение обратной задачи светорассеяния для ориентированных сфероидов.

Заключение

В диссертационной работе показана возможность определения параметров несферических частиц с использованием сканирующего проточного цитометра на примере клеток *E.coli* и нормальных эритроцитов человека.

Суммируя, можно выделить следующие результаты данной работы:

- предложена одотриггерная схема сканирующего проточного цитометра для исследования объектов, размеры которых сравнимы с длиной волны.
- в гидродинамической системе сканирующего проточного цитометра сфероидальные объекты с отношением полуосей более 2 на выходе из гидрофокусировки ориентируются длинной полуосью вдоль потока. Кроме того, при толщине рабочей струи менее 2 мкм эта ориентация сохраняется до регистрационной зоны прибора.
- исследовано влияние ориентации несферических частиц (вытянутых сфероидов вращения и двояковогнутых дисков) на картину рассеяния.
- проведена параметризация обратной задачи светорассеяния для вытянутых осесимметричных сфероидов вращения, ориентированных вдоль направления падающего излучения в диапазоне параметров: оптическая длина от 1 - 8, диаметр от 1 - 3 относительный коэффициент преломления от 1.01 до 1.08. погрешностью определения параметров ~2%.

- измерено дифференциальное сечение рассеяния клеток *E.coli*.
- в предположении, что клетки *E.coli* ориентированы вдоль направления падающего излучения использовано параметрическое решение обратной задачи и определены параметры клеток.

Диссертационная работа выполнена при поддержке гранта СО РАН номер 70-2000 и гранта РФФИ номер 00-02-17467.

Основные результаты работы докладывались на:

1. Швалов А.Н., «Исследование светорассеивающих свойств эритроцитов с помощью сканирующей проточной цитометрии», материалы XXXV Международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс», г. Новосибирск, 1997г.
2. Soini, J.T., Chernyshev, A.V., Shvalov, A.N., and Maltsev V.P. (1997). “Measurement of scattering patterns from individual non-spherical particles using scanning flow cytometer.” Abstr.Vol., Workshop on Light Scattering by Non-spherical Particles, Univ. of Helsinki, 1997, 37.
3. A.N.Shvalov, A.V.Chernyshev, J.T.Soini, E.Soini, and V.P.Maltsev Flying Light-Scattering Indicatrix of individual erythrocytes 7th European Symposium “Particle characterization” Nuernberg, Germany, 10-12 March 1998, Preprints II, pp. 675-684
4. A.N. Shvalov, J.T. Soini, I.V. Surovtsev, G.V. Kochneva, G.F. Sivolobova, A.K. Petrov, and V.P. Maltsev, “Individual E.Coli Cells Studied from Light Scattering with the Scanning Flow Cytometer”, *Advanced Receach Workshop “Assessment of Sponsored Biological Research in Russia for the New Millennium”* (September 2-4, 1999 Novosibirsk, Russia).
5. Alexander N. Shvalov, Valeri P. Maltsev, Galina V. Kochneva and Galina V. Sivolobova, “Light-scattering properties of *E.coli* and *E.coli* infected by phage” (poster), *CLEO Europe 1999 Focus Meetings, Novel Biomedical Optical Spectroscopy, Imaging, and Diagnostics*

6. Valeri Maltsev, Alexander Shvalov, “*Light-scattering properties of bacteria and cells measured with scanning flow cytometry*” *CLEO Europe 1999 Focus Meetings, Novel Biomedical Optical Spectroscopy, Imaging, and Diagnostics*,

и опубликованы в следующих изданиях:

1. Alexander Shvalov, Ivan Surovtsev, Andrei V. Chernyshev, Juhani T. Soini, Valeri P. Maltsev, “*Particle Classification from Light Scattering with the Scanning Flow Cytometer*”, *Cytometry* Vol. 37, Issue 3, 1999, pp. 215-220.

2. Ivan V. Surovtsev, Ivan A. Razumov, Alexander N. Shvalov, “*Kinetic Study of Formation of Antigen-Antibody Complexes on the Cell Surface with the Scanning Flow Cytometer*”, *SPIE Proceedings* v. 3604, pp. 199-206 (1999).

3. Alexander N. Shvalov, Juhani T. Soini, Andrey V. Chernyshev, Peter A. Tarasov, Erkki Soini and Valeri P. Maltsev “*Light-scattering properties of individual erythrocytes*” *Applied Optics* Vol. 38 No 1 pp. 230-235 (1999)

4. Alexander N. Shvalov, Juhani T. Soini, Ivan V. Surovtsev, Galina V. Kochneva, Galina V. Sivolobova, Alexander K. Petrov and Valeri P. Maltsev “*Individual Escherichia coli Cells Studied from Light Scattering with the Scanning Flow Cytometer*”, *Cytometry* vol. 41, 2000, pp. 41-45

5. I.V. Surovtsev, I.A.Razumov, V.M.Nekrasov, A.N.Shvalov, J.T.Soini, V.P.Maltsev, A.K.Petrov, V.B.Loktev, and A.V.Chernyshev "Mathematical model of ligand-receptor binding kinetics on a cell surface" *Binding Journal of Theoretical Biology*, Vol. 206, No. 3, pp. 407-417 (October 2000)

Приложение.

Текст программы SFC_ADC.DLL для работы с Quatech DAQ1201.

```
{procedure InitADC (dt: longint)
```

производит инициализацию АЦП и выставляет период дискретизации dt.

```
Procedure
```

```
StartADC (N_Channels:word;Gains,Channels:Chan_Settings);
```

производит выбор каналов Channels, в Gains - одного из 4 встроенных усилений (x1, x10, x100, x1000) на каждом из каналов для регистрации и запуск регистрации АЦП.

```
ReadADC (Length, Trigger_Shift : word; Level: integer; var  
data: integerdata);
```

Записывает данные с АЦП в буфер произвольного заданного размера Length для временного хранения данных и по триггерному сигналу меньше величины Level передает в блок обработки данные сигнала рассеяния одной частицы, зарегистрированного СПЦ. При этом положение сигнала триггера фиксировано относительно начала массива данных в пределах 4 квантов АЦП относительно Trigger_Shift.}

```
Library SFC_ADC;
```

```
const
```

```
{Константы АЦП}
```

```
SOS=$80;
```

```
{Base+2:Indexing index registers}
```

```
READ_IND=$F0;
```

```
{Mask for Base+2 to reading from Index registers, $00-reading}
```

```
{Base+3: After touching Base+2 works whis this one}
```

```
{Base+4: STATUS REGISTER}
```

```

EOC=          $80; { End of conversion, else not finished}
UNIPOLAR= $40; { Unipolar mode, else Bipolar; can be changed}
SINGLE_ENDED= $20; { Single-ended AD, else Differential}
FIFO_EMPTY=  $10; { FIFO empty, else not empty }
FIFO_FULL=   $08; { FIFO full, else not full}
FIFO_HALF=   $04; { FIFO half full, else less, then half
full}
FIFO_BUSY=   $02; { The scan sequence is not completed yet,
else not busy}
AD_ARM=      $01; { READ: A/D enable, else disable}
              { WRITE: Arming the A/D conversion waiting for
trigger}
              { signal, else disarm}

{Base+6: 4-bit digital I/O}
SCAN_2_7= $00; { Scan speed from shannel to channel}
SCAN_10_1= $40;
SCAN_20_1= $80;
TRIGGER_INPUT1= $10; {Select external trigger from
IP1/GS0/Trig [6]}
              {else from IP0/Ext clock [25]}

              {WRITE    READ}
IP0= $01; {23  25}
IP1= $02; {4   6}
IP2= $04; {22  24 (IP2 / COUNTER0 GATE)}
IP3= $08; {3   5  (IP3 / GS1)}

{Index 0:}

```

```

DIGITAL_TRIGGER= $08;    {Digital trigger from ()IP0/Ext clock
[25]) or (IP1/GS0/Trig) [6]}
                        {Else - Analog trigger}
SINGLE_TRIGGER= $04;    {Single trigger mode, else
Continious}
INTERNAL_TRIGGER=$02;    {Internal trigger, else - external}
RISING_EDGE= $01;    {Rising edge trigger, else -
Trailing}

{Index 2: Auxiliary control register, Write only.}
SOFTWARE_TRIGGER= $80;
FLUSH_SCAN= $40;
FLUSH_FIFO= $20;
STOP_SCAN= $08;
STOP_DMA= $04;

{Index 4..6: counter/timer 0..2}

{Index 7: Cotrol word for timer 8254}
LATCH_COUNTER= $00;
ONLY_LEAST_BYTE= $10;
ONLY_MOST_BYTE= $20;
LEAST_AND_MOST_BYTE= $30;
COUNT_COMPLETE= $80;    {COUNTER COPLETED COUNTING}

EVENT_COUNTING= $00;
TIMING_ONE_SHOT= $02; {Timing retriggerable one-shot}
RATE_GENERATOR= $04;
SQUARE_WAVE_MODE= $06;

```

```

SOFTWARE_TRIGGERED_STROBE=    $08;
HARDWARE_TRIGGERABLE_STROBE=  $0A;

BCD_COUNT=    $01; {else - Binary count}
Base=         $320;      (Порт для работы с АЦП)

Num=         30000;

type
  integerdata= array[1..Num] of integer;
  Chan_Settings = array[1..16] of word;

var data_r:IntegerData;
ch,gn:Chan_Settings;

procedure Write_Port(addr,data:word);
begin
  asm
    pusha
    mov dx,addr
    mov ax,data
    out dx,al
    popa
  end;
end;

function Read_Port(addr:word): word;
var result:word;
begin

```

```

asm
  pusha
  xor ax,ax
  mov dx,addr
    in al,dx
  mov result,ax
  popa
end;
Read_Port:=result;
end;

procedure Write_Index(ind,data:word);
begin
  Write_Port(Base+2,ind);
  Write_Port(Base+3,data);
end;

function Read_Index(ind:word):word;
var Result:word;
begin
  Write_Port(Base+2,ind OR READ_IND);
  Result:=Read_Port(Base+3);
  Read_Index:=Result;
end;

procedure Set_Status( status:word);
begin
  Write_Port(Base+4,status AND $FF);
end;

```

```

function Get_Status:word;
Var Result:word;
begin
    Result:=Read_Port(Base+4);
    Get_Status:=Result;
end;
{Инициализация счетчика АЦП}
Procedure Set_Timer(tim:integer;S_Time:word);
var S_Time000,S_Time0,S_Time00:word;
Begin
    Write_Index(7,LEAST_AND_MOST_BYTE);
    S_Time000:=S_Time div 1000;
    S_Time00:=(S_Time div 100) - S_time000*10;
    s_Time0:=(S_Time div 10) - S_time00*10-S_Time000*100;
    S_Time:=(S_time mod 10) + S_Time0*16 + S_Time00*256 +
S_Time000*4096;

    Write_Index(tim+4,Lo(S_Time));
    Write_Port(Base+3,Hi(S_Time));
    {Write_Index(tim+4,Hi(S_Time));}
End;
{Инициализация таймера АЦП}
Procedure Init_Counter(fl:word);
begin
    Set_Timer(1,fl);
    Set_Timer(2,2);
    Set_Timer(0,2);
end;

```

```

{Инициализация 512-ти байтного буфера АЦП}
Procedure
Init_FIFO(N_Channels:word;Gains,Channels:Chan_Settings);
var
  invert:array[0..3] of byte;
  i:integer;
begin
  invert[0]:=0;
  invert[1]:=2;
  invert[2]:=1;
  invert[3]:=3;
  Write_Port(Base,(( invert[Gains[1]] shl 4) AND $30 ) +
Channels[1]);
  Write_Port(Base,((( Gains[1] shl 4) AND $30 ) or SOS ) +
Channels[1]);
  i:=1;
  while( i<N_Channels) do
  begin
    i:=i+1;
    Write_Port(Base,(( invert[Gains[i]] shl 4) AND $30 )
+ Channels[i]);
    Write_Port(Base,(( Gains[i] shl 4) AND $30 ) +
Channels[i]);
  end;
end;
{Инициализация АЦП}
procedure InitADC (dt: longint);{StdCall;}export;
begin
  Read_Port($8000+Base);

```

```

Write_Port($8000+Base,0);
Set_Status(0);
Init_Counter(dt);           { Hz;Initiate 1 and 2 Timers}
end;
{Запуск АЦП}
Procedure
StartADC(N_Channels:word;Gains,Channels:Chan_Settings);{StdCall;
};}export;
begin
  Set_Status(0);
  Write_Index(0,INTERNAL_TRIGGER);
  Write_Index(2,FLUSH_SCAN OR FLUSH_FIFO);           {Clear FIFO}
  Init_FIFO(N_Channels,Gains,Channels);             {Init
FIFO}
  Write_Index(2,FLUSH_FIFO);
  Set_Status(SINGLE_ENDED OR AD_ARM);                 {Arm for
trigger}
  Port[Base+6]:=0;
  Write_Index(2,SOFTWARE_TRIGGER);
end;
{Считывание данных из буфера АЦП}
procedure ReadADC(Length,Trigger_Shift:word;Level:integer;var
data:integerdata);{Stdcall;}export;

var
Number_Sub_Ar,L_Block,Buffer_Length,Used_Buffer_Length,
Reper_In_Data_1,Reper_In_Data_2,Ofs_Buffer,Buffer_End,Ofs_Data
,

```



```

Seg_Buffer, Seg_Data, N_512_Block, Rest_Part, First_Part_Full: Word
;
Buffer: IntegerData;
begin
{Инициализация параметров}
  L_Block:=3
  Length:=L_Block*(Trunc(Length/L_Block));
  Trigger_Shift:=L_Block*(Trunc(Trigger_Shift/L_Block));

  Buffer_Length:=(Length-Trigger_Shift);
{data = U_B_L from Buffer +          + 512+F_Sh from FIFO}
  Buffer_Length:=L_Block*(Trunc(Buffer_Length/L_Block));
  Buffer_End:=ofs(Buffer[Buffer_Length]);
  Ofs_Data:=ofs(Data[1]);
  Ofs_Buffer:=ofs(Buffer[1]);
  Seg_Buffer:=seg(Buffer[1]);
  Seg_Data:=seg(data[1]);

  N_512_Block:=trunc((Length - Buffer_Length) / 512);
  Rest_Part:=(Length - Buffer_Length) - N_512_Block*512;

asm
      { cli}
      pusha
      push    ds
      push    es
      mov     First_Part_Full, 0
      mov     ax, Seg_Buffer
      mov     es, ax

```

```

        mov     bx,$0
        mov     di,Ofs_Buffer
        mov     si,di
{----- No trigger - Buffer crumpling -----}
@Check_Ports:
        mov     dx, Base+4      {Fifo - Half-full?}
        in      al,dx
        test    al,FIFO_HALF
        jz      @Check_Ports

        mov     si,di
        mov     dx,base
        mov     cx,L_Block
        push    cx
        cld                    {Fifo_half => Read block}
        rep    insw

        cmp     di,Buffer_End   {Check Buffer End}
        jl     @Not_Buffer_End

        mov     di,Ofs_Buffer
        mov     First_Part_Full,1

@Not_Buffer_End:
        pop     cx
        mov     ax,First_Part_Full
        or     ax,ax
        jz     @Check_Ports
        mov     ax,Level
        dec    bx

```

```

                                jz         @Have_Trigger      {Too long
whating..}
@Check_Level:
                                cmp         ax,es:[si]      {Level check}
                                jge         @Have_Trigger
                                inc         si
                                inc         si
                                loop        @Check_Level

                                jmp         @Check_Ports

{-----TRIGGER !!! -----}
{----- Filling Data From Buffer -----}
@Have_Trigger:
                                {cli}
                                mov         ax,Seg_Data
                                mov         es,ax             {es}
                                mov         cx,Buffer_End
                                mov         ax,Ofs_Buffer
                                mov         bx,ax             {si2}
                                sub         ax,di
                                neg         ax
                                shr         ax,1             {cx2}
                                sub         cx,di
                                shr         cx,1
                                inc         cx             {cx1}
                                mov         si,di             {si1}
                                mov         di,Ofs_Data      {di}

                                push        ds

```

```

        mov     ds,Seg_Buffer           {ds}
        rep     movsw

        or      ax,ax
        jz      @Read_Once

        mov     cx,ax
        mov     si,bx
        rep     movsw

@Read_Once:
        pop     ds

{----- Filling Data From FIFO -----}

        mov     cx,Rest_Part
        mov     dx,Base+4

@Block_Part2:
        in      al,dx
        test    al,FIFO_HALF
        jz      @Block_Part2

        mov     dx,Base
        rep     insw
        mov     bx,N_512_Block

@Last_Big_Block:
        or      bx,bx
        jz      @End

        mov     dx,Base+4

@Block_Part3:

```

```

        in      al,dx
        test   al,FIFO_HALF
        jz     @Block_Part3

        mov    cx,$0200
        dec   bx
        mov    dx,Base
        rep   insw
        jmp   @Last_Big_Block

@End:

        pop    es
        pop    ds
        popa
        sti

end;

end;

exports
    InitADC, StartADC, ReadADC;

begin
end.

```

Литература

- 1 Melamed M.R., Lindmo T., and Mendelsohn M.L. (Eds). Flow cytometry and sorting. - New York: Wiley-Liss, 1990. - 1140 с.
- 2 Kachel V. Electrical resistance pulse sizing: Coulter sizing. // Flow Cytometry and Sorting, 2nd ed., M.R. Melamed, T. Lindmo, M.L. Mendelsohn, eds. - New York: Wiley, 1990. P. 45 – 81.
- 3 Tycko D.H., Metz M.H., Epstein E.A., and Grinbaum A. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration. // Applied Optics. - 1985. - V. 24. - P. 1355 - 1365.
- 4 Steen H.B., Skarstad K., and Boye E. Flow cytometry of bacteria: cell cycle kinetics and effects of antibiotics. // Ann.N.Y.Acad.Sci. - 1986. - V. 468. - P. 329 - 338.
- 5 Steen H.B. and Boye E. Bacterial growth studied by flow cytometry. // Cytometry. - 1980. - V. 1. - P. 32 - 36.
- 6 Cross D.A. and Latimer P. Angular dependence of scattering from *Esherichia Coli* cells. // Applied Optics. - 1972. - V. 11. - P. 1225 - 1228.
- 7 Bronk B.V., Druger S.D., Czege J., and Van De Merwe W.P. Measuring diameters of rod-shaped bacteria in vivo with polarized light scattering. // Biophysical Journal. - 1995. - V. 69. - P. 1170 - 1177.
- 8 Van De Merwe W.P., Li Z.-Z., Bronk B.V., and Czege J. Polarized light scattering for rapid observation of bacterial size changes. // Biophysical Journal. - 1997. - V. 73. - P. 500 - 506.
- 9 Draine B.T. and Flatau P.J. Discrete-dipole approximation for scattering calculations. // Journal of Optical Society of America A. - 1994. - V. 11. - P. 1491 - 1499.
- 10 de Grooth B.G., Terstappen L.W.M.M., Puppels G.J., and Greve J. Light-scattering polarization measurements as a new parameter in flow cytometry. // Cytometry. - 1987. - V. 8. - P. 539 - 544.
- 11 Terstappen L.W.M.M., de Grooth B.G., Visscher K., van Kouterik F.A., and Greve J. Four-parameter white blood cell differential counting based on light scattering measurements. // Cytometry. - 1987. - V. 9. - P. 39 - 43.

12 Steinke J.M. and Shepherd A.P. Comparison of Mie theory and the light scattering of red blood cells. // *Applied Optics*. - 1988. - V. 27. - P. 4027 - 4033.

13 Streekstra G.J., Hoekstra A.G., Nijhof E.-J., and Heethaar R.M. Light scattering by red blood cells in ektacytometry: Fraunhofer versus anomalous diffraction. // *Applied Optics*. - 1993. - V. 32. - P. 2266 - 2272.

14 Hammer M., Schweitzer D., Michel B., Thamm E., and Kolb A. Single Scattering by Red Blood Cells. // *Applied Optics*. - 1998. - V. 37. - P. 7410 - 7418.

15 Borovoi A.G., Naats E.I., and Ooppel U.G. Scattering of light by a red blood cell. // *Journal of Biomedical Optics*. - 1998. - V. 3. - P. 364 - 372.

16 Gucker, F.T.Egan, J.J., *J. Coll.Sci.* 16, 68, 1961.

17 Wyatt P.J. Identification of bacteria by differential light scattering. // *Nature*. - 1969. - V. 221. - P. 1257 - 1258.

18 Wyatt P.J. and Phillips D.T. Structure of single bacteria from light scattering. // *Journal of Theoretical Biology*. - 1972. - V. 37. - P. 493 - 501.

19 Wyatt P.J. and Jackson C. Discrimination of phytoplankton via light-scattering properties. // *Limnology and Oceanography*. - 1989. - V. 34. - P. 96 - 112.

20 Maltsev V.P. Estimation of morphological characteristics of single particles from light scattering data in flow cytometry. // *Russian Chemical Bulletin*. - 1994. - V. 43. - P. 1115 - 1124.

21 Chernyshev A.V., Soini A.E., Surovtsev I.V., Maltsev V.P., and Soini E. A mathematical model of dispersion radical polymerization kinetics. // *Journal of Polymer Science Part B - Polymer Chemistry*. - 1997. - V. 35. - P. 1799 - 1807.

22 Chernyshev A.V., Soini A.E., Maltsev V.P., and Soini E. A model of complete classical treatment of dispersion radical polymerization kinetics. // *Macromolecules*. - 1998. - V. 31. - P. 6455 - 6460.

23 Soini J.T., Chernyshev A.V., Hanninen P.E., Soini E., and Maltsev V.P. A New Design of the Flow Cuvette and Optical Set-Up for the Scanning Flow Cytometer. // *Cytometry*. - 1998. - V. 31. - P. 78 - 84.

24 Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика. Том 6 Гидродинамика.

-
- 25 Дж. Хаппель, Г. Бреннер. Гидродинамика при малых числах Рейнольдса. Москва. "Мир" 1976.
- 26 Brenner H., *Chem. Eng. Sci.*, **19** (1964) p. 703
- 27 Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика. Том 1 Механика.
28. Борен К. и Хафмен Д. Поглощение и рассеяние света малыми частицами: пер. с англ. - М.: Мир, 1986. - 664 с.
- 29 Nilsson A.M.K., Alsholm P., Karlsson A., and Andersson-Engels S. T-matrix computations of light scattering by red blood cells. // *Applied Optics*. - 1998. - V. 37. - P. 2735 - 2748.
- 30 Chiappetta P. and Torresani B. Some approximate methods for computing electromagnetic fields scattered by complex objects. // *Measurement Science and Technology*. - 1998. - V. 9. - P. 171 - 182.
- 31 Skalak R., Tozeren A., Zarda R.P., and Chien S. Strain Energy Function of Red Cell Membranes. // *Biophysical Journal*. - 1973. - V. 13. - P. 245 - 264.
- 32 Mazon P., Muller S., and Azouzi H.El. On intensity reinforcements in small-angle light scattering patterns of erythrocytes under shear. // *European Biophysical Journal*. - 1997. - V. 26. - P. 247 - 252.
- 33 Shimuzi K. Modification of the Rayleigh-Debye approximation. // *Journal of Optical Society of America A*. - 1983. - V. 73. - P. 504 - 507.
- 34 Lopatin V.N. and Shepelevich N.V. Consequences of the integral wave equation in the Wentzel-Kramers-Brillouin approximation. // *Optics and Spectroscopy*. - 1996. - V. 81. - P. 115 - 118.
- 35 В.Н Лопатин, Н.В Шепелевич. Метод Вентцеля-Крамерса-Бриллюэна (ВКБ) как основное приближение для описания рассеяния света "мягкими" частицами // *Оптика атмосферы и океана*. (1996).- Т.9, N 6.- С. 846-852.
- 36 Klett J.D. and Sutherland R.A. Approximate methods for modeling the scattering properties of nonspherical particles: evaluation of the Wentzel-Kramers-Brillouin method. // *Applied Optics*. - 1992. - V. 31. - P. 373 - 386.
- 37 Wriedt T. A Review of Elastic Light Scattering Theories. // *Particle & Particle Systems Characterization*. - 1998. - V. 15. - P. 67 - 74.

38 Mishchenko M.I., Travis L.D., and Mackowski D.W. T-matrix computations of light scattering by nonspherical particles: A review. // *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*. - 1996. - V. 55. - P. 535 - 575.

39 Wielaard D.J., Mishchenko M.I., Macke A., and Carlson B.E. Improved T-matrix computations for large, nonabsorbing and weakly absorbing nonspherical particles and comparison with geometric optics approximation. // *Applied Optics*. - 1997. - V. 36. - P. 4305 - 4313.

40 Ф.Я. Сидько, В.Н. Лопатин, Л.Е. Парамонов. Поляризационные характеристики взвесей биологических частиц. Новосибирск: Наука. Сиб. отделение, (1990).

41 Shepelevich N.V., Lopatin V.V., Maltsev V.P., and Lopatin V.N. Extrema in the light-scattering indicatrix of a homogeneous sphere. // *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*. - 1999. - V. 1. - P. 448 - 453.

42 Maltsev V.P., Chernyshev A.V., Sem'yanov K.A. and Soini E. Absolute real-time determination of size and refractive index of individual microspheres. // *Measurement Science and Technology*. - 1997. - V. 8. - P. 1023 - 1027.

43 Shepelevich N.V., Prostakova I.V., and Lopatin V.N. Extrema in the Light-Scattering Indicatrix of a Homogeneous Spheroid. // *J QUANT SPECTROSC RADIAT*. - 1999. - V. 63. - P. 353 - 367.

44. Maniatis T, Fritsch E.F, Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. - Cold Spring: Harbor. - 1982. 576 с.

45. Mansour J.D., Robson J.A., Arndt C.W., and Schulte T.H. Detection of *Escherichia coli* in Blood using Flow Cytometry. // *Cytometry*. - 1985. - V. 6. - P. 186 - 190.

46 Boye E., Steen H.B., and Skarstad K. Flow cytometry of bacteria: a promising tool in experimental and clinical microbiology. // *J.Gen.Microbiol.* - 1983. - V. 129 (Pt 4). - P. 973 - 980.

47 Boye E. and Lobner-Olesen A. Bacterial growth control studied by flow cytometry. // *Res.Microbiol.* - 1991. - V. 142. - P. 131 - 135.

48. Jonston R.G., Singham S.B., and Salzman G.C. Polarized light scattering. // *Comments Molecular Cell Biophysics*. - 1988. - V. 5. - P. 171 - 192.

49. Bronk B.V., Van De Merwe W.P., and Stanley M. In vivo measure of average bacterial cell size from a polarized light scattering function. // *Cytometry*. - 1992. - V. 13. - P. 155 - 162.

50. Bronk B.V., Druger S.D., Czege J., and Van De Merwe W.P. Measuring diameters of rod-shaped bacteria in vivo with polarized light scattering. // *Biophysical Journal*. - 1995. - V. 69. - P. 1170 - 1177.

51. Van De Merwe W.P., Li Z.-Z., Bronk B.V., and Czege J. Polarized light scattering for rapid observation of bacterial size changes. // *Biophysical Journal*. - 1997. - V. 73. - P. 500 - 506.

52. Krössbacher L.M, Klima J, Psenner R. Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1998. – V. 64. – P. 688 - 694.