

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И ГОРЕНИЯ

На правах рукописи

Мальцев Валерий Павлович

АНАЛИЗ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ
ОДИНОЧНЫХ ЧАСТИЦ ПО ДАННЫМ СВЕТОРАССЕЯНИЯ В
ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

01.04.05 - оптика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук.

Научный руководители:

доктор химических наук, профессор

Петров А.К.

доктор физико-математических наук, профессор

Лопатин В.Н.

Новосибирск - 1996

О Г Л А В Л Е Н И Е

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. АНАЛИЗ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ЧИСЛЕННОГО РЕШЕНИЯ ОБРАТНОЙ ЗАДАЧИ СВЕТОРАССЕЯНИЯ ДЛЯ ОДИНОЧНЫХ ЧАСТИЦ.....	14
1.1 Метод двумерного рассеяния Ми (Two-Dimensional Mie Scattering, 2DMS).....	18
1.2 Метод тройного двумерного рассеяния Ми (Triple Two-Dimensional Mie Scattering, 3×2DMS).....	28
1.3 Метод пролетной индикатрисы светорассеяния (Flying Light Scattering Indicatrix, FLSI).....	34
ГЛАВА 2. РАЗРАБОТКА ПРОТОЧНОГО ЦИТОМЕТРА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ВОЗМОЖНОСТИ В ИЗМЕРЕНИИ СВЕТОРАССЕИВАЮЩИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОДИНОЧНЫХ ЧАСТИЦ:.....	46
2.1 Проточный цитометр стандартной конфигурации.....	48
2.2 Сканирующий проточный цитометр.....	52

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕТОРАССЕИВАЮЩИХ ХАРАКТЕРИСТИК БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАЗЕРНОГО НЕФЕЛОМЕТРА.....	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	79
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	86
ЛИТЕРАТУРА.....	94

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время, в связи с бурным развитием лазерной техники, средств автоматизации измерений и обработки данных и появлением на мировом рынке диагностической аппаратуры, в научных исследованиях и при технологическом контроле получили широкое распространение оптические анализаторы одиночных частиц. Светорассеяние является одним из измеряемых параметров в таких анализаторах.

Наиболее перспективна для анализа одиночных частиц техника проточной цитометрии (см., например, обзоры [1-3]). Создание и применение проточных цитометрических систем для автоматического анализа и разделения частиц в гидрозоях открыло новые возможности для исследований в области биологии и медицины. Цитометрия в потоке представляет собой большой шаг вперед по сравнению с обычными микроскопическими методами, при использовании которых анализ нескольких частиц занимает несколько часов. В проточных цитометрических системах частицы анализируются со скоростью до 300 тысяч в минуту. Измерение светорассеивающих свойств частиц в таких системах позволяет получать информацию об их морфологических характеристиках (размер, форма, особенности внутренней структуры, коэффициент поглощения и т. п.). Уникальность методики цитометрии в потоке состоит в том, что измерения выполняются на отдельных частицах с большой скоростью. Это обеспечивает высокую статистическую точность и позволяет надежно выявлять малые популяции. При этом анализаторы подобного типа обладают достаточно высокой

производительностью (время анализа 2 мин) и надежностью результатов анализа.

Все более жесткие требования предъявляются к времени обработки измеряемых величин светорассеяния на одиночных частицах при одновременном сохранении точности измерений.

Описанные в научной литературе работы, связанные с разработкой методов анализа одиночных частиц, демонстрируют некоторые возможности использования светорассеяния при определении морфологических характеристик одиночных частиц. Однако используемый в большинстве из них метод подгонки теоретических расчетов к экспериментальным результатам требует больших затрат времени и вряд ли найдет широкое применение при высокоскоростном анализе частиц. Поэтому представляется важным дальнейшее совершенствование методов расчета параметров частиц по данным светорассеяния (обратная задача светорассеяния). При этом новые методы должны характеризоваться малым временем оценки параметров (1-10 мс в проточной цитометрии) и достаточной точностью. Особенно широкое распространение такие экспресс-методы могут получить с дальнейшим развитием цитометрических систем при проведении иммуноанализа и анализа элементов крови в медицине [45], при контроле качества продукции сельского хозяйства (например, определении жирности и наличия бактерий в молоке), при экологическом контроле и т. д.

В диссертационной работе впервые:

1. Проведен анализ влияния углов сбора излучения, рассеянного одиночной частицей, на точность вычисления размера и показателя преломления методом двумерного рассеяния Ми. Определены

оптимальные с точки зрения решения обратной задачи светорассеяния углы сбора.

2. Предложен и проанализирован метод тройного двумерного рассеяния Ми, позволяющий определять характеристики одиночной частицы в диапазонах 3 - 110 по параметру рассеяния α и до 1.12 по относительному показателю преломления. Численно продемонстрированы возможности метода при определении средних характеристик дисперсных сред на примере частиц жира в молоке.
3. На созданном проточном цитометре стандартной конфигурации разработан метод анализа двухкомпонентной дисперсной среды. Определена чувствительность метода при одновременном определении концентраций бактерий и соматических клеток в молоке.
4. При изучении процесса латексной агглютинации в присутствии полипептидов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 на базе проточного цитометра стандартной конфигурации определены характерные времена образования комплексов в условиях реакции антиген-антитело, которые равнялись 2-5 мин.
5. Предложен и проанализирован метод пролетной индикатрисы светорассеяния одиночной частицы, позволяющий вычислять абсолютные значения размера и показателя преломления частицы по полученным эмпирическим уравнениям.
6. Разработан и создан сканирующий проточный цитометр, позволяющий измерять индикатрису одиночной частицы в углах от 5 до 125 градусов. Продемонстрирована способность метода пролетной

индикатрисы светорассеяния определять абсолютные размер и показатель преломления латексных частиц.

7. Разработан и создан лазерный нефелометр с измерением индикатрисы дисперсной среды в углах от 5 до 85 и от 95 до 175 градусов. Проведены сравнительные исследования светорассеивающих характеристик суспензий различных видов бактерий.

Практическая ценность настоящей работы определяется использованием результатов при:

- разработке экспресс-методов определения концентрации бактерий и содержания соматических клеток в молоке;
- разработке экспресс-методов определения массовой доли молочного жира;
- контроле процесса роста латексных частиц при их производстве.

Кроме этого, метод пролетной индикатрисы светорассеяния, базирующийся на сканирующем проточном цитометре, может быть использован для диагностики водных систем, содержащих частицы, при многопараметрическом иммуноанализе, использующем латексные частицы в качестве носителя специфических антигенов.

Диссертация состоит из трех глав, каждой из которых предпослан краткий обзор литературы. Первая глава диссертации посвящена анализу численных методов решения обратной задачи светорассеяния для одиночных частиц.

В первом разделе проведен анализ метода двумерного рассеяния Ми.

Во втором разделе представляется метод тройного двумерного рассеяния Ми, который позволяет расширить область корректных решений обратной задачи до значений параметра рассеяния равного 110.

В третьем разделе представляется метод пролетной индикатрисы светорассеяния, позволяющий проводить абсолютное определение размера и показателя преломления одиночных сферических частиц по индикатрисе светорассеяния.

Вторая глава посвящена экспериментальным работам с проточными цитометрами.

В первом разделе приводятся экспериментальные результаты по использованию проточного цитометра стандартной конфигурации при одновременном анализе бактерий и соматических клеток в молоке, а также при измерении процесса агглютинации латексных частиц в присутствии антител ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

Во втором разделе описывается схема и принцип работы сканирующего проточного цитометра с измерением индикатрисы одиночной частицы в полярных углах от 5 до 125 градусов. Демонстрируется работоспособность проточного цитометра при измерении латексных частиц.

Третья глава посвящена исследованиям с измерением индикатрис рассеяния для некоторых типов микроорганизмов на лазерном нефелометре.

В заключении кратко сформулированы основные результаты диссертационной работы.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Оптимальными углами сбора рассеянного излучения, обеспечивающими наименьшую ошибку определения размера и показателя преломления частицы при использовании метода двумерного рассеяния Ми, являются телесные углы, образованные полярными $\theta_1=5-10$ и $\theta_2=20-60$ градусов. Рабочая область метода определяется диапазонами: $\alpha = 3 - 44$ по параметру рассеяния α и до 1.12 по относительному показателю преломления.

2. Использование третьего угла сбора рассеянного излучения расширяет рабочую область метода до $\alpha = 110$. Оптимальными углами сбора рассеянного излучения при использовании метода тройного двумерного рассеяния Ми являются телесные углы, образованные полярными углами $\theta_1=5-10$, $\theta_2=20-60$ и $\theta_3=120-170$ градусов.

3. Метод пролетной индикатрисы светорассеяния одиночной частицы, заключающийся в использовании параметров индикатрисы (расстояние между минимумами и контраст индикатрисы), позволяет вычислять абсолютные значения размера и показателя преломления частицы в реальном времени с использованием оригинальных эмпирических уравнений. Рабочая область метода определяется диапазонами: $\alpha = 7 - 88$ и относительным показателем преломления - до 1.125.

4. Оригинальная оптическая система сканирующего проточного цитометра позволяет измерять индикатрису светорассеяния движущейся в потоке одиночной частицы в углах от 5 до 125 градусов за характерное время 3 мсек.

Основные результаты диссертации представлены в 9 публикациях, включенных в прилагаемый перечень. Содержание диссертации

докладывалось на Международной конференции ...Современные и лазерные технологии (ALT'92, Москва, 8-11 сентября 1992), Всероссийской конференции по лазерной химии (Лазаревское, 30 сентября - 5 октября, 1992 г), Межреспубликанской конференции "Оптические методы исследования потоков" (Новосибирск, 2-3 июня 1993 г.), Международной конференции ...Биомедицинская оптика (Сан Хосе (США), 4-9 февраля 1995 г.), Межреспубликанском симпозиуме ...Оптика атмосферы и океана (Томск, 20-23 июня 1995 г.), а также на научных семинарах в Институте химической кинетики и горения СО РАН (Новосибирск, 1992-1996 гг.), в Биомедицинском центре университета г. Упсала (Швеция, 1993 г.), на физическом отделении Стокгольмского университета (Швеция, 1994 г.), на отделении медицинской физики университета г. Турку (Финляндия, 1994-1996 гг.)

Все численные данные в работе получены при следующих неизменных параметрах (если не оговорено специально): длина волны излучения - 632.8 нм; показатель преломления окружающей среды 1.333. Падающее излучение неполяризовано.

ГЛАВА 1. АНАЛИЗ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ЧИСЛЕННОГО РЕШЕНИЯ ОБРАТНОЙ ЗАДАЧИ СВЕТОРАССЕЯНИЯ ДЛЯ ОДИНОЧНЫХ ЧАСТИЦ

В настоящее время измерение светорассеяния в проточных цитометрах широко используется при сортировке частиц [1, 2]. С этой целью обычно определяют интенсивность рассеяния вперед, рассеяния под углом 90^0 и ослабление. В работах [4, 16-18] было исследовано влияние углов сбора рассеянного излучения на эффективность селекции. Для определения объема эритроцитов и содержания гемоглобина (концентрация последнего связана с показателем преломления) в них измеряли [4, 46] сигналы светорассеяния в телесных углах, образованных полярными углами $3.0-5.5^0$ и $5.5-9.0^0$ и азимутальными углами $0-360^0$. Использовалось излучение диодного лазера мощностью 2.8 мВт при $\lambda=842$ нм. Объем и показатель преломления эритроцитов определяли методом двумерного рассеяния Ми (Two-Dimensional Mie Scattering, 2DMS) с применением для калибровки сетки 2DMS капли гептана, нонана и додекана в воде. Показано, что на размер области корректных решений обратной задачи светорассеяния влияет величина углов сбора рассеянного излучения. Размер и показатель преломления эритроцитов вычислялись с достаточной точностью для размеров в диапазоне $d = 3.5 - 6.2$ мкм ($n = 1.40$).

Распределение фитопланктона по размерам определено [6] на основе измерения интенсивности света, рассеянного в полярные углы $1.5-19$ и $73-107$. Использовался аргоновый лазер ($\lambda = 514$ нм, 100 мВт). Для

измерения размера и показателя преломления частиц также применялся метод 2DMS с аналогичной калибровкой.

С целью уменьшения области некорректных решений для метода 2DMS измеряли [5] рассеянное излучение на двух длинах волн (He-Ne-лазер, 632.8 нм, 10 мВт и He-Cd-лазер, 441.6 нм, 17 мВт) в полярные углы 17° и 75° (числовая апертура линз - 0.29). Привязка сетки 2DMS осуществлялась с использованием полистирольных частиц. Были измерены распределение по размерам частиц полистирола и молока.

Угловая зависимость интенсивности рассеяния света (индикатриса) представляет наиболее полную информацию о свойствах рассеивающей частицы [32]. Ее значение в определении морфологических характеристик частицы аналогично значению отпечатков пальцев в криминалистике. Основным методом, позволяющим оценивать параметры рассеивающих частиц, является метод подгонки. Для сферических частиц величины d и n подбираются так, чтобы обеспечить наилучшую аппроксимацию экспериментальных данных рассчитанными. Данный метод широко использовался последнее время в связи с увеличением вычислительных мощностей компьютеров [34]. Для измерения индикатрисы одиночной частицы в настоящее время используются два метода: измерение рассеяния на зафиксированной в луче лазера частицы и проточная цитометрия [10-15, 34, 43].

Первоначально метод подгонки рассчитываемых индикатрис к измеренным использовался в экспериментах, связанных с индикатрисами одиночных зафиксированных частиц. Известна техника удержания частицы электрическим полем в луче лазера (Differential II, Science

Spectrum, Inc.). В работе [10] была измерена индикатриса рассеяния частицы полистирольного латекса с диаметром 1099.6 нм. Метод подгонки для латекса дал в результате значения $d = 1200 \pm 10$ нм и $n = 1.59 \pm 0.01$. Возможности метода подгонки в дальнейшем расширены [11]. Изменялись индикатрисы одиночных биологических клеток с использованием техники Differential II. Метод подгонки применялся для модели сферической частицы с покрытием. В результате были определены параметры бактерий *Staphylococcus epidermidis*: радиус 353 ± 5 нм; толщина мембраны 25 ± 5 нм; показатель преломления цитоплазмы 1.50 ± 0.01 ; показатель преломления мембраны 1.54 ± 0.01 .

Расчет [12] на основе данных о положении минимумов индикатрисы одиночных бактерий *Staphylococcus epidermidis* позволил получить $d = 350 \pm 5$ нм.

В проточной цитометрии метод подгонки рассчитанных индикатрис к экспериментальным использовался в ряде работ [13, 14]. Так, состав пятикомпонентной смеси, состоящей из частиц с размерами 1.1, 5.0, 10.0, 15.6 и 19.5 мкм, определен [13] на основе данных по светорассеянию, измеренных на проточном цитометре. Для полистирольных латексных частиц получено достаточно хорошее согласие между измеренной функцией рассеяния и вычисленной по теории Ми. Из сравнения индикатрис рассеяния, рассчитанных по теории Ми для гомогенных сфер, определены [14] распределение по размерам и среднее значение показателя преломления для спор.

Метод подгонки экспериментально измеренных индикатрис к рассчитанным является наиболее точным методом решения обратной задачи светорассеяния для одиночных частиц. Однако он требует

длительных вычислений и довольно точного задания начальных параметров подгонки. Рассматриваемый в данной работе метод пролетной индикатрисы светорассеяния позволяет вычислять характеристики частицы, используя не всю индикатрису, а только некоторые ее параметры. Термин пролетная отражает основные особенности метода: расчет характеристик частицы проводится за характерное время пролета частицы в измерительной системе.

1.1 Метод двумерного рассеяния Ми (Two-Dimensional Mie Scattering, 2DMS)

В своей основе метод двумерного рассеяния Ми сводится к методу узлов прямой задачи рассеяния в двумерной плоскости [9]. Оси плоскости образованы значениями интенсивностей рассеяния в два телесных угла. Типичная схема 2DMS представлена на рис. 1.

Сеть 2DMS образована узлами, причем интенсивности в узлах рассчитываются по строгой теории Ми для сферических частиц (см., например, [8]). Измеренные значения интенсивности в заданные два телесных угла образуют в этой плоскости определенную точку (например, точка A на рис. 1). Тогда значения d (размер) и n (показатель преломления) в точках, расположенных между узлами, вычисляются в линейном или квадратичном приближении относительно узловых значений. Метод 2DMS позволяет достаточно быстро и точно определять значения d и n сферических частиц при условии предварительного расчета интенсивности в узловых точках.

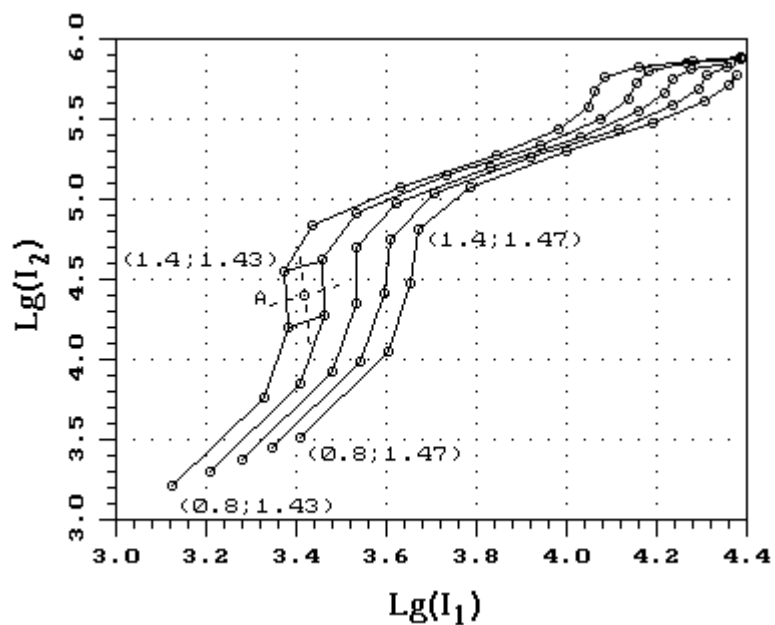


Рис. 1. Схема двумерного рассеяния Ми. I_1 и I_2 интенсивности светорассеяния одиночной сферической частицы в телесных углах Ω_1 (20°) и Ω_2 (510°). Узлы отмечены символом $(d; n)$, где d и n размер в мкм и показатель преломления частицы соответственно.

Однако вышеперечисленные немногочисленные работы, в которых метод 2DMS использовался для определения размера и показателя преломления частиц, не позволяют сделать заключение о его универсальности и точности. Оптимизация оптической схемы и определение точности метода представляется актуальной задачей, так как метод имеет значительный прикладной потенциал, ввиду его главного достоинства, а именно, возможности использования серийных проточных цитометров фирм Becton Dickinson, Epics и т.д. [35].

Рассмотрим существенные недостатки метода 2DMS: а) существование областей с множественными решениями обратной задачи светорассеяния (области скрутки сетки 2DMS), б) необходимость проведения калибровки значений интенсивностей, рассчитанных для узлов сетки, с учетом данных для частиц с известными размером и показателем преломления. Первое ограничение требует внимательного рассмотрения, второе обсуждаться здесь не будет, так как оно связано с удобством использования метода, хотя, в конечном счете, и определяет точность метода.

Образование областей скрутки обусловлено выбором углов сбора рассеянного излучения для определенных диапазонов размера и показателя преломления частиц. На рис. 2 представлен расчет логарифма интенсивности света, рассеянного под углами $2-5^{\circ}$, как функции размера частицы для двух значений показателя преломления. Отчетливо видны области скруток для $d = 2.5-3.5$, ~ 6 и 8.8 мкм. Такие области скруток в двумерном представлении показаны на рис. 3 ($\Omega_1 = 120-170^{\circ}$ и $\Omega_2 = 20-60^{\circ}$).

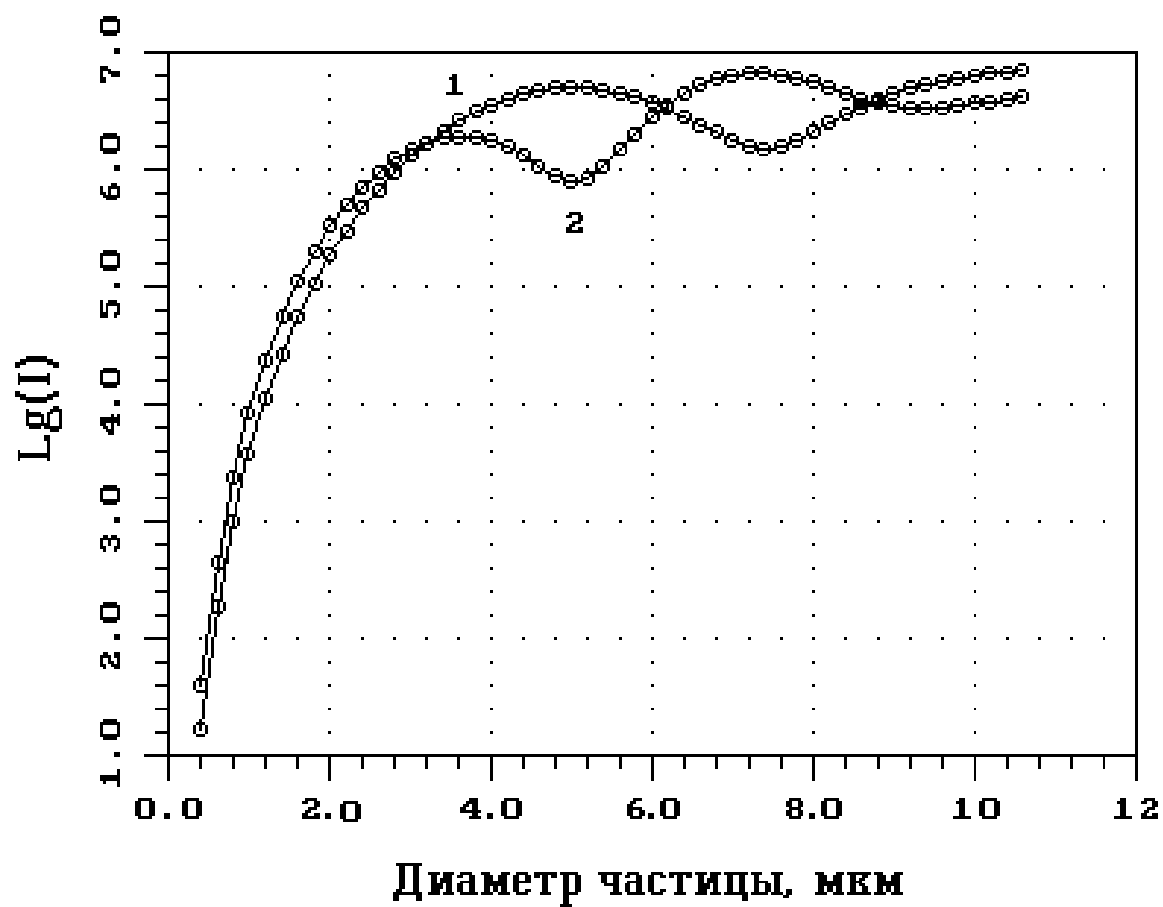


Рис. 2. Логарифм интенсивности света, рассеянного в телесный угол (полярные углы 25° ; азимутальные 0360°), как функция размера частицы для двух показателей преломления: 1.43 (1) и 1.48 (2).

Для более полного использования метода актуальным является выбор углов сбора рассеянного излучения так, чтобы погрешности, возникающие в областях скруток, были минимальными в как можно более широком диапазоне d и n . Была рассчитана средняя точность решения обратной задачи светорассеяния методом 2DMS в ограниченных диапазонах изменений размера и показателя преломления частиц. Сеть 2DMS была построена для $d = 0.4-20$ мкм с шагом 0.2 мкм и $n = 1.41-1.49$ с шагом 0.01 при различных углах сбора рассеянного излучения ($2-5^0$; $5-10^0$; $5-15^0$; $10-20^0$; $20-40^0$; $20-60^0$; $75-115^0$; $120-170^0$; $140-175^0$). Для вычисления средней ошибки по указанным диапазонам размеров и показателей преломления были построены зависимости, аналогичные представленным на рис. 2, для $n = 1.435, 1.453, 1.455, 1.458, 1.475$ с шагом 0.05 мкм по размеру. По рассчитанным значениям интенсивностей восстанавливались размер и показатель преломления частицы методом 2DMS. Сравнение восстановленных значений с исходными позволило определить оптимальные углы сбора рассеянного излучения на основе величин средних ошибок в вычислении размера методом 2DMS при различных телесных углах сбора. Углы сбора излучения $\Omega_1 = 20-60^0$ и $\Omega_2 = 5-10^0$ обеспечили наименьшую среднюю ошибку оценки, которая равнялась 0.16 мкм для размера и 0.003 для показателя преломления в диапазоне размеров 0.5-6 мкм. Результаты статистической обработки представлены на рис. 4.

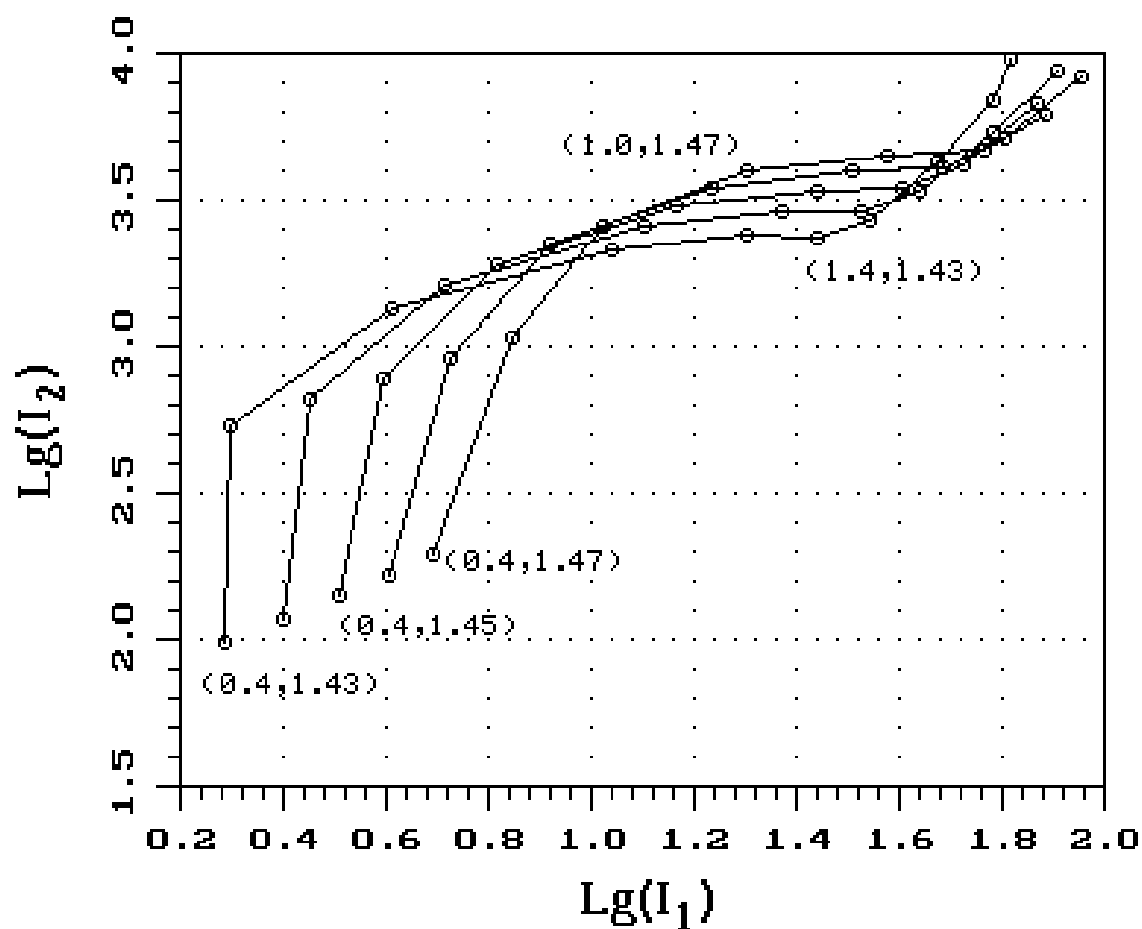


Рис. 3. Схема двумерного рассеяния Ми. I_1 и I_2 интенсивности светорассеяния одиночной сферической частицы в телесных углах Ω_1 (120°) и Ω_2 (2060°).

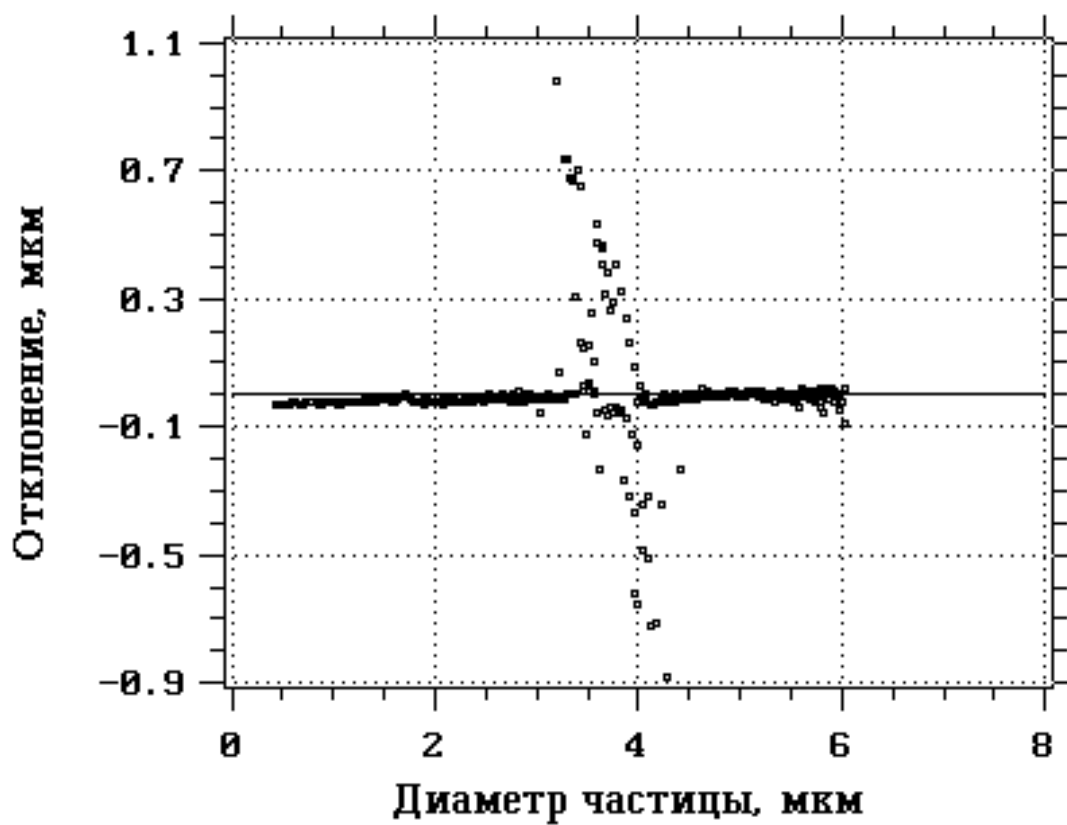


Рис. 4. Систематическая ошибка метода 2DMS при вычислении размера частицы.

Видно, что основная ошибка метода приходится на диапазон 3.3-4.7 мкм (область скрутки сетки 2DMS). Максимальная ошибка вычисления размера в этой области составляет $\begin{matrix} +1.0 \\ -0.9 \end{matrix}$ мкм. Аналогичный вид имеет распределение ошибки для показателя преломления от размера. Максимальная ошибка для области скрутки равнялась $\begin{matrix} +0.011 \\ -0.010 \end{matrix}$. Использование других углов сбора для построения сетки 2DMS и расчета средней ошибки приводило к увеличению области скрутки и средней ошибки вычислений размера частицы. Приведенные результаты показывают, что метод 2DMS можно применять для обработки данных светорассеяния при анализе большого класса частиц. С большой уверенностью можно предположить, что диапазон показателей преломления можно существенно расширить без заметного уменьшения точности метода. Значительные достоинства метода 2DMS - простота вычислений (линейные или квадратичные приближения) и скорость обработки (основное время затрачивается на поиск ближайшей к экспериментальному значению узловой точки).

Для частиц с размером больше 6 мкм скрутки сетки 2DMS не позволяли разработанному алгоритму поиска ближайшей точки однозначно определить четырехугольник сетки, в котором производится расчет размера и показателя преломления. В области размеров до 15 мкм данная сетка 2DMS позволяет лишь фрагментарно однозначно определять размер и показатель преломления.

1.2 Метод тройного двумерного рассеяние Ми (Triple Two-Dimensional Mie Scattering, 3×2DMS)

Метод 2DMS позволяет быстро получать достаточно точные значения размера и показателя преломления одиночных частиц при обработке данных об интенсивности света, рассеянного в двух телесных углах. При этом рабочий диапазон метода ограничен размерами частиц 0.4-6 мкм. Для частиц размером больше 6 мкм метод 2DMS дает существенные ошибки как в определении размера, так и показателя преломления. С ростом диаметра частицы скрутки сетки становятся все чаще и области корректности задачи - все уже. Это ограничение можно преодолеть, выбирая для этих областей другую пару углов. С этой целью был разработан метод тройного двумерного рассеяния Ми (3×2DMS). Он заключается в одновременной обработке трех схем 2DMS с заранее установленным приоритетом для каждой из схем. Таким образом метод 3×2DMS использует интенсивности рассеяния в трех телесных углах. Аналогично оптимизации, выполненной для метода 2DMS, была проведена оптимизация по третьему углу сбора рассеянного излучения. Минимальная средняя ошибка оценки по диапазону размеров была получена при использовании следующих углов сбора рассеянного излучения: $\Omega_1 = 5-10^0$; $\Omega_2 = 20-60^0$; $\Omega_3 = 120-170^0$. Результаты статистической обработки рассчитанных данных представлены на рис. 5.

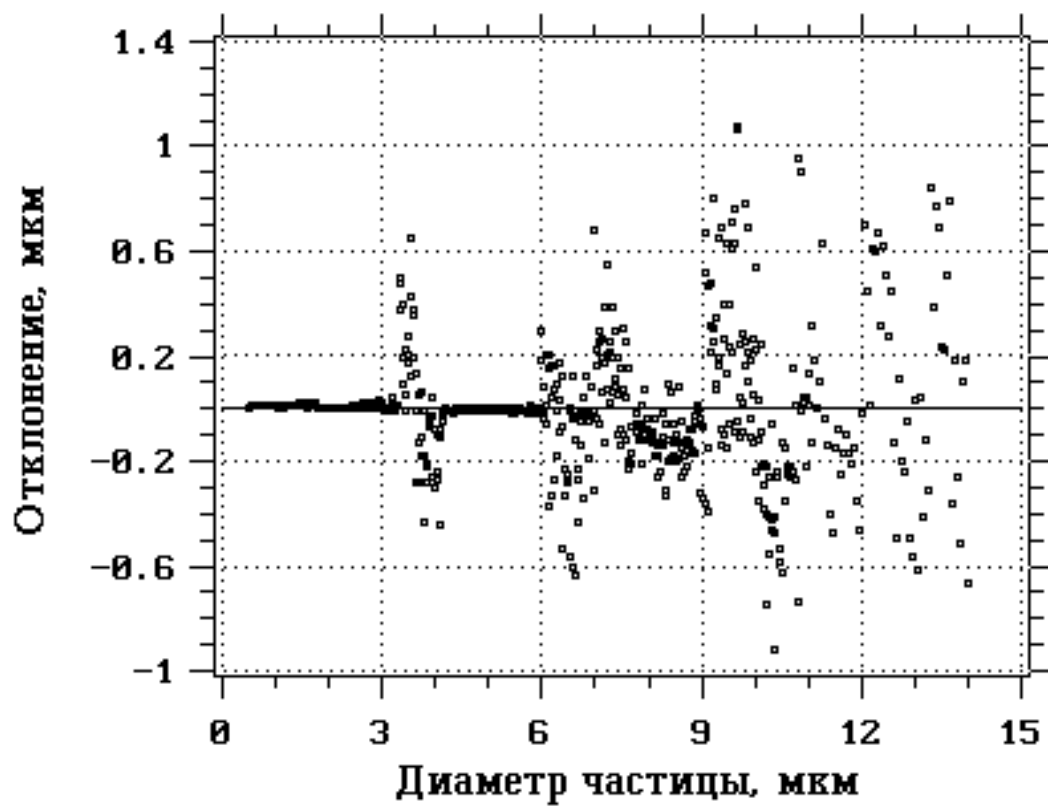


Рис. 5. Систематическая ошибка метода 3×2 DMS при вычислении размера частицы.

Средняя ошибка оценки по всему диапазону размеров и показателей преломлений (1.41-1.49) равнялась 0.24 мкм и 0.003 соответственно. Важно отметить, что метод 3×2DMS обеспечивает меньшую ошибку вычисления размера частицы в области 3.3-4.7 мкм по сравнению с методом 2DMS. Использование метода 3×2DMS позволило расширить рабочий диапазон по размеру до 15 мкм, при этом относительные ошибки вычисления размера и показателя преломления не превышали 12 % и 0.7%, однако это достигалось за счет увеличения времени обработки данных светорассеяния в 3 раза.

Следует отметить, что точность метода 3×2DMS существенно возрастает при определении в полидисперсных системах суммарных характеристик, таких, как общий объем частиц и средний показатель преломления. Точность вычисления в этом случае обуславливается суммарной ошибкой по всему диапазону, которая близка к нулю так как знак ошибки случайно меняется в зависимости от размера (см. рис. 5).

Вычисления общего объема и среднего показателя преломления частиц проводились для лог-нормального распределения частиц по размерам с определенным значением показателя преломления. Результаты проведенных нами расчетов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты расчета методом 3×2DMS

σ	d	$V_{\text{реал}}$	$n_{\text{реал}}$	$n_{\text{расчет}}$	$V_{\text{расчет}}$	ΔV
МКМ	МКМ	(отн. ед)			(отн. ед)	%
1.3	2.0	0.15	1.4530	1.4532	0.15	0
	3.0	0.76		± 0.0005	0.76	0
	4.0	2.39			2.40	-0.2
1.5	2.0	0.34			0.34	0
	3.0	1.66			1.67	-0.4
	4.0	4.62			4.64	-0.5
1.8	2.0	0.86			0.86	-0.4
	3.0	3.27			3.28	-0.2
	4.0	7.23			7.22	0.1
1.3	2.0	0.15	1.4560	1.4564	0.15	0
	3.0	0.77		0.0005	0.76	1.3
	4.0	2.48			2.41	3.0
1.5	2.0	0.34			0.34	0
	3.0	1.74			1.72	0.9
	4.0	5.33			5.32	0.2
1.8	2.0	0.97			0.97	0
	3.0	4.19			4.20	-0.1
	4.0	10.63			10.66	-0.3

1.3	2.0	0.15	1.4580	1.4582	0.15	0
	3.0	0.76		0.0004	0.76	0
	4.0	2.41			2.40	0.1
1.5	2.0	0.34			0.34	0
	3.0	1.69			1.69	0
	4.0	4.93			4.92	0.1
1.8	2.0	0.89			0.89	0
	3.0	3.50			3.50	0
	4.0	8.00			8.00	0

Примечание. Используются следующие обозначения: $n_{\text{реал}}$, $V_{\text{реал}}$ исходное значение показателя преломления и суммарного объема частиц при расчете интенсивностей рассеяния; σ , d ширина и положение максимума исходной лог-нормальной функции распределения частиц по размеру; $n_{\text{расч}}$ рассчитанный средний показатель преломления частиц; $V_{\text{расч}}$ вычисленное значение суммарного объема частиц; ΔV относительная ошибка вычислений суммарного объема частиц.

Из анализа данных видно, что среднее значение показателя преломления и общий объем вычисляются с хорошей точностью. Интерес к этой области размеров и показателей преломления был вызван тем, что метод 3×2DMS можно использовать при вычислении массовой концентрации частиц жира в молоке с одновременным контролем качества жира по среднему значению показателя преломления (жировые шарики молока: размер 1-15 мкм, показатель преломления 1.45-1.47). Реальная ширина функции распределения по размеру для молочного жира достаточно велика [36, 44]. Использование этого обстоятельства позволит отказаться от процесса стандартизации в подготовке пробы молока (гомогенизации), используемого в современных анализаторах.

Анализ методов 2DMS и 3×2DMS кратко описан в работе [7] автора.

1.3 Метод пролетной индикатрисы светорассеяния (Flying Light Scattering Indicatrix, FLSI)

Индикатриса одиночной частицы представляет из себя сложную интерференционную картину, содержащую максимальные и минимальные значения интенсивности рассеяния при разных значениях угла наблюдения [31]. Можно выделить несколько параметров индикатрисы (количество минимумов, их угловое положение, контраст и т.д.), величина которых связана с морфологическими характеристиками рассеивающей частицы (размер, показатель преломления, форма и т.д.). Решение обратной задачи светорассеяния в этом случае будет состоять в

а) выборе параметров индикатрисы, обеспечивающих наилучшую точность оценки характеристик частицы;

б) установлении зависимостей, выражающих характеристики частицы через эти параметры;

в) оценке погрешности вычислений.

В случае непоглощающих сферических частиц для вычисления их размера и показателя преломления достаточно использовать два параметра индикатрисы. Критерием выбора параметров индикатрисы должна служить степень зависимости этих параметров от параметров частицы. Если первый параметр в основном зависит от размера, то значение второго должно определяться показателем преломления. В данном случае расчет может быть проведен с применением следующих параметров индикатрисы: расстояние в градусах между первым и j -ым минимумами $\Delta\theta_j(\varphi_d)$, выбранными после граничного угла φ_d , и контраст индикатрисы $V(\varphi_v) = (I_{\max} - I_{\min}) / (I_{\max} + I_{\min})$, где I_{\max} и I_{\min} значения интенсивности рассеяния в точках максимума и минимума, выбранных после граничного угла φ_v . Для индикатрисы, представленной на рис. 6, приведены следующие параметры: $j = 3$; $\varphi_d = 20$; $\Delta\theta_3(20) = 24.92^\circ$; $\varphi_v = 40^\circ$; $V(40) = 0.605$. Значения $\Delta\theta_3(20)$, I_{\max} и I_{\min} были получены из графического анализа этой зависимости. Выбор параметров не случаен, так как в пределах аппроксимаций Релея-Ганса-Дебая и дифракции Фраунгофера расстояние между экстремумами зависит только от размера, тогда как контраст, в основном, определяется относительной разницей показателей преломления частицы и среды [30].

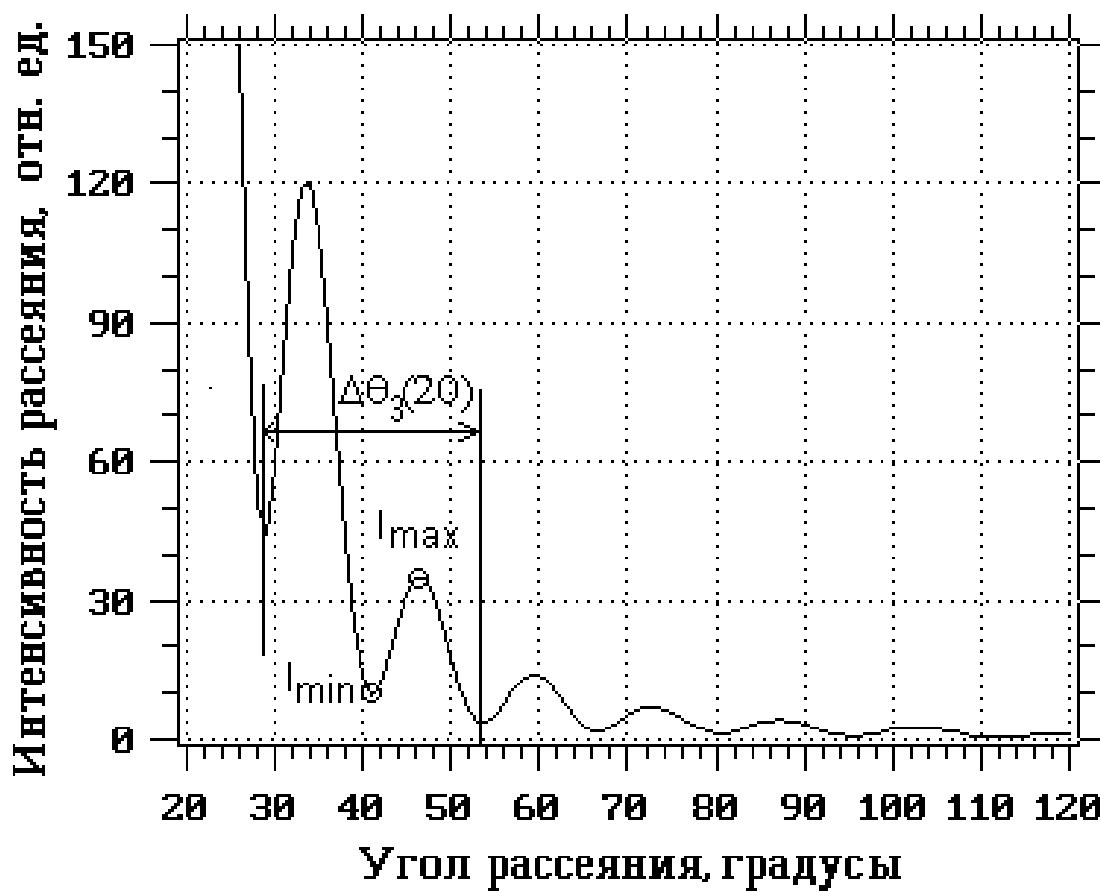


Рис. 6. Индикатриса рассеяния одиночной частицы. Расчетные параметры: $\lambda=480$ мкм; показатель преломления среды 1.333; диаметр частицы 1.7 мкм; показатель преломления частицы 1.45.

Чтобы получить требуемые уравнения, связывающие параметры индикатрисы и параметры частицы, интенсивности в экстремумах и их угловое положение рассчитывались по теории Ми, используя в качестве ядра, программу приведенную Бореном и Хафменом [8]. Индикатрисы были рассчитаны при следующих параметрах: длина волны излучения - 632.8 нм; показатель преломления среды - 1.333; размер частицы d изменялся в диапазоне 1 - 12 мкм с шагом 0.1 мкм (параметр рассеяния $\alpha = \pi n_0 d / \lambda$ изменялся в диапазоне 6.6 - 80); показатель преломления n изменялся в диапазоне 1.40 - 1.50 с шагом 0.01 (относительный показатель преломления $m = n / n_0$ лежат в пределах 1.050 - 1.125). Индикатрисы рассчитывались для непоглощающих частиц и неполяризованного падающего излучения.

Используя полученные индикатрисы, была проанализирована зависимость параметра $\Delta\theta_j(\varphi_d)$ от размера и показателя преломления частицы. Зависимость этих параметров от d и n представляет сложно организованную функцию с разрывами в тех точках, где минимум индикатрисы проходит через φ_d или φ_v . Тем не менее, можно построить аппроксимирующие функции, позволяющие определять d и n с приемлемой погрешностью. Установлено, что $\Delta\theta_j(\varphi_d)$ в основном зависит от размера частицы, тогда как зависимость от показателя преломления достаточно слабая. Была рассчитана средняя ошибка вычисления размера в вышеназванном диапазоне для различных уравнений и граничных углов. Граничный угол менялся от 10 до 60 градусов с шагом в 10 градусов. Параметр индикатрисы $\Delta\theta_3(20)$ обеспечил минимальную среднюю ошибку при вычислении размера частицы с использованием следующей функции:

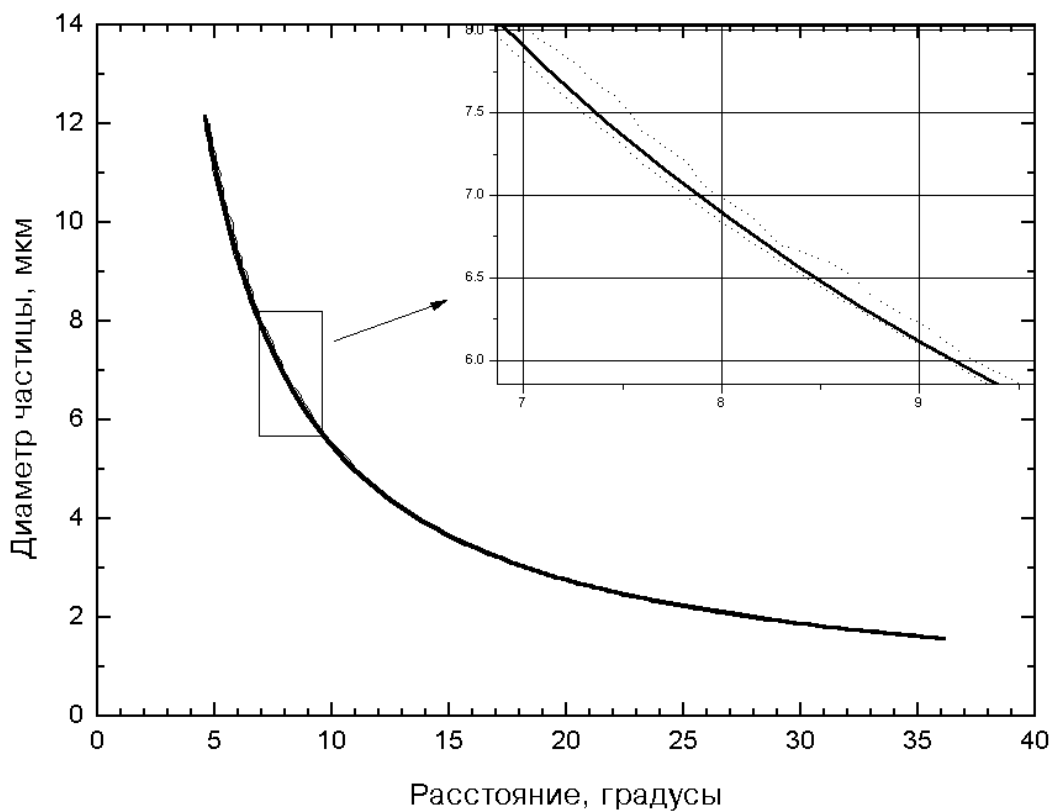


Рис. 7. Размер частицы как функция расстояния между первым и третьим минимумами, выбранными после граничного угла 20° для индикатрисы рассеяния одиночной частицы. Пунктиром обозначены коридор ошибок аппроксимации.

$$d = \alpha_1 + \alpha_2 \times [\Delta\theta_3(20)]^{-1} + \alpha_3 \times [\Delta\theta_3(20)]^{-3} + \alpha_4 \times [\Delta\theta_3(20)]^{-4}, \quad (1.1)$$

где $\alpha_1 = 0.127$ ($\sigma = 0.021$), $\alpha_2 = 52.4$ ($\sigma = 0.4$), $\alpha_3 = 190$ ($\sigma = 30$), $\alpha_4 = -660$ ($\sigma = 100$). График функции приведен на рис. 7. Абсолютная средняя ошибка вычислений размера частицы составляет 0.090 мкм (относительная ошибка не превышает 4%). Следует подчеркнуть, что уравнение (1.1) можно применять, если индикатриса измерена на длине волны 632.8 нм и в водной среде ($n=1.333$).

Для произвольных значений длины волны излучения λ' и показателя преломления среды n'_0 можно использовать следующее уравнение для вычисления размера частицы d' :

$$d' = d \times \frac{n_0}{n'_0} \times \frac{\lambda}{\lambda'} = 2.11 \times d \times \frac{\lambda}{n'_0} \quad (1.2)$$

где d рассчитан по уравнению (1). Чтобы использовать уравнения (1.1) и (1.2), необходимо проверять параметры α и m значения которых должны лежать в вышеназванных диапазонах.

Для вычисления показателя преломления частицы были использованы два параметра индикатрисы: $\Delta\theta_3(20)$ и $V(40)$.

$$n = \beta_1 + \beta_2 \times V(40) + \beta_3 \times V(40) \times [\Delta\theta_3(20)]^{-3} + \beta_4 \times [V(40)]^2 \times [\Delta\theta_3(20)]^{-1} + \beta_5 \times [\Delta\theta_3(20)]^{-3} + \beta_6 \times [\Delta\theta_3(20)]^{-4}, \quad (1.3)$$

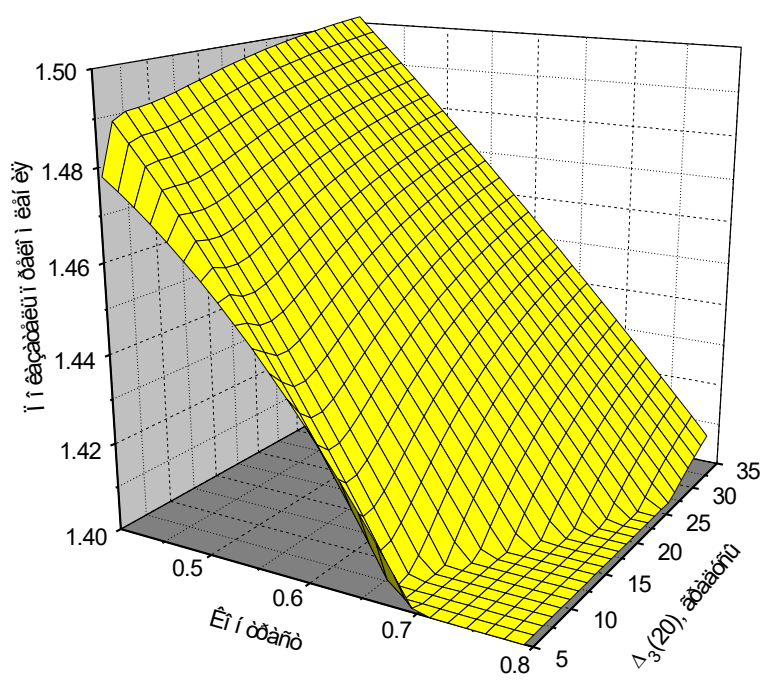


Рис. 8. Показатель преломления частицы как функция контраста индикатрисы $V(40)$ и расстояния между минимумами $\Delta\theta_3(20)$.

где $\beta_1 = 1.581$ ($s = 0.006$), $\beta_2 = 0.173$ ($s = 0.014$), $\beta_3 = 37$ ($s = 7$), $\beta_4 = 1.99$ ($s = 0.20$), $\beta_5 = 13$ ($s = 4$), $\beta_6 = 123$ ($s = 27$). Применение уравнения (1.3) позволило получить абсолютную среднюю ошибку вычисления показателя преломления частицы (показатель преломления среды 1.333), равную 0.014 с максимальной погрешностью в 1% для размеров меньших 7 мкм. Для больших размеров погрешность достигала величины 6%, что сравнимо с размером диапазона показателей преломления. Зависимость показателя преломления от параметров индикатрисы показана на рис. 8.

Для произвольного значения показателя преломления среды n_0 расчет показателя преломления частицы n можно проводить по следующему уравнению:

$$n' = n \times \frac{n'_0}{n_0} = 0.75 \times n \times n'_0 \quad (1.4)$$

где n - показатель преломления частицы, рассчитанный по уравнению (1.3). Чтобы использовать уравнения (1.3) и (1.4), необходимо проверить попадание относительного показателя преломления m в вышеназванный диапазон.

Используя уравнения (1.1), (1.2) и (1.3) с параметрами индикатрисы (см. рис. 6) $\Delta\theta_3(20) = 24.92^\circ$ и $V(40) = 0.605$, рассчитали размер и показатель преломления частицы: $d = 1.708$ мкм, $n = 1.449$. При этом параметр рассеяния $\alpha = 14.9$, а относительный показатель преломления $m = 1.087$ (оба лежат в вышеназванных диапазонах).

Таким образом, использование таких параметров индикатрисы, как контраст и расстояние между минимумами, позволяет определять размер и показатель преломления частиц с достаточно высокой точностью.

Следует отметить, что преимущество метода FLSI в определении параметров частицы по сравнению с методом 3×2 DMS в том, что при вычислениях используются относительные значения интенсивностей светорассеяния, что приводит к значительному достоинству метода, а именно, отсутствует процедура калибровки оптических и электронных трактов сканирующего проточного цитометра. Размер и показатель преломления одиночной частицы вычисляется с использованием следующих параметров: длины волны лазерного излучения и показателя преломления среды. При этом сохраняется высокая точность вычисления значений, средних для полидисперсной системы частиц (средний размер, суммарный объем, средний показатель преломления и т.д.). Еще одно свойство метода FLSI - высокая скорость оценки параметров частицы с помощью простых уравнений (1.1) и (1.3), что является важным в проточной цитометрии, так как результат может быть получен перед сортировкой частиц.

* * *

Проведен анализ влияния углов сбора излучения, рассеянного одиночной частицей, на точность вычисления размера и показателя преломления методом двумерного рассеяния Ми. Определены оптимальные с точки зрения решения обратной задачи светорассеяния углы сбора.

Предложен и проанализирован метод тройного двумерного рассеяния Ми, позволяющий определять параметры одиночной частицы в диапазонах 3 - 110 по параметру рассеяния α и до 1.12 по относительному показателю преломления. Численно продемонстрированы возможности

метода при определении средних характеристик дисперсных сред на примере частиц жира в молоке.

Предложен и проанализирован метод пролетной индикатрисы светорассеяния одиночной частицы, позволяющий вычислять абсолютные значения размера и показателя преломления частицы по полученным эмпирическим уравнениям.

ГЛАВА 2. РАЗРАБОТКА ПРОТОЧНОГО ЦИТОМЕТРА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ВОЗМОЖНОСТИ В ИЗМЕРЕНИИ СВЕТОРАСSEИВАЮЩИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОДИНОЧНЫХ ЧАСТИЦ

Несколько конструкций гидрофокусирующих головок для проточных цитометров, позволяющих измерять индикатрису одиночных частиц, описаны ранее (см., например, [2]). Индикатриса одиночных частиц позволяет определить морфологические характеристики рассеивающей частицы с наибольшей полнотой, поэтому ее измерение настолько важно. В частности, из анализа индикатрисы можно восстановить значения таких параметров частицы, как размер, показатель преломления, коэффициент поглощения, форма и т.д.[37-39, 42, 43].

Дифференциальный фотометр рассеяния [13] позволил измерять индикатрису одиночной частицы с наибольшей скоростью (несколько мкс). При этом использовалось оригинальное эллипсоидальное зеркало, направляющее свет, рассеянный в полярных углах $2.5177.5^{\circ}$ и азимутальных углах 0360° , на круговую матрицу, состоящую из 120 фотодиодов. Данная оптическая схема проточного цитометра дает возможность проводить измерение индикатрисы рассеяния и, тем самым, анализировать частицы с наибольшей скоростью.

Индикатрису полистирольных частиц и спор измеряли, используя сканирующий дифрактометр с одним фотоумножителем [14]. Применение вращающегося диска и 174 оптических световодов позволило измерять индикатрису одиночных частиц в полярных углах от 3° до 177° за 2.8 мс. Чтобы учесть различие в оптических характеристиках световодов,

применялся цифро-аналоговый преобразователь, работающий в режиме коррекции аналогового сигнала.

Подход, использующий движение частицы в потоке, был описан ранее [18]. Оптическая система проточного цитометра позволяла измерять индикатрису одиночных частиц в полярных углах от 1 до 49° с применением одного фотоумножителя. Для учета изменения интенсивности излучения, падающего на частицу во время движения, а также телесного угла сбора рассеянного излучения, измерялся корректирующий сигнал флуоресценции от частиц, окрашенных красителем.

2.1 Проточный цитометр стандартной конфигурации

В лаборатории лазерной фотохимии ИХКиГ СО РАН был разработан и создан проточный цитометр стандартной конфигурации. Для отработки техники проведения цитометрических измерений разрабатывалась методика одновременного определения концентраций бактерий и соматических клеток в молоке [20] и проведено исследование процесса агглютинации частиц латекса, используемого при иммуноанализе [21].

Двухкомпонентная полидисперсная система (молоко после предварительной обработки) изучена [20] на установке с измерением рассеянного на одиночной частице излучения. Разработанная методика подготовки пробы позволяла растворить мицеллы белка и жировые шарики молочной пробы, после чего проба представляла из себя

двухкомпонентную полидисперсную систему, состоящую из бактерий (*E.coli*) и соматических клеток (CV-1).

Для обеспечения регистрации сигналов рассеяния лазерного (632.8 нм) излучения от одиночной частицы проба пропускалась через гидрофокусирующую систему, что позволяло работать с величиной тестируемого объема $\sim 10^{-8}$ мл. Рассеянное излучение регистрировали в углах от 5° до 20° . С помощью рассчитанной по теории Ми функции ($d = 0.4-20$ мкм; $n = 1.38$) каждой амплитуде светорассеяния ставился в соответствие эффективный размер частицы d . Полученная функция распределения по эффективному размеру обрабатывалась в двух диапазонах (0.4-5 мкм) и (5-20 мкм).

Получено уравнение, связывающее концентрацию *E.coli* ($N_{E.coli}$) с числом частиц с $d < 5$ мкм (n): $N_{E.coli} = 790 \times n < 570000$. Чувствительность данной методики определения концентрации *E.coli* в двухкомпонентной системе в проведенных экспериментах составляла $(9.0 \pm 0.6) \times 10^5$ мл $^{-1}$. Аналогичное уравнение получено для концентрации клеток CV-1: $N_{CV-1} = 1020 \times n < 120 \times n > + 12000$. Чувствительность данной методики определения концентрации соматических клеток в двухкомпонентной системе в проведенных экспериментах можно оценить величиной $(2.5 \pm 0.2) \times 10^5$ мл $^{-1}$.

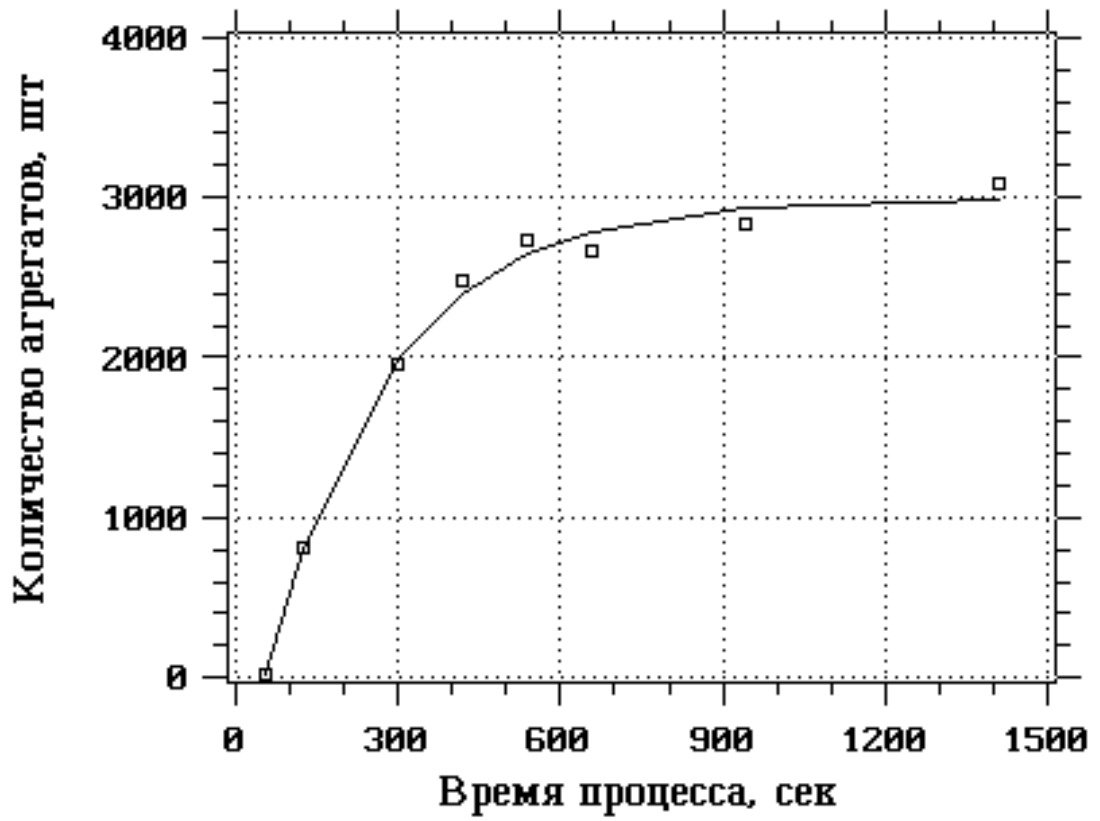


Рис. 9. Кинетика агглютинации латексных частиц с адсорбированными на поверхность антигенами в присутствии антител.

Совместно с НПО ВЕКТОР исследовался процесс латексной агглютинации, при котором полипептиды вирусов ВИЧ-1 (фрагменты 601-616 и 593-604 из последовательности трансмембранного белка GP41) и ВИЧ-2 (фрагмент 587-605 из последовательности трансмембранного белка GP36) адсорбировались на поверхность частиц латекса размером 0.8 мкм [21]. Агглютинацию суспендированных частиц латекса инициировали добавлением сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 из контрольной панели фирмы Gemini Bio-Products Inc (США). Количество образующихся в процессе агглютинации латексных комплексов измеряли путем регистрации сигналов рассеяния лазерного (632.8 нм) излучения. Использование гидрофокусирующего устройства и сфокусированного лазерного излучения позволяло регистрировать сигналы светорассеяния от каждого образовавшегося комплекса частиц латекса. Рассеянное излучение регистрировали в углах от 5^0 до 20^0 .

Измеряли зависимость числа образующихся в процессе агглютинации латексных комплексов от времени для различных сывороток. Полученные кинетические кривые (рис. 9) аппроксимировали функцией $N = N_{\infty} \times (1 - \exp[-k \times (t - t_0)])$, где t и t_0 - текущее и начальное время процесса агглютинации, N - число образовавшихся комплексов к моменту времени t , N_{∞} - конечное число образовавшихся комплексов, k - характерное обратное время процесса агглютинации. Характерное время процесса в экспериментах составило 170 ± 300 с для различных положительных сывороток. Измерялось также число образующихся комплексов при различных разбавлениях сывороток (от 1 : 10 до 1 : 3200). Для контрольных сывороток были определены оптимальные концентрации антител для образования агглютината.

2.2. Сканирующий проточный цитометр.

Основным отличием сканирующего проточного цитометра от проточного цитометра стандартной конфигурации является наличие оптической системы, в которой свет, рассеянный одиночной частицей, сканируется по апертуре фотоприемника во время ее движения в потоке [15]. Данная оптическая схема является инструментальным дополнением к методу FLSI. Основные характеристики сканирующего проточного цитометра:

- 1) индикатриса одиночной частицы измеряется в полярных углах от 5 до 120° с интегрированием по азимутальным от 0 до 360°,
- 2) измерения проводятся с использованием одного фотоприемника,
- 3) во время измерения частица движется в зоне постоянной освещенности.

Схема гидрофокусирующей головки и оптической системы сканирующего проточного цитометра представлена на рис. 10.

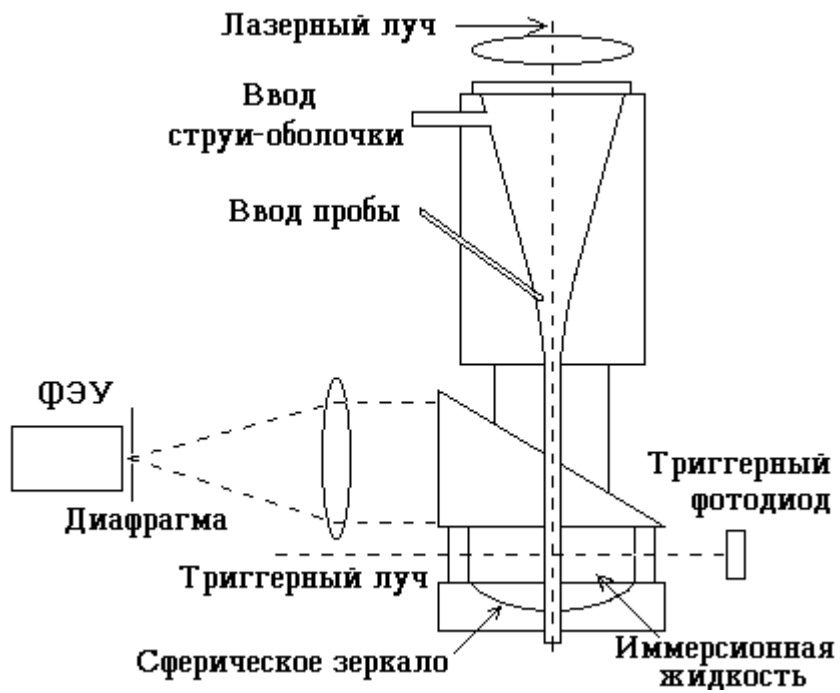


Рис. 10. Схема гидрофокусирующей головки с оптической кюветой сканирующего проточного цитометра.

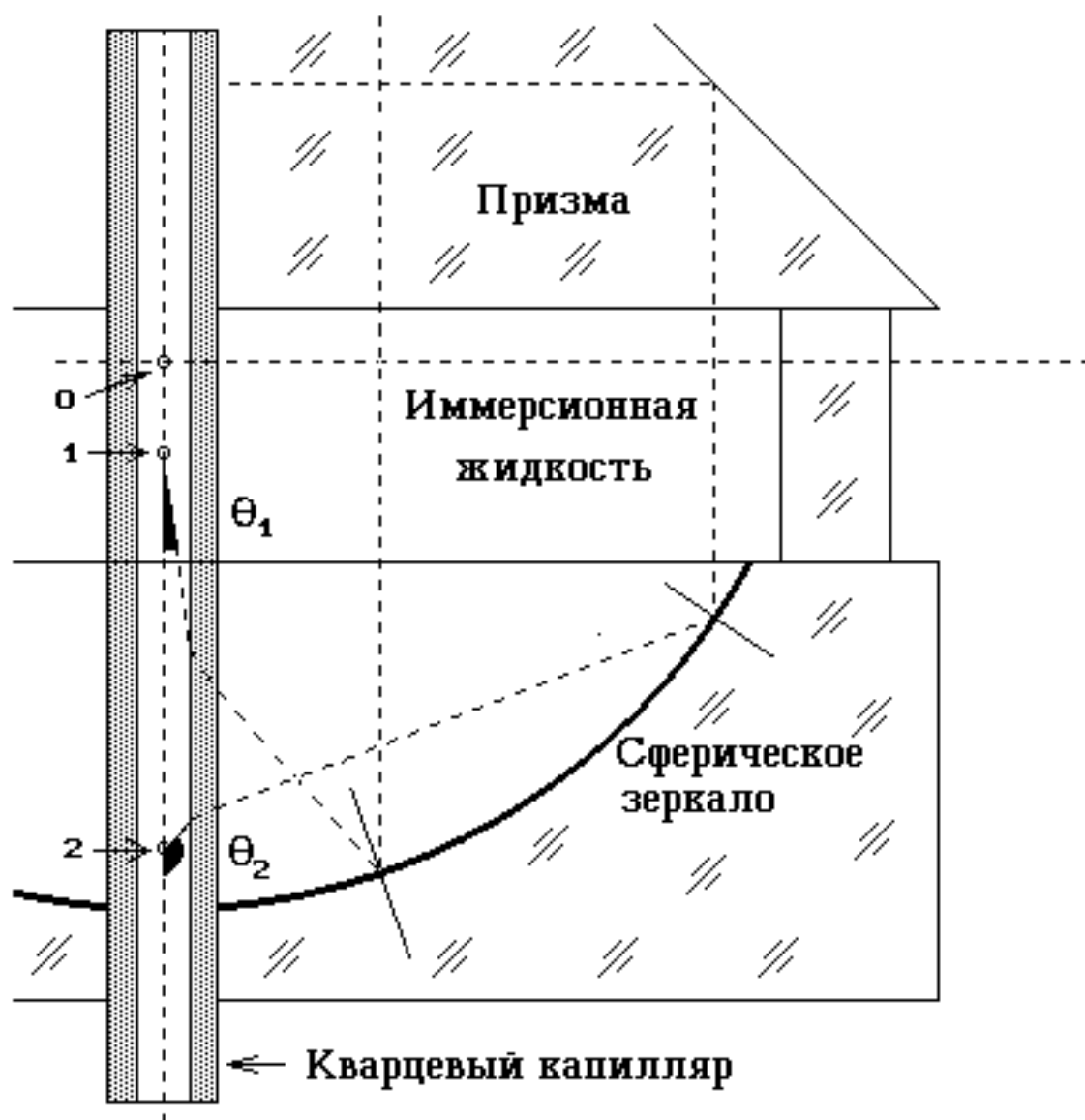


Рис. 11. Оптическая схема сканирующей системы проточного цитометра. Пунктирными линиями показаны основное излучение, триггерный луч и лучи рассеяния. Частица, проходя через точки 0 , 1 и 2 , запускает электронную систему, рассеивает свет под углами θ_1 и θ_2 соответственно.

Гидрофокусирующая головка создает два концентрических потока: внутренний (диаметр 1030 мкм), в котором движутся анализируемые частицы, и внешний поток (диаметр 300 мкм, равный диаметру капилляра), очищенный от частиц с помощью мембранного фильтра. Основное излучение фокусируется через оптическое окно в верхней части гидрофокусирующей головки в кювету с помощью юстировочного устройства (на рис. 10 не показано) и линзы. Фокусировка луча в оптической кювете обеспечивает постоянную освещенность движущейся частицы во время измерения индикатрисы. Другая линза фокусирует выходящее из кюветы (через призму) рассеянное излучение на диафрагму, расположенную на входном окне фотоумножителя. Схема кюветы представлена на рис. 11.

Потоки, созданные гидрофокусирующей головкой, направляются в кварцевый капилляр, расположенный внутри кюветы, состоящей из призмы, кварцевого цилиндрического кольца и сферического зеркала. Внутренняя область кюветы заполнена иммерсионной жидкостью. Луч лазера, проходящий через цилиндрическое кольцо (триггерный луч), служит для запуска электронной системы цитометра. Для любой точки внутри зоны измерения свет, рассеянный только под определенным углом, отразится сферическим зеркалом параллельно оси потока и, отразившись от поверхности призмы, покинет оптическую кювету. Такая оптическая кювета позволяет измерять индикатрисы одиночных частиц в углах от 5 до 125° .

Электронная система сканирующего проточного цитометра записывает в память ЭВМ интенсивность рассеяния как функцию времени или положения частицы внутри рабочей зоны. При условии, что

фотоприемник регистрирует только лучи, образующие цилиндр, ось которого совпадает с осью потока, положение частицы (расстояние ℓ от частицы до дна сферического зеркала) можно выразить через угол рассеяния и параметры оптической системы.

$$\ell = X + \frac{d}{2} \times \text{ctg}(\theta) + \frac{D-d}{2} \times \text{ctg}(\varphi_1) + \left(\sqrt{2 \times X \times R - X^2} - \frac{D}{2} \right) \times \text{ctg}(\varphi_2),$$

$$\text{где } \varphi_i = \arccos\left(\frac{n_0}{n_i} \times \cos(\theta)\right) \quad (i = 1,2),$$

n_0 - показатель преломления среды, n_1 - показатель преломления капилляра, n_2 - показатель преломления иммерсионной жидкости; D и d - внешний и внутренний диаметры капилляра, соответственно;

$$X = R \times \left[1 - \sqrt{\frac{(1 + \cos(\varphi_2))}{2}} \right];$$

R - радиус сферического зеркала. Функция, связывающая положение частицы с углом рассеяния, показана на рис. 12 (пунктирная линия).

Изменение эффективности сбора рассеянного излучения (угловое разрешение системы) в зависимости от положения частицы внутри рабочей зоны сканирующей системы изменяет регистрируемую индикатрису. Чтобы учесть это влияние, передаточная функция была рассчитана, принимая во внимание реальные геометрические размеры и параметры оптической системы. Эта функция представлена на рис. 12 (сплошная линия).

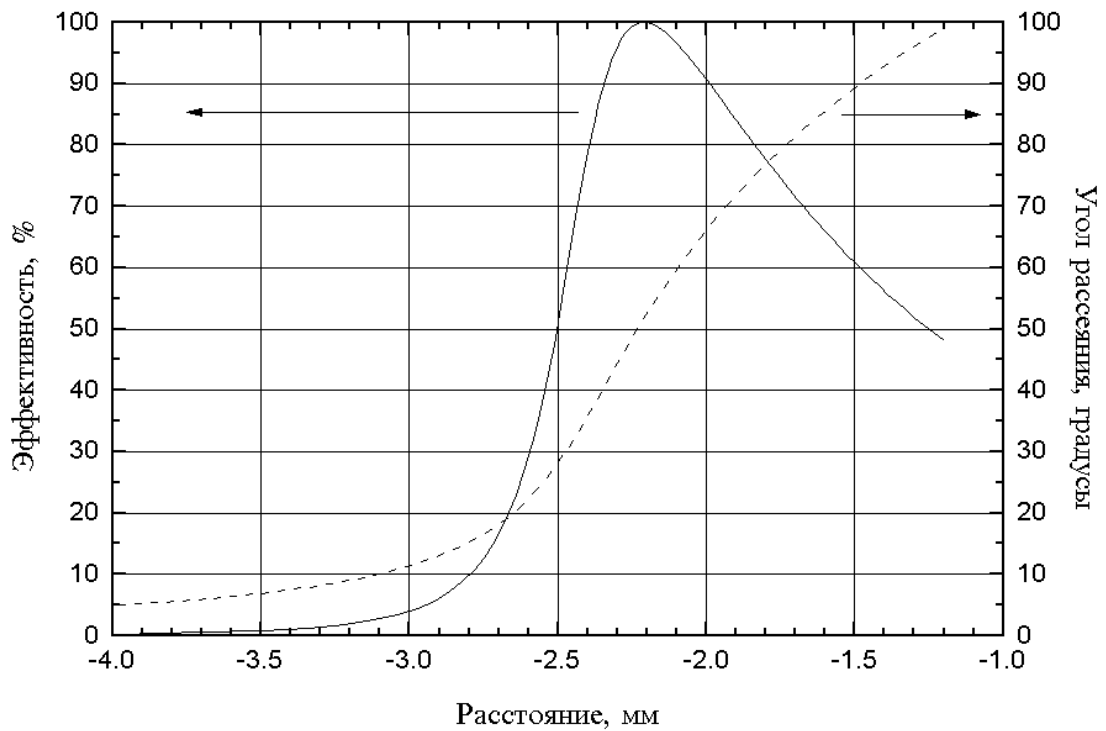


Рис. 12. Относительная эффективность сбора рассеянного излучения оптической схемой (сплошная линия) и угол рассеяния (пунктирная линия) как функция расстояния до частицы от дна сферического зеркала.

Обе функции использовались нами, чтобы преобразовать экспериментально полученную зависимость рассеяния от времени в реальную индикатрису одиночной частицы. Программа, используемая для расчета передаточной функции и углового разрешения оптической системы, представлена в приложении.

Работоспособность сканирующего проточного цитометра проверялась с использованием латексных частиц с неизвестными параметрами. Для приведенного эксперимента, триггерный луч располагался на расстоянии 4.22 мм от дна сферического зеркала. На рис. 13, *a* и 14, *a* представлены пролетные индикатрисы латексных частиц, полученные непосредственно с фотоумножителя, на рис. 13, *b* и 14, *b* - индикатрисы, пересчитанные с учетом изменения телесного угла сбора рассеянного излучения. Для оценки размера и показателя преломления латексных частиц был использован метод FLSI с модифицированными уравнениями (1) и (2). Использовали следующие параметры индикатрисы: $\Delta\theta_2(20)$ и $V(30)$ и эмпирические уравнения вычисления размера и показателя преломления из работы [15]. Полученные в результате оценки для размеров и показателей преломления латексных частиц составляли 3 мкм и 1.576 (для индикатрисы на рис. 13, *b*); 4.95 мкм и 1.57 (рис. 14, *b*). Метод подгонки дал следующие результаты: 3 мкм и 1.58; 4.68 мкм и 1.58 соответственно. Микроскопический анализ позволил получить средние размеры латексных частиц в двух измеренных суспензиях. Для первой суспензии средний диаметр частиц 3 мкм, для другой - 4.7 мкм. По литературным данным [19] показатель преломления латексных частиц лежит в диапазоне от 1.57 до 1.59.

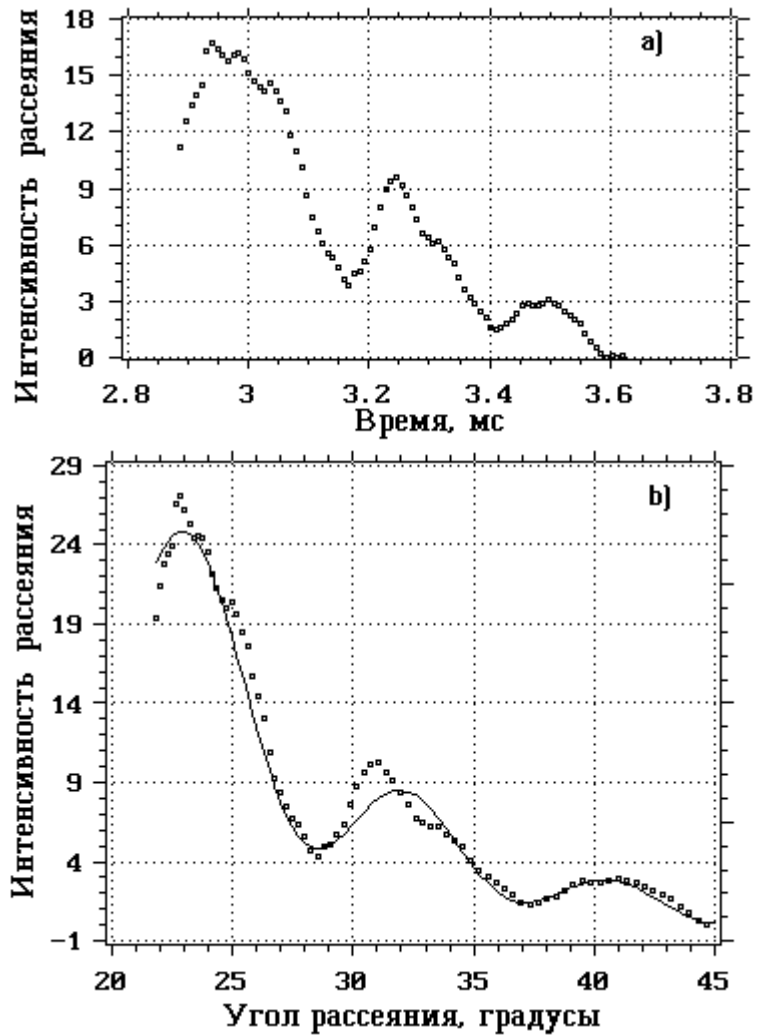


Рис. 13. Пролетная индикатриса светорассеяния латексной частицы в зависимости от времени (*a*) и угла (*b*). Индикатриса, полученная при использовании метода подгонки (сплошная линия), рассчитана для диаметра сферы 3 мкм и показателя преломления 1.58.

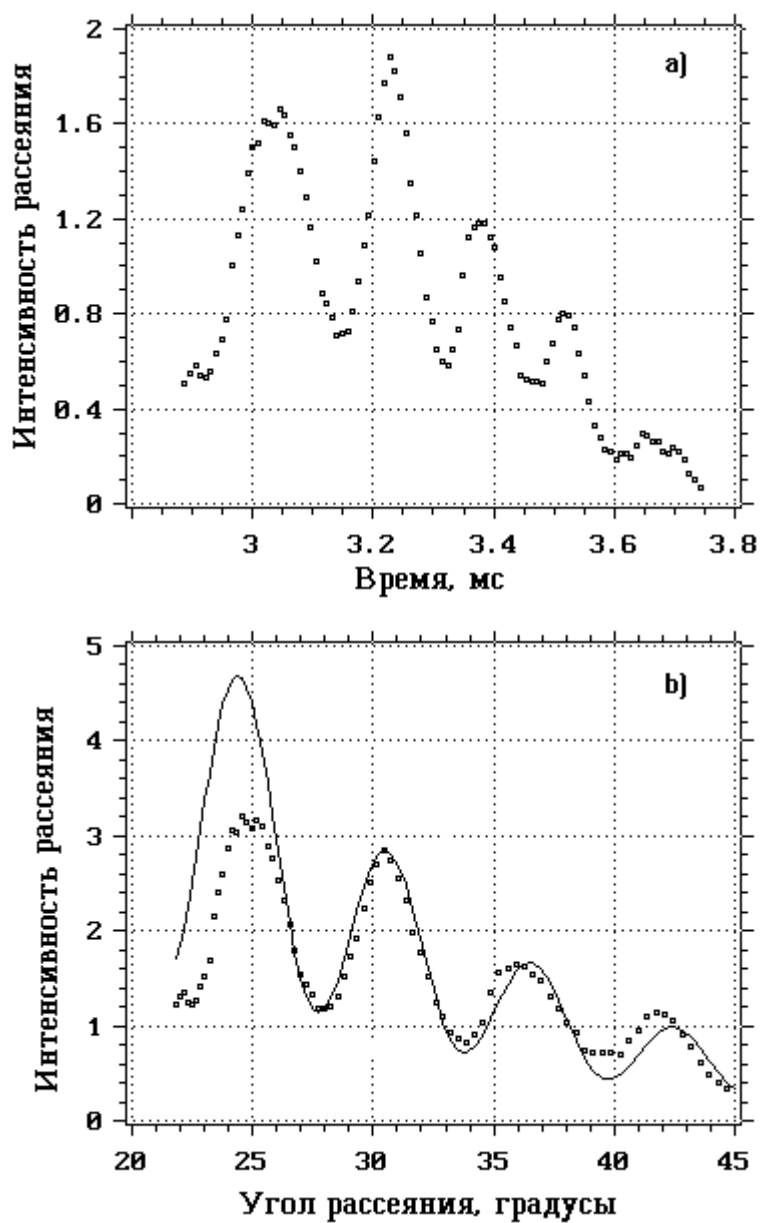


Рис. 14. Пролетная индикатриса светорассеяния латексной частицы в зависимости от времени (*a*) и угла (*b*). Индикатриса, полученная при использовании метода подгонки (сплошная линия), рассчитана для диаметра сферы 4.68 мкм и показателя преломления 1.58.

Эксперименты с латексными частицами на сканирующем проточном цитометре продемонстрировали возможность применения метода полетной индикатрисы светорассеяния для определения параметров одиночных частиц. Использование цитометра такого типа и метода FLSI для обработки данных светорассеяния позволило определять размер и показатель преломления сферических частиц без проведения предварительной калибровки оптического и электрического трактов цитометра. С целью получения более точных значений параметров частицы в качестве стартовых для метода подгонки можно использовать результаты, полученные методом FLSI.

Однако сканирующий проточный цитометр предъявляет достаточно жесткие требования к точности исполнения оптической кюветы, как и к расположению собирающей линзы и диафрагмы. Первое ограничение накладывается на линзу, фокусирующую лазерное излучение в рабочую зону кюветы. Характерное расстояние, которое частица проходит при измерении индикатрисы, около 3 мм при радиусе сферического зеркала - 5 мм. Линза должна создать в зоне регистрации постоянную интенсивность падающего излучения, или другими словами, длина перетяжки гауссового пучка в фокусе линзы с изменениями интенсивности $\leq 1\%$ должна перекрывать рабочую зону сканирующей системы. Следующее требование налагается на точность прохождения частицы через центр сферического зеркала. Было оценено, что такая неточность в 10 мкм не вызывает значительного искажения измеряемой индикатрисы. Это вполне достижимо в гидрофокусирующей системе, так как характерный диаметр внутренней струи, содержащей исследуемые частицы, составляет величину 10 - 15 мкм. Значительные трудности возникают при определении местоположения диафрагмы перед

фотоприемником, которое соответствует передаточной функции. В частности, некоторое расхождение в измеренной индикатрисе и рассчитанной методом подгонки (рис. 14b) вызвано одной из этих причин.

Конструктивные особенности сканирующего проточного цитометра обеспечивают дальнейшее развитие методов анализа одиночных частиц на базе проточной цитометрии. В частности, интегрирование рассеянного света по азимутальному углу позволяет получить высокое значение отношения сигнала к шуму для достаточно малых частиц, что, в свою очередь, дает возможность использовать более дешевый и надежный He-Ne-лазер вместо применяемого обычно аргонового, что очень важно при разработке клинического проточного цитометра, так как существующие проточные цитометры фирм Becton Dickinson, Epic Division имеют относительно высокую стоимость [3] (от 50000 до 500000 USD). Сканирующий проточный цитометр дает возможность также измерять флуоресценцию одиночных частиц в реальном времени, позволяет разрабатывать методики анализа частиц, меченных красителем с большим временем флуоресценции, избавляясь, тем самым, от неспецифического сигнала автофлуоресценции, возникающей при облучении макромолекул [22,37]. В настоящее время в ИХКиГ СО РАН получены соответствующие предварительные результаты, для обеспечения измерения флуоресценции при этом использовался импульсный азотный лазер [25].

Основное свойство метода FLSI, состоящее в абсолютном (не требующим калибровки) определении параметров одиночных частиц в реальном времени, предполагается использовать при проведении многовариантного анализа макромолекул с использованием латексных

частиц (об использовании латексных частиц для анализа макромолекул см., например, лит. [2, 23, 24]). В частности, чтобы определить за одно измерение шесть типов макромолекул, в проточном цитометре стандартной конфигурации необходимо использовать три типа красителей в качестве меток и два лазера для возбуждения флуоресценции. Метод FLSI дает возможность использовать латексные частицы разных размеров (например, от 1 до 10 мкм с шагом 0.5 мкм) и один флуорохром. При этом на частицы данного размера адсорбируется сенсор, чувствительный к молекуле определенного строения [49]. В результате исследования такой системы на сканирующем проточном цитометре по индикатрисе определяется тип молекулы (размер частицы), а по интенсивности флуоресценции - ее концентрация в растворе.

Рассмотренные расчетные методы и экспериментальные результаты позволяют оценить ситуацию в быстро развивающейся области - диагностика одиночных частиц с использованием светорассеяния [47, 48]. Представленные данные свидетельствуют о том, что светорассеяние может послужить основой для разработки диагностических методов анализа движущихся частиц. Согласно последнему обзору по проточной цитометрии [3], дальнейшее развитие флуоресцентных методов может быть связано с усложнением методов регистрации (совмещение проточного цитометра с фурье-спектрометром, применение фазочувствительных методов с определением времени флуоресценции и т.д.). К сожалению, перспективы проточной цитометрии с использованием светорассеяния не обсуждаются. По нашему мнению, обработка данных светорассеяния, полученных на сканирующем

проточном цитометре, методом FLSI и регистрация флуоресценции во времяразрешенном режиме позволяют модернизировать проточную цитометрию без значительного усложнения регистрирующей аппаратуры. В настоящее время целесообразно приступить к разработке на основе метода FLSI и релаксационной флуорометрии практически удобных методик для использования в пищевой промышленности, медицине и биологии.

* * *

На созданном проточном цитометре стандартной конфигурации разработан метод анализа двухкомпонентной дисперсной среды. Определена чувствительность метода при одновременном определении концентраций бактерий и соматических клеток в молоке.

При изучении процесса латексной агглютинации в присутствии полипептидов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 на базе проточного цитометра стандартной конфигурации определены характерные времена образования комплексов в условиях реакции антиген-антитело, которые равнялись 2-5 мин.

Разработан и создан сканирующий проточный цитометр, позволяющий измерять индикатрису одиночной частицы в углах от 5 до 125 градусов. Продемонстрирована способность метода пролетной индикатрисы светорассеяния определять абсолютные размер и показатель преломления латексных частиц.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕТОРАСSEИВАЮЩИХ ХАРАКТЕРИСТИК БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАЗЕРНОГО НЕФЕЛОМЕТРА

Измерение индикатрисы светорассеяния одиночной частицы позволяет получить практически полную информацию о свойствах дисперсных сред. Однако, в некоторых ситуациях достаточно грубо определить характеристики дисперсной среды. В этом случае возможно использование данных светорассеяния от среды, как целого, т.е. провести нефелометрические измерения [41]. Как и в случае с одиночной частицей, наиболее полную информацию о свойствах дисперсной среды можно получить из индикатрисы светорассеяния [38].

Наиболее распространенным и детально разработанным является метод малоуглового рассеяния [26]. Индикатриса измеряется в области малых углов (обычно до 15 градусов) и распределение по размерам вычисляется методом подгонки индикатрис, заранее рассчитанных по точной теории рассеяния для размеров в рабочей области метода с определенным шагом. Метод имеет существенные ограничения в применении как-то:

- не принимается во внимание зависимость индикатрисы от показателя преломления частиц (в малоугловой области индикатриса слабо зависит от показателя преломления частицы);

- в следствии значительной зависимости интенсивности рассеяния в малоугловую область от размера (от шестой степени в области Релея до второй - в области дифракции Фраунгофера), метод дает существенные ошибки для широкораспределенных по размеру систем;

- практически полностью теряется информация о форме частиц.

Тем не менее, продолжается развитие данного метода с использованием последних достижений оптических технологий и систем обработки данных.

Использование индикатрисы светорассеяния дисперсной среды не только в малых, но и в средних углах позволит во-первых, учесть влияние (т.е. измерить) средний показатель преломления частиц, во-вторых - повысить точность метода при измерении широкораспределенных по размеру систем, так как в области средних углов интенсивность рассеянного света не так сильно зависит от размера.

На рис. 15 а) представлена схема лазерного нефелометра, позволяющего измерять индикатрису рассеяния в углах от 5 до 85 и/или от 95 до 175 градусов (для водной среды в плоской кювете углы рассеяния изменяются от 5 до 49 и/или от 131 до 175 градусов) [33]. Излучение лазера 1 направляется через делительный кубик 2 в кювету 5 с исследуемой дисперсной средой. Эта часть излучения используется для измерения индикатрисы в углах от 95 до 175 градусов. Другая часть излучения (около 30 %) направляется с помощью зеркал 3 и 4 в кювету 5 с противоположной стороны, обеспечивая измерение индикатрисы в углах от 5 до 85 градусов. Измерение индикатрисы осуществляется с помощью вращающегося зеркала 6, щелевой диафрагмы 7 и фотоумножителя 8. Время измерения индикатрисы 0.01 сек.

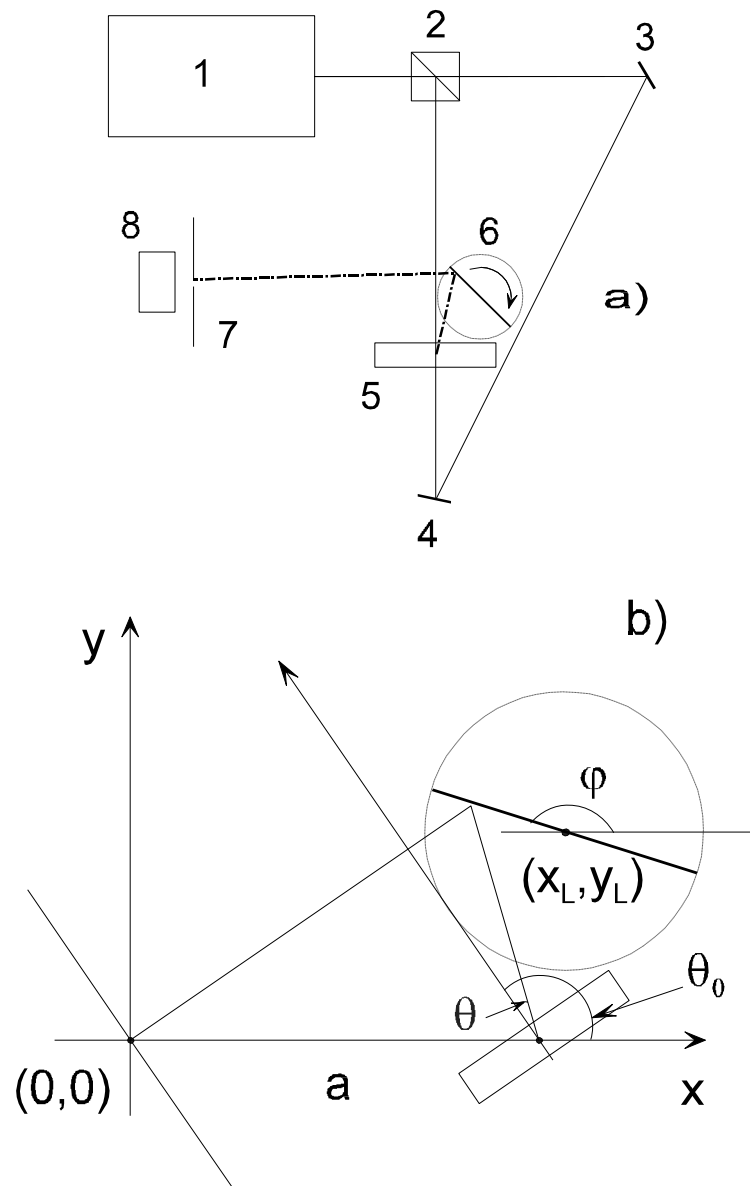


Рис. 15. а) Схема лазерного нефелометра с измерением индикатрисы светорассеяния. б) Схема взаиморасположения элементов лазерного нефелометра.

Взаимное расположение центра кюветы 5, оси вращения зеркала 6 и диафрагмы 7 определяет диапазон углов, в которых измеряется индикатриса. Выбирая в качестве центра координат (рис. 15 б) - положение диафрагмы и направляя ось X через центр кюветы, можно получить систему уравнений, связывающей угол рассеяния θ с углом поворота вращающегося зеркала φ (значение φ контролируется электронно-оптической системой нефелометра).

$$\begin{aligned}
 Y &= (a - X) \times \operatorname{tg}(\theta_0 - \theta), \\
 X &= X_L - \frac{Y - Y_L}{\operatorname{tg}(\varphi)}, \\
 2 \times \varphi + \theta &= \theta_0 + \operatorname{arctg}\left(\frac{Y}{X}\right) + \pi,
 \end{aligned}
 \tag{3.1}$$

где a - расстояние от диафрагмы 8 до центра кюветы 5;

θ_0 - угол между распространением излучения и осью X;

X, Y - координаты точки отражения на зеркале 6;

X_L, Y_L - координаты оси вращения зеркала 6.

Координаты оси вращения сканирующего зеркала 6 находятся в зависимости от заданного диапазона углов измерения индикатрисы из системы уравнений:

$$\begin{aligned}
Y_{\min} &= L \times \sin(\varphi_{\min}) + Y_L, \\
Y_{\min} &= (a - X_{\min}) \times \operatorname{tg}(\theta_0 - \theta_{\min}), \\
X_{\min} &= X_L - \frac{Y_{\min} - Y_L}{\operatorname{tg}(\varphi_{\min})}, \\
2 \times \varphi_{\min} + \theta_{\min} &= \theta_0 + \operatorname{arctg}\left(\frac{Y_{\min}}{X_{\min}}\right) + \pi, \\
Y_{\max} &= L \times \sin(\varphi_{\max}) + Y_L, \\
Y_{\max} &= (a - X_{\max}) \times \operatorname{tg}(\theta_0 - \theta_{\max}), \\
X_{\max} &= X_L - \frac{Y_{\max} - Y_L}{\operatorname{tg}(\varphi_{\max})}, \\
2 \times \varphi_{\max} + \theta_{\max} &= \theta_0 + \operatorname{arctg}\left(\frac{Y_{\max}}{X_{\max}}\right) + \pi,
\end{aligned} \tag{3.2}$$

где θ_{\min} , θ_{\max} - минимальный и максимальные углы измеряемой индикатрисы;

φ_{\min} , φ_{\max} - углы поворота зеркала, при котором излучение, рассеянное под углами θ_{\min} , θ_{\max} , попадает в диафрагму;

X_{\min} , Y_{\min} - координаты точки отражения на зеркале б при θ_{\min} ;

X_{\max} , Y_{\max} - координаты точки отражения на зеркале б при θ_{\max} ;

$2L$ - размер вращающегося зеркала.

Лазерный нефелометр использовался для сравнительного изучения индикатрис различных видов молочнокислых бактерий. Исследование проводилось с целью выяснения возможности определения общей концентрации бактерий различных видов по интегральному измерению светорассеяния. Определение общей концентрации в этом случае возможно при существовании диапазона углов, в которые интенсивности светорассеяния от одинаковых концентраций бактерий различных видов одинакова.

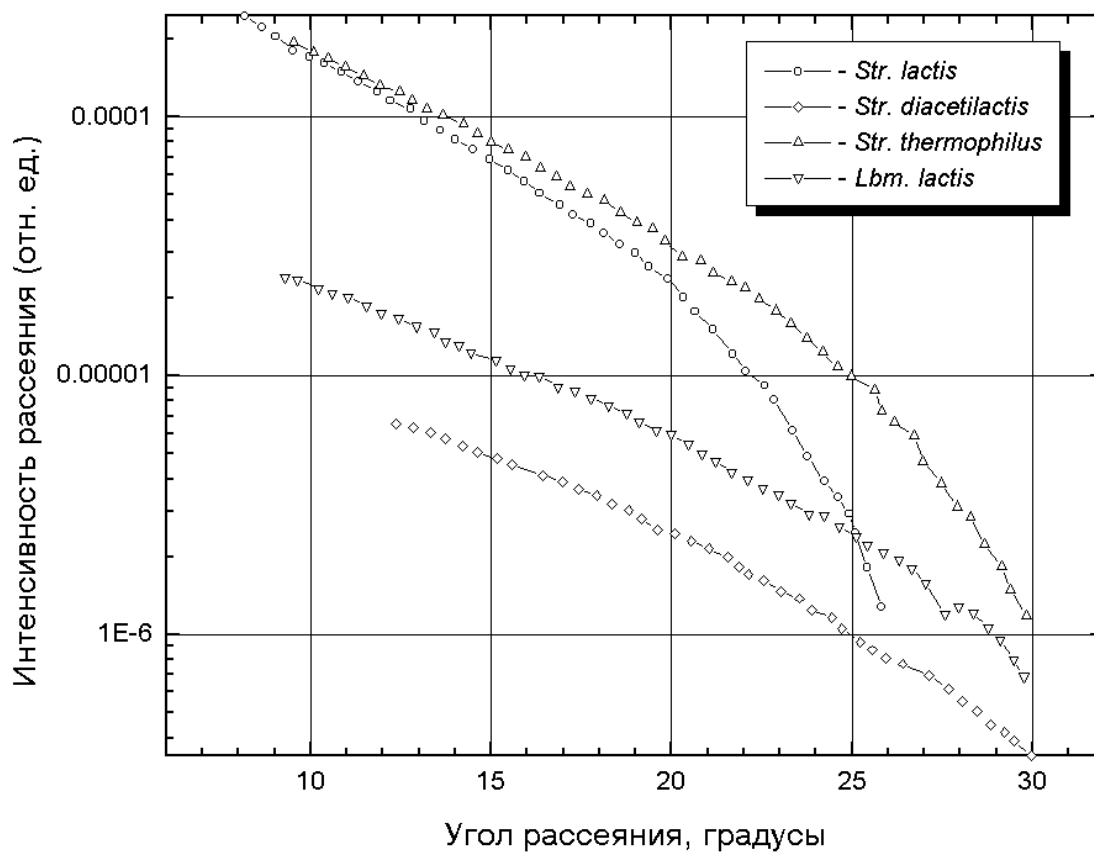


Рис. 16 Зависимость интенсивности рассеянного света (длина волны 632.8 нм) от угла регистрации для бактерий различных видов.

Были измерены индикатрисы наиболее распространенных видов бактерий в молоке. Четырех-часовые культуры клеток отмывали физиологическим раствором от питательной среды и растворяли в бидистиллированной воде до концентраций 10^6 - 10^7 кл/мл. Для достижения однократного рассеяния света суспензией микроорганизмов, оптическая плотность растворов равнялась 0.05 (толщина кюветы 3 мм). Концентрацию микроорганизмов определяли методом посева на питательную среду - гидролизованное молоко. В качестве источника излучения использовался He-Ne лазер с выходной мощностью 4 мВт.

На рис. 16 приведены нормированные на одинаковую концентрацию индикатрисы суспензий чистых культур бактерий видов *Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus termophilus* и *Lactobacterium lactis*. Каждая индикатриса является результатом усреднения по двадцати измеренным с дисперсией среднего в каждой точке равной 4%.

Результаты свидетельствуют о существенных различиях в исследуемых диапазонах углов интенсивности рассеяния у разных видов микроорганизмов. Приведем данные о морфологии этих микроорганизмов из литературы. Так стрептококки (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus termophilus*) состоят из шаровидных кокков, которые соединяются в цепочки различной длины для различных видов [27, 28]. Диаметр кокков колеблется в пределах 0.5 - 1.5 мкм. *Lactobacterium lactis* - палочкообразные бактерии, объединенные в цепочки [29]. Эффективность рассеяния бактерий *Streptococcus diacetylactis* минимальная по сравнению с остальными бактериями (см. рис 16). На основании литературных данных и представленных индикатрис, можно предположить, что наиболее короткие цепочки образуют именно

Streptococcus diacetylactis. Так как бактерии типа *Lactobacterium lactis* - палочкообразные, а эффективность рассеяния не значительно отличается от *Streptococcus diacetylactis*, вероятно длина цепочек у этих бактерий также не значительна. Наиболее длинные цепи образуют *Streptococcus lactis* о чем свидетельствует значительная эффективность рассеяния и наибольшая асимметрия индикатрисы.

Проведенные измерения свидетельствуют о значительной зависимости индикатрисы от вида бактерий, т.е. от морфологии рассеивателя и может служить для идентификации микроорганизмов различных типов. В тоже время, отсутствие в измеренном диапазоне углов области с одинаковой эффективностью рассеяния (аналогичной области углов 5 - 10 градусов для *Str. lactis* и *Str. thermophilus*) не позволяют использовать нефелометрический метод для определения общей концентрации микроорганизмов различных типов.

* * *

Разработан и создан лазерный нефелометр с измерением индикатрисы дисперсной среды в углах от 5 до 85 и от 95 до 175 градусов. Проведены сравнительные исследования светорассеивающих характеристик суспензий различных видов бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе проанализированы методы и экспериментальные системы, позволяющие определять параметры одиночных частиц по данным светорассеяния. Главный результат исследования заключается в разработке метода пролетной индикатрисы светорассеяния одиночной частицы на базе оригинального сканирующего проточного цитометра. Относительно простая оптическая схема и несложные эмпирические уравнения позволяют решать очень важную проблему физической оптики, а именно определять параметры дисперсной среды без привлечения каких-либо других методов.

Суммируя, можно выделить следующие результаты данной работы:

1. Проведен анализ влияния углов сбора излучения, рассеянного одиночной частицей, на точность вычисления размера и показателя преломления методом двумерного рассеяния M_i . Определены оптимальные с точки зрения решения обратной задачи светорассеяния углы сбора.
2. Предложен и проанализирован метод тройного двумерного рассеяния M_i , позволяющий определять характеристики одиночной частицы в диапазонах 3 - 110 по параметру рассеяния α и до 1.12 по относительному показателю преломления. Численно продемонстрированы возможности метода при определении средних характеристик дисперсных сред на примере частиц жира в молоке.
3. На созданном проточном цитометре стандартной конфигурации разработан метод анализа двухкомпонентной дисперсной среды.

Определена чувствительность метода при одновременном определении концентраций бактерий и соматических клеток в молоке.

4. При изучении процесса латексной агглютинации в присутствии полипептидов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 на базе проточного цитометра стандартной конфигурации определены характерные времена образования комплексов в условиях реакции антиген-антитело, которые равнялись 2-5 мин.
5. Предложен и проанализирован метод пролетной индикатрисы светорассеяния одиночной частицы, позволяющий вычислять абсолютные значения размера и показателя преломления частицы по полученным эмпирическим уравнениям.
6. Разработан и создан сканирующий проточный цитометр, позволяющий измерять индикатрису одиночной частицы в углах от 5 до 125 градусов. Продемонстрирована способность метода пролетной индикатрисы светорассеяния определять абсолютные размер и показатель преломления латексных частиц.
7. Разработан и создан лазерный нефелометр с измерением индикатрисы дисперсной среды в углах от 5 до 85 и от 95 до 175 градусов. Проведены сравнительные исследования светорассеивающих характеристик суспензий различных видов бактерий.

Диссертационная работа выполнена в рамках программы С-117-93/86 ...Сканирующая проточная цитометрия (программа ...Университеты России), при поддержке грантами: ...Высокочувствительный многовариантный иммуноанализ Шведского сельскохозяйственного университета, ...Многопараметрический анализ Академии наук Финляндии.

Основные результаты работы докладывались на:

1. Международной конференции ...Современные и лазерные технологии АЛТ'92, Москва, 8-11 сентября 1992.

2. Всероссийской конференции по лазерной химии, Лазаревское, 30 сентября - 5 октября, 1992 г.

3. Межреспубликанской конференции "Оптические методы исследования потоков", Новосибирск, 2-3 июня 1993 г.,

4. Международной конференции ...Биомедицинская оптика, Сан Хосе (США), 4-9 февраля 1995 г.

5. Межреспубликанском симпозиуме ...Оптика атмосферы и океана, Томск, 20-23 июня 1995 г.

6. Научных семинарах в Институте химической кинетики и горения СО РАН (Новосибирск, 1992-1996 гг.), в Биомедицинском центре университета г. Упсала (Швеция, 1993 г.), на физическом отделении Стокгольмского университета (Швеция, 1994 г.), на отделении медицинской физики университета г. Турку (Финляндия, 1994-1996 гг.)

и опубликованы в следующих изданиях:

1. Мальцев В.П., Мальцева Т.В., Сорокин А.М. и Матвеева Е.К. Устройство для измерения углового распределения рассеянного излучения. Авторское свидетельство 1289196 (1985).

2. V.P.Maltsev, A.V.Khadaev, T.S.Mashnin, V.I.Prots, Diagnostics of Multy-Component Varigrained Systems by Analyzing the Light Scattered by a Single Particle. Measurement of the Concentration of Bacterial and Somatic Cells in Milk. International Conference on Advanced and Laser Technologies ALT'92. Book of summaries, part 3, September 8-11, Moscow, 1992, p. 100

3. V.P.Maltsev, Triple Two-Dimensional Mie Scattering. Estimation of Refractive Index and Size of Spherical Particles from Single Particle Scattering Pattern. Calculation of Fat Content of a Milk. International Conference on Advanced and Laser Technologies ALT'92. Book of summaries, part 5, September 8-11, Moscow, 1992, p. 91.

4. Т.С.Машнин, В.П.Мальцев, И.А.Лавриненко, В.А.Бурмистров, А.А.Дорошкин. Исследование процесса латексной агглютинации с использованием пептидов антигенов вируса иммунодефицита человека методом проточной цитометрии. Тезисы докладов конференции "Оптические методы исследования потоков", Новосибирск, июнь 1993 г., с. 58.

5. В.П.Мальцев. Эффективность селекции частиц с использованием светорассеяния в проточной цитометрии. Тезисы докладов конференции "Оптические методы исследования потоков", Новосибирск, июнь 1993 г., с. 56.

6. В.П.Мальцев, А.В.Хадаев, С.Г.Струц, Б.Г.Егиазаров. Способ определения общего количества бактерий в молоке. Патент RU 2016407 (1995).

7. В.П.Мальцев. Оценка морфологических характеристик одиночных частиц по данным светороссеяния в проточной цитометрии. Известия Академии наук. Серия химическая. 1994, N7, 1182-1190.

8. A.V.Chernyshov, V.I.Prots, A.A.Doroshkin, and V.P.Maltsev. Measurement of scattering properties of individual particles with a scanning flow cytometer. Applied Optics v. 34, N. 27, pp. 6301-6305 (1995).

9. V.P.Maltsev, A.V.Chernyshev, A.A.Doroshkin, and E.Soini, Light scattering and fluorescence of single particles measured by a scanning flow cytometer. In: Ultrasensitive Instrumentation for DNA Sequencing and Biochemical Diagnostics, edited by G.E.Cohn, J.M.Lerner, K.J.Liddane, A.Scheeline, and S.A.Soper, Proceedings of SPIE 2386, pp. 199-205 (1995).

ПРИЛОЖЕНИЕ

Программа, используемая для расчета передаточной функции и углового разрешения оптической системы сканирующего проточного цитометра, написана в среде Turbo-Pascal и может быть использована на машинах совместимых с IBM PC. Здесь приводится часть программы, отвечающей собственно за расчет. Ввод и вывод данных пользователь может организовать самостоятельно.

```
Program ScanningSystemCalculation;
```

```
Типы переменных:
```

```
LensType = Record
```

```
Radius, Distance, RefrBefor, RefrAfter :Real;
```

```
End;
```

```
Переменные:
```

```
Theta - текущий угол рассеяния;
```

```
InitPoint - расстояние от дна сферического зеркала до частицы;
```

```
Channel_Diam - внутренний диаметр капилляра;
```

```
Capil_Diam - наружный диаметр капилляра;
```

```
Refr_Index_Capil - показатель преломления капилляра;
```

```
Refr_Index_Imm - показатель преломления иммерсионной жидкости;
```

```
Radius_Mirr - радиус сферического зеркала;
```

PinHoleDiameter - диаметр диафрагмы на входном окне ФЭУ;

{ ----- }

Function CalcLens(X,Y,Al :Real;

Len :LensType;

Var X1,Y1,Al1 :Real) :Boolean;

Var a,b,c,t,v :Real;

ok :Boolean;

Begin With Len do

Begin t:=Sin(Al)/Cos(Al); v:=Y-t*X; b:=2*t*v-2*(Radius+Distance);

a:=SQR(t)+1; c:=SQR(v)+SQR(Distance)+2*Radius*Distance;

If (b*b-4*a*c>=0) Then ok:=true Else ok:=false;

If ok THEN

Begin If NegLen THEN X1:=(-b+SQR(b*b-4*a*c))/(2*a)

ELSE X1:=(-b-SQR(b*b-4*a*c))/(2*a);

Y1:=(X1-X)*t+Y; Al:=(ArcTan(Y1/(X1-Distance-Radius)))-Al;

c:=(Sin(Al)*RefrBefor/RefrAfter); If (Abs(c)<=1) Then

All:=ArcTan(Y1/(X1-Distance-Radius))-ArcTan(c/SQR(1-SQR(c)));

End;

End; CalcLens:=ok;

End;

{ ----- }

Procedure CalcEndPoint(InitPoint,Theta :Real;

Var X,Y,OutputAngle :Real);

Var a,b,c,y2,x2,TgFi,CosB :Double;

Begin

x:=InitPoint+Channel_Diam*Cos(Pi*Theta/180)/(2*Sin(Pi*Theta/180));

If Theta<>90 Then

Begin

CosB:=Cos(Pi*Theta/180)*1.333/Refr_Index_Capil;

x:=x+(Capil_Diam-Channel_Diam)*CosB/(2*SQR(1-SQR(CosB)));

TgFi:=CosB*Refr_Index_Capil/Refr_Index_Imm;

TgFi:=SQR(1-SQR(TgFi))/TgFi;

a:=1+SQR(TgFi); b:=2*Radius_Mirr+2*x*SQR(TgFi)-Capil_Diam*TgFi;

c:=SQR(Capil_Diam/2)+SQR(x*TgFi)-x*TgFi*Capil_Diam;

c:=SQR(b)-4*a*c; If c<0 Then Exit;

If Theta< 90 THEN X:=(b+SQR(c))/(2*a)

```

ELSE X:=(b-SQRT(c))/(2*a)

End ELSE TgFi:=1E+30; Y:=SQR(Radius_Mirr)-SQR(Radius_Mirr-X);

If Y<0 Then Exit; Y:=SQRT(Y); If Theta>90

THEN OutputAngle:=ArcTan(TgFi)-2*ArcTan(Y/(X-Radius_Mirr))+Pi

ELSE OutputAngle:=ArcTan(TgFi)-2*ArcTan(Y/(X-Radius_Mirr));

End;

```

```
{ ----- }
```

```
Function EndPointDistance(InitPoint,Theta :Real) :Real;
```

```
Var
```

```
x,y,Fi :Real;
```

```
Begin CalcEndPoint(InitPoint,Theta,x,y,fi);
```

```
CalcWayBeam(X,Y,Fi,X,Y,Fi); Y:=Y+(Image-X)*Sin(Fi)/Cos(Fi);
```

```
EndPointDistance:=Y;
```

```
End;
```

```
{ ----- }
```

```
Procedure CalcWayBeam(StartX,StartY,Alpha :Real;
```

```
Var FinishX,FinishY,FinishAlpha :Real);
```

```
Var i :Integer;
```

```
Begin For i:=1 to NLens do
```

```
  Begin
```

```
    If not CalcLens(StartX,StartY,Alpha,Lens[i],FinishX,FinishY,FinishAlpha)
```

```
      THEN Exit;
```

```
      StartX:=FinishX; StartY:=FinishY; Alpha:=FinishAlpha;
```

```
    End;
```

```
End;
```

```
{ ----- }
```

```
Procedure CalcInitPoint(Theta :Real;
```

```
  Var InitPoint,X,Y :Real);
```

```
Var TgB,TgF :Double;
```

```
Begin Theta:=Theta*pi/180;
```

```
  X:=Radius_Mirr*(1-SQRT((1+1.333*Cos(Theta)/Refr_Index_Imm)/2));
```

```
  Y:=SQRT(2*X*Radius_Mirr-SQR(X));
```


If Theta<>(pi/2) THEN

Begin

TgB:=1.333*cos(Theta)/Refr_Index_Capil;

TgB:=SQRT(1-SQR(TgB))/TgB;

TgF:=1.333*cos(Theta)/Refr_Index_Imm;

TgF:=SQRT(1-SQR(TgF))/TgF;

InitPoint:=X-Channel_Diam*cos(Theta)/(2*sin(Theta))-

(Capil_Diam-Channel_Diam)/(2*TgB)-(Y-Capil_Diam/2)/TgF;

End ELSE InitPoint:=X;

End;

{ ----- }

Begin

.....

CalcInitPoint(Theta,InitPoint,Xx,Yy);

CalcWayBeam(Xx,Yy,0,FinishX,FinishY,FinishAlpha);

Image:=(0-FinishY)*cos(FinishAlpha)/sin(FinishAlpha)+FinishX;

Repeat Ang[i]:=Theta;

 CalcInitPoint(Theta,InitPoint,Xx,Yy);

 Fi:=Theta;

Repeat

 Y:=EndPointDistance(InitPoint,Fi);

```
    Fi:=Fi+0.001;

Until Abs(Y)>=PinHoleDiameter/2;

YData[i]:=Fi; Fi:=Theta;

Repeat

    Y:=EndPointDistance(InitPoint,Fi);

    Fi:=Fi-0.001;

Until Abs(Y)>=PinHoleDiameter/2;

YData[i]:=YData[i]-Fi;

Abb[i]:=YData[i]*Sin(Theta*pi/180)*2*Pi*Pi/180;

XData[i]:=InitPoint;

i:=i+1; Theta:=Theta+AngleStep;

Until Theta>=End_Angle; Npoints:=i-1;

.....

End.
```

ЛИТЕРАТУРА

1. Стейнкамп Дж. Цитометрия в потоке // Приборы для научных исследований. - 1984. - №9. - С. 3-35.
2. Melamed M.R., Lindmo T., and Mendelsohn M.L. (Eds). Flow cytometry and sorting. - New York: Wiley-Liss, 1990. - 1140 с.
3. Cram L.S., Martin J.C., Steinkamp J.A., Ioshida T.M., Buican T.N., Marrone B.L., Jett J.H., Salzman G. and Sklar L. New flow cytometry capabilities at the national flow cytometry resource. // Proceedings of the IEEE. - 1992. - V. 80. - P. 912-917.
4. Tycko D.H., Metz M.H., Epstein E.A., Grinbaum A. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration. // Applied Optics. - 1985. - V. 24. - P. 1355-1365.
5. Takeda K., Ito Y., and Munakata C. Simultaneous measurement of size and refractive index of a fine particle in flowing liquid. // Meas. Sci. Technol. - 1992. - V. 3. - P. 27-32.
6. Ackleson S.G. and Spinard R.W. Size and refractive index of individual marine particulates: a flow cytometric approach. // Applied Optics. - 1988. - V. 27. - P. 1270-1277.
7. Maltsev V.P. Triple Two-Dimensional Mie Scattering. Estimation of Refractive Index and Size of Spherical Particles from Single Particle Scattering Pattern. Calculation of Fat Content of a Milk. // International Conference on Advanced and Laser Technologies ALT'92. - Book of summaries, part 5. - 1992. - September 8-11. Moscow. - P. 91.

8. Борен К. и Хафмен Д. Поглощение и рассеяние света малыми частицами: пер. с англ. - М.: Мир, 1986. - 664 с.

9. Quist G.M. and Wyatt P.J. Empirical solution to the inverse-scattering problem by the optical strip-map technique // J. Opt. Soc. Am. A2. - 1985. - P. 1979-1986.

10. Phillips D.T., Wyatt P.J., and Berkman R.M. Measurement of the Lorenz-Mie scattering of a single particle: polystyrene latex. // J. Colloid Interface Sci. - 1970. - V. 34. - P. 159-162.

11. Wyatt P.J. Light scattering in the microbial world. // Journal Colloid and Interface Science. - 1972. - V. 39. - P. 479-491.

12. Stull V.R. Size distribution of bacterial cells // J. Bacteriol. - 1972. - V. 109. - P. 1301-1303.

13. Bartholdi M., Salzman G.C., Heibert R.D., and Kerker M. Differential light scattering photometer for rapid analysis of single particles in flow. // Applied Optics. - 1980. - V. 19. - P. 1573 - 1584.

14. Ludlow I.A. and Kaye P.H. A scanning diffractometer for the rapid analysis of microparticles and biological cells. // J. Colloid Interface Sci. - 1979. - V. 69. - P. 571 - 589.

15. Chernyshov A.V., Prots V.I., Doroshkin A.A., and Maltsev V.P. Measurement of scattering properties of individual particles with a scanning flow cytometer. // Applied Optics. - 1995.- V. 34, N27. - P. 6301-6305.

16. 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 measurement. // Cytometry. - 1988. - V. 9. - P. 39-43.

17. Stewart C.C., Stewart S.J. and Habbersett R.C. Resolving leucocytes using axial light loss. // *Cytometry*. - 1989. - V. 10. - P. 426-432.

18. Loken M.R., Sweet R.G. and Herzenberg L.A. Cell discrimination by multiangle light scattering. // *J. Histochem. Cytochem.* - 1976. - V. 24, - P. 284-291.

19. Bangs L.B. *Uniform Latex Particles*. - Indianapolis: Seradyn Inc., 1987. - 79 с.

20. Maltsev V.P., Khadaev A.V., Mashnin T.S., Prots V.I. Diagnostics of Multy-Component Varigrained Systems by Analyzing the Light Scattered by a Single Particle. Measurement of the Concentration of Bacterial and Somatic Cells in Milk. International Conference on Advanced and Laser Technologies ALT'92. // *Book of summaries, part 3*. - 1992. - September 8-11, Moscow. - P. 100.

21. Машнин Т.С., Мальцев В.П., Лавриненко И.А., Бурмистров В.А., Дорошкин А.А. Исследование процесса латексной агглютинации с использованием пептидов антигенов вируса иммунодефицита человека методом проточной цитометрии. // Тезисы докладов конференции "Оптические методы исследования потоков". - 1993. - Новосибирск. - С. 58.

22. Soini E. and Lovgren T. Time-resolved fluorescence of lanthanide probes and applications in biotechnology. // *CRC Reviews in Analytical Chemistry*. - 1987. - V. 18, Issue 2. - P. 105-154.

23. Newman D.J., Henneberry H. and Price C.P. Particle enhanced light scattering immunoassay. // *Ann. Clin. Biochem.* - 1992. - V. 29, - P. 22-42.

24. Lindmo T., Borner O., Ugelstad J., and Nustad K. Immunometric assay by flow cytometry using mixtures of two particle types of different affinity. // J Immunol Methods. - 1990. - V. 126. - P. 183-189.
25. Maltsev V.P., Chernyshev A.V., Doroshkin A.A., and Soini E. Light scattering and fluorescence of single particles measured by a scanning flow cytometer. // In: Ultrasensitive Instrumentation for DNA Sequencing and Biochemical Diagnostics, edited by G.E.Cohn, J.M.Lerner, K.J.Liddane, A.Scheeline, and S.A.Soper, Proceedings of SPIE. - 1995. - V. 2386. - P. 199-205.
26. Hirleman E.D., Oechsle V., and Chigier N.A.. Response characteristics of laser diffraction particle size analyzers: optical sample volume extent and lens effects. // Optical Engineering. - 1984. - V. 23. - P. 610 - 619.
27. Фишер М. Основы микробиологии. - Москва: Мир, 1965. - 487 с.
28. Тимаков В.Д., Левашев В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. - М.: Медицина, 1983. - 640 с.
29. Brock T.D. Biology of microorganisms. - Englewood Cliffs, New Jersey 07632: Prentice-Hall, Inc., 1979. - 854 p.
30. ван де Хюлст Г. Рассеяние света малыми частицами. - Москва: Иностранная литература, 1961. - 536 с.
31. Wyatt P.J. Differential light scattering: A physical method for identifying living bacterial cells. // Applied Optics. - 1968. - V. 7. - P. 1879-1896.
32. Сидько Ф.Я., Лопатин В.Н. и Парамонов Л.Е. Поляризационные характеристики взвесей биологических частиц. - Новосибирск: Наука, 1990. - 120 с.

33. Мальцев В.П., Мальцева Т.В., Сорокин А.М. и Матвеева Е.К. Устройство для измерения углового распределения рассеянного излучения. // Авторское свидетельство 1289196. - 1985.
34. Marx E. and Mulholland G.W.. Size and refractive index determination of single polystyrene spheres. // J. of the National Bureau of Standards. - 1983. - V. 88. - P. 321-338.
35. Dean N.D. Commercial instruments. // In: Flow Cytometry and Sorting, 2nd ed., M. R. Melamed, T. Lindmo, M. L. Mendelsohn, eds. - New York: Wiley, 1990. - P. 171-186.
36. Тепел А. Химия и физика молока. - Москва: Пищевая промышленность, 1979. - 436 с.
37. Latimer P.. Light scattering and absorption as method of studying cell population parameters. // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. - 1982. - V. 11. - P. 129-150.
38. Безрукова А.Г. и Владимирская И.К. Информативность параметров светорассеяния при исследовании клеток. // Цитология. - 1982. - Т. 24, N5. - С. 507-521.
39. Исимару А.. Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах. - Москва: Мир, 1981. - Ч. 1. - 280 с.
40. Acquista C.. Light scattering by tenuous particles: a generalization of the Rayleigh-Gans-Rocard approach. // Applied Optics. - 1976. - V. 15. - P. 2932-2936.
41. Jones M.R., Leong K.H., Brewster M.Q., and Curry B.P. Inversion of Light-Scattering Measurements for Particle Size and Optical Constants: experimental study. // Applied Optics. - 1994. - V. 33. - P. 4025-4034.

42. Wyatt P.J., Schehrer K.L., Phillips S.D., Jackson C., Yu-Jain Chang, Parker R. G., Phillips D. T., and Bottiger J. R. Aerosol particle analyzer. // *Applied Optics*. - 1988. - V. 27. - P. 217-221.
43. Cooke D.D. and Kerker M. Particle size distribution of colloidal suspensions by light scattering based upon single particle counts-polystyrene latex. // *J. Colloid Interface Sci.* - 1973. - V. 42. - P. 150-155.
44. *Emulsions and Emulsion Technology*, ed. K. J. Lissant. - New York: Marcel Dekker, 1974, part 1. - 487 p.
45. Bohmer R-M. and King J.C. Immuno-Gold Labeling for Flow Cytometric Analysis. // *J. Immun. Methods*. - 1984. - V. 74. - P. 49.
46. Kim Y.R., Ornstein L. Isovolumetric sphering of erythrocytes for more accurate and precise cell volume measurement by flow cytometry. // *Cytometry*. - 1983. - V. 3. - P. 419 - 427.
47. Wyatt P.J., Schehrer K.L., Phillips S.D., Jackson C., Chang Yu-Jain, Parker R.G., Phillips D.T., and Bottiger J.R. Aerosol particle analyzer. // *Applied Optics*. - 1988. - V. 27. - P. 217-221.
48. Wyatt P.J., Jackson C. Discrimination of phytoplankton via light-scattering properties. // *Limnology and Oceanography*. - 1989. - V. 34. - P. 96 - 112.
49. Lindmo T., Borner O., Ugelstad J., Nustad K. Immunometric assay by flow cytometry using mixtures of two particle types of different affinity. // *J. of Immunological methods*. - 1990. - V. 126. - P. 183 - 189.