МОЛОДЕЖНЫЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

Издатель ФГБОУ ВПО "МГТУ им. Н.Э. Баумана". Эл No. ФС77-51038.

УДК 535.36

Моделирование трех клеточных популяций лейкоцитов методом проточной цитометрии

Москаленко А.А., студент Россия, 105005, г. Москва, МГТУ им. Н.Э. Баумана, кафедры «Биомедицинские технические системы»

Научный руководитель: Змиевской Г.Н., к.ф-м.н., доцент Россия, 105005, г. Москва, МГТУ им. Н.Э. Баумана <u>bmt-1@bmstu.ru</u>

Введение

Для идентификации и характеризации белых кровяных клеток широко используются оптические методы, поскольку они неинвазивны и обладают высокой скоростью анализа. Наиболее важными среди них являются методы, основанные на измерении светорассеяния и флуоресценции. Классическим оптическим методом изучения морфологии клеток является микроскопия, но она обладает низким быстродействием и малой точностью определения параметров, поэтому для индентификации мононуклеарных клеток широко применяется проточная цитометрия, которая позволяет одновременно измерять сигналы светорассеяния и флуоресценции от одиночных клеток с высоким быстродействием [1].

В последние годы проточная цитометрия становится одним из наиболее востребованных методов как для фундаментальных исследований, так и для диагностики в клинико-иммунологической практике. Расширилась приборная база, значительно увеличились возможности анализа иммунной системы, позволяющие охарактеризовать не только качественные и количественные параметры основных популяций клеток, но и их более широкий субпопуляционный состав. Используя различные методологические подходы и новую реагентную базу, при помощи проточной цитометрии стало возможным оценивать функциональные свойства популяций и субпопуляций клеток.

Развитие современных клеточных технологий и разнообразие новых методологических подходов к исследованиям, связанным с использованием проточной цитометрии в биологии и медицине, поставило целый ряд вопросов о стандартизации данного метода. Эти вопросы особенно важны как для врачей лабораторной диагностики, так

http://sntbul.bmstu.ru/doc/608592.html

и для ученых и специалистов.

Столь высокоинформативный инструмент анализа создает предпосылки для появления множества новых методологических подходов для диагностики различных клеточных дисфункций. Например, уже сейчас 4-5 параметрический анализ позволяет выявить не только ту или иную субпопуляцию клеток, но и ее функциональную активацию или депрессию [2].

Исторически в цитометрии методы, основанные на светорассеянии, быстро развивались в 1980-х. Но в начале 1990-х многоцветный флуоресцентный анализ вышел на первый план и в дальнейшем определял развитие проточной цитометрии. Между тем, хотя флуоресцентные метки позволяют быстро и достоверно решить задачу идентификации, т.е. разделять и подсчитывать любые субпопуляции клеток крови, но при этом не решаются морфологические задачи. Именно, флуоресцентные метки используются для изучения химической структуры клетки в нанометровом масштабе, следовательно, они не предоставляют никакой информации о морфологии клетки, т.е. об её размере и форме, ядре и других элементах внутренней структуры. Они определяют лишь наличие определённых макромолекул на поверхности или внутри клетки, тем самым разделяя «положительные» и «отрицательные» клетки, т.е. клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют эти макромолекулы.

Одним из важнейших медицинских приложений данных методов является рутинный анализ крови. При этом актуальной проблемой становится дороговизна флуоресцентных меток. Их цена добавляется к себестоимости каждого анализа крови, в то время как методы, основанные на светорассеянии, упрощают проведение анализа [1].

Светорассеяние определяется распределением показателя преломления внутри клетки, которое, в свою очередь, напрямую связано с её морфологией. В сканирующих проточных цитометрах (СПЦ) измеряется вся индикатриса светорассеяния, однако такой метод отличается сложностью и трудоемкостью и не получил пока широкого распространения. В стандартных проточных цитометрах для решения задачи идентификации и определения основных характеристик клеток регистрируется информация о светорассеянии в пределах части полной индикатрисы. Как правило, это светорассеяние в пределах прямой полусферы под углами, близкими к оптической оси, либо под углами, близкими к 90°. Такие диапазоны исследуемых углов рассеяния имеют принятые названия: прямое и боковое рассеяние.

Прямое (малоугловое) светорассеяние – forward scatter (FSC). Детектор прямого светорассеяния располагается по ходу лазерного луча за проточной ячейкой и регистрирует излучение лазера, рассеянное в пределах углов 1÷7, 1÷19 градусов. Интенсивность Молодежный научно-технический вестник ФС77-51038

рассеянного под малым углом света пропорциональна размеру клетки. Более крупные клетки рассеивают свет сильнее более мелких.

Боковое светорассеяние – side scatter (SSC). Внутреннее содержимое клеток оптически неоднородно. Луч лазера, проходя сквозь клетку, многократно преломляется и рассеивается во все стороны. Полученная при регистрации этого излучения информация позволяет судить о сложности внутреннего строения клетки (соотношение ядро-цитоплазма, наличие гранул, других внутриклеточных включений).

Комбинация бокового и прямого светорассеяния позволяет судить о морфологии клетки в целом, выделять различные популяции клеток (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) для дальнейшего анализа.

Целью данной работы является развитие потенциала проточного цитометра для проведения более точного анализа. Это развитие обусловлено получением дополнительной информации при анализе обратного светорассеяния (BSC) и построении оригинальной расчетной модели. Предлагаемый метод требует более глубокого изучения, так как в перспективе это позволит определять новые параметры клеток крови, которые потенциально являются диагностически важными.

Анализ исследуемого биообъекта и его оптическая модель

Лейкоциты различаются по происхождению, функциям и внешнему виду. По морфологическим признакам лейкоциты, окрашенные по Романовскому-Гимзе, со времён Эрлиха традиционно делят на две группы:

- зернистые лейкоциты, или гранулоциты клетки, имеющие крупные сегментированные ядра и обнаруживающие специфическую зернистость цитоплазмы; в зависимости от способности воспринимать красители они подразделяются на нейтрофильные, эозинофильные и базофильные;
- незернистые лейкоциты, или агранулоциты клетки, не имеющие специфической зернистости и содержащие простое несегментированное ядро, к ним относятся лимфоциты и моноциты.

Соотношение разных видов белых клеток, выраженное в процентах, называется лейкоцитарной формулой. Исследование количества и соотношения лейкоцитов является важным этапом в диагностике заболеваний. В данной работе представлен анализ 3-х популяций клеток (В-лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов) по 3-м параметрам: прямое, боковое и обратное светорассеяние.

http://sntbul.bmstu.ru/doc/608592.html



Рис. 1. Оптические модели лейкоцитов:1 – изображение предшественника В-лимфоцита, полученное с помощью конфокального микроскопа [1]; 2 – модель моноцита, 3 – модель нейтрофильного гранулоцита [3, 4]

На Рисунке 1 представлены оптические модели исследуемых типов клеток. Лимфоцит имеет почти сферическую форму и одно ядро. Модель моноцита отличается от лимфоцита изогнутой формой ядра и, как следствие, некоторым увеличением показателя преломления, а также содержанием вакуолей в цитоплазме. Модель нейтрофильных гранулоцитов представляет собой множество гранул разных размеров, находящихся внутри сферы.

В работах [5-9] представлены многослойные модели клеток. Можно увидеть, что двухслойный шар – это адекватная модель первого порядка, часто используемая для решения обратной задачи светорассеяния (модель сферы с покрытием). Эта модель устраняет часть недостатков модели моносферы с однородным распределением показателя преломления. Однако она не учитывает возможную неоднородность ядра. Для изучения влияния такой неоднородности на светорассеяние используется более сложная модель с добавлением ещё трех слоёв. Такие многослойные модели клеток весьма усложняют расчеты и все равно требуют корректировки в связи с неоднородной структурой. Например, по отношению к гранулоцитам их уже применять нельзя, так как это не мононуклеарные клетки, как, например, лимфоциты или моноциты. Оптимизация модели в нашем случае основывается на более простой модели сферы, эквивалентной по оптическим свойствам рассматриваемой клетке и имеющей соответствующий показатель преломления.

Молодежный научно-технический вестник ФС77-51038

Моделирование светорассеяния в программе MiePlot v4300

Расчёт интенсивности светорассеяния проводился для построения диаграмм для трёх популяций. Моделирование светорассеяния сферической частицей проводилось по теории Ми – классическая задача электродинамики, решенная в 1908 году Густавом Ми для сферической частицы произвольного размера.

Задача рассматривает рассеяние электромагнитной волны с напряженностью электрического поля:

$$E = E_0 e^{-ikr - i\omega t},$$

где *w* – частота,

k – волновой вектор,

 E_0 – амплитуда волны, на сферической частице с радиусом *r* и диэлектрической проницаемостью ε .

Решение задачи находится с помощью разложения электромагнитного поля на сферические гармоники. Рассеяние зависит от соотношения размеров частицы и длины волны, которая падает на частицу.

В случае, когда частица намного меньше длины волны, рассеяние является частным случаем рэлеевского. Внешняя электромагнитная волна поляризует частицу, создавая в ней дипольный момент. Дипольный момент, колеблющийся в такт с частотой внешней волны, переизлучает свет с характерной для дипольного момента диаграммой направленности. Если можно пренебречь частотной зависимостью диэлектрической проницаемости частицы, интенсивность рассеяния пропорциональна четвертой степени частоты, что приводит к сильному рассеянию коротких волн. В рассеянном белом свете преобладает голубой оттенок, а в непроходящем – красный.

В случае близости размеров частицы к длине волны света диаграмма направленности рассеяния усложняется. Проявляется интерференция волн, отраженных от различных участков поверхности частицы. Интенсивность рассеянного под определенным углом света зависит от того, сколько раз волна укладывается на диаметре частицы, поэтому она сильно зависит от размеров частицы. Когда размеры частицы превышают длину волны, чередование максимумов и минимумов в диаграмме направленности становится настолько частым, что при падении белого света на, например, коллоидный раствор, наблюдатель увидит белый

http://sntbul.bmstu.ru/doc/608592.html

рассеянный свет. Если размеры сферы становятся намного больше длины волны, то поверхность сферы можно рассматривать как близкую к плоской, и в этом случае преломление и отражение света описываются формулами Френеля.

При расчёте зададимся размерами и показателями клеток (табл. 1).

Таблица 1.

Тип клеток	Показатель преломления	Размер, мкм
лимфоциты	1,3974	7,71
моноциты	1,3954	10,30
нейтрофилы	1,4938	9,60

Входные данные для расчёта

Параметры окружающей среды: дистилированная вода, протекающая в кварцевой кювете, играет роль обжимающей жидкости для образца, показатель преломления взят при температуре 25 С и равен 1,337.

Параметры излучения: гауссов пучок с длиной волны 488 нм и перетяжкой эллиптической формы с осями 20×60 мкм. Показатели преломления и размеры клеток взяты из работ [1, 4, 5] по определённым экспериментально величинам. Длина волны соответствует голубому лазеру, обычно используемому в стандартных цитометрах для определения параметров светорассения.

В результате расчёта получены 3 индикатрисы светорассения. На Рисунках 2 и 3 показаны индикатрисы в декартовой и полярной системе координат. Для наибольшей наглядности при построении в полярной системе координат опущено прямое светорассеяние и выделены обратное и боковое. Как видно из полученных графиков, нейтрофилы обладают сильным рассеивающим действием в боковом и обратном направлениях.

Это явление связано с внутренним строением клетки (о чём сказано выше) и высоким показателем преломления мелких гранул, находящихся в цитоплазме.



Рис. 2. Индикатрисы светорассеяния, построенные для трёх типов клеток в декартовой и полярной системе координат



Рис.3. Индикатрисы светорассеяния, построенные для трёх типов клеток по трём диапазонам углов: (1÷7), (76÷104), (170÷178)

В проточном цитометре уровень электронного сигнала соответствует уровню интенсивности светорассеяния, регистрируемому фотоэлектронным умножителем (ФЭУ), причём интенсивность усредняется в определённом диапазоне углов, в котором регистрирует излучение тот или иной фотодетектор. В соответствии с этим найдем интенсивности для прямого, бокового и обратного светорассеяния. Следует отметить, что регистрация в таких диапазонах углов обусловлена прямоугольной формой проточной кюветы.

Интегральный расчёт интенсивности проводился по следующим формулам:

$$\begin{split} I_{\Pi P \Pi M} &= 2 \int_{1}^{7} I(\theta) d\theta; \\ I_{\text{бок}} &= \int_{76}^{104} I(\theta) d\theta; \\ I_{\text{обр}} &= 2 \int_{170}^{178} I(\theta) d\theta. \end{split}$$

Для удобства перейдем к относительным единицам:

$$\overline{I_{\text{прям}}} = \frac{I_{\text{прям}}}{I_0}, \qquad \overline{I_{\text{бок}}} = \frac{I_{\text{бок}}}{I_0}, \qquad \overline{I_{\text{обр}}} = \frac{I_{\text{обр}}}{I_0},$$

Молодежный научно-технический вестник ФС77-51038

где I_0 – интенсивность падающего света, $\frac{B_T}{M^2}$.

Результаты расчёта представлены в Таблице 2.

Таблица 2.

Тип клеток	$I_{\rm прям}$, отн. ед.	I _{бок} , отн. ед.	I _{обр} , отн. ед.
лимфоциты	0,080	1,838*10 ⁻⁷	3,794*10 ⁻⁸
моноциты	0,081	2,845*10 ⁻⁷	6,137*10 ⁻⁸
нейтрофилы	0,780	5,412*10 ⁻⁶	$1,075*10^{-5}$

Суммарные интенсивности в прямом, боковом и обратном диапазоне углов

Построение диаграмм для трёх популяций

Для построения популяций было выбрано гауссово распределение. Нормальное распределение для одной случайной величины записывается следующим образом:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

где μ – математическое ожидание, которое мы приняли равным расчётному результату; σ^2 – дисперсия, которая задавалась в приближении к реальным результатам (табл. 3)

С помощью программы Mathcad были построены одномерные графики распределения популяций по полученным результатам расчётов предыдущих моделей и построены двумерные графики распределения популяций.

Таблица 3.

Тип клеток	$\sigma^2_{_{\mathrm{прям}}}$	$\sigma^2_{ m fok}$	$\sigma^2_{ m o fp}$
лимфоциты	$7,0*10^{-4}$	5,0*10 ⁻⁸	2,0*10 ⁻⁹
моноциты	7,0*10 ⁻⁴	5,0*10 ⁻⁸	5,0*10 ⁻⁸
нейтрофилы	$8,0*10^{-4}$	1,0*10 ⁻⁵	1,0*10 ⁻⁵

Значения дисперсии для построения графиков

На Рисунке 4 приведены результаты построения популяций лейкоцитов. Хорошо видно сходство с экспериментальными данными, полученными на обычном проточном цитометре.



Рис. 4. Построение популяций для трёх типов клеток по данным прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассения. Слева – расчётная модель, справа – экспериментальная. Цифрами отмечены: 1 – гранулоциты, 2 – моноциты, 3 – лимфоциты



Рис. 5. Построение популяций для трёх типов клеток по данным обратного (BSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Цифрами отмечены: 1 – В-лимфоциты, 2 – моноциты, 3 – нейтрофилы

Молодежный научно-технический вестник ФС77-51038

Большой разброс значений интенсивности связан не только с различиями в размерах клеток и форм данной популяции, он также зависит от точности измерений и настройки прибора, от параметров гидродинамической фокусировки, помех при регистрации и усилении сигнала на ФЭУ. На Рисунке 5 изображены популяции клеток, построенные по данным с обратного и бокового светорассеяния. Как видно, популяция В-лимфоцитов вырождается в жирную точку, что облегчает дискриминацию популяций. Однако регистрация и получение обратного светорассения от клеток является сложной конструкторской задачей, решение которой позволит повысить точность диагностики, уменьшить число флуоресцентных каналов, а вместе с этим снизить расходы, проводимые при анализе.

Выводы

1. В проделанной работе обнаружено количественное согласие предложенной расчётной модели, разработанной на основании теории Ми, с экспериментальными данными.

2. Установлена возможность регистрации обратного светорассеяния от гранулоцитов за счёт заметной доли энергии рассеянного излучения, направленного в обратную полусферу.

3. Данная тема требует дальнейшей разработки и совершенствования статистических методик при построении двумерных графиков популяций.

Список литературы

- 1. Юркин М.А. Моделирование светорассения клетками крови с помощью метода дискретных диполей: Дис. ... канд.физ.-мат.наук. Новосибирск, 2008. 231 с.
- Хайдуков С.В. Многоцветный анализ в проточной цитометрии для медикобиологических исследований: Дис. ... д-ра биол.наук. СПб, 2008. 52 с.
- Maltsev V.P., Hoekstra A.G., Yurkin M.A. Optics of White Blood Cells: Optical Models, Simulations, and Experiments // Tuchin V.V. Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses. Darmstadt, 2011. P. 63-93.
- 4. Light scattering by neutrophils: model, simulation, and experiment / V.P. Maltsev [et al.] // Journal of Biomedical Optics. Новосибирск, 2008. № 13. Р. 1-7.
- Light scattering and morphology of the lymphocyte as applied to flow cytometry for distinguishing healthy and infected individuals/ G.I. Ruban [et al.] // Journal of Biomedical Optics. Минск, 2010. № 15. – Р. 1-9.

- Flow Cytometry with Gold Nanoparticles and their Clusters as scattering Contrast Agents: FDTD Simulation of Light-Cell Interaction / S. Tanev [et al.] // J Biophotonics. Ottawa, 2008. № 2. – P. 505-520.
- S. Saltsberger, I. Steinberg, and I. Gannot. Multilayer Mie Scattering Model for Investigation of Intracellular Structural Changes in the Nucleolus and Cytoplasm. // Hindawi Publishing Corporation International Journal of Optics. Tel-Aviv, 2011, C. 1-9.
- Использование решения обратной задачи светорассеяния для характеризации мононуклеарных клеток / В.П.Мальцев [и др.] // Вестник НГУ. Новосибирск, 2009, Т.4, № 2. – С. 61-68.
- Строкотов Д.И. Исследование оптических свойств мононуклеарных клеток, в том числе находящихся в процессе апоптоза, с целью их идентификации и хараткеризации по светорассеянию: Дис. ... канд.физ.-мат.наук. Новосибирск, 2011.100 с.
- 10. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? / D.I. Strokotov [et al.] // Journal of Biomedical Optics. Новосибирск, 2009. № 14. С. 1-12.
- 11. Physics of a Rapid CD4 Lymphocyte Count with Colloidal Gold/ P. Hansen [et al.] // Journal of the International Society for Advancement of Cytometry. New York, 2011. P. 1-10.