

УДК 535.36

Д. И. Строкотов<sup>1,2</sup>, Ю. Г. Пичугин<sup>1,2</sup>, М. А. Юркин<sup>1</sup>, М. М. Гридина<sup>3</sup>,  
О. Л. Серов<sup>3</sup>, В. П. Мальцев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт химической кинетики и горения СО РАН  
ул. Институтская, 3, Новосибирск, 630090, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

<sup>3</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН  
пр. Акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090, Россия

E-mail: sdi@ngs.ru

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕШЕНИЯ ОБРАТНОЙ ЗАДАЧИ СВЕТОРАССЕЯНИЯ ДЛЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК\*

В данной работе предложены два метода решения обратной задачи светорассеяния для одиночных частиц, морфология которых описывается моделью двухслойного шара. Работоспособность методов продемонстрирована при определении параметров лимфоцитов и эмбриональных стволовых клеток по индикатрисам светорассеяния, измеренным на сканирующем проточном цитометре. Оба метода, спектральный метод и метод глобальной оптимизации, использовались для определения диаметров и показателей преломления ядра и цитоплазмы эмбриональных стволовых клеток мыши и лимфоцитов человека. Измеренные таким образом параметры клеток в целом согласуются с литературными данными. Определение этих параметров актуально для диагностики патологических состояний лимфоцитов и статуса дифференцировки эмбриональных стволовых клеток. Методика, описанная в данной работе, применима ко всем мононуклеарным клеткам. Кроме того, рассмотрены ограничения предложенных методов и способы их улучшения.

*Ключевые слова:* проточная цитометрия, обратная задача светорассеяния, индикатриса светорассеяния, лимфоциты, морфология лимфоцитов, глобальная оптимизация, стволовые клетки, спектральный метод.

### Введение

Под мононуклеарными клетками понимается сборный класс одноклеточных клеток – таких, что и сама клетка, и ее ядро имеют форму, близкую к сферической. Под данное определение попадают многие типы клеток, в частности, лимфоциты и эмбриональные стволовые (ЭС) клетки.

Растущая распространенность иммунодефицитных состояний определяет новый круг задач диагностики, напрямую связанных с иммунокомпетентными клетками крови, в особенности с Т-лимфоцитами. Современные методики фенотипирования лимфоцитов требуют дорогостоящих моно-

клональных антител и значительного времени для проведения анализа [1]. Поэтому актуальна задача развития быстрых и точных методов определения истинных параметров лимфоцитов, не искаженных в процессе подготовки проб.

ЭС клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцист. Они высокоплюрипотентны и способны при соответствующих условиях неограниченное время размножаться в культуре *in vitro* без потери плюрипотентности, сохраняя нормальный кариотип [2]. ЭС клетки могут дифференцироваться во все типы тканей [3], что делает их привлекательными для применения в терапевтических целях.

---

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 07-04-00356; 08-02-91954), интеграционных проектов Сибирского отделения РАН (2006-3 и 2006-14).

В процессе дифференцировки ЭС клеток происходят значительные изменения в их морфологии: изменяются размеры и форма клеток, а также ядерно-цитоплазматическое соотношение [4]. Таким образом, определяя параметры, характерные для морфологии ЭС клеток, можно потенциально оценить «степень ее недифференцированности».

Классическим инструментом изучения морфологии клеток является микроскоп [5], но он обладает низким быстродействием и недостаточной точностью определения параметров. Сканирующий проточный цитометр (СПЦ) позволяет измерять индикатрису светорассеяния одиночных частиц [6], которая содержит информацию, потенциально достаточную для характеристики их морфологии. Одним из преимуществ СПЦ по сравнению с микроскопом является высокая скорость анализа частиц, что обеспечивает высокую статистическую точность. Однако такая характеристика требует решения обратной задачи светорассеяния, что не тривиально даже для простейших форм частицы [7].

Ранее нами для исследования мононуклеарных клеток была предложена модель пятислойного шара в комбинации с методом глобальной оптимизации, реализованном в режиме мультистарт [8]. Данная модель, хотя и позволяет определять характеристики клеток, при реальном использовании в экспериментальной работе проявила ряд недостатков. Во-первых, характеристики пятислойной модели неоднозначно связаны с параметрами клетки. Во-вторых, большое количество параметров модели приводит к сложной зависимости целевой функции в используемом нами методе глобальной оптимизации от параметров. В результате нет гарантии нахождения глобального минимума всего при 50 запусках метода оптимизации. Более того, оценки ошибок определения параметров, получаемые в работе [8] в рамках метода Левенберга – Марквардта по локальной кривизне минимума целевой функции, не являются надежными. В-третьих, более подробное исследование поверхности целевой функции для нахождения глобального минимума затруднено значительным временем вычислений.

Целью данной работы является исследование возможностей описания рассеяния мононуклеарными клетками с помощью модели двухслойного шара, так как она лише-

на некоторых из вышеописанных недостатков. При этом для решения обратной задачи мы используем спектральный метод и метод глобальной оптимизации. Работоспособность созданных алгоритмов решения обратной задачи подтверждается на примере анализа индикатрис лимфоцитов и ЭС клеток, измеренных с помощью СПЦ.

### **Инструментальная часть и пробоподготовка**

СПЦ позволяет одновременно измерять сигналы светорассеяния и флуоресценции от одиночных клеток со скоростью до 500 частиц в секунду. Основное преимущество СПЦ в том, что измерение светорассеяния происходит в широком диапазоне углов, – в данной работе индикатрисы одиночных клеток измерялись в диапазоне от 5 до 60°. Текущая конфигурация СПЦ измеряет индикатрису, выражающуюся следующей формулой через элементы матрицы Мюллера [7]:

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

где интегрирование идет по азимутальному углу рассеяния.

Для подготовки образцов лимфоцитов использовалась цельная периферическая венозная кровь из локтевой вены здорового донора (мужчина, 18 лет) с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) в качестве антикоагулянта. Центрифугирование проводилось с ускорением 340 g в течение 20 минут в солевом растворе (фосфатно-солевой буфер) с плотностью 1,077 мг/л и рН 7,4. Затем из обогащенного лейкоцитами осадка выделялись лимфоциты с помощью иммунофлуоресцентных маркеров CD3-FITC и CD19-PE для Т- и В-клеток соответственно. После окрашивания в течение 20 минут проба была снова отмыта и разбавлена для получения концентрации около 10<sup>6</sup> клеток/мл. Полученную пробу анализировали на СПЦ, измеряя одновременно два сигнала: интенсивность флуоресценции от специфически связанных с лимфоцитом маркеров и индикатрису светорассеяния.

Мышиные ЭС клетки (линии E14Tg2aSc4TP6.3) культивировали при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>, на покрытых 0,1 % раствором желатина пластиковых планшетах, в среде для роста ЭС клеток: Глазго моди-

фицированная среда Игла, с 10 % эмбриональной бычьей сыворотки для ЭС клеток, 100 мкг/мл пенициллин / стрептомицина, L-глутамином, раствором незаменимых аминокислот,  $\beta$ -меркаптоэтанолом и 1 000 ед/мл ингибирующего лейкемию фактора (LIF). При подготовке проб для анализа на СПЦ конфлюэнтный монослой ЭС клеток обрабатывали трипсином в течение 5 минут при 37 °С, центрифугировали 10 минут при 1 000 об/мин в среде, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, после чего осадок, содержащий клетки, был ресуспендирован в среде без сыворотки до концентрации  $10^6$  клеток/мл.

### Методы решения обратной задачи светорассеяния

*Спектральный метод.* Как показано в работе [9], положение пика в Фурье-спектре индикатрисы однородного шара пропорционально его размеру. Точнее говоря, в амплитудном спектре Фурье, взятом от  $w(\theta)I(\theta)$ , где

$$w(\theta) = \sin^2 \left( \pi \frac{\theta - \theta_0}{\theta_1 - \theta_0} \right),$$

а  $\theta_0$ ,  $\theta_1$  – границы диапазона углов, в которых измерена индикатриса светорассеяния  $I(\theta)$ .

В данной работе мы используем аналогичный спектр, но уже для определения характерных размеров двухслойного концентрического шара. Для удобства будем называть внутренний шар ядром, а внешний – клеткой или цитоплазмой. Обозначим их диаметры и показатели преломления как  $D_{\text{яд}}$ ,  $D_{\text{цит}}$  и  $m_{\text{яд}}$ ,  $m_{\text{цит}}$  соответственно.

Для двухслойного шара имеется четыре характерных размера, показанных на рис. 1, а спектр индикатрисы такой частицы содержит четыре пика (рис. 2). Моделирование светорассеяния двухслойными шарами проводилось по теории Ми [10]. В этом спектре содержится достаточно информации для определения как  $D_{\text{цит}}$ , так и  $D_{\text{яд}}$ . Более того, положение этих пиков пропорционально соответствующим характерным размерам (данные не приведены), что, в принципе, позволяет построить алгоритм определения обоих диаметров по положению пиков в спектре.

Однако при  $D_{\text{яд}} / D_{\text{цит}}$  близких к единице пики, соответствующие  $D_{\text{яд}}$ ,  $D_{\text{цит}}$  и их полусумме, сливаются в один, а пик, соответствующий полуразнице, сливается с пиком нулевой частоты. Таким образом, в спектре остается всего один нетривиальный пик, положение которого примерно соответствует  $D_{\text{цит}}$ . Так как и для лимфоцитов, и для ЭС клеток отношение диаметров достаточно велико, в данной работе мы разрабатываем алгоритм характеристики именно для этого случая.

В качестве параметра, определяющего размер частицы, удобно выбрать безразмерный параметр

$$\alpha = \frac{\pi d}{\lambda} m_0,$$

где  $d$  – размер частицы;  $\lambda$  – длина волны падающего излучения в вакууме;  $m_0$  – показатель преломления среды.

Для  $\alpha_{\text{цит}}$  была рассчитана поправка для определения диаметра цитоплазмы при сдвиге положения соответствующего пика

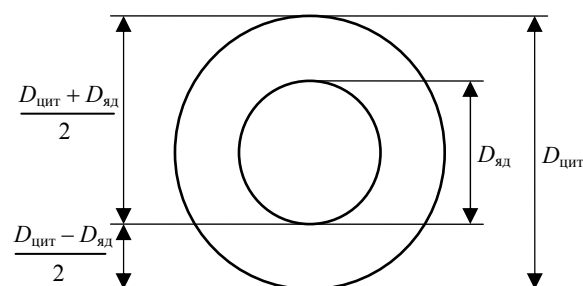


Рис. 1. Характерные размеры двухслойного шара

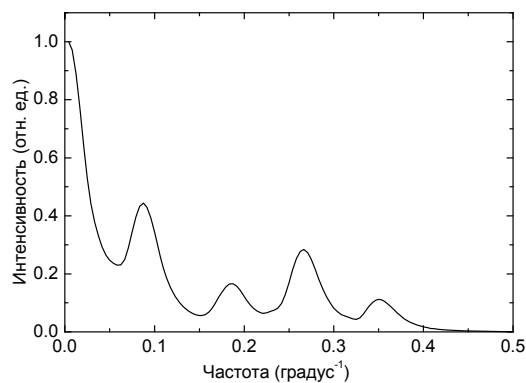


Рис. 2. Фурье-спектр модифицированной индикатрисы двухслойного шара с диаметрами и показателями преломления слоев, равными 8 и 4 мкм и 1,37 и 1,47 соответственно

за счет слияния с пиком полусуммы. В рабочем диапазоне отношений диаметра ядра к диаметру цитоплазмы (0,8–0,92) поправка составляет:

$$R_{\text{real}}[\text{мкм}] = 1,02 \cdot R_{\text{eval}}[\text{мкм}] + 0,65.$$

Для определения  $\alpha_{\text{яд}}$  мы используем ширину «суммарного» пика в спектре, которую количественно описываем с помощью эксцесса  $K = (\mu_4/\mu_2^2) - 3$ , где  $\mu_2$  и  $\mu_4$  – второй и четвертый центральные моменты соответственно. В частности, эксцесс равен нулю для распределения Гаусса, положителен для распределения с ярко выраженными пиками и высоко поднятыми «хвостами» и отрицателен для распределения с широкими «плечами». Суперпозиция двух (или более) пиков попадает под последнее определение, при этом эксцесс уменьшается при увеличении расстояния между пиками.

Для решения обратной задачи с использованием значения эксцесса последнего пика Фурье-спектра была проведена серия расчетов (табл. 1), где показатели преломления определены относительно показателя преломления среды (физраствор,  $m_0 = 1,337$ ). Эти диапазоны соответствуют типичным

значениям для мононуклеарных клеток [8]. Значения параметров случайно выбирались из указанных диапазонов.

Из всех модельных индикатрис были выделены те, в спектрах которых присутствовал только один пик. Они были разбиты на несколько классов согласно значению  $\alpha_{\text{цит}}$ , полученному по положению пика. Например, на рис. 3 приведены результаты для  $\alpha_{\text{цит}} \in [63,70]$ . На каждом из участков, зависимость между  $K$  и  $D_{\text{яд}}/D_{\text{цит}}$  аппроксимируется линейной функцией. Среднеквадратичное отклонение рассчитанных точек от их линейной аппроксимации составляет 0,03.

В результате, предлагается следующий алгоритм определения размеров двухслойного шара (при  $0,8 < D_{\text{яд}}/D_{\text{цит}} < 0,92$ ):

- алгоритм работает, только если спектр имеет один выраженный пик;
- по положению пика выбирается соответствующая линейная аппроксимационная формула, и по ней из  $K$  определяется  $D_{\text{яд}}/D_{\text{цит}}$ ;
- если это отношение не попадает в диапазон  $[0,8; 0,92]$ , то данная индикатриса отбрасывается;
- по положению пика и  $D_{\text{яд}}/D_{\text{цит}}$  определяются отдельно  $D_{\text{яд}}$  и  $D_{\text{цит}}$  (с учетом поправки на сдвиг положения максимума).

Для проведенной серии расчетов алгоритм работает в 35 % случаев (в остальных случаях индикатриса не проходит один из тестов). Результаты определения  $D_{\text{яд}}/D_{\text{цит}}$  и  $D_{\text{цит}}$  приведены на рис. 4 и 5.

Также была проведена серия расчетов для анализа работы спектрального метода на частицах со сдвинутым ядром, с отношением диаметра ядра к диаметру клетки, равным 0,8. Для сдвига ядра, равного 0,6 от максимальной величины, погрешность определения диаметра клетки составила 2 %, что значительно меньше ошибок, возникающих вследствие экспериментальной погрешности измерения индикатрисы. Погрешность определения диаметра ядра составила 9 %. При больших сдвигах ядра разработанный нами алгоритм отбрасывает предложенную индикатрису.

*Метод глобальной оптимизации.* Суть этого метода заключается в поиске наилучших параметров модели концентрического двухслойного шара из заданного интервала. При разработке специфических методов глобальной оптимизации в первую очередь учитывают свойства целевой функции и до-

Таблица 1  
Параметры серии расчетов модели двухслойного шара

Параметр	Расчетные данные
Количество расчетов	1 200
Диапазон $\alpha_{\text{цит}}$	38–76
Диапазон $m_{\text{цит}}/m_0$	1,01–1,03
Диапазон $D_{\text{яд}}/D_{\text{цит}}$	0,8–0,92
Диапазон $m_{\text{яд}}/m_0$	1,08–1,13

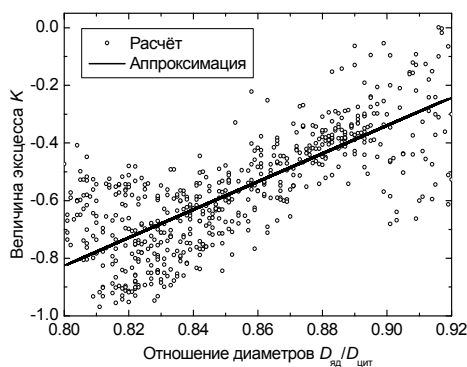


Рис. 3. Зависимость между  $K$  и  $D_{\text{яд}}/D_{\text{цит}}$  для  $D_{\text{цит}} \in [10,11]$  мкм (Значения других параметров приведены в тексте)

пустимого множества рассматриваемого класса систем, для которых разрабатывается метод [11].

В связи с тем, что отсутствует априорная информация о монотонности минимизируемой функции, в данной работе был применен метод мултистарта. В нашем случае целевой функцией является среднеквадратичное отклонение (СКО) десятичного логарифма модельной индикатрисы, вычисленной по теории Ми, от логарифма индикатрисы частицы.

В качестве алгоритма регрессии (поиска локального минимума) мы используем метод Левенберга – Маквардта (МЛМ), который превосходит по производительности метод наискорейшего спуска и другие методы сопряженных градиентов в различных задачах [12]. В итоге алгоритм состоит из следующих действий:

- выбираем начальные параметры модели случайно из диапазона, в котором предположительно лежат параметры частицы, и, варьируя параметры модели, минимизируем целевую функцию (с помощью МЛМ);
- берем другие начальные параметры случайным образом из того же диапазона и снова минимизируем СКО;
- процедура повторяется 50 раз, и из всех полученных (локальных) минимумов выбирается наименьший, который считается глобальным;
- если полученное СКО меньше заданного уровня, то параметры соответствующей модели принимаются за параметры исходной частицы.

Эмпирически установлено, что за 50 процедур глобальный минимум повторяется 8–12 раз, следовательно, такого количества процедур статистически достаточно для достоверного определения глобального минимума. Важно отметить, что при увеличении количества параметров модели, например при использовании пятислойной модели, 50 процедур будет недостаточно.

Сравнение величины СКО с заданным уровнем необходимо для проверки адекватности применения модели к исследуемой частице. Самым очевидным отклонением от модели, приводящим к большим СКО, является сдвиг ядра относительно центра частицы, что обычно наблюдается для живых клеток [13]. Другие отклонения включают отклонения формы клетки и ядра от сферической, а также их неоднородность.

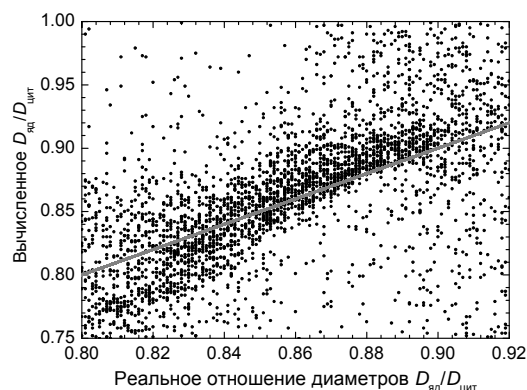


Рис. 4. Соотношение между реальными и вычисленными спектральным методом  $D_{\text{яд}}/D_{\text{цит}}$ . Значения других параметров приведены в тексте. Сплошная линия соответствует точному определению

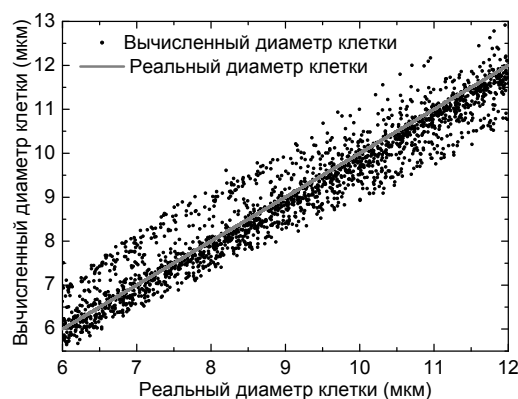


Рис. 5. Соотношение между реальными и вычисленными спектральным методом  $D_{\text{цит}}$ . Значения других параметров приведены в тексте. Сплошная линия соответствует точному определению

Более того, СКО зависит еще и от экспериментальных погрешностей, поэтому определение уровня отсечки априори не представляется возможным. Вместо этого мы определяем его непосредственно по измеряемой пробе. Для этого все частицы прогоняются через метод глобальной оптимизации без использования уровня, и строится распределение пробы по полученному СКО (рис. 6). Это распределение аппроксимируется логнормальным, а положение его максимума используется в качестве уровня отсечки. В завершение отбрасываются все частицы с СКО больше этого уровня.

Диапазон параметров для выбора начальных условий определяется конкретной задачей. Диапазон, используемый в данной работе, приведен в табл. 2 [14].

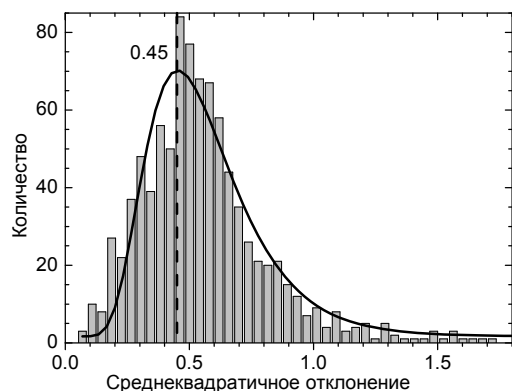


Рис. 6. Распределение ЭС клеток по СКО в методе глобальной оптимизации (гистограмма), аппроксимированное логнормальным распределением (сплошная линия). Пунктиром показан уровень отсечки, определенный по этому распределению

Таблица 2

Диапазон параметров  
для выбора начальных значений  
в методе глобальной оптимизации

Параметр	Диапазон	
	для ЭС клеток	для лимфо- цитов
$D_{цит}$	3,7–11,8 мкм	4,4–6,7 мкм
$m_{цит}$	1,35–1,37	1,35–1,37
$D_{яд} / D_{цит}$	0,6–1	0,6–1
$m_{яд}$	1,45–1,50	1,45–1,50

Таблица 3

Результаты характеристики ЭС клеток

Параметр	Спектрал.	Глоб. оптим.
Доля обраб.	35 %	28 %
$\alpha_{цит}$	$70 \pm 30$	
$D_{цит}$	$11,0 \pm 4,7$ мкм	$10,7 \pm 1,1$ мкм
$D_{яд} / D_{цит}$	$0,85 \pm 0,04$	$0,82 \pm 0,04$
$m_{цит}$	–	$1,38 \pm 0,05$
$m_{яд}$	–	$1,43 \pm 0,01$

Таблица 4

Результаты характеристики лимфоцитов

Параметр	Спектрал.	Глоб. оптим.
Доля обраб.	26 %	29 %
$\alpha_{цит}$	$49 \pm 13$	
$D_{цит}$	$5,7 \pm 1,5$ мкм	$5,4 \pm 0,7$ мкм
$D_{яд} / D_{цит}$	–	$0,91 \pm 0,01$
$m_{цит}$	–	$1,38 \pm 0,01$
$m_{яд}$	–	$1,46 \pm 0,01$

Также была проведена серия расчетов для анализа работы метода глобальной оптимизации на частицах со сдвинутым ядром, с отношением диаметра ядра к диаметру клетки равным 0,8. Максимальная погрешность определения диаметра клетки составила 9 %, которая наблюдалась для сдвига ядра равного 0,7 от максимальной величины. Максимальная погрешность определения диаметра ядра составила 1 %, показателя преломления цитоплазмы – 2 %, показателя преломления ядра – 0,4 %.

## Результаты и обсуждение

Результаты применения разработанных методов для характеристики ЭС клеток и лимфоцитов сведены в табл. 3, 4. Для каждого алгоритма показана доля успешно обработанных клеток и результаты определения параметров клеток в формате «среднее  $\pm$  дисперсия» (по всей пробе). Следует отметить, что спектральный метод не определяет показатели преломления, и не может надежно определить  $D_{яд} / D_{цит}$  для лимфоцитов, так как значение этого отношения близко к 1 и не попадает в текущую область применимости метода. Уровень отсечки в методе глобальной оптимизации составил 0,45 и 0,012 для ЭС клеток (см. рис. 6) и лимфоцитов соответственно.

Распределения ЭС клеток по  $D_{цит}$  и  $D_{яд} / D_{цит}$  приведены на рис. 7 и 8, а распределение лимфоцитов по размеру – на рис. 9.

Уширение распределения клеток по размерам можно объяснить наличием в спектрах экспериментальных индикатрис более одного пика. Причиной появления дополнительных пиков является отличие реальных клеток от выбранной нами модели – двухслойной сферы. Таким образом, актуальной является проблема критерия выбора одного пика из многих в спектре индикатрисы. Вариантом решения данной проблемы является введение минимального уровня интенсивности пика. В данном случае пики, имеющие интенсивность ниже заданной, не рассматриваются, а из пиков более интенсивных рассматривается самый последний. Однако даже с введением уровня невозможно добиться полного согласия между обоими методами (данные не приведены).

В распределении отношений диаметров ядра и клетки для ЭС клеток, полученном методом глобальной оптимизации, два пика.

Один из них совпадает с пиком на гистограмме, полученной спектральным методом, а другой пик может быть связан с тем, что отличия клетки от двухслойной сферы искажают целевую функцию так, что один из локальных минимумов становится глобальным. Ядерно-цитоплазматическое отношение для ЭС клеток и для лимфоцитов, полученное спектральным методом и методом глобальной оптимизации, совпадает с результатами, полученными в работах [15; 16].

Распределение лимфоцитов по диаметру цитоплазмы, построенное с использованием метода глобальной оптимизации, несколько расходится с данными, приведенными в работе [17]. Данное различие может быть вызвано влиянием пробоподготовки и условиями измерения, которые приводят к изменениям в морфологии клеток [13]. В будущей работе предполагается выявить источник этих различий.

### Заключение

В данной работе предложены два метода характеристики мононуклеарных клеток по индикатрисам светорассеяния, измеренных с помощью сканирующего проточного цитометра. Методы были апробированы на эмбриональных стволовых клетках мыши и лимфоцитах человека. Полученные параметры клеток в целом находятся в согласии с литературными данными.

Однако необходимо дальнейшее развитие обоих методов для улучшения согласия между ними, увеличения доли успешно обработанных клеток и оценки погрешностей определения параметров для конкретной клетки. Все это позволит определять диагностически важные параметры из индикатрисы светорассеяния с необходимой точностью.

### Список литературы

1. *Flow Cytometry and Sorting*, 2<sup>nd</sup> ed. / Eds. M. R. Melamed, T. Lindmo, M. L. Mendelson. N. Y.: Wiley-Liss, 1990. 824 p.
2. *Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine*. Washington: National Academy Press, 2002. 59 p.
3. *Grompe M., Finegold M. Liver Stem Cells // Stem Cell Biology / Eds. D. R. Marshak, R. L. Gardner, D. Gottlieb*. N. Y.: Cold

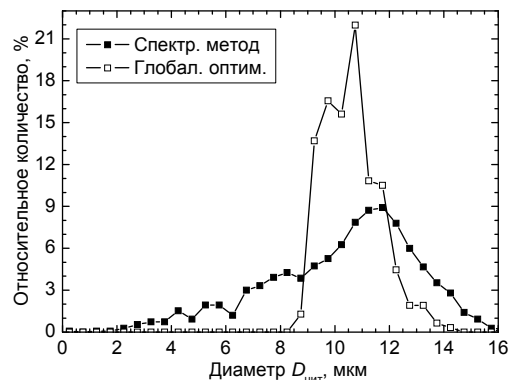


Рис. 7. Распределение ЭС клеток по диаметру цитоплазмы, определенное спектральным методом и методом глобальной оптимизации.

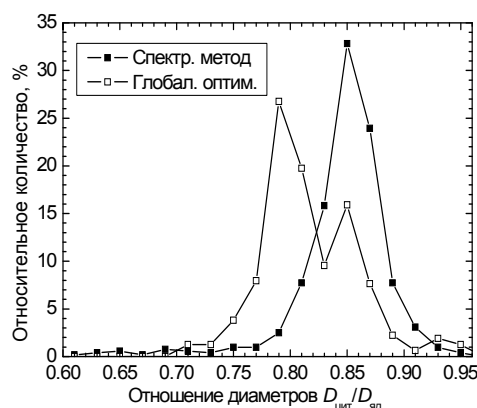


Рис. 8. Распределение ЭС клеток по соотношению  $D_{\text{яд}}$  к  $D_{\text{цит}}$ , определенное спектральным методом и методом глобальной оптимизации

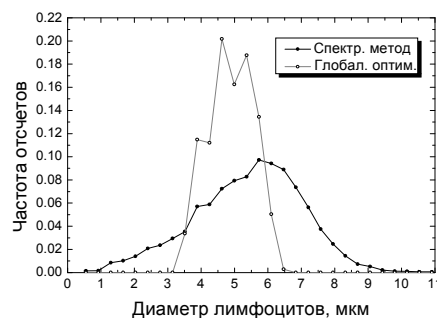


Рис. 9. Распределение лимфоцитов по диаметру цитоплазмы согласно спектральному методу и методу глобальной оптимизации

Spring Harbor Laboratory Press, 2001. P. 455–497.

4. *Hong Wan, Ming Yuan, Cathy Simpson et al. Stem / Progenitor Cell-Like Properties of Desmoglein 3dim Cells in Primary and Immortalized Keratinocyte Lines // Stem cells*. 2007. Vol. 25. No. 5. P. 1286–1297.

5. *Ruban G. I., Kosmacheva S. M., Goncharova N. V. et al. Investigation of Morphometric*

Parameters for Granulocytes and Lymphocytes as Applied to a Solution of Direct and Inverse Light-Scattering Problems // *Journal of Biomedical Optics*. 2007. Vol. 12. No. 4. P. 044017.

6. *Maltsev V. P.* Scanning Flow Cytometry for Individual Particle Analysis // *Review of Scientific Instruments*. 2000. Vol. 71. P. 243–255.

7. *Maltsev V. P., Semyanov K. A.* Characterisation of Bio-Particles from Light Scattering. Utrecht: VSP, 2004. 132 p.

8. *Zharinov A. E., Tarasov P. A., Shvalov A. N. et al.* A Study of Light Scattering of Mononuclear Blood Cells with Scanning Flow Cytometry // *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*. 2006. Vol. 102. No. 1. P. 121–128.

9. *Semyanov K. A., Tarasov P. A., Zharinov A. E. et al.* Single-Particle Sizing from Light Scattering by Spectral Decomposition // *Applied Optics*. 2004. Vol. 43. P. 5110–5115.

10. *Борен К., Хафмен Д.* Поглощение и рассеяние света малыми частицами. М.: Мир, 1986. 664 с.

11. *Орлянская И. В.* Современные подходы к построению методов глобальной оптимизации // *Исследовано в России [Электронный журнал]*. 2002. Т. 5. С. 2097–2108.

12. *Nocedal J., Wright S. J.* Numerical Optimization. N. Y.: Springer, 1999. P. 276–311.

13. *Гущина Ю. Ю., Плескова С. Н., Звонкова М. Б.* Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии // *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*. 2005. Т. 1. С. 48–53.

14. *Dunn A. M.* Modeling of Light Scattering from Inhomogeneous Biological Cells // *Optics of Biological Particles* / Eds. A. G. Hoekstra, V. P. Maltsev, G. Videen. Dordrecht: Springer, 2006. Vol. 238. P. 19–29.

15. *Zhou Q., Jouneau A., Brochard V. et al.* Development Potential of Mouse Embryos Reconstructed from Metaphase Embryonic Stem Cell Nuclei // *Biology of Reproduction*. 2001. Vol. 65. P. 412–419.

16. *Андерсон Ш.* Атлас гематологии. М.: Логосфера, 2007. 608 с.

17. *Loiko V. A., Ruban G. I., Gritsai O. A. et al.* Morphometric Model of Lymphocyte as Applied to Scanning Flow Cytometry // *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*. 2006. Vol. 102. P. 73–84.

*Материал поступил в редколлегию 03.10.2008*

**D. I. Strokotov, Yu. G. Pichugin, M. A. Yurkin, M. M. Gridina, O. L. Serov, V. P. Maltsev**

#### **APPLICATION OF THE SOLUTION OF THE INVERSE LIGHT SCATTERING PROBLEM FOR CHARACTERIZATION OF MONONUCLEAR CELLS**

In this manuscript we propose two methods to solve inverse light scattering problem for single particles, which can be described as a coated sphere. The efficiency of the methods is illustrated by characterization of lymphocytes and stem cells using light scattering patterns obtained with scanning flow cytometer. Both methods, spectral and global optimization, were used to obtain diameters and refractive indices of the cytoplasm and the nucleus of mice embryo stem cells and human lymphocytes. These results agree with data obtained from other studies. Determination of these parameters is important for diagnostics of pathological states of lymphocytes and differentiation status of embryo stem cells. Moreover, methods described in this manuscript are applicable to all mononuclear cells. We also considered limitations of these methods and their possible improvements.

*Keywords:* flow cytometry, inverse light-scattering problem, light scattering pattern, lymphocytes, lymphocyte morphology, global optimization, stem cells, spectral method.