

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И ГОРЕНИЯ ИМ. В.В. ВОЕВОДСКОГО

На правах рукописи



Гилев Константин Викторович

РАЗВИТИЕ МЕТОДА ЧИСЛЕННОГО РЕШЕНИЯ ОБРАТНОЙ ЗАДАЧИ
СВЕТОРАССЕЯНИЯ И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ
ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ИХ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ

Специальность 05.13.18 – математическое моделирование, численные методы и
комплексы программ

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук.

Научный руководитель:
Доктор физико-математических наук, профессор
Мальцев В.П.

Новосибирск – 2017

Оглавление

Оглавление.....	2
Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	9
1.1. Методы измерения характеристик эритроцитов	9
1.2. Форма эритроцитов	11
1.3. Методы моделирования светорассеяния	14
1.4. Методы решения обратной задачи	14
Глава 2. Характеризация оптической кюветы сканирующего проточного цитометра	17
2.1. Оптическая схема	17
2.2. Методы обработки изображений	19
2.3. Результаты характеризации	21
Глава 3. Аналитическая приближение формы эритроцита	25
3.1. Методы минимизации функционала энергии	25
3.2. Расчёт формы эритроцита	26
3.3. Аппроксимация формы эритроцита расширенной моделью Фанга	34
3.4. Заключение главы	37
Глава 4. Методы решения обратной задачи светорассеяния	38
4.1. Постановка задачи	38
4.2. Метод интерполяции по базе данных	39
4.3. Метод случайного заполнения базы данных	40
4.4. Оптимизационный метод для решения обратной задачи Ми, основанный на построении адаптивного алгоритма расчёта интерполяционной базы данных	41
4.4.1. Алгоритм построения интерполяционной базы данных	41
4.4.2. Реализация метода	49
4.4.2.1. Построение баз данных	49
4.4.3. Тестирование баз данных	52
4.4.3.1. Расчётные данные для шаров	52
4.4.3.2. Возмущённые теоретические данные для шара	53
4.4.3.3. Точные теоретические данные для сфероидов	56
4.4.3.4. Экспериментальные данные полистирольных микросфер	57
4.5. Заключение главы	59
Глава 5. Выбор метода моделирования светорассеяния эритроцитами человека	61
5.1. Методы расчёта	61
5.1.1. Метод дискретных источников	61
5.1.2. Метод дискретных диполей	62
5.2. Оптическая модель эритроцита	62
5.3. Результаты и обсуждение	63
5.4. Заключение главы	70
Глава 6. Характеризация эритроцитов человека	71
6.1. Методы	71
6.1.1. Пробоподготовка	71
6.1.2. Сканирующий проточный цитометр	71
6.2. Показатель преломления эритроцитов	71

6.3. Моделирование светорассеяния.....	73
6.4. Решение обратной задачи светорассеяния	74
6.5. Результаты и обсуждение.....	75
6.5.1. Решение обратной задачи светорассеяния	75
6.5.2. Обработка экспериментальных данных.....	76
Заключение	84
Список сокращений	86
Список литературы	88

Введение

Исследование эритроцитов является основой клинического анализа крови. Интерес к эритроцитам неизменно высок в связи с важной ролью, которую они играют для здоровья человека. Являясь самой многочисленной клеткой крови нашего организма (количество эритроцитов составляет $\approx 4.5 \div 5$ миллионов в мм^3 цельной крови), эритроцит решает множество задач: осуществляет транспорт кислорода, углекислого газа и ионов в организме; участвует в формировании тромбов и определяет реологические свойства крови; белки на поверхности эритроцитов формируют группу крови человека.

Эритроцит является эластичной клеткой, форма которого представляет собой двояковогнутый диск диаметром около 7.5 мкм и толщиной около 2 мкм. Высокая эластичность клетки позволяет проходить сквозь узкие (около 3 мкм) капилляры и осуществлять возложенные на неё функции в труднодоступных местах. В процессе жизни клетки (около 120 дней) эластичность мембраны эритроцита снижается, поэтому в организме предусмотрен механизм, когда старые слабдеформируемые клетки утилизируются в селезёнке для предотвращения образования тромбов в капиллярах.

Подсчёт количества эритроцитов и измерение таких характеристик, как объём, площадь, форма, концентрация гемоглобина позволяют оценить состояние крови и выявить такие заболевания, как анемия, наследственный сфероцитоз, наследственный эллиптоцитоз, серповидная анемия, миелопролиферативные, сердечно-сосудистые и другие заболевания [1,2]. Исследование динамических свойств эритроцитов позволяет оценить ионную проницаемость мембраны, способность к снабжению эритроцитов кислородом и выявить склонность к преждевременным родам [3].

Сканирующая проточная цитометрия (СПЦ) является перспективным подходом для полной и быстрой характеристики эритроцитов. Данный подход основывается на измерении рассеяния лазерного излучения от каждой клетки пробы с высокой скоростью (около 10^2 клеток в секунду) [4,5]. В связи с тем, что пространственное распределение и поляризационные свойства света, рассеянного клеткой, зависят от морфологии: формы, размера, показателя преломления и внутренней структуры [6], существует возможность восстановить характеристики измеряемых объектов по индикатрисам светорассеяния. Существенной частью метода характеристики является решение обратной задачи светорассеяния, используя параметрическую модель измеряемых клеток [7,8]. Потенциал данного подхода был продемонстрирован в [9,10], и успешно применён для характеристики тромбоцитов, бактерий, микрочастиц крови и жировых частиц

молока [7,11–15]. Распространение данного подхода на эритроциты сдерживалось сложной формой клеток. Так как обратная задача светорассеяния для одиночной частицы не имеет ни аналитического, ни явного численного решения даже для сферических частиц, требуется разработать численный метод, основанный на приближённом обращении прямого отображения. При этом прямая задача должна решаться много (тысячи) раз, каждый раз требуя значительных вычислительных ресурсов, в связи с тем, что клетки крови значительно больше длины волны видимого света и имеют сложную морфологию. Поэтому выбор методов моделирования светорассеяния клеток крови с учётом точности, вычислительной сложности и требованиям к размеру оперативной памяти является также актуальной проблемой.

Корректное измерение индикатрисы светорассеяния на сканирующем проточном цитометре предполагает качественное изготовление оптической кюветы. Основным требованием является совпадение центра внутреннего капилляра, по которому движется проба, и центра сферического зеркала, собирающего светорассеяние в различные углы, с точностью до 20 микрометров. В случае превышения данного ограничения, происходит неконтролируемое искажение индикатрисы светорассеяния и внесение погрешности в решение обратной задачи. Для решения данной проблемы требуется разработка метод характеристики оптической кюветы.

Задачами данной работы является:

1. Разработать оптическую модель и численный метод расчёта формы эритроцита человека на основе принципов минимизации функционала энергии для замкнутых оболочек;
2. Разработать численный метод решения параметрической обратной задачи интерполяцией по предварительно рассчитанной базе данных, обладающий заданной точностью решения;
3. Произвести систематическое исследование и выбор наилучшего численного метода для моделирования светорассеяния эритроцитами с точки зрения точности и вычислительной сложности;
4. Разработать и программно реализовать численный метод решения обратной задачи светорассеяния для эритроцитов;
5. Разработать и программно реализовать метод определения качественных свойств кварцевых капилляров, применяемых для измерения индикатрис светорассеяния.

Теоретическая ценность работы заключается в:

- Разработке аппроксимационной модели эритроцита, основанной на физических принципах минимума энергии деформации поверхности;
- Развитии численных методов решения обратных задачи на основе анализа прямой задачи, связанного с разработкой адаптивного метода построения интерполяционной базы данных;
- Развитии методов решения обратной задачи светорассеяния.

Практическая ценность работы:

- Разработанный численный алгоритм определения формы эритроцита (аппроксимационная формула) может быть использован для моделирования различных физических и биологических процессов;
- Разработанный метод построения интерполяционной базы данных может быть использован при решении различных обратных задач при известном численном решении прямой задачи;
- Метод характеристики эритроцитов расширяет возможности современных биомедицинских исследований и клинической диагностики, позволяя более глубокое исследование клеток крови;
- Разработанные методы могут быть использованы в развитии потенциала сканирующего проточного цитометра для характеристики клеток крови

Работа выполнена в Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН и поддержана в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», грантами РФФИ и РНФ.

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, списка сокращений и списка цитированной литературы, включающего 132 наименований. Диссертация изложена на 93 страницах, включает 8 таблиц и 49 рисунков.

Первая глава представляет собой литературный обзор, в котором рассматриваются подходы к моделированию формы эритроцитов, рассмотрены методы моделирования светорассеяния эритроцитами и рассмотрены методы решения обратной задачи светорассеяния для одиночных частиц.

Вторая глава посвящена методам определения качества оптической кюветы СПЦ. Разработана оптическая схема измерений с использованием фоточувствительной матрицы, методы выделения границ и характеристика взаимного расположения найденных графических примитивов изображения. Представлены результаты характеристики кварцевых оптических кювет.

Третья глава посвящена разработке математической модели формы эритроцита. Реализовано численное решение дифференциальных уравнений, определяющих форму. Проведён поиск многозначностей решений задачи. Выбрана параметризация и аппроксимационная формула, однозначно описывающая форму эритроцита.

Четвёртая глава посвящена разработке методов решения обратной задачи. В частности, разработан итерационный метод расчёта интерполяционной базы данных для решения параметрической обратной задачи. Представлено решение для сферических частиц, результаты обработки модельных данных, зашумлённых модельных данных, а также экспериментальных данных, полученных на СПЦ.

Пятая глава посвящена исследованию применимости методов моделирования светорассеяния для эритроцитов человека. В частности, проведено систематическое сравнение метода дискретных источников и метода дискретных диполей. Проведено исследование влияния различных параметров модели на точность методов и вычислительную сложность.

Шестая глава посвящена решению обратной задачи светорассеяния для эритроцитов. Описано создание интерполяционной базы данных, численный метод обращения базы данных и метод оценки ошибок решения задачи. Представлены данные обработки проб 22 доноров.

В заключении сформулированы основные результаты работы, которые опубликованы в 8 статьях и 8 тезисах конференций.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Аппроксимационная формула расчёта формы эритроцита человека, описываемого тремя параметрами (диаметр, минимальная толщина, максимальная толщина), основанная на принципах минимума энергии деформации поверхности со среднеквадратической погрешностью аппроксимации менее 50 нм.

2. Адаптивный метод построения интерполяционной базы данных для решения параметрической обратной задачи светорассеяния, основанный на анализе прямой задачи. Точность решения обратной задачи светорассеяния для диаметра сферических частиц составляет 27 нм, показателя преломления – 0.44×10^{-2} .

3. Метод характеристики нативных эритроцитов человека по индикатрисам светорассеяния (с помощью СПЦ) с возможностью определения 5 первичных (диаметр, минимальная толщина, максимальная толщина, показатель преломления, угол ориентации относительно падающего излучения) и 7 производных (объём, площадь, индекс сферичности, спонтанная кривизна, безразмерная спонтанная кривизна, концентрация гемоглобина, содержание гемоглобина) характеристик клеток. Медианная погрешность определения диаметра составляет – 0.34 мкм, толщины – 0.07 мкм, объёма – 9 фл.

Содержание диссертации докладывалось на международных конференциях: Международной конференции «Оптика биологических частиц» (Новосибирск, 3-6 октября 2005 г.); III Евразийском конгрессе по медицинской физике и инженерии "МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА – 2010" (Москва, 21-25 июня 2010 г.); Международной конференции «Electromagnetic and Light Scattering XIII», 26–30 September 2011, Taormina, Italy); Международной конференции «Специальные техники измерений (поляриметрия) и удаленное зондирование» (Украина, Киев, 12-27 сентября 2010 г.); IV Международной молодежной школы-конференции «Теория и численные методы решения обратных и некорректных задач», Новосибирск, 5–12 августа 2012г.; XIV Международной конференции «Electromagnetic and Light Scattering», Лилль, Франция, 17-21 июня 2013 г.; Международной конференции «Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology», Новосибирск, 24-27 июня 2014 г.; Научных семинарах в Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Институте вычислительных технологий СО РАН, Институте математики им. С.Л.Соболева СО РАН, Институте вычислительной математики и математической геофизики СО РАН.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Методы измерения характеристик эритроцитов

Подсчёт и исследование эритроцитов под световым микроскопом широко применяется в клинической диагностике [16]. Несмотря на недостаточную точность и невозможность измерения концентрации гемоглобина, данный метод широко используется, в частности, для обнаружения и характеристики аномальных клеток, которые не могут быть исследованы с помощью автоматических методов. Существуют приборы, которые производят сканирование эритроцитов в потоках микрокапилляров и последующее автоматизированное определение размеров с помощью цифрового микроскопа. Однако, в связи с деформацией эритроцитов в капиллярах, измерение может осуществляться со систематической погрешностью [17–19].

Другой широко распространённый метод автоматического подсчёта количества и измерения объёма эритроцитов – это импедансный метод (метод Култера), основанный на измерении электрического сопротивления одиночных клеток в потоке [20]. Несмотря на статистически значимое число измеряемых эритроцитов в проточной кювете (до 10^6 клеток), данный метод не учитывает различия в форме и концентрации гемоглобина среди клеток пробы, что вносит неконтролируемую погрешность измерений объёма [21].

Похожим является метод проточной цитометрии, основанный на измерении светорассеяния от одиночных клеток, обычно – светорассеяние в передние и боковые углы. Основное ограничение существующих приборов, основанных на принципе проточной цитометрии, в том, что они предполагают сферизацию эритроцитов перед проведением измерений, что требует дополнительной пробоподготовки. Кроме того, с помощью данного метода может быть измерен только объём и концентрация гемоглобина, но не форма клеток [22,23]. Существуют попытки оценить форму с помощью метода проточной цитометрии [24] и метода, основанного на обработке изображений [25], но это приводит лишь к качественным результатам.

Существует ряд методов, позволяющих производить измерения объёма, площади и содержания гемоглобина (показателя преломления) одиночных эритроцитов: интерференционная микроскопия [26], цифровая голографическая микроскопия [27,28], диэлектрическая спектроскопия [29], конфокальная микроскопия [27,30], количественная фазовая и амплитудная микроскопия [31], трансиллюминационная микроскопия [32], дифракционная оптическая томография [33–35]. Однако данные методы основаны на упрощённых предположениях о теории светорассеяния

(следовательно, вносят неконтролируемая погрешность) и не могут быть применены в клинических исследованиях с связи со значительной сложностью проведения измерений.

Модификацией проточного цитометра является сканирующий проточный цитометр (СПЦ) [37]. Метод предполагает измерение индикатрисы светорассеяния при движении частицы в кювете, в течение которого она постоянно освещается лазерным лучом, который направлен вдоль линейного потока (см. Рис. 1). На одном конце кюветы находится сферическое зеркало, а на другом – оптическая система, которая собирает только соосное излучение. Для каждого положения частицы в измерительной зоне существует конкретный угол рассеяния θ , для которого лучи отражаются сферическим зеркалом параллельно оси капилляра. Поскольку частица движется с постоянной скоростью, интенсивность света, измеряемая оптической системой, как функция времени, можно преобразовать в индикатрису. В настоящее время, СПЦ может измерять индикатрисы одиночных частиц со скоростью до 200 частиц в секунду в диапазоне углов от 5° до 70° . Данный метод был успешно применён для измерения индикатрис светорассеяния и последующего определением характеристик тромбоцитов, лимфоцитов, микрочастиц крови, палочкообразных бактерий и жировых частиц молока [7,11–13,15]. Также производились попытки характеристики эритроцитов спектральным методом и интерполяцией по базе данных [9,23,38]. Однако данные методы использовали упрощённый подход к моделированию формы эритроцита и не обладали достаточной точностью решения обратной задачи. В связи с этим, разработка метода

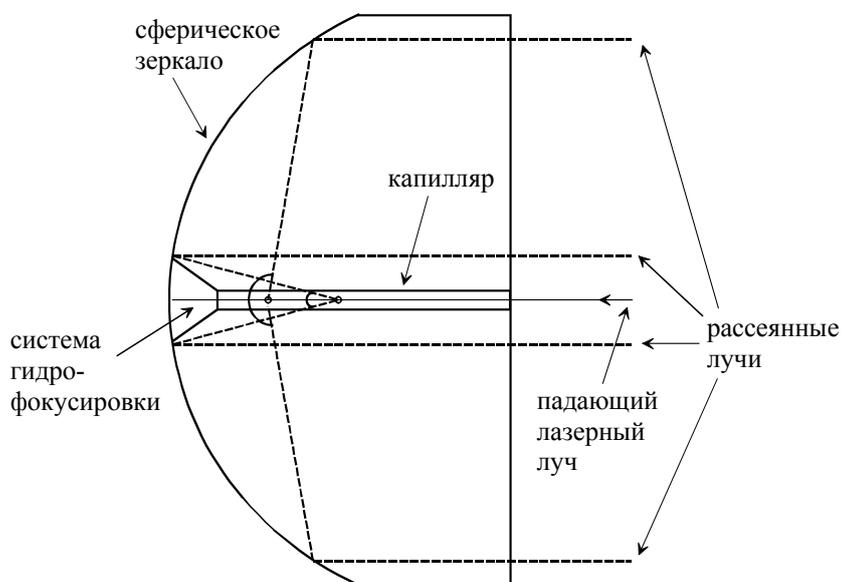


Рис. 1. Схема оптической кюветы СПЦ, осесимметричной относительно падающего лазерного луча. Отдельные частицы из пробы двигаются вдоль капилляра из гидрофокусирующей системы и постоянно освещаются лазером. Для примера показаны два положения частицы, соответствующие разным углам рассеяния (адаптировано из Soini et al [36]).

характеризации эритроцитов, по данным, измеренным на СПЦ, обладает большим технологическим и научным потенциалом.

Аналогичный подход, основанный на измерении индикатрис в сочетании с подгонкой теоретических индикатрис, был использован для определения диаметров эритроцитов в микроканалах [39].

1.2. Форма эритроцитов

Типичный эритроцит человека имеет форму двояковогнутого диска диаметром ~ 7.5 мкм, толщиной ~ 2 мкм, объёмом ~ 90 мкм³, площадью поверхности ~ 130 мкм², и может сферизоваться без растяжения мембраны до объёма ~ 140 мкм³ [22,26,33,40,41]. Эритроцит состоит из гемоглобина (32%), воды (65%) и компонент мембраны (3%) в массовых долях, и не содержит ядра [42]. Характеристики эритроцитов, представленные в литературе, отображены в Таблице 1.

Для моделирования светорассеяния и решения обратной задачи светорассеяния необходимо иметь возможность описывать форму эритроцита с помощью нескольких параметров. Существует ряд простых эмпирических параметрических уравнений формы эритроцита, которые были использованы в оптических исследованиях эритроцитов [10,41,43–46]. Несмотря на то, что большинство из них согласуются с отдельными экспериментальными данными, они не могут надёжно описывать всё многообразие форм нативных эритроцитов в связи с тем, что данные модели основаны на рассмотрении в лучшем случае лишь нескольких сотен клеток [26,33]. Поэтому модель, основанная на физических предположениях, является более предпочтительной.

С механической точки зрения эритроцит представляет из себя эластичную оболочку, наполненную гемоглобином, форма которого определяется минимумом свободной энергии мембраны [47]. Предполагается [44], что главный вклад составляет энергия деформации поверхности мембраны. Данная идея была развита, включением спонтанной кривизны для рассмотрения асимметрии между двумя слоями мембраны [48]. Данная модель приводит к широкому многообразию форм эритроцитов (чашевидных и гантелевидных эритроцитов, стоматоцитов, дискоцитов) при вариации спонтанной кривизны и объёма при фиксированной площади клетки. Альтернативный способ определения формы эритроцита состоит в рассмотрении асимметрии мембранного бислоя (модель ΔA) [41,49,50], при котором разность между площадью поверхности внутреннего и внешнего слоя мембраны остаётся постоянной в процессе минимизации энергии деформации. Модель со спонтанной кривизной и модель ΔA приводят к равным формам [51], поэтому мы ограничиваемся рассмотрением модели

спонтанной кривизны. Вклад мембранного цитоскелета в энергию мембраны важен для сильно аномальных клеток [30], которые не рассматриваются в данной работе, останавливаясь на рассмотрении только нормальных зрелых нативных эритроцитов.

Минимизируя энергию деформации, форма эритроцита может быть получена в виде дискретного профиля, полученного численно [48,52,53], или в виде аппроксимационной формулы [44,46,54,55]. Для приложений, в которых предполагается множественное вычисление формы эритроцитов, например, для подгонки экспериментальных индикатрис к расчётным для решения обратной задачи светорассеяния, форма эритроцита должна быть одновременно физически реалистичной, легко вычислима, и описываться малым набором параметров. Важно, чтобы параметры модели имели ясный физический (или геометрический) смысл в отличие от абстрактных эмпирических моделей.

Таблица 1 Представленные в литературе характеристики эритроцитов (средние значения, стандартные отклонения и диапазоны), измеренные различными методами. Где d – диаметр, h_1 – минимальная толщина, h_2 – максимальная толщина, V – объём, S – площадь, $SI = 4.836 \cdot V^{2/3}/S$ – индекс сферичности, n – показатель преломления, МСН – содержание гемоглобина в эритроците, МСНС – концентрация гемоглобина в эритроците.

d , мкм	h_1 , мкм	h_2 , мкм	V , фл	S , мкм ²	SI	n	МСН, пг	МСНС, г/дл	Источник, метод исследования
8.55 ± 0.41 [8.4 ÷ 8.67]	1.02 ± 0.08 [0.99 ÷ 1.03]	2.4 ± 0.126 [2.37 ÷ 2.42]							Ponder, 1930, [40] Микроскопия
								[28 ÷ 36]	Varer, 1957, [56]
8.07 ± 0.49 [≈6.5 - ≈9.5]			107.5 ± 16.8 [≈68- ≈168]	138 ± 17 [≈90 ÷ ≈190]	0.78 ± 0.03 [≈0.72 ÷ ≈0.88]				Sanham, 1968, [16] Микроскопия
7.82 ± 0.62	0.81 ± 0.35	2.58 ± 0.27	94 ± 14	135 ± 16	0.74				Evans, 1972, [41] Интеренционный микроскоп
7.65 ± 0.67 [5.77 - 10.09]	1.44 ± 0.47 [0.01 - 3.89]	2.84 ± 0.46 [1.49 ÷ 4.54]	97.9 ± 0.4 [47 ÷ 168]	130 ± 16 [86 ÷ 205]	0.79 ± 0.06 [0.505 ÷ 0.909]				Fung, 1981, [26] Интеренционный микроскоп
7.79 ± 0.64			88.4 ± 12.8	143 ± 14	0.719				Linderkamp, 1983, [57] Микроскоп, импедансный метод, забор в микропипетки
			90.4 ± 7.3 [≈72 ÷ ≈113]				30.3 ± 2.9 [≈22.5 ÷ ≈37.0]	33.4 ± 1.4 [≈29 ÷ ≈35.5]	Туско, 1985, [22] Проточная цитометрия
			99.77 ± 11	142 ± 14	0.73				Gifford, 2003, [18] Забор в микропипетки
			81.8 ± 10.4				28.6	34.9	Rappaz, 2008, [27] Импедансный метод
7.7 ± 0.5			83.3 ± 13.7			1.418 ± 0.012	29.9 ± 4.4	36.2 ± 4	Rappaz, 2008, [27] Цифровая голографическая микроскопия
			93.1 ± 7.9 [≈79 ÷ ≈104]			1.399 ± 0.006 [≈1.387 ÷ ≈1.41]	28.8 ± 1.2 [≈22 ÷ ≈35]	30.9 ± 3.1 [≈25 ÷ ≈36]	Park, 2008, [34] Томографическая фазовая микроскопия
			90.5 ± 3.3 [≈83 ÷ ≈100]					31.8 ± 0.17 [≈28 ÷ ≈36]	Park, 2009, [58] Спектроскопическая фазовая микроскопия
			100.7 ± 17.9			1.402 ± 0.008	27.2 ± 5.3		Phillips, 2012, [59] Трансиллюминационный микроскоп
			94.8 ± 11.4 [≈75 ÷ ≈125]	138 ± 13 [≈105 ÷ ≈175]	0.731 ± 0.05 [≈0.6 ÷ ≈0.8]		32.2 ± 4.2 [≈25 ÷ ≈44]	34.1 ± 2.9 [≈25 ÷ ≈40]	Kim, 2014, [33] Диффракционная оптическая томография

1.3. Методы моделирования светорассеяния

Для моделирования светорассеяния сферизованными эритроцитами может быть применена Теория Ми, используемая для однородных шаров [60]. Данный метод является быстрым и точным. Время расчёта индикатрисы светорассеяния на современном компьютере составляет порядка миллисекунды. Однако, несферические эритроциты требуют использования более сложных методов.

В случае применения модели сплющенного сфероида возможно применить метод Т-Матриц [61]. Однако, у данного метода есть ограничение на размерный параметр частицы, а также на величину отношения полуосей сфероида (менее 3). Кроме того, известно, что применение модели сфероида для моделирования светорассеяния несферизованными эритроцитами не обладает необходимой точностью [62].

Приближённые методы светорассеяния, например, приближения Вентцеля-Крамера-Бриллюина и Рытова [63,64] не могут быть применены для моделирования светорассеяния, так как они дают удовлетворительные результаты только для определённых показателей светорассеяния (например, рассеяния в передние углы, $x \gg 1$, $|m-1| \ll 1$, где $x = \pi d / \lambda$ - размерный параметра, d - диаметр, λ - длина волны, m - показатель преломления). Аналогичное ограничение имеет и геометрическая оптика, которая применима для частиц с $x \gg 1$.

В последние годы следующие методы использовались для моделирования светорассеяния от одиночных эритроцитов: метод граничных элементов [65], метод конечных разностей во временной области [63,66], метод дискретных диполей (МДД) [62,63] и метод дискретных источников (МДИ) [67–69]. Некоторые из этих методов были рассмотрены в [70] и был сделан вывод, что МДИ является наиболее эффективным методом, сочетающим наивысшую вычислительную скорость и возможность вычисления светорассеяния для любого направления падающего излучения. Однако, сравнение было основано на эритроцитах с размерным параметром равным $x = 28$. Более того, направление падения света совпадало с осью симметрии эритроцита, что привело к значительному повышению эффективности МДИ. В связи с этим, выбор метода моделирования светорассеяния остаётся открытым.

1.4. Методы решения обратной задачи

В настоящее время аналитического решения обратной задачи светорассеяния для одиночной частицы не найдено. Наиболее успешный метод реализован для сферических частиц, позволяющий определить размер и показатель преломления из амплитудной матрицы рассеяния, которая включает амплитудные и фазовые компоненты рассеянного поля, измеренные на всём угловом диапазоне полярных углов $[0^\circ, 180^\circ]$ [71]. Однако такие измерения не могут быть

произведены с помощью проточного цитометра или аналогичного прибора, обладающего высокой скоростью измерений светорассеивающих свойств одиночных частиц.

Альтернативные подходы состоят в численном решении обратной задачи. Методы спектрального разложения [72–74] позволяют определить размер шара по спектрам Фурье и Гегенбауэра индикатрисы. Однако данный метод не даёт информации о показателе преломления частиц. Параметрическое решение [75] основано на зависимости параметров частиц от контраста и расстояния между минимумами индикатрисы. Данный метод обеспечивает достаточную точность только для сфер и чувствителен к экспериментальному шуму [6]. Нейронные сети также были использованы для характеристики одиночных сфер [76–78]. Данный метод предполагает машинное обучение на теоретических индикатрисах и был успешно применён для характеристики полистирольных микросфер и сферизованных эритроцитов [76]. Однако, применение нейронных сетей до сих пор является частично эмпирическим подходом и требует человеческого управления, а именно тонкой настройки внутренних параметров для каждого типа одиночных частиц.

Наиболее общий подход характеристики одиночных частиц с относительно простой формой – это оптимизация, т.е. подгонка теоретического сигнала к экспериментальному, например, с помощью метода наименьших квадратов. Осциллирующая форма индикатрис с сильной зависимостью от параметров частиц требует использования устойчивых методов глобальной оптимизации. В частности, стохастические методы глобальной оптимизации [79,80] и метод DiRect [80,81] были использованы для характеристики сферических частиц.

Аналогичная проблема характеристики многослойных концентрических сфер была решена с помощью мультистартового метода Левенберга-Марквардта [82] и DiRect [83]. Однако, для несферических частиц, например, тромбоцитов и эритроцитов, методы оптимизации становятся вычислительно сложными, в связи с увеличением числа параметров модели и вычислительным усложнением решения прямой задачи (расчёта индикатрисы). Новые методы оптимизации должны позволять определение характеристик клеток за разумное время (миллисекунды), чтобы можно было их использовать в клинической диагностике для анализа пробы, состоящей из нескольких тысяч частиц. В связи с этим требуется разработать ускоренные методы оптимизации, например, используя предварительное изучение свойств прямого и обратного отображения. При этом однократные предварительные вычислительные затраты являются приемлемыми.

Наиболее простой подход ускорения состоит в вычислении большой базы данных индикатрис и решении обратной задачи светорассеяния интерполяцией с помощью ближайшего соседа. В частности, данный метод был применён для шаров [84], сфероидов [85] и двояковогнутых дисков [10,62]. Однако, во всех случаях несферических частиц точность

решения не была надёжно оценена. Основная проблема данного подхода (не рассматриваемая в перечисленных статьях) – нахождение оптимальной структуры и размера базы данных. В каждом случае следует найти компромисс между вычислительной сложностью метода (как на первом этапе конструирования базы данных, так и на этапе решения обратной задачи для каждой частицы) и точностью решения обратной задачи. Это усложняется различной чувствительностью индикатрис к параметрам частицы в различных областях параметров, что приводит к необходимости неравномерной плотности базы данных. Более того, может существовать пороговое значение функции зависимости ошибки интерполяции от плотности сетки в связи с осцилляторным поведением индикатрисы. Выше этого предела погрешность непрерывно уменьшается с увеличением плотности, как и обычно при интерполяции. Но ниже этого предельного значения погрешности резко увеличиваются до значений сравнимых с размерами всей области параметров (см. раздел 4.4.1). Связанным с этим является вопрос о максимально допустимой для данной базы данных величине экспериментального шума.

Оптимальность интерполяционной базы данных ранее обсуждалась по отношению к иной задаче, связанной с обнаружением дефектов в двумерных поверхностях [86,87]. Однако, предложенный адаптивный алгоритм построения базы данных посвящен только погрешностям интерполяции внутри элементарной ячейки, неявно подразумевая необходимую плотность базы данных. Существуют также методы, основанные на интерполяции методом ближайшего соседа [88,89], использующие аналогичные идеи. Однако, они занимаются построением множества образцов определённого экспериментального сигнала в отличие от универсальной базы данных.

В данной работе предлагается метод адаптивного построения базы данных для характеристики одиночных частиц по измеренным индикатрисам. Метод должен обладать однозначностью решения и локальной точностью, не давая больших погрешностей обратного отображения при ограничении размера конструируемой базы данных. После общего описания проблемы и метода в разделе 4.4.1 соответственно, мы рассмотрим простую модель однородного шара для примера практического применения в разделе 4.4.2.

В недавней статье [90] обратная задача светорассеяния для одиночных шаров решалась построением сети начальных приближений для последующей оптимизации с помощью градиентного спуска. Данный подход основан на подробном и строгом анализе прямого отображения и производных, что гарантирует совершенную точность для данных без шума. В отличие от описанной работы, в данной работе предполагается, что существует относительно малое число индикатрис, дающую информацию о свойствах отображения. С практической точки зрения данное решение может быть применено и для несферических частиц. Поэтому, метод, предложенный в данной работе может быть применён для моделей многих частиц, описываемых набором из нескольких параметров.

Глава 2. Характеризация оптической кюветы сканирующего проточного цитометра

Корректное измерение индикатрисы светорассеяния на сканирующем проточном цитометре предполагает качественное изготовление оптической кюветы. Кювета представляет из себя кварцевый цилиндр диаметром 5 мм и длиной 5 мм, одно из оснований которого отшлифовано до сегмента шара (см. Рис. 1 и Рис. 2). По центру параллелепипеда проходит капилляр диаметром 254 мкм. Основным требованием является совпадение центра внутреннего капилляра, по которому движется проба, и центра сферического зеркала, собирающего светорассеяние в различные углы, с точностью до 20 микрометров [91]. В случае превышения данного ограничения, происходит неконтролируемое искажение индикатрисы светорассеяния и внесение погрешности в решение обратной задачи. Для решения данной проблемы был разработан метод характеристики оптической кюветы, основанный на анализе изображений, полученных с помощью фотоматрицы.

2.1. Оптическая схема

Оптическая схема измерений представлена на Рис. 3. Свет, испускаемый светодиодом (5), рассеивается кварцевой кюветой (3), зафиксированной на натянутой леске (6) над предметным столиком (4) и, проходя через объектив (2), собирается фоточувствительной матрицей (1). Для исключения aberrаций, используется ахроматический объектив (ЛОМО ПЛАН 3.5*0.1 OM-3, фокусное расстояние 29.92 мм, рабочее расстояние 23.4 мм). Для тех же целей,



Рис. 2 Фотография кварцевой кюветы СПЦ. Монета приведена для иллюстрации масштаба.

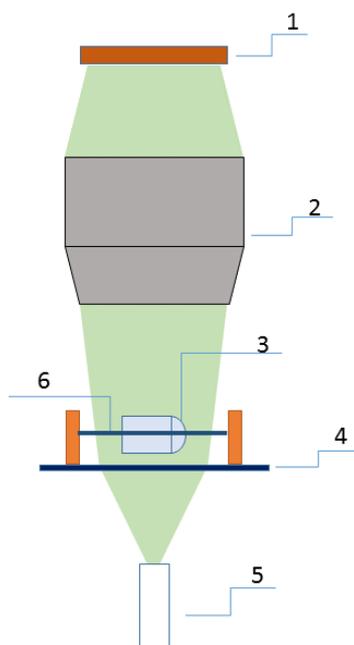


Рис. 3 Оптическая схема измерений. 1 – фоточувствительная матрица (CMOS 22.2*14.7, 4272*2848 пикселей, фотокамера Canon 1100D), 2 – объектив (ЛОМО ПЛАН 3.5*0.1 OM-3, фокусное расстояние 29.92 мм, рабочее расстояние 23.4 мм, планахромат), 3 – кварцевая кювета, 4 – стеклянная подложка, 5 – источник излучения, 6 – позиционирующая леска.

сферическая часть капилляра располагается в центре снимаемого изображения. Кратность объектива выбрана из условия максимального размера проекции кварцевого кюветы на фотоматрицу размером (22.2×14.7 мм).

При измерении параметров внутреннего капилляра могут происходить неконтролируемые смещения его положения в следствии преломления на кварце. Поэтому для определения положения внутреннего канала через него проведена натянутая леска, диаметром, совпадающим с размеров внутреннего канала (250 мкм). Измерение положения натянутой лески на входе и выходе из кюветы позволяет получить направление капилляра без наложенных искажений, вызванных преломлением на кварцевой основе.

Пример снимаемого изображения представлен на Рис. 4.

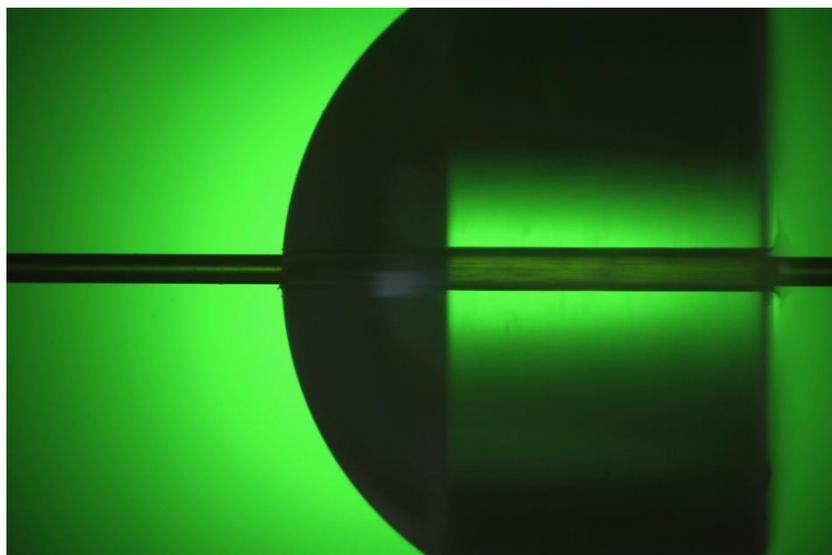


Рис. 4. Изображение, проецируемое на фотоматрицу.

2.2. Методы обработки изображений

Для определения расстояния между центрами сферы и внутреннего цилиндрического капилляра требуется изолированная обработка обоих компонент с последующим измерением взаимных расположений. Характеризация сферической поверхности и внутреннего цилиндрического капилляра осуществляется в два этапа: выделении границ и аппроксимации полученных границ заданной моделью (окружностью и парой прямых соответственно).

Для выделения границ могут быть использованы два метода: градиентные методы и метод приближения сигмоидальной функцией [92]. При этом область поиска прямых границ представляет ряд параллельных отрезков перпендикулярных заданной границе, в то время, как область поиска круглой границы представляется рядом отрезков, образующие лучи которых выходят из одной точки (предварительно приближённо выбранного центра окружности) (см. Рис. 5).

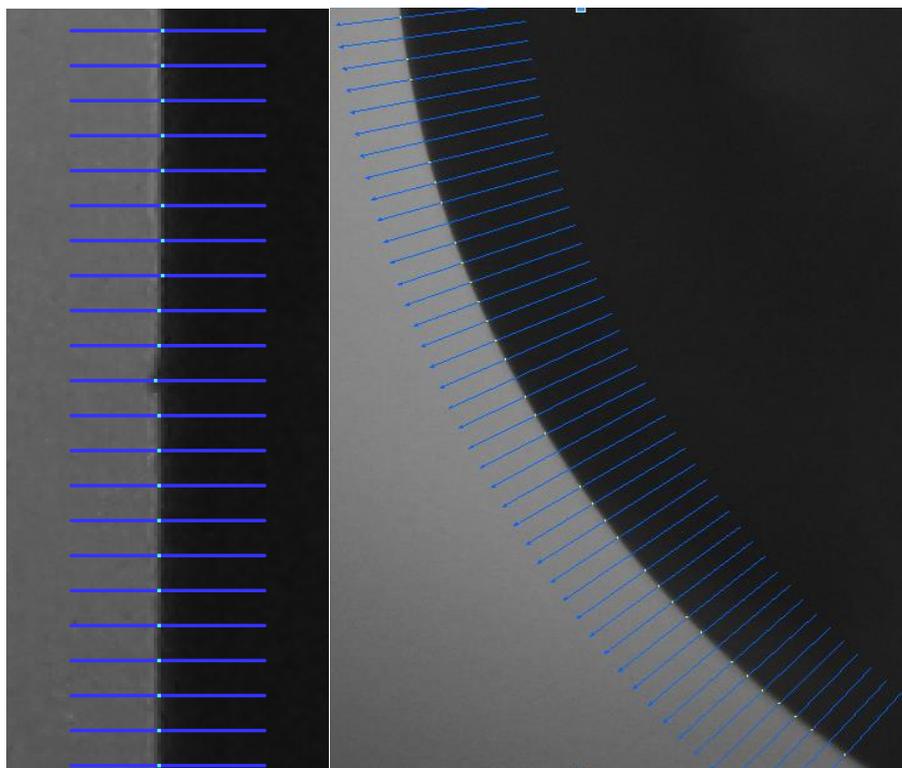


Рис. 5. Области поиска границ объектов: прямой области (слева) и сферической области (справа)

Градиентный метод предполагает вычисление производной от интенсивности по заданному направлению отрезка. Для предотвращения случайных выбросов интенсивностей (экспериментальный шум), приводящих к разрыву производной, интенсивности усредняются по направлениям, перпендикулярным направлениям поиска. Вычисление градиента осуществляется наложением двумерной маски на изображение.

Метод нахождения границы приближением сигмоидальной функцией предполагает представление границы в виде функции вида $s(h, k, l, \sigma, x) = h + \frac{k}{2} \left(\operatorname{erf} \left(\frac{x-l}{\sqrt{2}\sigma} \right) + 1 \right)$, где

$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt$ - функция ошибок Лапласа, h, l – параллельный перенос функции по оси s и x

соответственно, k – коэффициент растяжения функции по оси s и x соответственно. В этом случае положением границы будет являться точка l симметрии данной функции (см. Рис. 6).

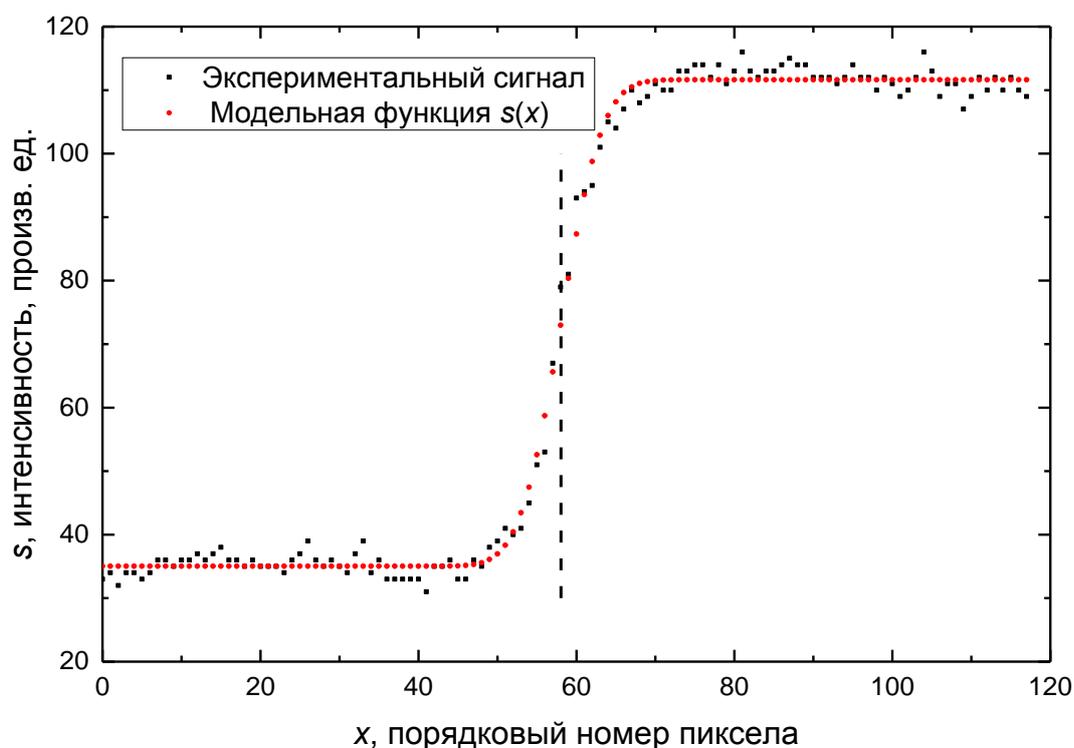


Рис. 6 Определение границ с помощью функции ошибок Лапласа. Вертикальной пунктирной линией обозначена граница области.

Для определения параметров геометрических объектов на втором этапе может быть произведена аппроксимация найденных координат границ с помощью прямых (внутренний капилляр, 2 параметра модели – угол наклона прямой и смещение относительно начала координат) и окружностей (сферическое зеркало, 3 параметра – координаты центра на плоскости и радиус). Тогда расстояние между центром сферы и центром капилляра определяется расстоянием между центром сферы и найденной осью капилляра. Наряду с найденными параметрами моделей может быть произведена оценка погрешностей метода, исходя из анализа матрицы ковариации при реализации процедуры подгонки модели методом Левенберга-Марквардта.

2.3. Результаты характеристики

Для решения задачи был разработана программа в среде LabView 2012 с использованием модуля NI Vision, осуществляющая поиск границ и вычисление взаимного расположения между геометрическими объектами. Предварительно в программе указывается примерное расположение областей поиска искомых объектов. На основе вышеописанных методов происходит дальнейшая обработка изображений. На Рис. 7 показан интерфейс программы, а также области поиска геометрических моделей.

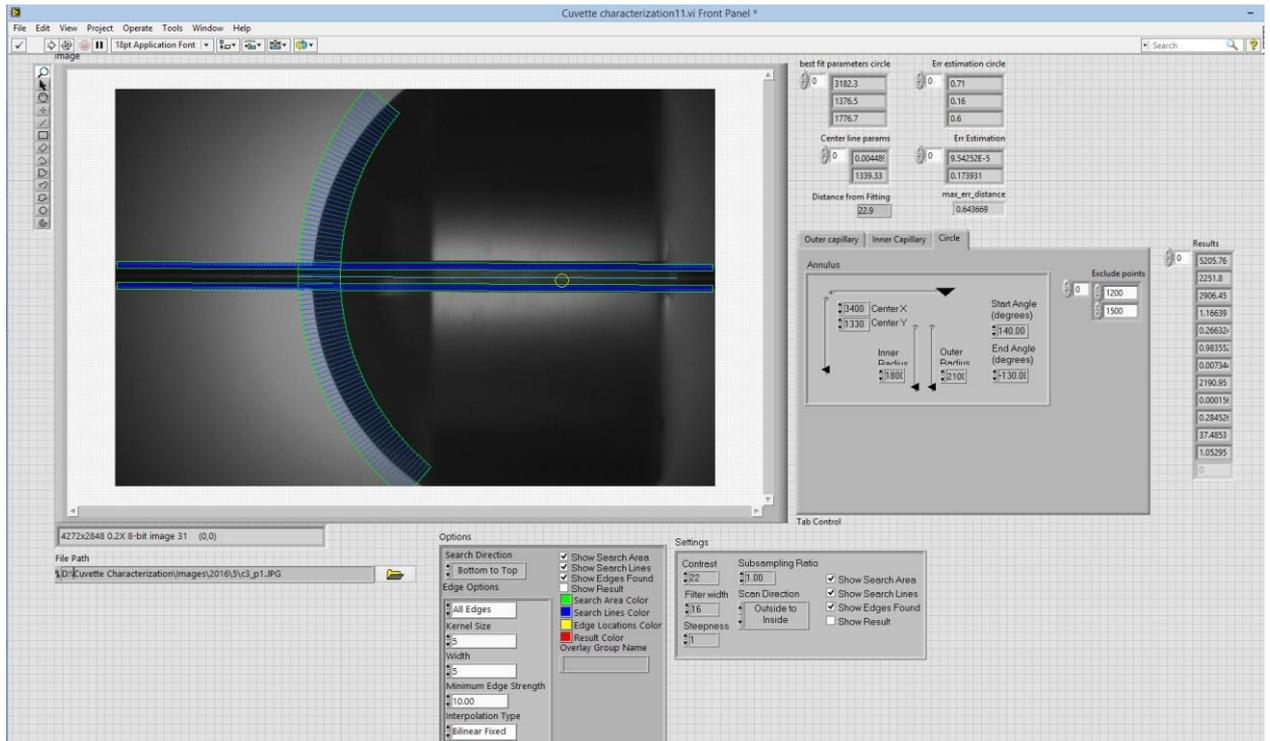


Рис. 7. Интерфейс программы характеризации оптической кюветы в среде LabView

Численные эксперименты показали, что результаты определения границы при использовании обоих методов (градиентный метод и приближение сигмоидальной функцией) отличаются не более чем на 2 пикселя (≈ 2.5 мкм), что не превышает необходимую точность измерений. При этом смещение не носило систематический характер и не приводило к соответствующему значительному смещению параметров аппроксимирующих геометрических моделей. В связи с этим в дальнейшем использовался вычислительно более простой градиентный метод.

Экспериментально был подобран размер маски усреднения для градиентного спуска (равный 5 пикселям), размер маски дифференциального оператора (равный также 5) и пороговое значение градиента интенсивности. На следующей иллюстрации представлено исходное изображение вместе с найденными объектами.

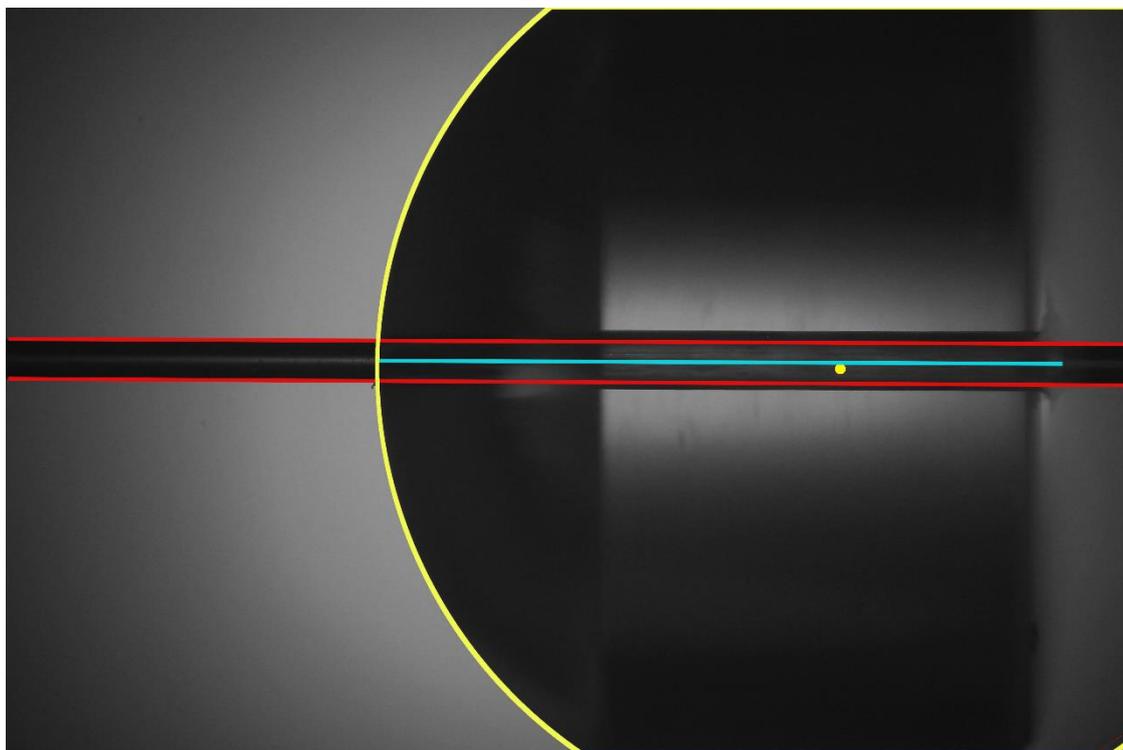


Рис. 8. Результат обработки снимка кюветы. Найденная граница сферической части кюветы, аппроксимированная с помощью окружности показана жёлтым цветом, найденная граница капилляра, аппроксимированная с помощью пары прямых - красным цветом, ось капилляра - голубым цветом

На основе вышеописанных методов проанализировано 4 образца кварцевых кювет. Изображения с кювет получены в двух перпендикулярных проекциях (для каждой проекции с двух симметричных сторон), соосных внутреннему капилляру. При этом пары проекций 1 и 2, а также 3 и 4 являются приблизительно (с учётом визуального контроля) симметричными, поэтому расстояние от центра сферы до центра капилляра достаточно близки.

Результаты обработки представлены в Таблице 2.

Отличие в параметрах X_c , Y_c , k , b , отвечающих за положение капилляра и сферического зеркала связаны с погрешностями ручного позиционирования кюветы относительно фотоматрицы. Различные значения радиуса сферического зеркала R_c , в частности на симметрических проекциях (1 - 2, 3 - 4), связаны с несимметричностью кюветы относительно оси, а также возможными допущениями при выборе симметричных положений кюветы. Разработанный метод характеристики кварцевых кювет, обладает высокой точностью определения расстояния между центром сферы и внутренним капилляром (менее 1 мкм).

Следует отметить, что лишь один из представленных образцов показал приемлемое качество в обеих проекциях. Остальные изделия требуют дальнейшей доработки.

Таблица 2. Результаты характеристики четырёх кварцевых кювет в четырёх перпендикулярных проекциях. X_c – абсцисса центра окружности, Y_c – ордината центра окружности, R_c – радиус окружности, $\sigma(X_c)$, $\sigma(Y_c)$, $\sigma(R_c)$ – погрешности определения абсциссы центра, ординаты центра и радиуса окружности соответственно, k , b – коэффициенты уравнения прямой ($y = kx + b$) для осевой линии капилляра, $\sigma(k)$, $\sigma(b)$ – погрешности определения параметров k и b , d – расстояние от центра зеркала до осевой линии капилляра, $\sigma(d)$ – погрешность определения параметра d .

Номер капилляра	1				2				3				4			
	1	3	2	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
X_c , мкм	5299.8	5297.7	5119.5	5190.7	5310.6	5287.9	5278.8	5168.6	4872.2	4931.8	4889.4	4845.3	4838.2	5103.5	4920.5	5047.7
Y_c , мкм	2413.7	2344.6	2400.7	2359.1	2331.9	2299.2	2311.9	2263.3	2367.8	2417.4	2368.5	2398.2	2251.4	2344.7	2258.0	2330.6
R_c , мкм	2936.8	2849.1	2848.1	2850.7	2890.2	2826.2	2852.8	2845.0	2870.7	2867.5	2851.7	2848.2	2900.5	2855.5	2843.9	2851.6
$\sigma(X_c)$, мкм	1.5	1.4	2.2	1.2	3.1	2.3	4.7	2.8	5.5	1.4	1.6	1.0	1.2	1.3	1.1	1.2
$\sigma(Y_c)$, мкм	0.3	0.3	0.4	0.2	0.6	0.4	0.9	0.5	1.1	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
$\sigma(R_c)$, мкм	1.3	1.2	1.9	1.0	2.6	1.9	4.0	2.4	4.6	1.1	1.4	0.9	1.1	1.1	1.0	1.0
k	0.007	0.007	-0.006	-0.006	-0.002	-0.009	-0.010	-0.009	0.005	0.010	0.005	0.012	0.001	0.004	-0.007	0.005
b , мкм	2194.8	2333.0	2356.6	2392.4	2387.9	2317.7	2317.5	2376.4	2415.8	2356.1	2348.1	2308.2	2337.8	2224.0	2373.1	2269.7
$\sigma(k)$	0.00006	0.00005	0.00006	0.00007	0.00006	0.00005	0.00005	0.00006	0.00007	0.00006	0.00005	0.00006	0.00007	0.00006	0.00005	0.00007
$\sigma(b)$, мкм	0.10	0.09	0.11	0.13	0.11	0.08	0.10	0.11	0.13	0.12	0.10	0.12	0.12	0.10	0.10	0.12
d , мкм	18.1	20.3	11.6	12.2	18.0	13.6	30.4	27.0	3.9	6.4	35.9	38.0	78.4	79.0	50.5	62.7
$\sigma(d)$, мкм	0.6	0.5	0.8	0.6	0.8	0.8	1.2	0.8	1.6	1.0	0.6	0.8	0.6	0.4	0.6	0.4

Глава 3. Аналитическая приближение формы эритроцита

3.1. Методы минимизации функционала энергии

Основываясь на предположениях о том, что форма эритроцита определяется условием минимума энергии деформации поверхности, описанных в разделе 1.2, форма может быть определена численно. Энергия деформации поверхности записывается в виде функционала:

$$E(A, c_0) = \frac{k_c}{2} \oint_A (c_p + c_m - c_0)^2 dS, \quad (1)$$

где c_p и c_m – главные кривизны поверхности мембраны, k_c – константа упругости, A замкнутая поверхность. Спонтанная кривизна c_0 описывает кривизну свободной мембраны (незамкнутой части мембраны, «вырезанной» из клетки) и может быть отличной от нуля в связи с различиями внутреннего и внешнего слоёв мембраны. Минимизация функционала (1) при фиксированных объёме V и площади S приводит к искомой форме. При описании формы может также использоваться величина SI , объёмный индекс сферичности, обозначающий отношение объёма нативного эритроцита к объёму эритроцита, сферизованного с сохранением площади поверхности S : $SI = 3\sqrt{4\pi VS}^{-3/2}$. $SI = 1$ для шара и стремится к нулю при «сдувании» шара до плоской фигуры с сохранением площади. Таким образом, форму эритроцита, можно рассматривать, как функцию от трёх параметров: V , SI и c_0 .

Заметим, что $E(A, c_0) = E(kA, c_0/k)$, где kA – равномерное растяжение поверхности A в k раз. В связи с этим, все безразмерные формы, определённые уравнением (1) могут быть получены вариацией только SI и c_0 для некоторого фиксированного объёма V , который играет роль коэффициента растяжения (размера). Для упрощения последующего обсуждения мы определим безразмерную спонтанную кривизну c_d :

$$c_d = c_0 \left(\frac{S}{4\pi} \right)^{1/2} = c_0 \left(\frac{3V}{4\pi \cdot SI} \right)^{1/3}. \quad (2)$$

c_d нормирована на площадь, равна c_0 при $S = 4\pi$ и вместе с заданным SI однозначно определяет безразмерную форму эритроцита. Полное многообразие форм эритроцита получается из безразмерного многообразия равномерным растяжением.

Для расчёта формы эритроцита могут быть использованы два различных численных метода. Первый метод основан на итерационном процессе минимизации энергии трёхмерной поверхности. Существует реализация данного метода в виде программного пакета “Surface Evolver” [93]. Форма представляется в виде триангулированной замкнутой поверхности (см. Рис. 9). Оптимизационная процедура начинается с некоторой стартовой формы и реализуется при

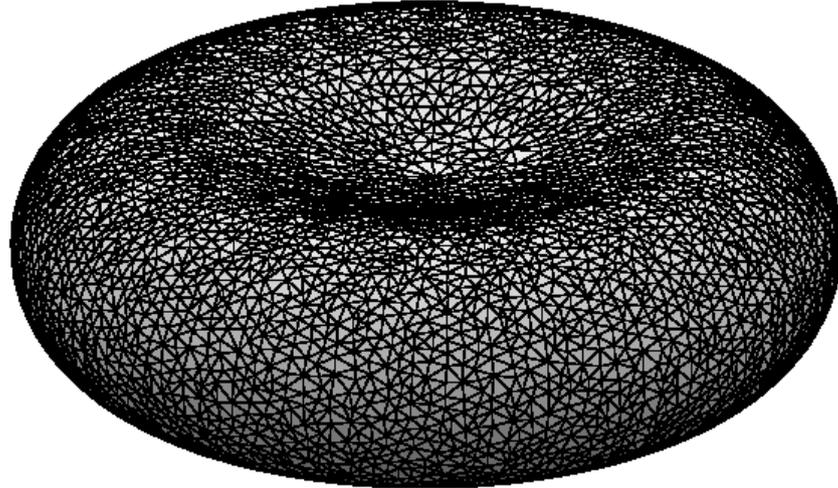


Рис. 9 Результат моделирования формы эритроцита с помощью программы Surface Evolver для $V = 90$ фл, $SI = 0.7$, $c_0 = 0$ мкм⁻¹.

ограничении на объём V , площадь S и спонтанную кривизну c_0 . Несмотря на возможности Surface Evolver решать оптимизационные задачи для поверхностей произвольной формы, включая чашевидные эритроциты, программный пакет требует управления оператором. Кроме того, итерационный процесс трёхмерной поверхности является вычислительно сложным. В связи с этим, далее Surface Evolver использовался лишь как референсный метод.

Второй метод основан на моделировании осесимметричных двумерных профилей, предложенный Deuling & Helfrich [48]. В этом случае, задача минимизации энергии поверхности преобразуется к уравнению Эйлера-Лагранжа.

3.2. Расчёт формы эритроцита

Уравнение Эйлера-Лагранжа может быть преобразовано в систему трёх нелинейных дифференциальных уравнений для функций $c_p(s)$, $c_m(s)$, $f(s)$:

$$\begin{cases} \frac{dc_m}{ds} = \pm(1 - fc_p^2)^{-1/2} \left\{ c_p [(c_p - c_0)^2 - c_m^2] + 2(\lambda/k_c)c_p \right\} \\ \frac{dc_p}{ds} = \pm 2(1 - fc_p^2)^{1/2} (c_m - c_p) / f \\ \frac{df}{ds} = \pm 4(1 - fc_p^2)^{1/2}, \end{cases} \quad (3)$$

где s – нормализованная площадь, равная 0 на верхнем полюсе, 0.5 – на экваторе и 1 - на нижнем полюсе, $f = x^2$, x – расстояние от оси вращения. При следующих граничных условиях:

$$\begin{aligned} \text{при } s=0: f=0, c_m = c_p = c_m^0 \\ \text{при } s=0.5: f=f_m, c_p = f_m^{-1/2}, c_m = c_m^m \end{aligned} \quad (4)$$

Данная система решается методом конечных разностей, подбирая подходящие граничные условия методом стрельбы на полюсе и экваторе эритроцита, гарантирующие гладкую сшивку ветвей профиля в серединной точке профиля [94]. Подбор параметров может осуществляться оптимизационными методами, например, Левенберга-Марквардта или DiRect. Примеры двумерных профилей, вычисленных с помощью уравнения (1), для различных значений c_0 и SI показаны на Рис. 10. Здесь и далее мы используем ось z в качестве оси симметрии частицы, а координата x соответствует координате ρ в цилиндрических координатах.

Вычислительные эксперименты показали неоднозначность решения задачи: заданный набор параметров (V , SI, c_0) может соответствовать двум или более различным формам с

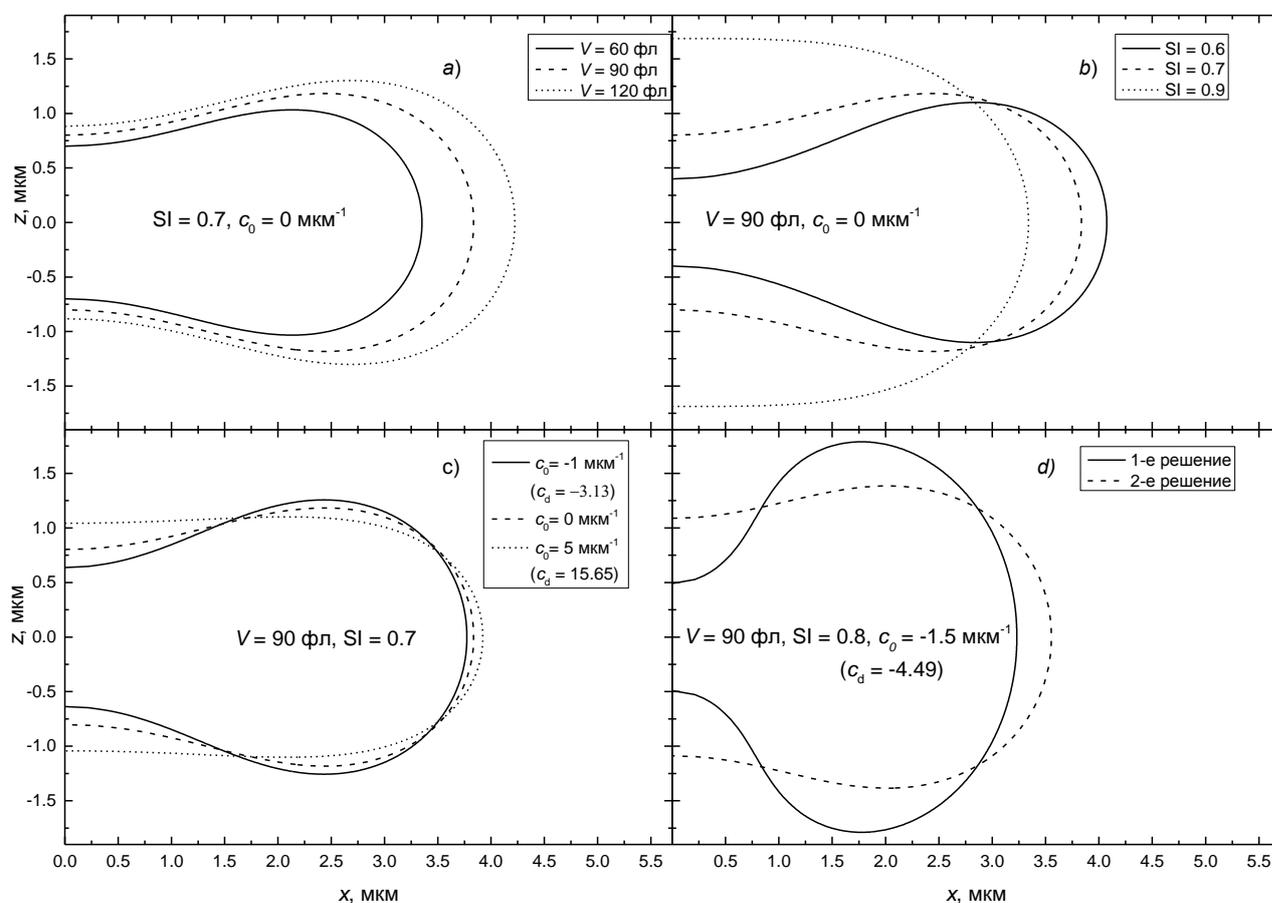


Рис. 10 Примеры профилей эритроцитов, рассчитанных с помощью подхода Deuling (метод решения системы дифференциальных уравнений). А) SI = 0.7, $c_0 = 0 \text{ мкм}^{-1}$, и различными V ; Б) $V = 90 \text{ фл}$, $c_0 = 0 \text{ мкм}^{-1}$, и различными SI; В) $V = 90 \text{ фл}$, SI = 0.7, и различными c_0 ; Г) двузначное решение для $V = 90 \text{ фл}$, SI = 0.8,

минимальной энергией (локальным решениям). Пример такой неоднозначности показан на Рис. 10 d . Для проверки того, что данное свойство является фундаментальным свойством задачи, а не особенностью численного метода, решение были сопоставлено с результатом работы программы Surface Evolver (см. Рис. 11).

Далее мы численно проверили число решений, как функцию от параметров V , SI и c_0 . Различные решения могут быть получены методом Левенберга-Марквардта, используя различные стартовые точки. Диапазон каждого из четырёх внутренних параметров был разделён на 3 равные части, и центры 81 полученных гиперпрямоугольников были использованы в качестве стартовых точек для минимизации.

Численный эксперимент показал, что 81 стартовая точка является достаточной для получения всех возможных решений. В связи с масштабированием формы, описанным в разделе 3.1, число решений полностью определяется двумя безразмерными параметрами: SI и c_d . На Рис. 13 показаны области в пространстве SI и c_d , отвечающие различным количествам решений. Следует заметить, что: а) границы области на самом деле гладкие, а видимый шум является ограничением частоты дискретизации алгоритма поиска числа решений; б) область в которой отсутствуют решения относится только к классу осесимметричных двояковыгнутых (симметричных относительно плоскости $z=0$) форм, в связи с применяемым подходом, основанным на численном решении дифференциальных уравнений. Остальные формы, например, чашевидные, могут существовать в данном регионе и могут быть получены с помощью, например, метода эволюции трёхмерной поверхности (данные не показаны).

Для реализации описанного выше метода был написан программный модуль в среде LabView, интерфейс которого представлен на Рис. 12.

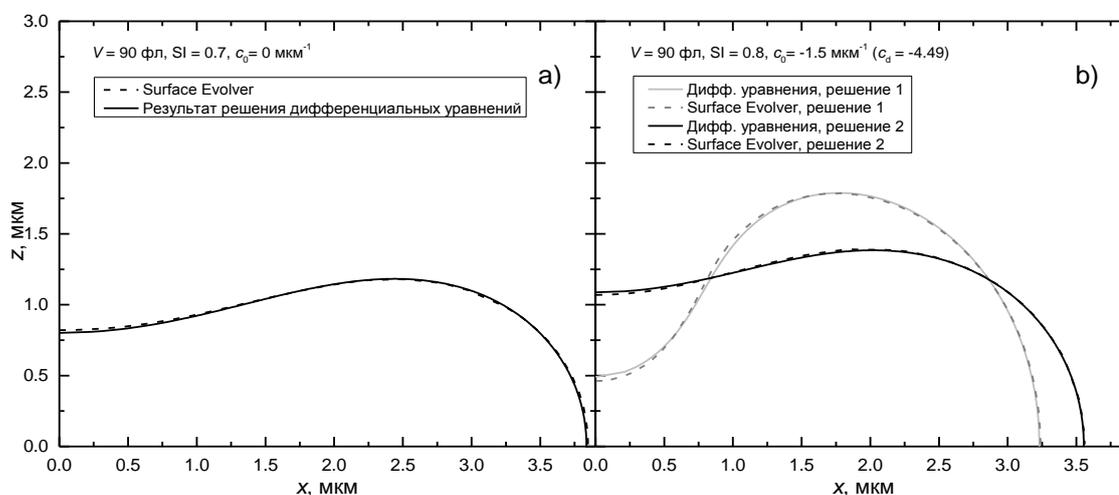


Рис. 11 Сравнение профилей эритроцитов, полученных программой Surface Evolver (с различными начальными формами) и из решений системы дифференциальных уравнений (подхода Deuling) с параметрами аналогичными **Рис. 10**.

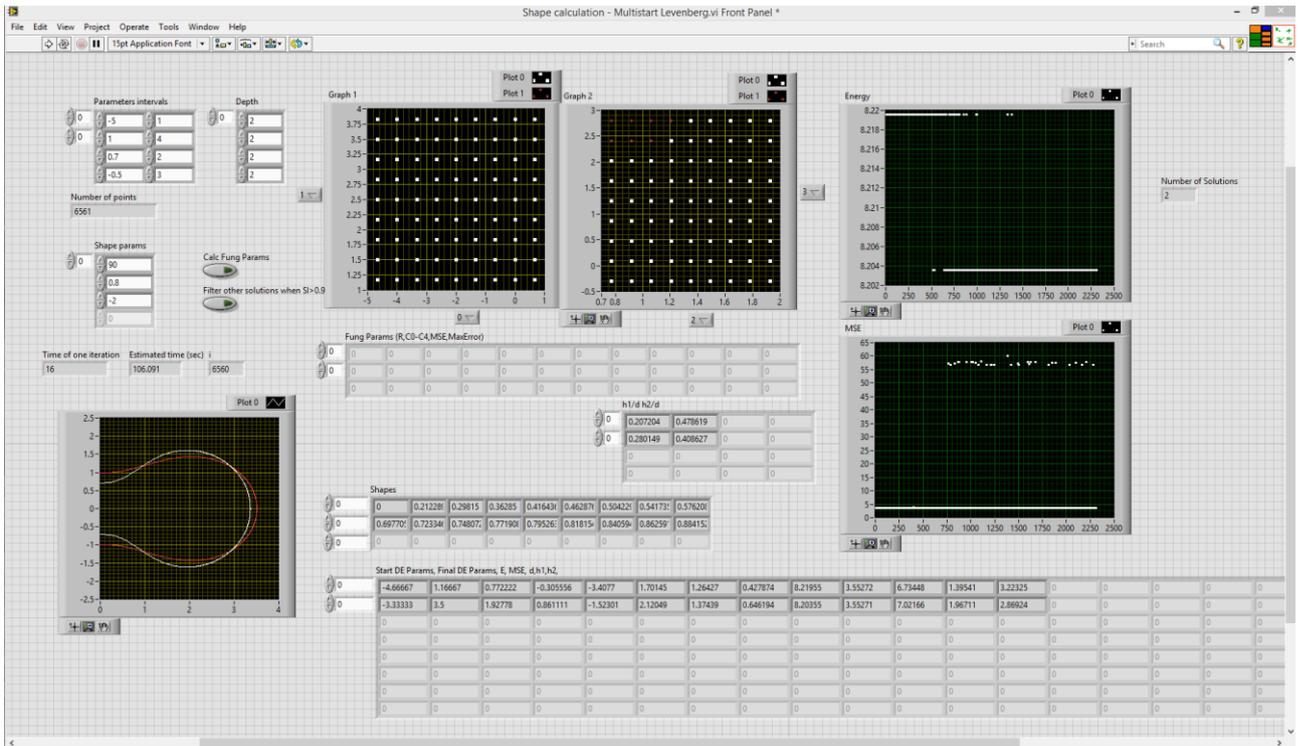


Рис. 12 Программный модуль для вычисления форм эритроцита, отвечающих заданному объёму, площади и спонтанной кривизне. Данное решение получается применением метода множественного решения системы дифференциальных уравнений методом Левенберга-Марквардта с начальными решениями в различных узлах выбранной сетки (мультистарт).

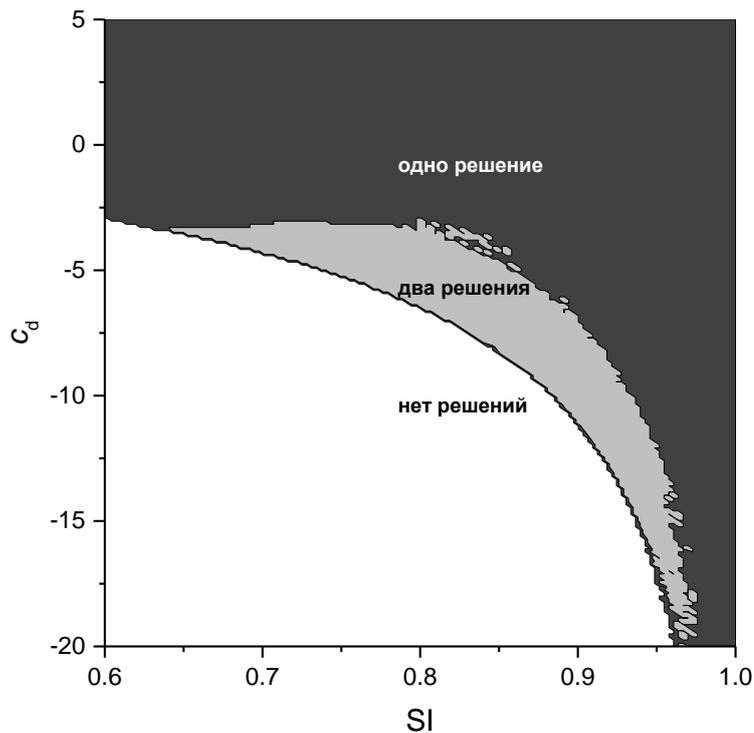


Рис. 13 Число осесимметричных двояковогнутых форм эритроцитов (решение дифференциальных уравнений) от двух безразмерных параметров формы. Белый цвет – нет решений, серый – одно решение, светло-серый – два решения.

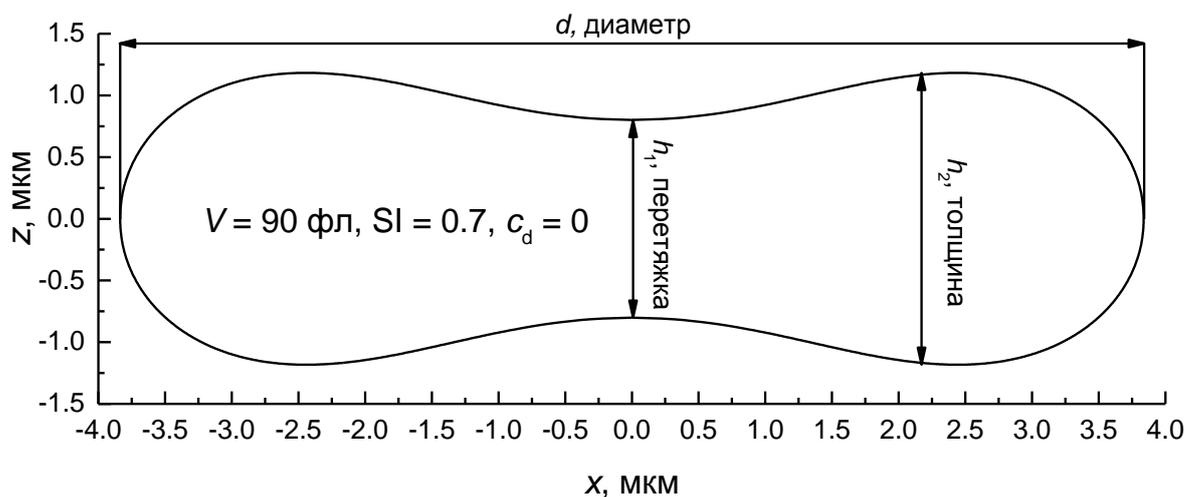


Рис. 14 Альтернативная параметризация эритроцита, приводящая к однозначному описанию формы.

Наличие данной неоднозначности в решении неудобно для количественной характеристики формы эритроцитов, которая предполагает минимальное число параметров модели, однозначно описывающих форму. В связи с этим мы предложили иную параметризацию: d, h_1, h_2 – диаметр, минимальная толщина и максимальная толщина соответственно (см. Рис. 14). Численный эксперимент со случайно выбранными наборами данных параметров показали, что данная параметризация является однозначной. Поэтому данные параметры позже использованы для нахождения аппроксимационного уравнения поверхности эритроцита. [см. уравнение (8)]. Заметим, что h_1/d и h_2/d однозначно определяют безразмерную форму, которая может быть далее растянута до необходимого диаметра d .

Однако, новая параметризация добавляет уровень сложности. В то время, как нахождение этих параметров для произвольной формы не представляет вычислительной сложности, обратная процедура требует нахождения таких (V, SI, c_0) , для которых вычисленная форма имеет искомые параметры (d, h_1, h_2) , что предполагает вложенную подгонку в уже существующую подгонку. Для облегчения вычислительной сложности предложено аналитическое приближение профиля вращения частицы. Для нахождения аналитического приближения, являющимся одновременно удобным и точным, мы рассматриваем следующие параметрические уравнения:

1) Широко используемое при моделировании светорассеяния уравнение овалов Кассини [46,95,96]:

$$[(x-a)^2 + z^2][(x+a)^2 + z^2] = b^4, \quad (5)$$

где a и b – свободные параметры.

2) Уравнение Борового [43] представляемое в сферических координатах (r, θ) :

$$r = a \sin^q \theta + b, \quad (6)$$

где a, q и b свободные параметры.

3) Уравнение Фанга [41]:

$$z = \pm(d/2)\sqrt{1-(2x/d)^2} [C_0 + C_2(2x/d)^2 + C_4(2x/d)^4], \quad (7)$$

где C_0 , C_2 и C_4 – свободные параметры, определяющие безразмерную форму, а d – коэффициент растяжения.

4) В данной работе предлагается расширенная модель Фанга (РМФ) порядка N :

$$z = \pm(d/2)\sqrt{1-(2x/d)^2} \sum_{n=0}^{N-1} C_n (2x/d)^{2n}, \quad (8)$$

Где C_0 – C_{N-1} - свободные параметры и d - коэффициент растяжения.

Параметрические уравнения (5), (6) и (8) были проверены подгонкой к реалистичным формам, полученным минимизации энергии деформации поверхности (уравнение (7) является частным случаем уравнения (8)). Аппроксимация была реализована последовательным применением методов DiRect (начальная оценка) и Левенберга-Марквардта (уточнение) [97,98]. Наилучшие результаты подгонки показаны на Рис. 15. Расширенная модель Фанга пятого порядка обеспечивает наилучшую подгонку в широком диапазоне параметров (V, SI, c_0), даже для сильно несферических частиц ($V = 90 \text{ fl}$, $SI = 0.55$, $c_0 = 0 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$) или ($V = 90 \text{ fl}$, $SI = 0.7$, $c_0 = -1.2 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$, $c_d = -3.76$), в то время как другие параметрические уравнение недостаточно хорошо подгоняют референсные профили, полученные решением системы дифференциальных уравнений (3). В связи с этим РМФ выбрана нами для дальнейшего рассмотрения. Точность аппроксимации была исследована в зависимости от числа членов в уравнении (8), при вариации N от 1 до 10, и было обнаружено, что $N = 5$ обеспечивает достаточную точность в широком диапазоне параметров (V, SI, c_0) (см. Рис. 16).

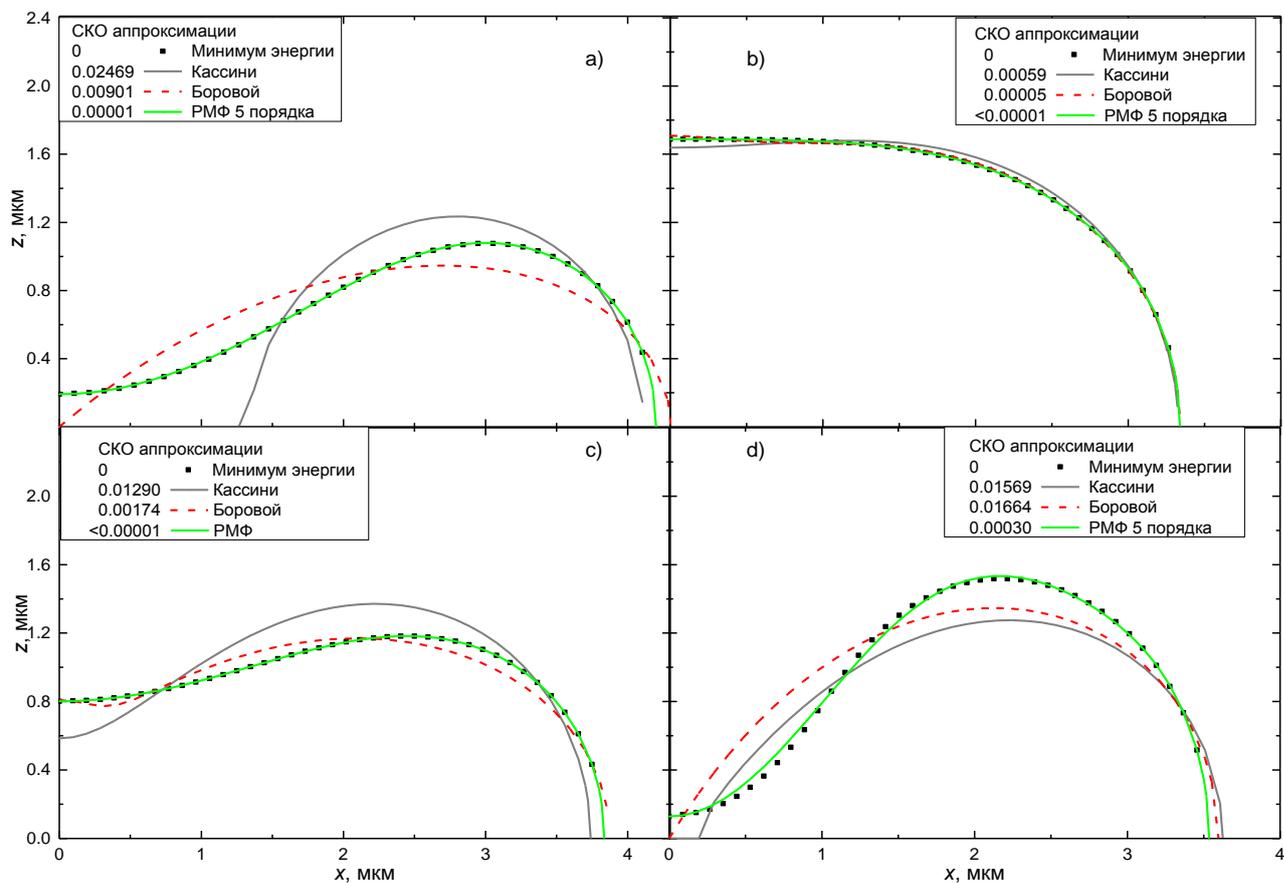


Рис. 15 Аналитические приближения профилей эритроцитов для различных параметров частиц в сравнении с профилями, полученными системой уравнений (3). а) $V = 90$ фл, $SI = 0.55$, $c_0 = 0$ мкм $^{-1}$; б) $V = 90$ фл, $SI = 0.9$, $c_0 = 0$ мкм $^{-1}$; в) $V = 90$ фл, $SI = 0.7$, $c_0 = 0$ мкм $^{-1}$; д) $V = 90$ фл, $SI = 0.7$, $c_0 = -1.2$ мкм $^{-1}$ ($c_d = -3.76$).

Точность аналитической аппроксимации зависит от конкретного приложения. Однако мы можем сравнить результаты с температурными флуктуациями поверхности эритроцита, измеренными с помощью методов оптической голографической микротомографии и равными 40 нм [33]. Можно заключить, что точность расширенной модели Фанга пятого порядка находится в пределах температурных флуктуаций для большинства форм (Рис. 16, а). Оставшиеся различия имеют незначительное влияние на индикатрисы светорассеяния (СКО

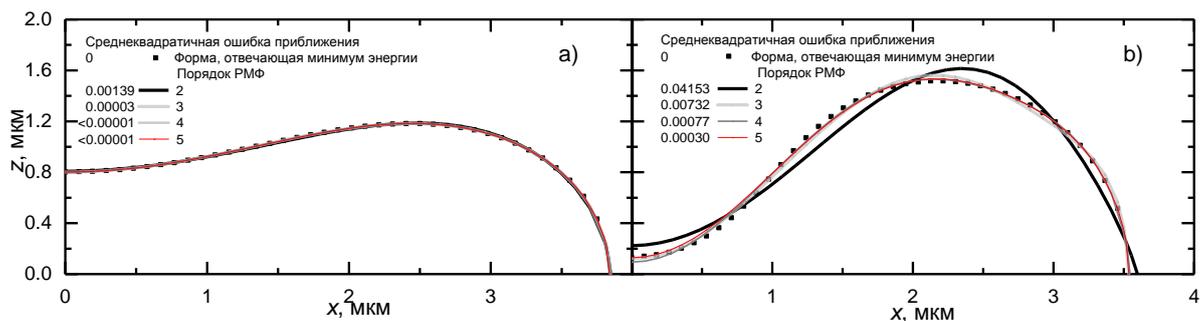


Рис. 16 Приближение профиля эритроцита расширенной моделью Фанга. а) $V = 90$ фл, $SI = 0.7$, $c_0 = 0$ мкм $^{-1}$; б) $V = 90$ фл, $SI = 0.7$, $c_0 = -1.2$ мкм $^{-1}$ ($c_d = -3.76$).

согласно уравнению (26) (стр. 74) составляет менее 0.1% квадрата нормы индикатрисы); следовательно, данная модель является достаточной для методов характеристики эритроцитов. Дополнительным преимуществом данной модели является возможность простого вычисления объёма эритроцита:

$$V = \frac{\pi d^3}{4} \sum_{n=0}^4 C_n B\left(n+1, \frac{3}{2}\right) = \frac{\pi d^3}{6} \left(C_0 + \frac{2}{5} C_1 + \frac{8}{35} C_2 + \frac{16}{105} C_3 + \frac{128}{1155} C_4 \right), \quad (9)$$

где B – бета-функция.

Для использования выбранной аналитической формулы мы построили плотную базу данных безразмерных форм в диапазоне параметров $SI \in [0.6, 1]$ и $c_d \in [-20, 5]$ (что соответствует области, показанной на Рис. 13), включающую все известные ветви решений. Затем для каждой формы мы определяем значения h_1/d и h_2/d . Устанавливая $C_0 = h_1/d$ (по определению) и подгоняя оставшиеся четыре коэффициента C_1 – C_4 к безразмерной форме с помощью линейной регрессии (фиксируя диаметр d). Таким образом мы получаем дискретную базу данных коэффициентов C_1 – C_4 , как функций от h_1/d и h_2/d . Область покрытия аргументов h_1/d и h_2/d показана на Рис. 17, соответствует используемым диапазонам SI и c_d и покрывает почти все формы, соответствующие минимуму энергии деформации. Значение C_1 – C_4 проиллюстрированы в разделе 3.3. Мы дополнительно упрощаем их использование с помощью полиномиальной аппроксимации:

$$C_k(h_1/d, h_2/d) = \sum_{i=0}^4 \sum_{j=0}^4 p_{i,j}^k (h_1/d)^i (h_2/d)^j, \quad (10)$$

где коэффициенты $p_{i,j}^k$ вычисляются с помощью линейной регрессии и представлены в 3.3, где также рассматривается вопрос точности аппроксимации.

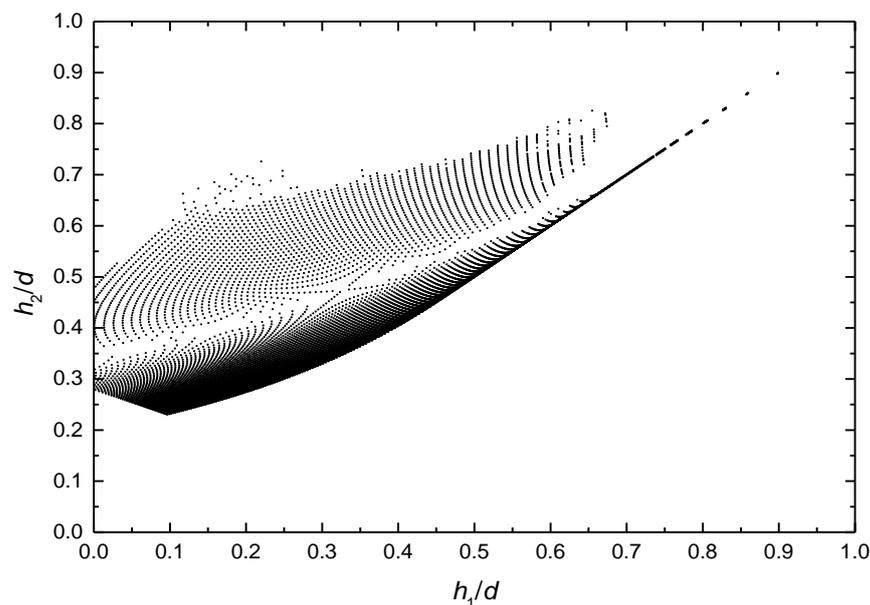


Рис. 17 Множество безразмерных форм эритроцитов в терминах параметров $(h_1/d, h_2/d)$, используемое для построения полиномиальных приближений коэффициентов C_1 – C_4 .

3.3. Аппроксимация формы эритроцита расширенной моделью Фанга

Аппроксимация формы эритроцита расширенной моделью Фанга (8) позволяет осуществлять быстрое аналитическое вычисление профиля эритроцита для заданных (d, h_1, h_2) без использования вычислительно сложной процедуры оптимизации. Коэффициенты модели C_k зависят только от безразмерных параметров h_1/d и h_2/d . Так как эта зависимость гладкая (см. Рис. 18), возможна аппроксимация разложением в ряд Тейлора от этих двух переменных (10). Линейная регрессия позволяет определить значения $p_{i,j}^k$, представленные в Таблице 3. Численные эксперименты показывают, что увеличение значащих цифр в представлении коэффициентов $p_{i,j}^k$ не приводят к значительному увеличению точности.

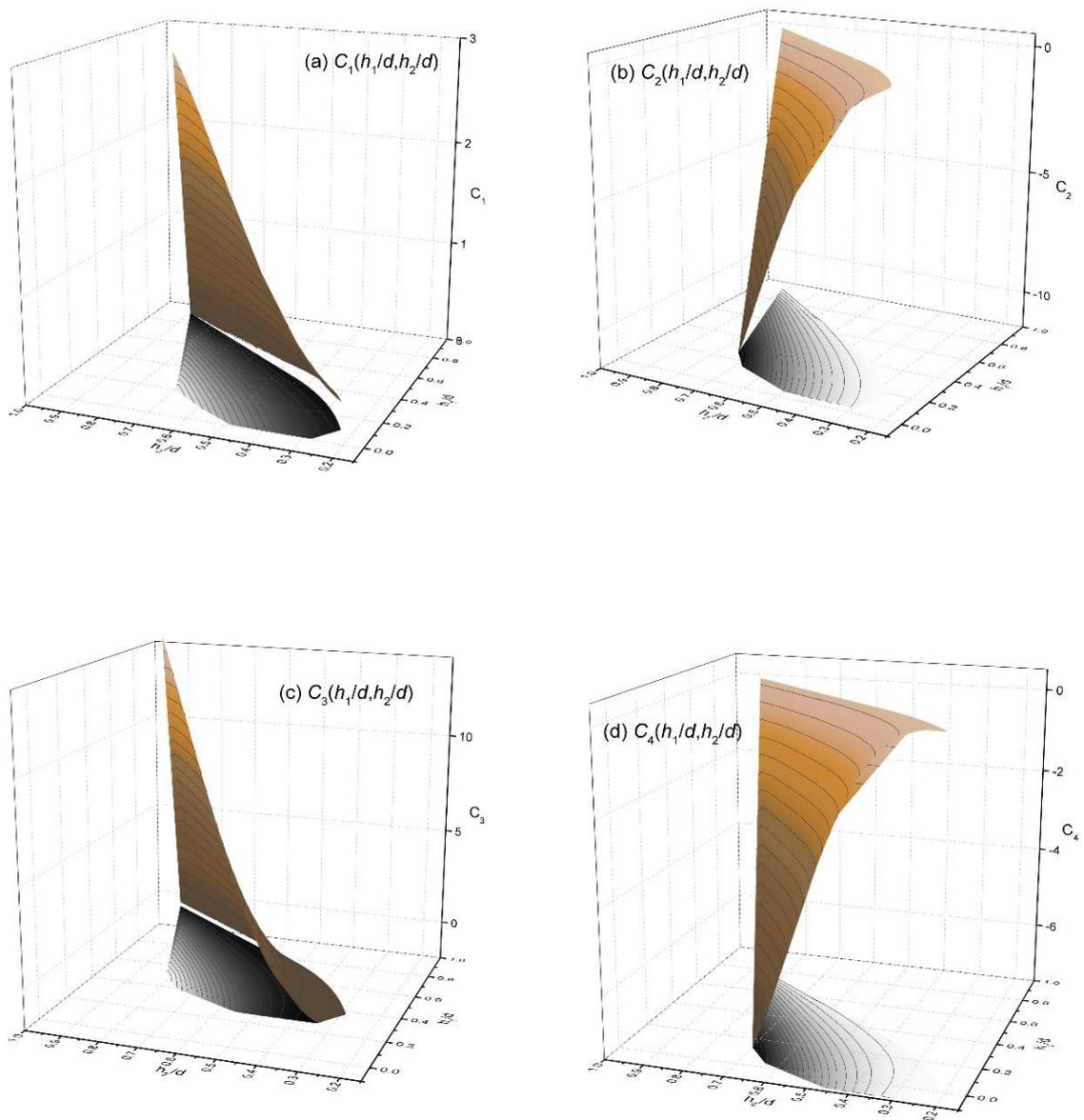


Рис. 18 Зависимости коэффициентов профиля эритроцита C_k от h_1/d и h_2/d , построенные по множеству форм из иллюстрации **Рис. 17**. Серым цветом показана проекция поверхности на плоскость.

Таблица 3 Коэффициенты полиномиальных приближений для коэффициентов C_k РМФ, см. уравнение (10).

$P_{i,j}^1 =$	-1.18	13.77	-54.38	126.35	-92.11
	2.75	-37.33	158.86	-410.04	398.16
	-8.41	67.05	-171.66	193.53	-346.65
	12.68	-326.51	1466.91	-1771.10	870.59
	146.67	-753.38	845.01	-153.50	-176.22
$P_{i,j}^2 =$	2.58	-31.40	170.93	-428.69	294.63
	-4.84	58.55	-384.40	1253.86	-1219.84
	7.69	-92.70	316.83	-661.36	1156.53
	-0.97	856.00	-3875.95	4887.05	-2564.75
	-537.21	2346.08	-2666.82	644.18	474.48
$P_{i,j}^3 =$	-3.05	46.27	-286.45	689.40	-450.49
	0.30	-28.96	498.56	-1856.77	1783.69
	-0.52	59.15	-372.93	1114.49	-1780.23
	-31.03	-1040.11	5002.64	-6629.98	3641.78
	789.63	-3318.45	3867.79	-1057.66	-637.67
$P_{i,j}^4 =$	1.60	-26.64	164.97	-377.16	238.25
	1.86	3.23	-260.57	986.71	-925.32
	-1.54	-17.94	206.74	-670.97	963.14
	23.85	461.55	-2360.87	3259.08	-1844.64
	-390.06	1629.77	-1933.89	552.47	316.68

Используя полученные приближённые значения C_k , была проверена точность определения профиля эритроцита на множестве 5000 форм со случайно выбранными параметрами ($h_1/d, h_2/d$) из того же диапазона, что и использовался для регрессии. Результаты аппроксимации представлены на Рис. 19. Отметим, что максимальные ошибки обнаруживаются для сильно несферичных частиц ($h_1 \ll h_2$) причиной чего являются модельные ошибки расширенной формулы Фанга, а также для дисковидных частиц ($h_1 = h_2$) источником ошибок которых являются ошибки представления C_k при полиномиальном разложении. Обе компоненты ошибок могут быть уменьшены увеличением числа членов в разложении уравнений (8) и (10) соответственно. Однако, выбранная степень аппроксимации является достаточной для большинства приложений.

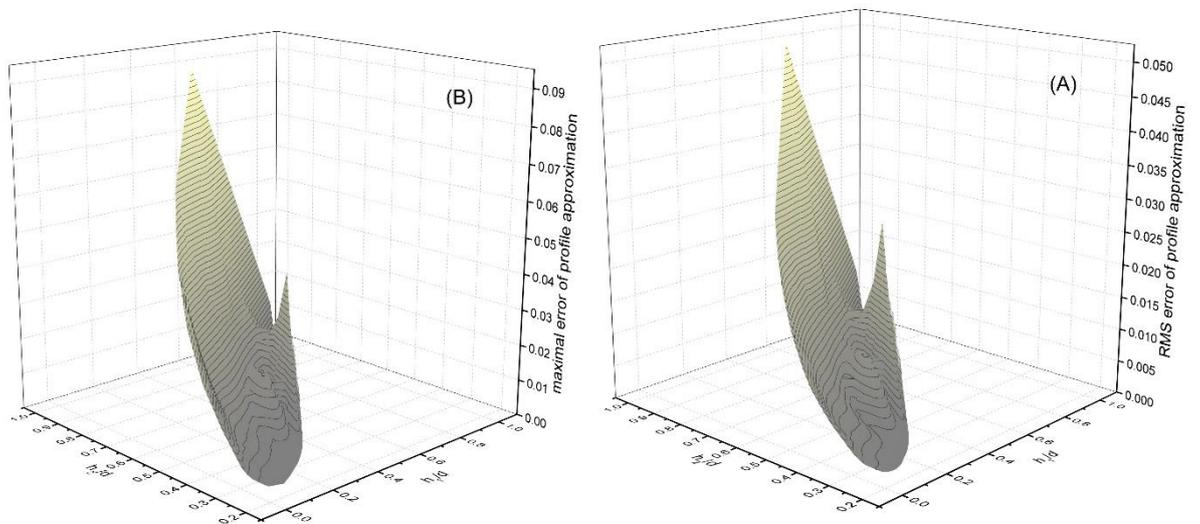


Рис. 19 Среднеквадратичные (А) и максимальные (В) ошибки аппроксимации профилей эритроцитов, при вычислении коэффициентов C_k из полиномиальной аппроксимации.

3.4. Заключение главы

Таким образом построено аналитическое приближение к модели формы нативного эритроцита, отвечающая минимуму энергии деформации поверхности. Модель задаётся тремя параметрами: d , h_1 , h_2 , соотношение которых h_1/d , h_2/d описывает безразмерную форму клетки, а d является масштабирующим коэффициентом. Данное аналитическое приближение может быть использовано для задач, требующих быстрого вычисления формы с высокой точностью. В частности, данное приближение использовано для решения обратной задачи светорассеяния при расчёте интерполяционной базы данных.

Глава 4. Методы решения обратной задачи светорассеяния

4.1. Постановка задачи

Прямая задача светорассеяния в текущей постановке состоит в определении индикатрисы светорассеяния по заданным параметрам частицы. Формально это описывается отображением $f: X \rightarrow Y$, где $X \subset \mathbb{R}^p$ – область определения параметров частицы, $Y \subset \mathbb{R}^d$ – подпространство индикатрис и $d \geq p$. Предполагается, что f – C^1 -гладкое и однозначное отображение, значение которого может быть получено (с необходимой точностью) для любой точки в X . В частности, для сферической частицы отображение реализуется с помощью теории Ми [60], что обеспечивает аналитическое решение в терминах бесконечных рядов. Особенности теории Ми обсуждаются в [90]. Расчёт прямой задачи светорассеяния для осесимметричной частицы может быть реализован с помощью метода Т-Матриц [99] или метода дискретных источников [67]. Для частицы произвольной формы может использоваться метод дискретных диполей [100]. Типичные индикатрисы светорассеяния для сферических частиц, определённые описанным ниже уравнением (22) (стр. 49), показаны на Рис. 20.

Обратная задача светорассеяния состоит в определении параметров модели частицы по известной индикатрисе светорассеяния.

Обозначим $x^\dagger = f^{-1}(y)$, $y \in f(X)$. Свойства f влекут непрерывность f^{-1} . Для использования экспериментальных данных с шумом, расширим f^{-1} на всё \mathbf{R}^d

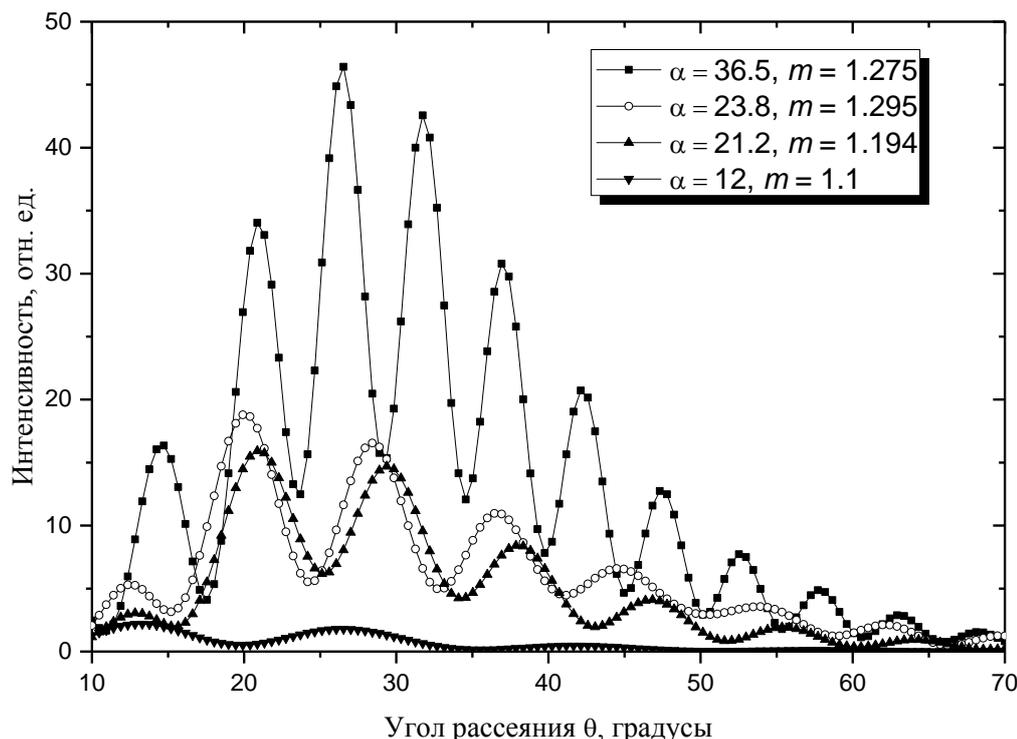


Рис. 20. Индикатрисы светорассеяния от сферических частиц для нескольких размерных параметров α и показателей преломления m .

$$g : \mathbf{R}^d \rightarrow X, x^\delta = g(y) = \operatorname{argmin}_{x \in X} \|y - f(x)\|, \quad (11)$$

Таким образом, обратная задача является оптимизационной задачей в L_2 -норме в пространстве индикатрис. Однако, заметим, что могут быть использованы и другие нормы. Заметим также, что предполагается корректность обратной задачи при отсутствии экспериментальных шумов. Это подробнее обсуждается в [90], включая численный анализ якобиана f .

4.2. Метод интерполяции по базе данных

Данный метод решения обратной задачи предполагает предварительный расчёт базы данных индикатрис для интерполяции обратного отображения g (определения характеристик частицы) с требуемой точностью. При этом важным вопросом является плотность и структура базы данных. В случае, если прямая задача решается достаточно быстро (например, для сферических частиц прямая задача светорассеяния численно решается за миллисекунды), возможно плотное заполнение базы данных, потенциально приводящее к высокой точности интерполяции. Создание плотной базы данных для частиц более сложной формы будет вычислительно сложной задачей в связи с увеличением числа параметров модели и времени расчёта прямой задачи. Кроме того, на этапе интерполяции перебор узлов базы данных в случае высокой плотности будет занимать значительное время. Напротив, для слишком редкой базы данных даже линейная межузловая интерполяция может быть неприменима в связи с недостаточным описанием особенностей прямого отображения.

Интерполяция методом ближайшего соседа далее используется в данной работе и может быть определена, как метод (дискретной) глобальной оптимизации по базе данных

$$g_1 : \mathbf{R}^d \rightarrow X_1, x_1 = g_1(y) = \operatorname{argmin}_{x \in X_1} \|y - f(x)\|, \quad (12)$$

где $X_1 \subset X$ – конечное множество точек базы данных (значения параметров).

Погрешность решения может быть определена следующим образом

$$\|x^\dagger - x_1\| \leq \|x^\dagger - x^\delta\| + \|x^\delta - x_1\|,$$

где $\varepsilon^\delta = \|x^\dagger - x^\delta\|$ относится к ошибкам, связанным с шумами, $\varepsilon^d = \|x^\delta - x_1\|$ относится к ошибкам дискретизации. Обсуждение экспериментального шума лежит вне границ данной главы, поэтому предполагаем, что возмущения экспериментальных данных малы, т.е. индикатриса лежит в «близком соседстве» с $f(X)$, в котором g остаётся непрерывной.

4.3. Метод случайного заполнения базы данных

Данный метод расчёта базы данных подразумевает равномерное распределение характеристик частиц в базе данных. Преимуществом данного метода является возможность создания базы данных произвольной плотности, в частности при расширении диапазонов границ параметров базы данных. Также при построении базы данной со случайно структурой возможно применение статистических методов оценки погрешностей решения обратной задачи [83]. Недостатками данного метода заполнения базы данных является невозможность учёта чувствительности выходных сигналов (индикатрис светорассеяния) к различным характеристикам частиц. Данный метод был успешно использован для характеристики тромбоцитов, микрочастиц крови, бактерий и жировых частиц молока по светорассеянию [11,12,14,15].

4.4. Оптимизационный метод для решения обратной задачи Ми, основанный на построении адаптивного алгоритма расчёта интерполяционной базы данных

Для расчёта интерполяционной базы данных, оптимальной с точки зрения плотности, качества решения обратной задачи и времени расчёта предлагается итерационный алгоритм заполнения базы данных, основанный на анализе прямого отображения.

4.4.1. Алгоритм построения интерполяционной базы данных

На первом этапе область параметров нормализуется в единичный гиперкуб для уравнивания влияния параметров, отличающихся по абсолютной величине. Предложенный алгоритм является адаптивным и основан на последовательном разбиении (согласно правилу, описанному ниже) области параметров на прямоугольные области (гиперпрямоугольники), центры которых составляют базу данных. Новые точки добавляются в базу данных в результате разбиения ячеек, составляющих базу данных, на гиперпрямоугольники меньшего размера. В частности, мы использовали структуру ячеек и правила разбиения аналогично методу глобальной оптимизации DiRect [81]. Согласно данным правилам, ячейка (гиперпрямоугольник) разбивается вдоль своего наибольшего размера на три равных части. При этом центр центральной части совпадает с центром исходной ячейки и только две точки вместе с их образами f (индикатрисами) добавляются в базу данных. Если существует несколько наибольших размеров гиперпрямоугольника (гиперквадратное сечение), разбиение производится вдоль каждого из них последовательно.

Структура, использованная в данной работе, выбрана с точки зрения удобства использования и простоты реализации. Более того, обращение с параметрами осуществляется

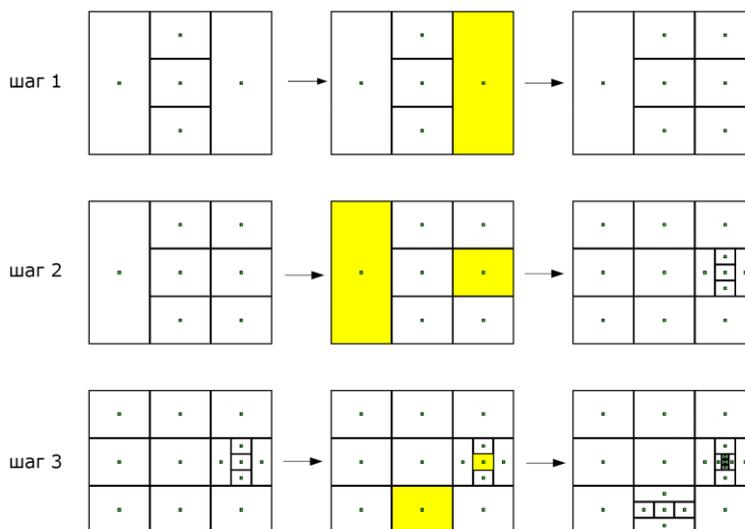


Рис. 21 Пример последовательности трёх шагов построения интерполяционной базы данных разбиением пространства параметров на гиперпрямоугольники. Структура разбиения аналогична используемой методом DiRect. Изображение заимствовано из [101].

почти независимо друг от друга, что является преимуществом, когда параметры имеют разную физическую природу, типичные размеры и степень влияния на индикатрису. Однако, алгоритм, описанный ниже может использовать и другие структуры, например, симплексы [87].

Определим два понятия соседства для некоторой точки $x \in X$:

- 1) $N(x)$ – дискретное множество соседей точки базы данных; центры тех гиперпрямоугольников, которые касаются гранями гиперпрямоугольник с центром в x .
- 2) Шар

$$B(x, \varepsilon) = \{u \in X \mid |u^j - x^j| < \varepsilon^j, j = 1, \dots, p\}. \quad (13)$$

Верхний индекс j относится к j -тому компоненту вектора в X , ε - p -компонентный вектор, определяющий априорно заданную плотность базы данных. Уравнение (13) определяет шар в метрике L_∞ с предварительным масштабированием параметров (деление их покомпонентно на ε). Эта норма выбрана в противоположность к L_2 -норме в связи с возможной несоизмеримостью различных параметров (что обсуждалось ранее). Однако, алгоритм может включать любые другие нормы при соответствующем изменении (13).

База данных представляет собой множество пар $(x_1, f(x_1))$, $x_1 \in X_1$, и заполняется итеративно. На каждом шаге происходит проверка условия для каждого элемента x_1 базы данных:

$$\forall x_1 \in X_1 \quad \forall u \in N(x_1) \quad \forall v \in X_1 \setminus B(x_1, \varepsilon) \quad \|f(u) - f(x_1)\| < \|f(v) - f(x_1)\|. \quad (14)$$

Если данное условие не выполняется, гиперпрямоугольник, центр которого совпадает с x_1 разбивается на гиперпрямоугольники меньшего размера. Во-первых, данное условие влечёт, что $\forall x_1 \in X_1 \quad N(x_1) \subset B(x_1, \varepsilon)$, т.е. база данных должна быть достаточно плотной относительно расстояния между соседними точками в пространстве параметров в сравнении с заданной точностью ε . Во-вторых, условие (14) устанавливает, что индикатрисы всех соседних к x_1 точек базы данных должны быть ближе, чем индикатрисы всех несоседних точек вне большего шара $B(x_1, \varepsilon)$.

Построение базы данных начинается с произвольного разбиения области параметров X на гиперпрямоугольники. Структура разбиения может быть выбрана различной, однако удобн (например, разбиением исходного пространства параметров на 3 части по каждому параметру). Область X сама по себе не должна обязательно быть прямоугольной, они может быть любой связной областью, составленной из гиперпрямоугольников, удовлетворяя структуре метода DiRect [81].

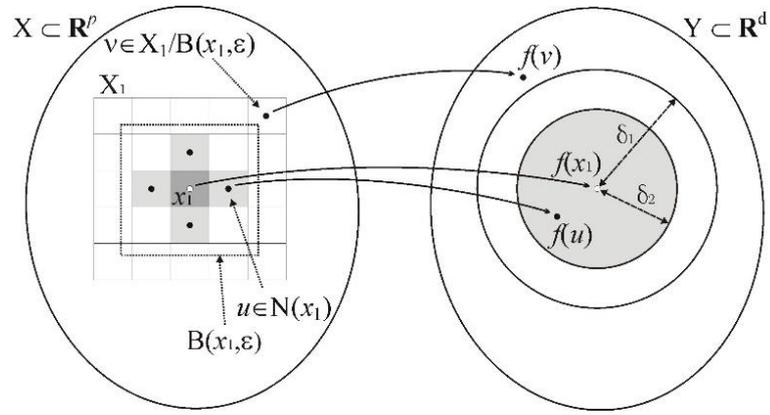


Рис. 22 Схематическая иллюстрация определений (15)

Определим дополнительно несколько метрик в пространстве индикатрис:

$$\begin{aligned} \delta(x) &= \inf_{u \in X \setminus B(x, \varepsilon)} \|f(u) - f(x)\|, \quad \delta_1(x) = \min_{u \in X_1 \setminus B(x, \varepsilon)} \|f(u) - f(x)\|, \\ \delta_2(x) &= \max_{u \in N(x)} \|f(u) - f(x)\|. \end{aligned} \quad (15)$$

где $\delta(x)$ радиус погрешностей в пространстве индикатрис, $\delta_1(x)$ радиус ошибок в пространстве индикатрис по базе данных, $\delta_2(x)$ расстояние в пространстве индикатрис до наиболее удалённого соседа (по параметрам). Схематическая интерпретация определения (15) показана на Рис. 22.

Тогда условие (14) эквивалентно

$$\forall x_1 \in X_1 \quad \delta_2(x_1) < \delta_1(x_1), \quad (16)$$

которое должно удовлетворяться для точек базы данных после завершения процедуры построения. Последнее условие также отображено на Рис. 22.

Формально алгоритм построения базы данных может быть выражен следующим образом:

Нормализовать область параметров в единичный гиперкуб

Сформировать начальные точки базы данных X_1

Do

{

Определить множество точек S , которые не удовлетворяют условию (14)

For all $x \in S$

{

Разделить гиперпрямоугольник, соответствующий x , на гиперпрямоугольники меньшего размера

}

} while ($S \neq \emptyset$)

For all $x_1 \in X_1$ вычислить $\delta_2(x_1)$.

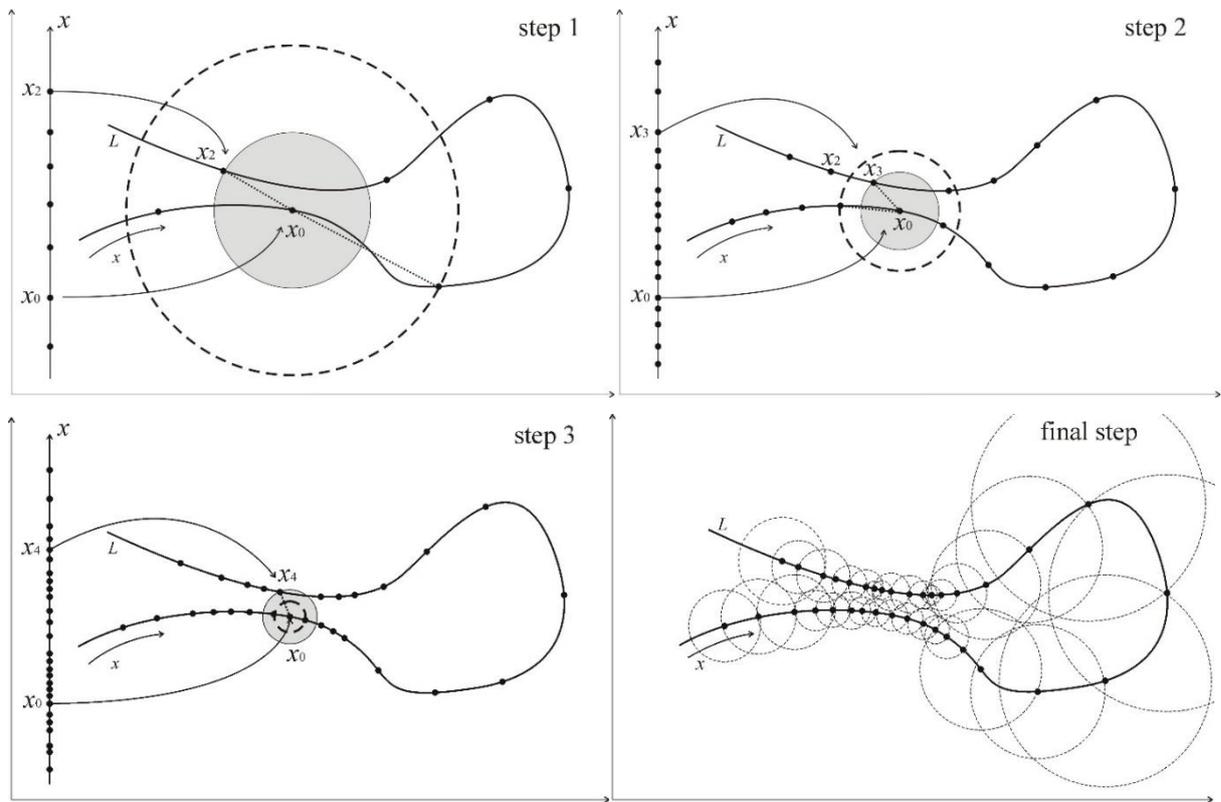


Рис. 23 Схематическая иллюстрация предложенного алгоритма адаптивного построения интерполяционной базы данных для отображения $L: X \rightarrow \mathbf{R}^2$, $X \subset \mathbf{R}^1$. Закрашенный круг описывает наименьшее расстояние до несоседа $\delta_1(x)$, окружность с пунктирным контуром описывает наибольшее расстояние до соседа $\delta_2(x)$.

Несколько шагов процедуры представлены на Рис. 23 для упрощённой модели отображения $L: X \rightarrow \mathbf{R}^2$, $X \subset \mathbf{R}^1$. Данное отображение является параметризацией кривой L от одной переменной x . Здесь значение ε выбрано так, что для базы данных на шаге №1 (step 1) геометрические размеры $N(x)$ и $B(x, \varepsilon)$ приблизительно равны. Вокруг $L(x_0)$ изображены два круга: закрашенный круг радиусом $\delta_1(x_0)$ и пунктирный круг радиусом $\delta_2(x_0)$. В данном конкретном случае $\delta_1(x_0)$ такое же, как и наименьшее расстояние до не соседей. На шаге №1 $\delta_1(x_0) < \delta_2(x_0)$, что приводит к уточнению базы данных. На шаге №2, $(\delta_2(x_0) - \delta_1(x_0))$ становится меньше, чем на предыдущем шаге, но оставаясь при этом положительным. На шаге №3, в результате дополнительного разбиения, $\delta_1(x_0) > \delta_2(x_0)$, т.е. условие (16) выполнено. После финального шага (Рис. 23) условие (16) эквивалентно утверждению, что пунктирный круг вокруг любой точки не содержит точек базы данных из удалённых частей кривой.

Теорема 1:

Если f - C^1 -гладкое и взаимно-однозначное отображение, то описанный выше алгоритм построения базы данных сходится за конечное число шагов.

Доказательство:

Обозначим $L(x_i)$ – гиперпрямоугольник, окружающий узел x_i , $l(x_i)$ – максимальный размер стороны гиперпрямоугольника $L(x_i)$, $x^* = \arg \min_{x \in X_1 \setminus B(x_0, \varepsilon)} \|f(x_0) - f(x)\|$ – точка вне шара радиуса ε , с наиболее близким к $f(x_0)$ образом. Тогда $\|x^* - x_0\| > \varepsilon$ по построению.

Докажем теорему от противного. Допустим алгоритм построения базы данных не сходится. Тогда возможны два варианта:

а) Существует x_0 такой, что для любого сколь угодно плотного разбиения окружающего x_0 гиперпрямоугольника (утонения базы данных) выполнено $\delta_2(x_0) > \delta_1(x_0)$, либо б) существует последовательность точек разбиения x_i таких, что $x_i \in L(x_{i-1})$, $\delta_2(x_i) > \delta_1(x_i)$. Так как $l(x_i) = \frac{1}{3^i} \rightarrow 0$, то данная последовательность сходится и $\exists x_0 = \lim_{i \rightarrow \infty} x_i$ и $\delta_2(x_0) \geq \delta_1(x_0)$.

В обоих случаях существует такая последовательность x_i^{**} граничных точек гиперпрямоугольника $L(x_i)$, что $x_0 = \lim_{i \rightarrow \infty} x_i^{**}$.

Согласно непрерывности f^{-1} : $\forall \varepsilon_1 > 0 \exists \delta > 0$, что если $\|f(x_0) - f(x^*)\| < \delta$, то $\|x_0 - x^*\| < \varepsilon_1$. А согласно непрерывности f : $\forall \delta > 0 \exists N \in \mathbb{N}$, что если $n > N$, то $\|x_0 - x_n^{**}\| < \frac{1}{n}$ и $\|f(x_0) - f(x_n^{**})\| < \delta$. Так как $\delta_2(x_0) \geq \delta_1(x_0)$, то $\|f(x_0) - f(x^*)\| \leq \|f(x_0) - f(x_n^{**})\|$. Следовательно, $\forall \varepsilon > 0 \exists N \in \mathbb{N}$, что если $n > N$, то $\|x_0 - x_n^{**}\| < \frac{1}{n}$ и $\|x_0 - x^*\| \leq \varepsilon$. Но это противоречит предположению, что $\|x_0 - x^*\| > \varepsilon$.

Теорема доказана.

С практической точки зрения искомым свойством g_1 является достаточная точность на всём $f(X)$:

$$\forall x \in X \quad g_1(f(x)) \in B(x, \varepsilon). \quad (17)$$

Графическая интерпретация последнего условия представлена на Рис. 24.

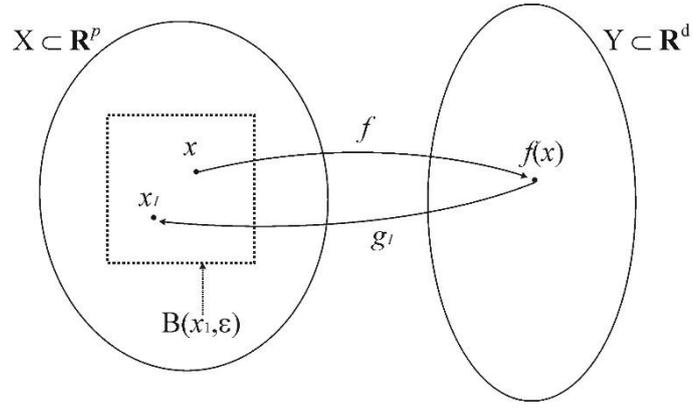


Рис. 24 Графическая иллюстрация условия (17)

Однако, мы не знаем ни значений f вне X_1 , ни константы Липшица. Это приводит к тому, что любое условие на базу данных не может быть ни необходимым, ни достаточным для (17). Другими словами, условие (16) или подобное может определять свойства g_1 на $f(X_1)$, в то время как условие (17) или любое подобное практическое требование всегда удовлетворяется на $f(X_1)$, так как $\forall x_1 \in X_1 g_1(f(x_1)) = x_1$. Тем не менее, определим

$$Z(x) = \{ x_1 \in X_1 \mid \|f(x_1) - f(x)\| < \delta_1(x) \}, \quad (18)$$

которое является минимальным множеством точек, которые должны быть удалены из X_1 , чтобы изменить g_1 для нарушения (17) в x . По построению, $\forall x_1 \in X_1 x_1 \in Z(x_1) \subset B(x_1, \varepsilon)$. Тогда условие (14) эквивалентно $N(x_1) \subset Z(x_1)$. Таким образом, после последнего шага процедуры построения, база данных становится избыточной в смысле, что требуется удалить по крайней мере x и $N(x)$ из X_1 для нарушения условия (17) в точке x .

Когда процесс разбиения завершается, можно оценить чувствительность индикатрис к характеристикам частицы, используя величины, определённые условиями (15). Все эти величины положительны в связи с непрерывностью g . Более того, $\delta_1(x)$ является дискретной аппроксимацией $\delta(x)$, которая в свою очередь является важной мерой, гарантирующей определённую точность обратного отображения:

$$\forall u, x \in X \quad \|f(u) - f(x)\| < \delta(x) \Rightarrow u \in B(x, \varepsilon). \quad (19)$$

Искомое свойство $\delta_1(x)$ является подобным утверждением

$$\forall u, x \in X \quad \|f(u) - f(x)\| < \delta_1(x) \Rightarrow u \in B(x, \varepsilon) \quad (20)$$

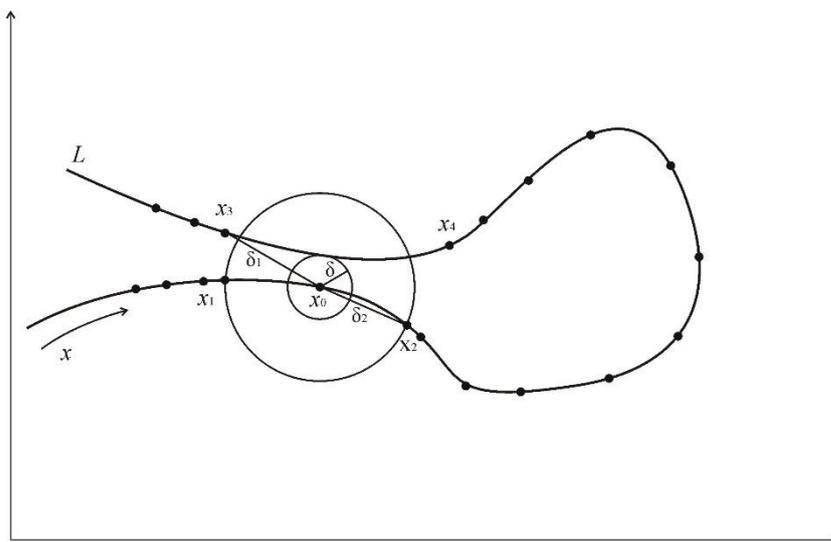


Рис. 25 Пример базы данных, которая удовлетворяет условию (14), но не условию (20)

которое, однако, не может быть доказано в связи с дискретной природой доступной информации (см. обсуждение выше). Другими словами, не существует гарантии, что $\delta_2(x) < \delta(x)$, хотя неравенство может выполняться для многих точек базы данных. Пример такого случая показан на Рис. 25. Не требуются дополнительные разбиения около x_0 согласно условию (16), потому что $\delta_2(x_0) < \delta_1(x_0)$. Однако, $\delta(x_0)$ меньше, чем и $\delta_2(x_0)$, и $\delta_1(x_0)$, поэтому для некоторых точек x на дуге между x_3 и x_4 $\|f(x) - f(x_0)\| < \delta_2(x_0)$ не влечёт за собой, что $x \in B(x_0, \epsilon)$.

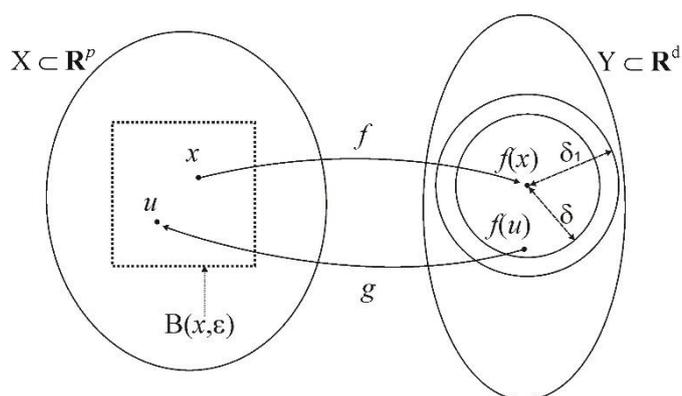


Рис. 26 Схематичная иллюстрация условий (19) и (20)

Схематичная интерпретация условий (19) и (20) показана на Рис. 26.

Существует несколько способов усилить условие (16) для лучшего обнаружения случаев, подобных показанных в Рис. 25. Например:

- рассмотреть не только точки базы данных по определению $\delta_2(x)$, но также симплексы, построенные на любом множестве соседствующих точек;
- заменить неравенство в (16) на $2\delta_2(x) < \delta_1(x)$.

Однако, как обсуждалось ранее, сильные предположения, например, о производных f , требуются для придания строгости данным методам, так что мы оставим их для будущих исследований.

Значения δ_2 могут быть использованы для проверки надёжности решения обратной задачи. Если решение таково, что

$$\|y - f(g_1(y))\| \leq \delta_2(g_1(y)), \quad (21)$$

то оно *вероятно* означает, что настоящее решение $g(y)$ принадлежит $B(g_1(y), \varepsilon)$, беря во внимание ограничения описанные выше. Схематичное объяснение последнего представлено на Рис. 27.

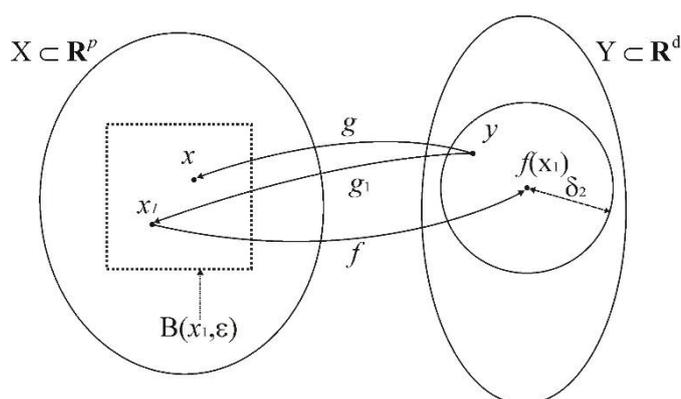


Рис. 27 Схематичная иллюстрация условия (21)

Однако, нарушение условия (21) не всегда влечёт за собой, что решение сильно ошибочно. Так что ожидается, что условие (21) является полезным только в статистическом смысле, когда применяется к большому массиву данных. Его применимость к экспериментальным данным с шумом ещё более спорно, потому что из этого следует, что $y \neq f(g(y))$ и следовательно $\|y - f(g_1(y))\|$ более не является прямой мерой близости $g(y)$ и $g_1(y)$. Возможна коррекция условия (21) для облегчения данной проблемы, но это требует точного знания структуры экспериментального шума, которое лежит вне задач данной работы. Так что при обработке экспериментальных данных далее, мы представляем результаты с и без использования условия (21) в качестве порогового.

4.4.2. Реализация метода

4.4.2.1. Построение баз данных

В данной главе строится база данных для однородных сферических частиц. Индикатриса, измеряемая на СПЦ может быть промоделирована, как равномерная дискретизация функции

$$I(\theta) = \frac{w(\theta)}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\phi S_{11}(\theta, \phi). \quad (22)$$

в диапазоне $\theta \in [10^\circ, 70^\circ]$, используя $k = 128$ точек. S_{11} – элемент матрицы рассеяния Мюллера [60], θ и ϕ – полярный и азимутальный углы соответственно, $w(\theta)$ – весовая функция [83]

$$w(\theta) = \frac{1^\circ}{\theta} \exp[-2 \ln^2(\theta/54^\circ)] \quad (23)$$

Вычисление одиночного значения отображения f для шаров, используя теорию Ми [60], занимает несколько миллисекунд на персональном компьютере при использовании процессора частотой 2.4 МГц. Заметим, что индикатриса измеряется для одной фиксированной длины волны.

Сферическая частица характеризуется $p = 2$ параметрами: размерный параметр $\alpha \in [5, 40]$ и показатель преломления (относительно окружающей среды) $m \in [1.05, 1.3]$. Размерный параметр α связан с радиусом r соотношением $\alpha = 2\pi r n_0 / \lambda$, где длина волны λ падающего света составляет 660 нм, а показатель преломления среды (физиологический раствор) m_0 равен 1.337. Следующие задаваемые величины точности выбраны из практических соображений: $\delta\alpha = 5$ и $\delta m = 0.1$, после нормализации в единичный гиперкуб преобразующиеся в $\varepsilon = (\varepsilon^1, \varepsilon^2) = (0.14, 0.4)$. Процесс заполнения базы данных начинается с равномерной сетки размером 9×9 , после чего запускается итерационный процесс «алгоритм построения базы данных», описанный в разделе 4.4.1. Данный процесс сходится и приводит в конечном счёте к базе данных S с числом точек N_{db} равным 9366. Соответствующее множество P_1 показано на Рис. 28 (С) с наложенным прямоугольником размером $\varepsilon^1 \times \varepsilon^2$.

Также было исследовано влияние выбранных параметров модели, а также задаваемой точности ε на размер базы данных. Для этого были построены 5 дополнительных баз данных. Параметры всех баз данных представлены в Таблице 4, а сами базы данных показаны на Рис. 28. Базы данных А и В отличаются от С отсутствием требований точности определения параметров m и α соответственно. Это эквивалентно установкой соответствующего компонента параметра ε равным 1. База данных D является более плотной версией базы данных С с повышенными требованиями по точности обоих параметров. Сферическая частица может быть параметризована также следующей парой параметров: размерным параметром α и набегом фазы

$\rho = 2\alpha(m - 1) \in [0.5, 24]$. Было показано, что эти параметры показывают лучшую корреляцию с индикатрисой, чем α и m [75]. Базы данных E и F построены в координатах (α, ρ) , однако можно заметить, что только половина области параметров покрывается точками базы данных, что приближённо является образом исходной прямоугольной области в координатах (α, m) . Так как $\delta\rho = 2[\alpha\delta m + (m - 1)\delta\alpha]$, одному значению $\delta\rho$ могут соответствовать несколько параметров $\delta\alpha$ и δm . Если диапазоны изменения последних параметров взяты, как и для базы данных C, то $\delta\rho$ изменяется от 1.5 до 11. Эти предельные значения $\delta\rho$ были взяты для построения баз данных F и E соответственно.

Таблица 4 Параметры баз данных построенных с помощью адаптивного алгоритма.

Индекс базы данных	$\delta\alpha$	δm or $\delta\rho$	ε^1	ε^2	N_{db}
A	5	$\delta m = 0.25$	0.14	1	3254
B	35	$\delta m = 0.1$	1	0.4	8664
C	5	$\delta m = 0.1$	0.14	0.4	9366
D	2	$\delta m = 0.05$	0.057	0.2	16074
E	5	$\delta\rho = 11$	0.14	0.47	1725
F	5	$\delta\rho = 1.5$	0.14	0.064	7769

Заметим, что выбор параметров $\delta\alpha$, δm и $\delta\rho$ имеет большое влияние на структуру и размер базы данных. Ожидаемо размер базы данных обратно коррелирует с ε . Более того, для всех баз данных плотность значительно меняется по всему множеству P , что подтверждает необходимость применения адаптивной процедуры построения.

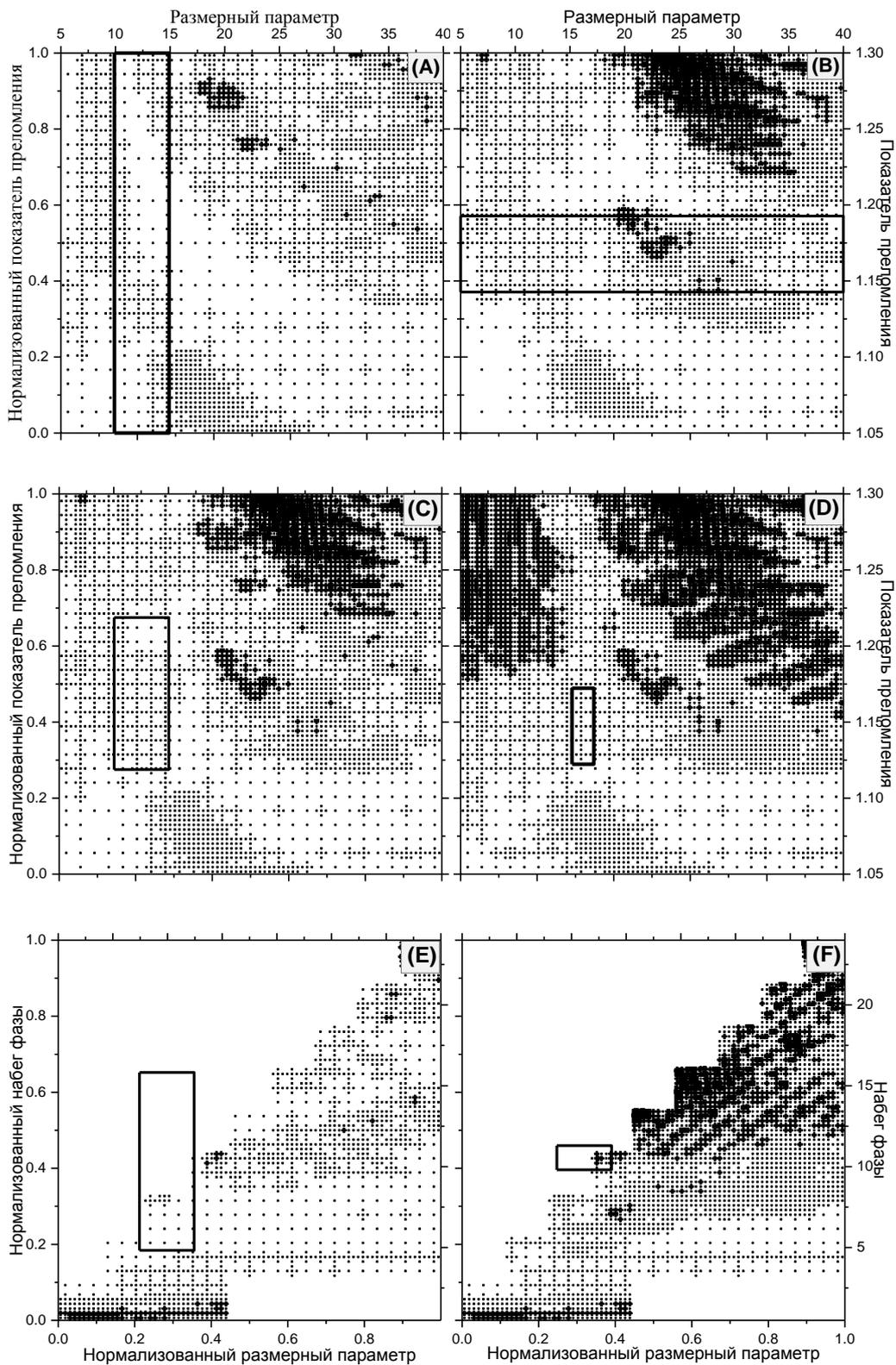


Рис. 28 Иллюстрация структуры построенных баз данных в пространстве параметров частиц. Базы данных А – D построены в терминах размерного параметра α и показателя преломления m , в то время как Е и F, в терминах α и параметра набег фазы ρ . Наложенные прямоугольники иллюстрируют требуемую точность ε . Два масштаба, показанные для каждого параметра соответствуют исходным и нормализованным значениям.

4.4.3. Тестирование баз данных

4.4.3.1. Расчётные данные для шаров.

Построенные базы данных были протестированы на множестве, содержащем 1000 теоретических индикатрис однородных шаров с параметрами, принадлежащими равномерному распределению в P . Для всех баз данных использовалось пороговое значение (21), т.е. данные, для которых результат не прошёл тест были отброшены. Однако, мы также проверили базу данных C без порогового значения; соответствующие результаты обозначены, как C_1 . Число индикатрис (из 1000), прошедших пороговый фильтр обозначается N_{th} . Тестовые данные также

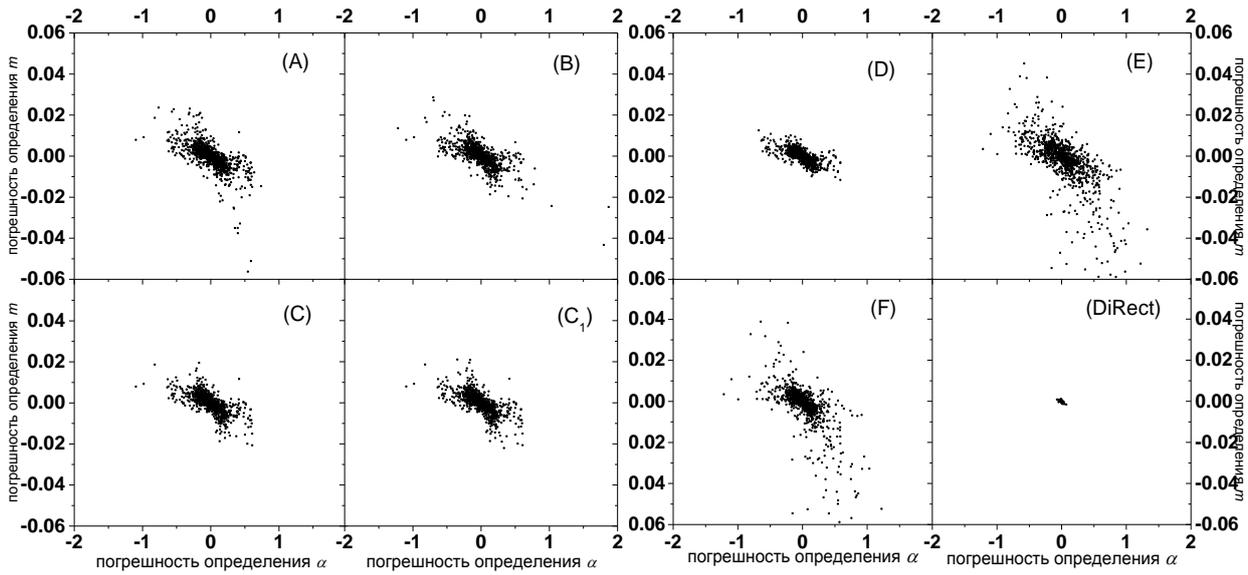


Рис. 29 Погрешности определения параметров, используя базы данных А – F и DiRect алгоритм, при обработке 1000 теоретических индикатрис от шаров со случайными параметрами из области P (подробности в тексте)

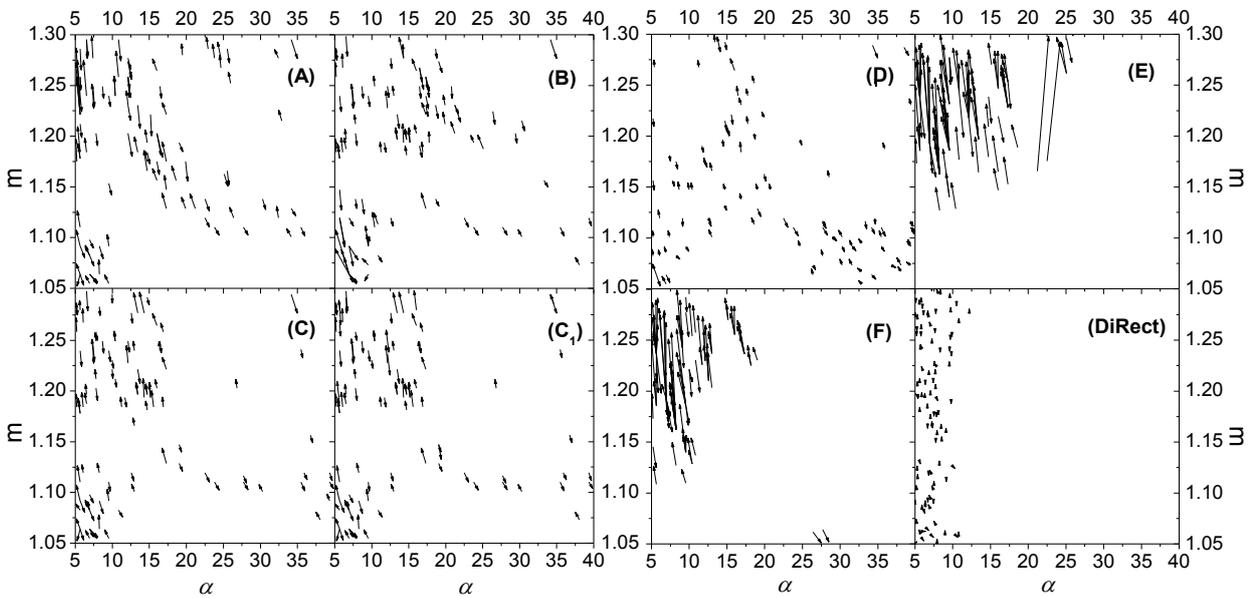


Рис. 30 Погрешности определения параметров аналогично данным **Рис. 29**: иллюстрация 100 наибольших погрешностей в виде стрелок, основание и острие которых соответствует истинному и вычисленному значениям соответственно.

были обработаны при помощи алгоритма DiRect. Это метод глобальной оптимизации, который в данной работе используется, как референсный. При этом его вычислительная сложность намного больше метода баз данных. Результаты обработки, включающие среднюю абсолютную ошибку (MAE) α и m и значения N_{th} , представлены в Таблице 5 наряду с результатами остальных случаев. Непосредственное заключение по данной таблице состоит в том, что предлагаемый метод примерно в 100 раз быстрее точного метода глобальной оптимизации (DiRect) для каждой индикатрисы. Заметим, что скорость метода DiRect сравнима со скоростью других методов глобальной оптимизации [79,80]. Поэтому метод, предложенный в данной работе также значительно быстрее других опубликованных методов характеристики сферических частиц по индикатрисе светорассеяния.

Распределение ошибок для данного случая показано на Рис. 29. Ошибки метода DiRect пренебрежимо малы, что и ожидалось для незашумлённых данных. Заметим, что $N_{th} \geq 966$ для этих данных; следовательно, почти не существует различий между C и C_1 . Переходя от A к D ошибки уменьшаются при увеличении N_{db} . Обе базы данных E и F , построенные в координатах (α, ρ) , в общем, менее точны, чем другие базы данных сравнимых размеров (хотя нет прямой аналогии с базой данных E). Эти заключения также подтверждаются значениями MAE, показанными в Таблице 5. Другим общим заключением является значительная обратная зависимость ошибок по α и m , что подробно обсуждается в [90]. Для баз данных E и F некоторые точки с наибольшими погрешностями (менее 2% от общего количества точек) не показаны на Рис. 29 в связи с их выбросом за границы графиков.

На Рис. 30 показаны 100 наибольших (в терминах $|\delta\alpha| + |\delta m|$) погрешностей для каждой базы данных более подробно, включая истинные и вычисленные значения параметров. В частности, это показывает, что наибольшие погрешности для баз данных E и F имеют место для малых α и больших m и, в основном, вдоль оси m .

4.4.3.2. Возмущённые теоретические данные для шара.

Индикатрисы, использовавшиеся в предыдущем тестировании, были подвержены возмущению аддитивным гауссовым шумом. Амплитуда σ шума выбрана независимо для каждой индикатрисы случайно из диапазона $[0, 0.2]$, умноженного на среднеквадратическое значение соответствующей индикатрисы.

Эти модифицированные индикатрисы были обработаны всеми базами данных и методом DiRect. Распределение полученных погрешностей и подробное изображение 100 максимальных погрешностей показано на Рис. 31 и Рис. 32 соответственно. Для баз данных C , E и F и для метода DiRect некоторые точки выпали из границ изображения на Рис. 31. Погрешности для всех баз

данных, кроме C_1 сравнимы с незашумлёнными данными при отбрасывании 80% входных данных. Более того, N_{th} коррелирует с погрешностями и обратно коррелирует с N_{db} , что может быть объяснено отношением всех этих значений к δ_2 . Если пороговое значение не используется, ошибки получаются больше примерно в два раза (например, сравнивая C_1 и C). Это означает, что погрешности дискретизации (отображение g_1 , реализованное с помощью базы данных C_1 , без шума) и погрешности, связанные с шумом (отображение g , реализованное с помощью метода DiRect, с шумом) на самом деле влияют на результаты обработки базой данных C_1 . Тот факт, что база данных D является более точной, чем метод DiRect обманчиво, так как погрешности первого метода определяются по меньшему множеству индикатрис, прошедших фильтрацию (21).

Аргументы за и против использования порогового значения во многом зависят от конкретного приложения и структуры шума. В частности, важным открытым вопросом является вопрос: является ли N_{th} индикатрис репрезентативным для всего множества измерений (см. также раздел 4.4.3.3). Однако, некоторые виды пороговых значений очевидно желанны, когда шум вполне большой, чтобы делать отображение g разрывным. В этом случае даже точная оптимизация может приводить к различным частям многообразия $f(X)$ сравнимых с положением истинного значения. Следовательно, полученные погрешности параметров могут быть сравнимы с размером всей области X . Это то, что показано на Рис. 22 (DiRect). Данная задача может частично быть облегчена определением (вместо одиночной ближайшей точки) функции распределения вероятности на X для каждой индикатрисы, которая может быть найдена с помощью байесовского подхода [83]. Однако, информация, полученная от таких зашумлённых данных, остаётся очень незначительной.

В случае Рис. 32 оптимальное пороговое значение должно отфильтровывать только около 20 индикатрис, что приводит к большим погрешностям как для метода DiRect, так и для базы данных C_1 . Так что пороговое значение (21), которое отфильтровывает около 800 индикатрис является слишком ограничительным. Мы оставляем задачу оценки оптимального порогового значения для будущих исследований, хотя байесовский подход [83] может дать ответ на данный вопрос.

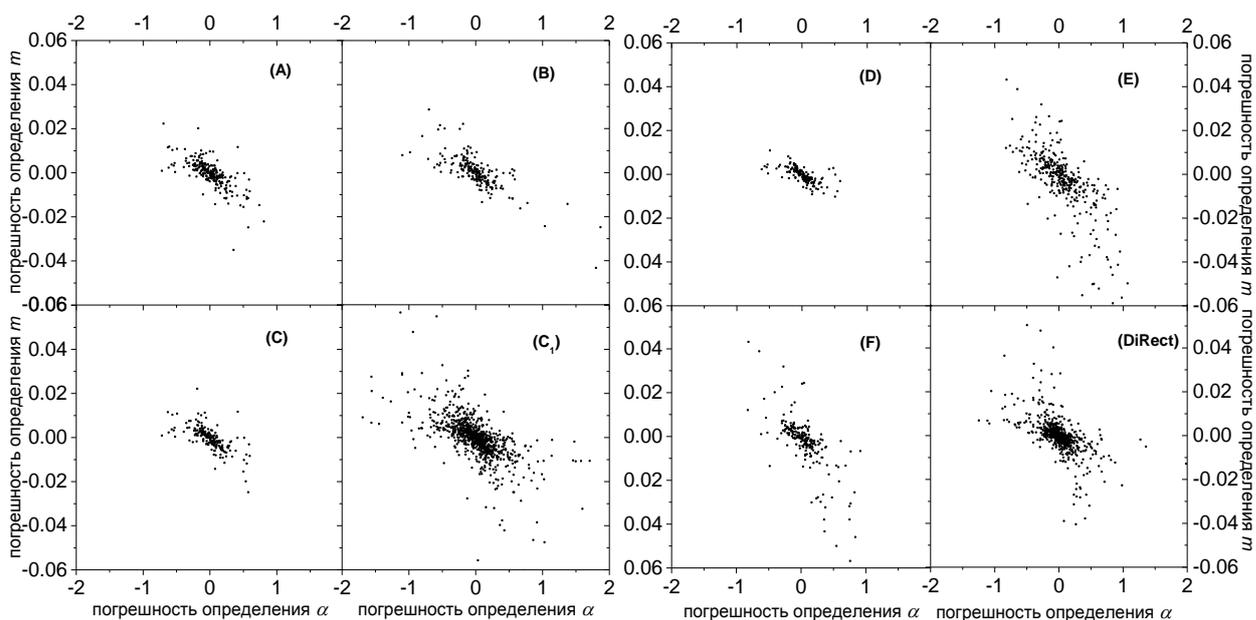


Рис. 31 Результаты, аналогичные Рис. 29, но для случая возмущения шумом индикатрис шаров.

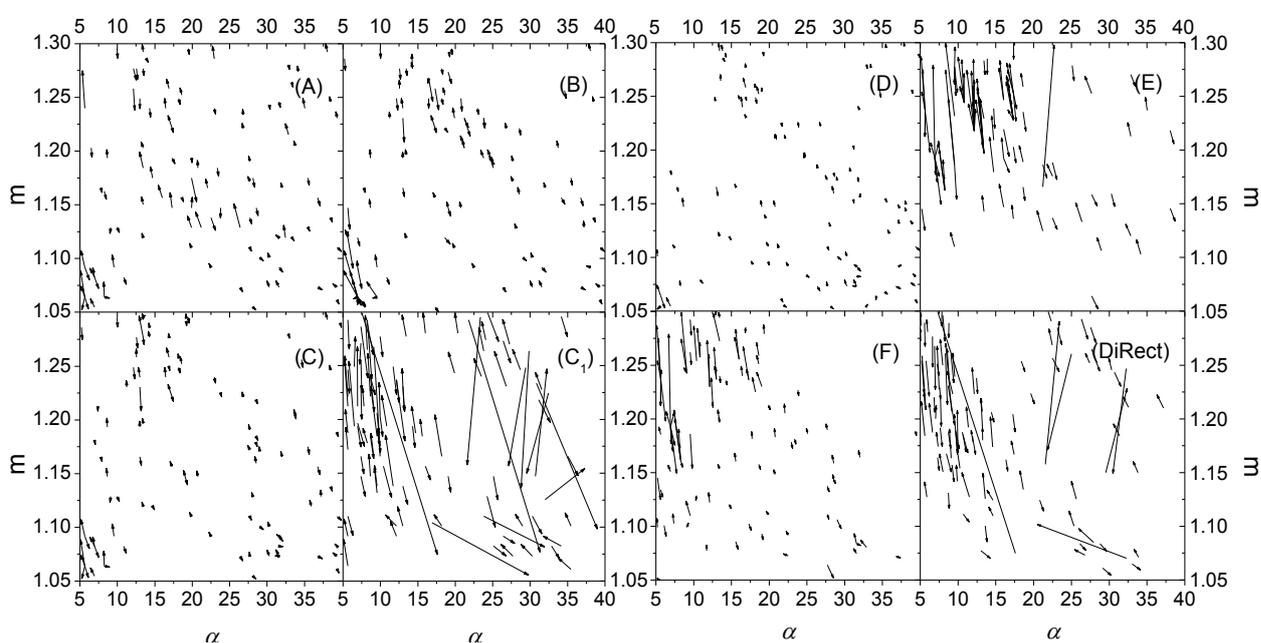


Рис. 32 Результаты, аналогичные Рис. 30, но для случая возмущения шумом индикатрис шаров.

4.4.3.3. Точные теоретические данные для сфероидов.

Также была исследована устойчивость решения обратной задачи к деформации частиц. Такие модельные ошибки всегда присутствуют в приложениях, когда используется простая модель. Каждая сфера в исходном тестовом множестве была заменена на сфероид эквивалентного объёма, соотношение осей которого случайно выбрано в диапазоне $[0.9, 1.1]$. Ориентация каждого сфероида (его ось симметрии) по отношению к падающему излучению выбрана случайно из диапазона $[0^\circ, 90^\circ]$. Вычисление индикатрис сфероидов реализовано с помощью метода T-Матриц [102].

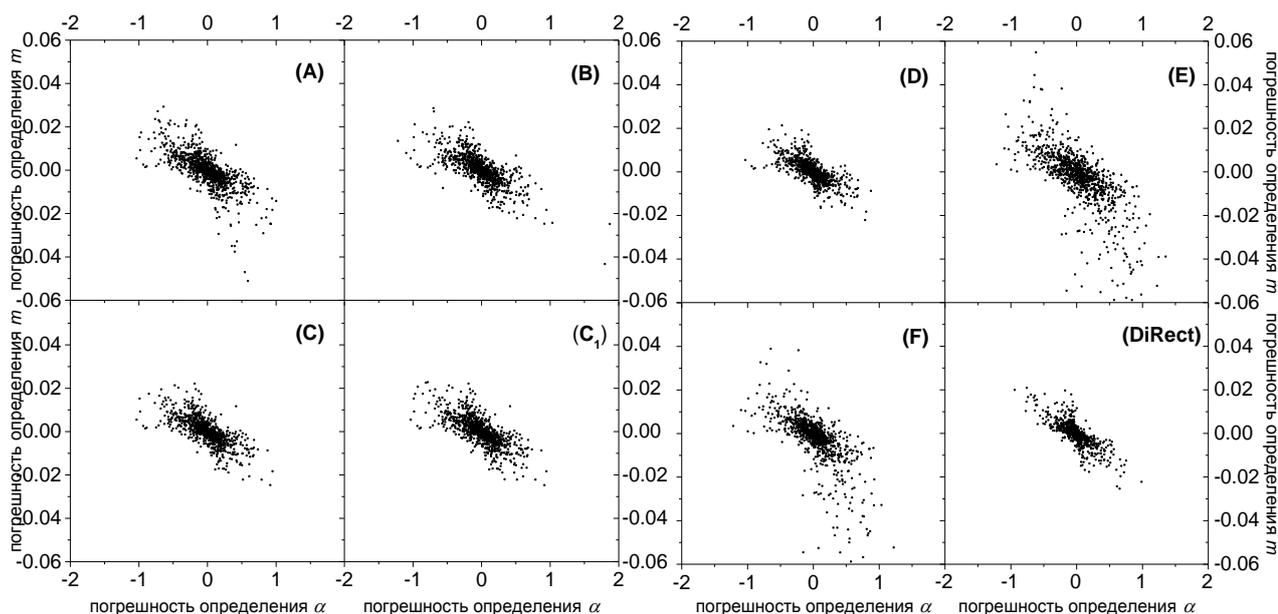


Рис. 33 Результаты, аналогичные Рис. 29, но для индикатрис сфероидов

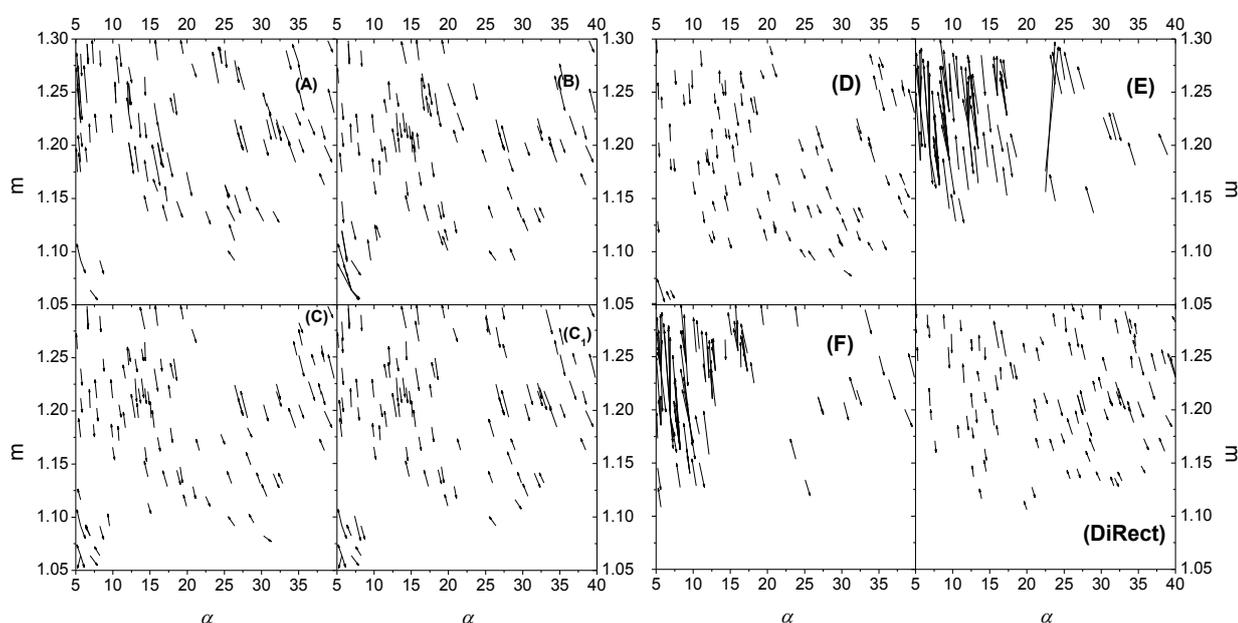


Рис. 34 Результаты, аналогичные Рис. 30, но для индикатрис сфероидов

Таблица 5 Сводная таблица результатов обработки теоретических и экспериментальных данных для сферических частиц. MAE (Mean Absolute Error) – средняя абсолютная ошибка.

		A	B	C	C ₁	D	E	F	DiRect
N_{db}		3254	8664	9366	9366	16074	1725	7769	–
Время, ^a мс		7	18	19	19	36	5	15	1550
Идеальный шар	MAE(α)	0.17	0.16	0.14	0.14	0.11	0.26	0.18	0.002
	MAE(m), 10^{-2}	0.44	0.39	0.34	0.35	0.24	0.94	0.64	0.01
	N_{th}	988	973	984	1000	982	972	966	1000
Шар (индикатрисы искажены шумом)	MAE(α)	0.19	0.22	0.17	0.30	0.15	0.28	0.20	0.16
	MAE(m), 10^{-2}	0.44	0.50	0.39	0.71	0.28	1.11	0.77	0.41
	N_{th}	234	213	193	1000	148	357	219	1000
Идеальный сфероид	MAE(α)	0.23	0.22	0.20	0.20	0.17	0.31	0.24	0.12
	MAE(m), 10^{-2}	0.56	0.51	0.46	0.49	0.39	1.03	0.77	0.32
	N_{th}	976	904	913	1000	872	969	914	1000
Эксперимент	mean(α)	23.65	23.42	23.35	23.36	23.66	23.36	23.40	23.86
	mean(m)	1.193	1.196	1.194	1.195	1.194	1.205	1.197	1.207
	N_{th}	238	115	90	751	149	541	325	751

^a Время вычисления одной процедуры обращений (значения g_1).

Эти индикатрисы были обработаны с помощью всех баз данных и методом DiRect. Распределение полученных погрешностей и детальный обзор ста наибольших погрешностей показаны на Рис. 33 и Рис. 34 соответственно. Здесь опять для баз данных E и F незначительное число точек выпало из границ диаграммы на Рис. 33. В целом, эффект деформации формы на индикатрисы меньше, чем гауссов шум, описанный в предыдущем случае. Результаты метода DiRect являются надёжными для всех входных индикатрис, и соответствующее MAEs примерно в 1.5 раза меньше, чем для шаров с шумом (Таблица 5). Также, большинство индикатрис проходят пороговый барьер для всех баз данных ($N_{th} \geq 872$). Вот почему MAEs для баз данных приблизительно равно результатам для случая идеальных шаров (без шума) с постоянной добавкой (0.06 для α и 0.0012 для m). Можно заключить, что все базы данных и метод DiRect являются устойчивыми к деформациям частицы, описанным в начале раздела.

4.4.3.4. Экспериментальные данные полистирольных микросфер.

На последнем этапе база данных была протестирована на экспериментальных данных. Индикатрисы полистирольных микросфер (Invitrogen C37253) в физиологическом растворе были измерены на СПЦ [4]. Угловой диапазон, длина волны и показатель преломления среды были такими же, как указаны в разделе 4.4.2.1. Согласно данным производителя, среднее α микросфер

равняется 25 с коэффициентом вариации 4%. Относительный показатель преломления полистирола для данной длины волны равен 1.185 [103], в то время, как 1.183 дал наилучшее приближение для диффузного отражения и пропускания суспензии с 1 мкм полистирольными микросферами [104].

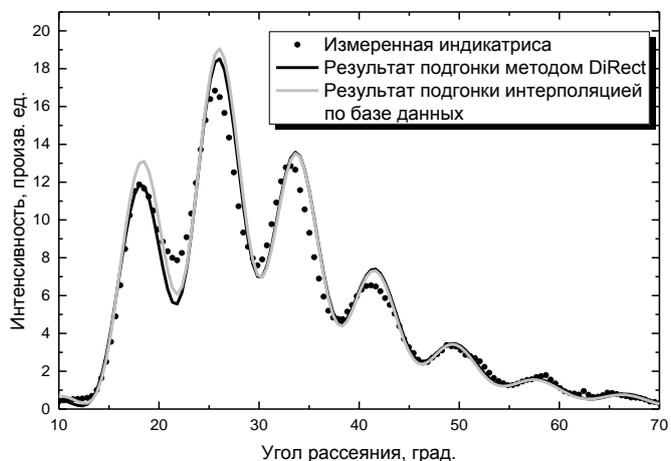


Рис. 35 Типичные экспериментальная индикатрисы полистирольной микросферы и соответствующие теоретические индикатрисы, найденный с помощью DiRect ($\alpha = 23.27$, $m = 1.2022$) и базы данных C ($\alpha = 23.36$, $m = 1.1966$)

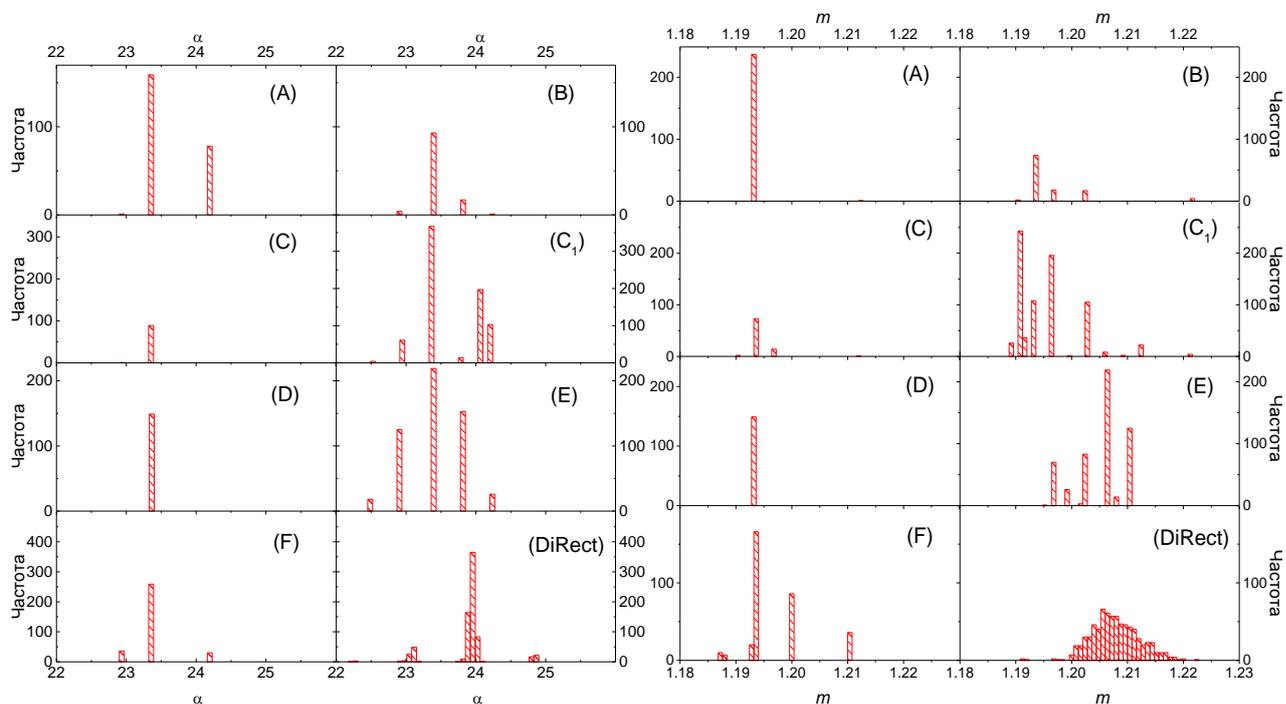


Рис. 36 Распределения проб полистирольных микросфер по параметрам α и m , индикатрисы от которых получены на СПЦ и обработаны с помощью баз данных А–F и методом DiRect.

Распределение по пробе параметров α и m показаны на Рис. 36. Соответствующие средние значение и N_{th} представлены в Таблице 5. Результаты, полученные методом DiRect в большинстве случаев согласуются с референсными значениями, описанными ранее. Однако, существует систематическое отличие, связанное с возмущением экспериментальных индикатрис, вызванное изменением скорости потока и положением частицы в потоке пробы СПЦ. Результаты всех баз данных достаточно точны в пределах экспериментальных ошибок. Более того, среднее значение α сходится к значению, полученному DiRect с увеличением N_{db} . Однако, среднее m по-видимому сходится к значению 1.194, которое отличается от результата, полученного методом DiRect (1.207) и фактически ближе к референсному значению. Однако все эти различия значительно меньше требуемой точности ε , и, следовательно, могут рассматриваться, как особенность процедуры дискретизации. В отличие от всех предыдущих тестовых случаев, N_{th} показывает небольшую корреляцию с N_{db} , подчёркивая необходимость более изоцированного порогового значения.

Типичная экспериментальная индикатрисы показана на Рис. 35 наряду с соответствующими результатами подгонки методом DiRect и базы данных S . Можно заметить, что погрешность дискретизации базы данных (различие между двумя подогнанными индикатрисами) меньше, чем экспериментальный шум (искажение).

4.5. Заключение главы

Предложен адаптивный метод создания неоднородной базы данных для аппроксимации нелинейного обратного отображения с заданной погрешностью без использования оценки производных прямого отображения. Интерполяция методом ближайшего соседа по базе данных используется в качестве приближения обратного отображения. Новизной данного метода является обнаружение узлов базы данных, близких по норме в пространстве индикатрис, но сильно отличных в пространстве параметров, и последующего дополнительного расчёта узлов базы данных в соседстве с обнаруженным. Такое поведение прямого отображения часто имеет место, например, в обратных задачах светорассеяния и значительно ухудшает производительность многих других методов при решении данных задач.

Предложенный метод был протестирован на решении обратной задачи светорассеяния для непоглощающих однородных шаров, с помощью индикатрис светорассеяния, измеренных на СПЦ. Результаты согласуются с референсным методом глобальной оптимизации DiRect как для теоретических данных (с шумом и без), так и для экспериментальных. Более того, база данных была протестирована при наличии модельных ошибок, связанных с деформацией шара. Метод содержит ряд параметров, контролирующих построение и использование базы данных: множество характеристик частицы, нормы в пространстве аргументов и образов, форму

элементарных ячеек, на которые разбивается пространство параметров (гиперпрямоугольников, симплексов и т.д.) и алгоритм последовательного разбиения, и пороговое значение, свидетельствующее о точности решения. Настройка данных параметров для максимизации скорости и точности обратного отображения остаётся открытой проблемой.

Реализация данного метода построения базы данных осуществлена в среде LabView 2012.

Глава 5. Выбор метода моделирования светорассеяния эритроцитами человека

Среди рассмотренных в разделе 1.3 методов моделирования светорассеяния одиночных эритроцитов, наиболее перспективными являются метод дискретных диполей (МДД) и метод дискретных источников (МДИ). В данной главе производится сравнение угловой зависимости элемента матрицы Мюллера S_{11} рассчитанного обоими методами, при вариации характеристик клеток в биологических диапазонах. Особое внимание направлено на ограничения обоих методов при увеличении размерного параметра эритроцитов.

5.1. Методы расчёта

5.1.1. Метод дискретных источников

Теория МДИ и численная схема подробно описана в работах [69,105]. Здесь кратко даётся описание метода. МДИ использует идею приближенного решения уравнений Максвелла, которое строится представлением электромагнитного поля конечной линейной комбинацией электрических и магнитных полей мультиполей, распределённых внутри рассеивающего объекта. В случае эритроцита, дискретные источники (ДИ) расположены в комплексной плоскости, сопряжённой с осью симметрии частицы. Эта процедура подробно описана в [106].

Согласно построению приближённого решения, которое принимает во внимание осесимметричность тела и расположение ДИ в комплексной плоскости, сопряжённой с осью симметрии, согласование условий переноса на поверхности частицы преобразуется во множество одномерных задач, определенных на образующих частицы. Было обнаружено, что более надежные результаты могут быть получены использованием обобщенного метода согласованных точек и псевдорешения переопределённой системы линейных уравнений [106].

МДИ позволяет контролировать точность результатов вычислений с помощью двух шагов: (а) контроль внутренней сходимости результатов увеличением числа точек согласования и ДИ и (b) проверкой остатков в норме наименьших квадратов на граничных условиях на поверхности частицы. При расчёте число точек согласования, где определяются амплитуды ДИ может увеличиваться пока не будет достигнута максимальная точность результата. При этом число ДИ обычно в 2-4 раза меньше, чем число точек согласования.

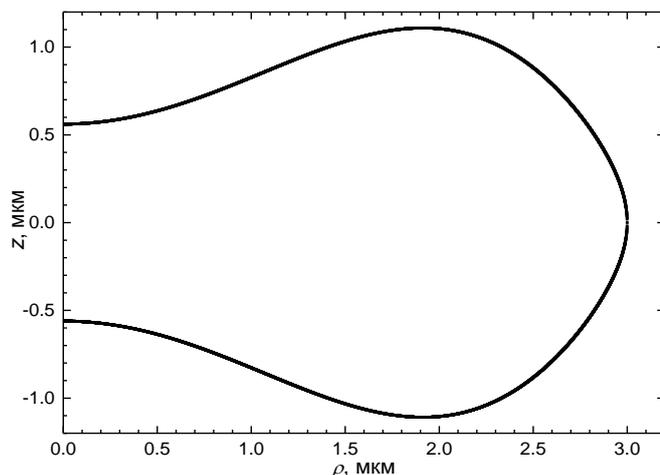


Рис. 37 Профиль эритроцита диаметром 6 мкм.

5.1.2. Метод дискретных диполей

Метод дискретных диполей (МДД) основан на объёмной дискретизации частицы и таким образом применим к частицам произвольной формы и внутренней структуры. Подробное описание метода может быть найдено в [107,108]. Основным ограничением МДД является его вычислительная сложность, которая увеличивается пропорционально числу объёмных элементов дискретизации (диполей). В качестве численной реализации МДД был использован код ADDA v.0.79 [100], с помощью которого возможны параллельные вычисления на компьютерном кластере [109]. Для корректного моделирования клеток крови достаточно дискретизации ADDA, соответствующую 10-11 диполям на длину волны. МДД является общим методом, поэтому симметрия частицы не используется за исключением одной особенности: когда частица инвариантна повороту частицы на 90° к направлению падения падающего света, полная матрица Мюллера может быть получена из расчёта только для одной поляризации падающего поля [109]. В этом случае расчёт в два раза быстрее общего случая.

5.2. Оптическая модель эритроцита

В данной главе МДД и МДИ применены для расчёта светорассеяния одиночных эритроцитов, форма которых соответствует среднему эритроциту и определена в Fung et al. [41]:

$$z(\rho) = R \sqrt{1 - \left(\frac{\rho}{R}\right)^2} \left(C_0 + C_1 \left(\frac{\rho}{R}\right)^2 + C_2 \left(\frac{\rho}{R}\right)^4 \right), C_0 = 0.187, C_1 = 1.035, C_2 = -0.774,$$

где z и ρ - цилиндрические координаты и $D = 2R$ – диаметр эритроцита (единственный параметр модели). Конкретный случай $D = 6 \mu\text{m}$ показан на Рис. 37. Диаметр эритроцита обычно изменяется от 6 до $10 \mu\text{m}$, а вещественная часть показателя преломления для длины волны $\lambda = 0.66 \mu\text{m}$ принимает значения от 1.39 до 1.41. Мнимая часть показателя преломления

составляет около 10^{-4} [110], поэтому в данной работе ей можно пренебречь. Мы также не рассматриваем влияние мембраны эритроцита в связи с небольшой толщиной (7 нм) [111].

Мы сравниваем методы расчёта, используя следующие характеристики эритроцитов. Диаметр изменяется от 6 до 8 мкм, верхний предел определён текущими возможностями МДИ. Мы рассматриваем эритроциты в физиологическом растворе (показатель преломления 1.337). Для рассматриваемых значений относительного показателя преломления m - 1.03 и 1.06, и длина волны в среде составляет $\lambda = 0.4936$ мкм (0.66 мкм в вакууме). Размерный параметр варьируется от 28 до 38. Падающее излучение распространяется вдоль оси z , и вычисляется зависимость S_{11} от угла рассеяния θ в плоскости xz . Ориентация эритроцитов связанная с осью симметрии – вдоль либо оси z или оси x (угол Эйлера β равен 0° или 90° соответственно).

Так как МДД и МДИ основаны на дискретизации объёма и площади соответственно, они работают с различными описаниями модели частицы. Чтобы сделать наши результаты независимыми от описания формы мы используем один профиль, содержащий 100 узлов, предполагая линейную интерполяцию между узлами. МДИ использует профиль в неизменной форме, в то время, как МДД строит объёмную дискретизацию эритроцита на основе профиля вращения.

5.3. Результаты и обсуждение

На Рис. 38 — Рис. 41 представлен $S_{11}(\theta)$, рассчитанный с помощью МДД и МДИ с различными значениями диаметра, показателя преломления и угла ориентации. Согласие между двумя методами в основном хорошее, однако оно сильно зависит от параметров задачи. Общая тенденция такова, что различия увеличиваются с увеличением θ , D , β и m . Показатель преломления имеет меньшее воздействие на различия, когда изменяется в пределах биологической вариабельности. Для $\beta = 0^\circ$ согласие хорошее вдоль всего диапазоне θ , когда $D \leq 7$ мкм, но значительное расхождение (по порядку величины) для $90^\circ \leq \theta \leq 120^\circ$, когда $D = 7.5$ мкм. Для $\beta = 90^\circ$ и $D \leq 7.5$ мкм согласие - хорошее только до $\theta = 60^\circ - 70^\circ$. Наибольший тестируемый диаметр (8 мкм) даёт значительное расхождение для всех случаев, исключая рассеяние в передние углы (до 15°).

Так как мы сравниваем два потенциально неточных метода, желательно иметь некоторое контрольное решение для независимой оценки погрешности обоих методов. Однако, насколько нам известно, не существует принципиально более точных методов для эритроцитов. Более того, точность МДИ не может быть улучшена, используя ещё больше вычислительных ресурсов. Для сплюснутых тел с большим диаметром МДИ требует вычисления большого числа гармоник Фурье. Например, для эритроцита диаметром 6 мкм и возбуждающей длины волны

$\lambda = 0.4936$ мкм необходимо 45 гармоник. Это приводит к численной нестабильности для больших углов ориентации β . Например, погрешности вычисления индикатрис для всех диаметров эритроцитов, представленных в работе, не превышает 0.2 % для $\beta = 0^\circ$. В то же время невязка для $\beta = 90^\circ$ меняется от 3% для $D = 6$ мкм до 8% для $D = 8$ мкм. Хотя невязка может быть использована как внутренняя проверка качества, она является только приближённой мерой точности конечных показателей рассеяния.

Поэтому, мы использовали дополнительные вычислительные ресурсы для повышения точности МДД, основываясь на доказанном свойстве сходимости МДД по степени дискретизации [112]. Мы осуществили расчёт МДД для одиночного эритроцита ($D = 7.5$ мкм, $m = 1.03$) и двух ориентаций ($\beta = 0^\circ$ и 90°), меняя размер диполя d от $\lambda/8$ до $\lambda/93$. Число диполей на диаметр эритроцита менялось от 128 до 1408 соответственно, и полное число диполей достигало 6×10^8 . Эти массивные вычисления были произведены на голландском вычислительном кластере LISA [113], используя до 560 процессорных ядер и до 770 Гб оперативной памяти. Результаты для отдельного угла ($\theta = 120^\circ$) показаны на Рис. 42. Хотя значения интенсивностей в этом углу показывают одно из наихудших сходимостей по размеру диполя точек среди всех θ (данные для других углов не показаны), можно очевидно заметить, что результаты МДД сходятся с уменьшением размера диполя. Однако, данная сходимость осциллирующая, усложняющая выбор определённого референсного значения или интервала. Например, процедура экстраполяции, описанная в [114], основываясь на 9 лучших дискретизациях, приводит к доверительному интервалу $[0.54, 3.14] \times 10^{-2}$ для $S_{11}(120^\circ)$ для случая $\beta = 0^\circ$, которое слишком широко для практического применения. Процедура экстраполяции изначально была проверена на телах, сравнимых по размеру с длиной волны [114] и требует отдельного исследования для эффективного применения для частиц большего размера.

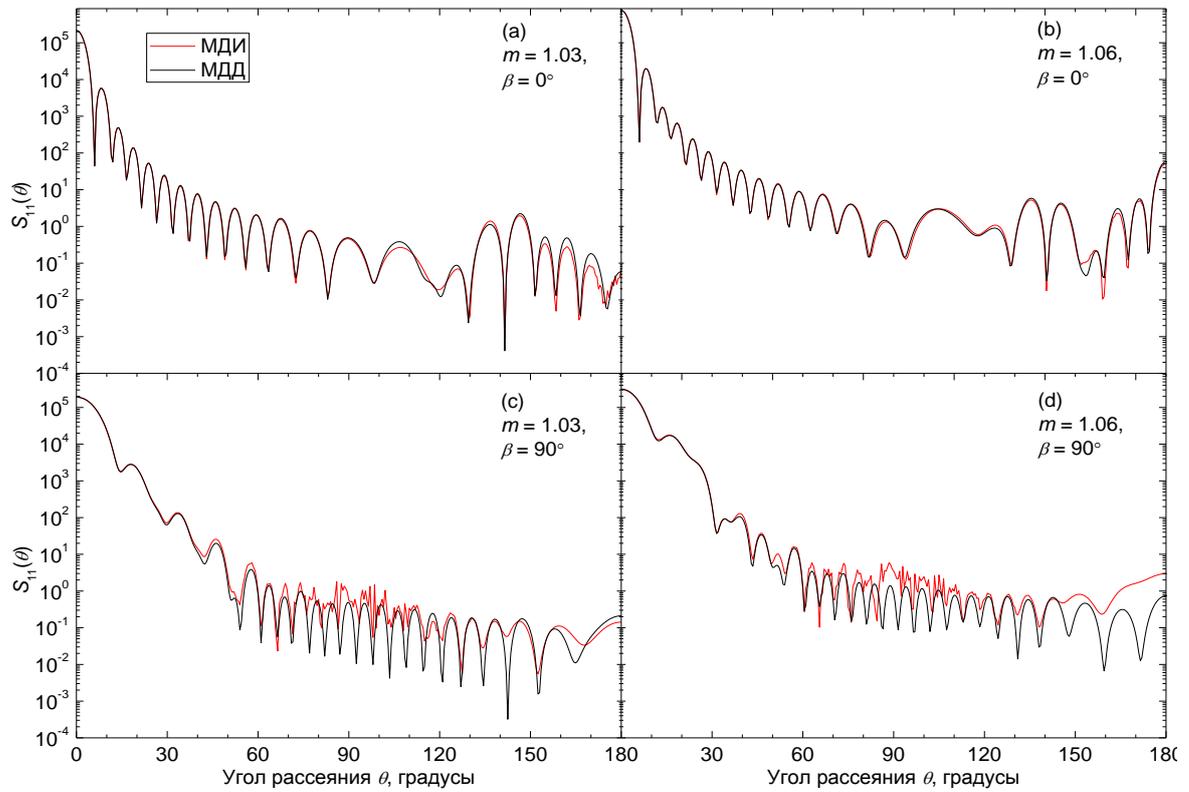


Рис. 38 $S_{11}(\theta)$ в логарифмическом масштабе для эритроцита с $D = 6$ мкм, $m = 1.03$ (а,с) и 1.06 (b,d), $\beta = 0^\circ$ (а,b) и 90° (с,d) рассчитанные с помощью МДИ и МДД.

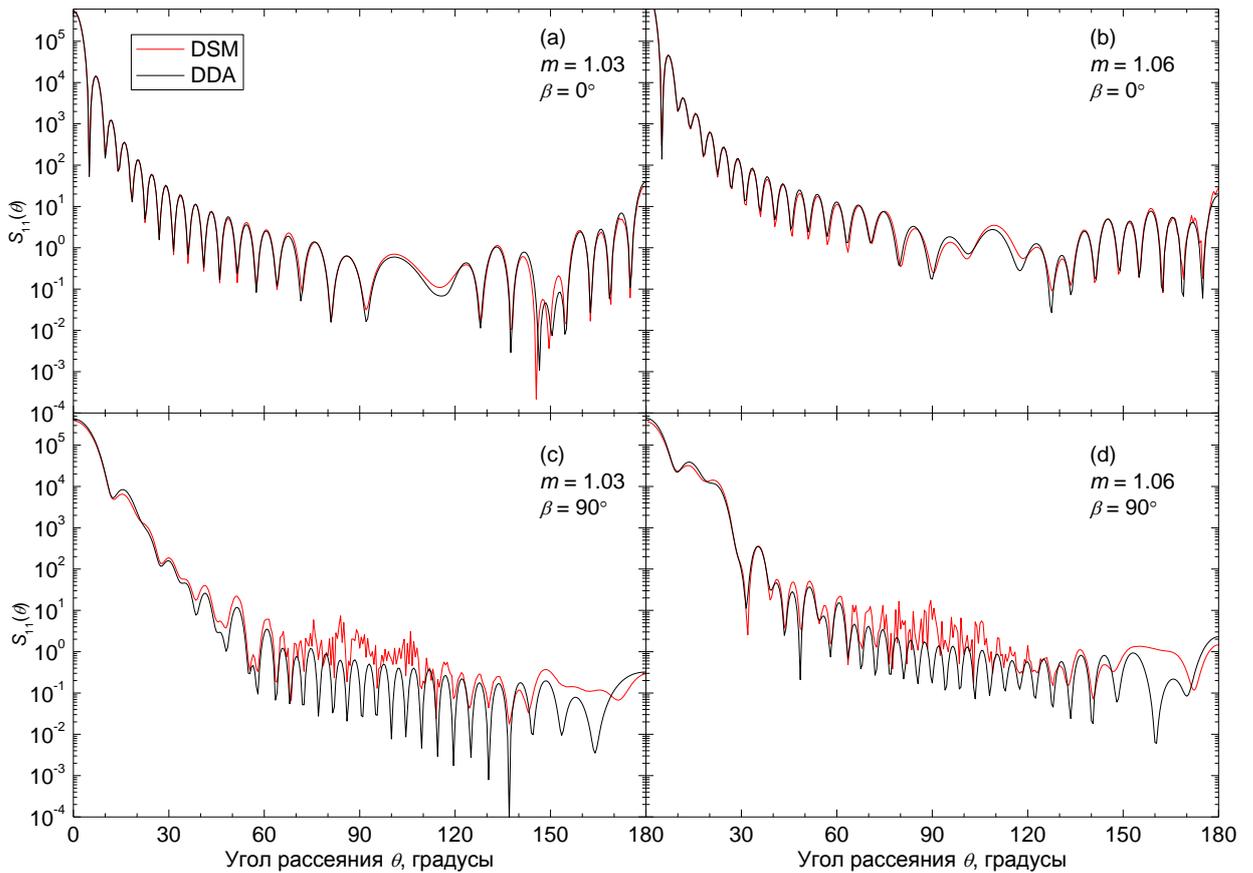


Рис. 39 Аналогично Рис. 38, но для $D = 7$ мкм.

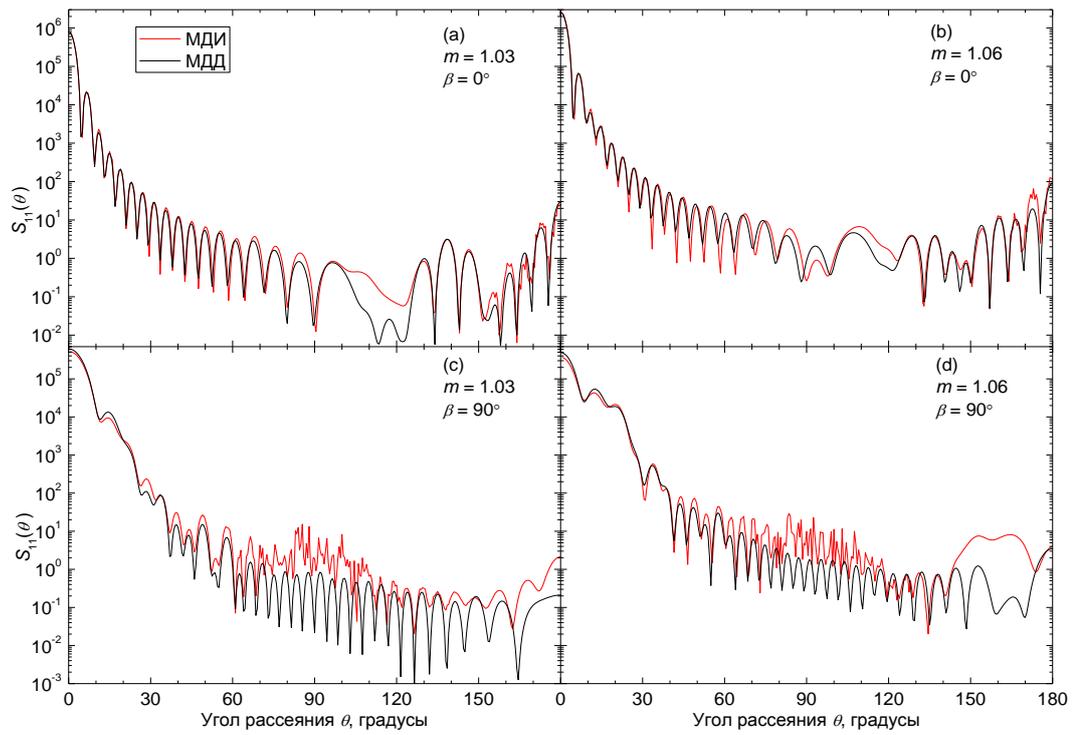


Рис. 40 Аналогично Рис. 38, но для $D = 7.5$ мкм.

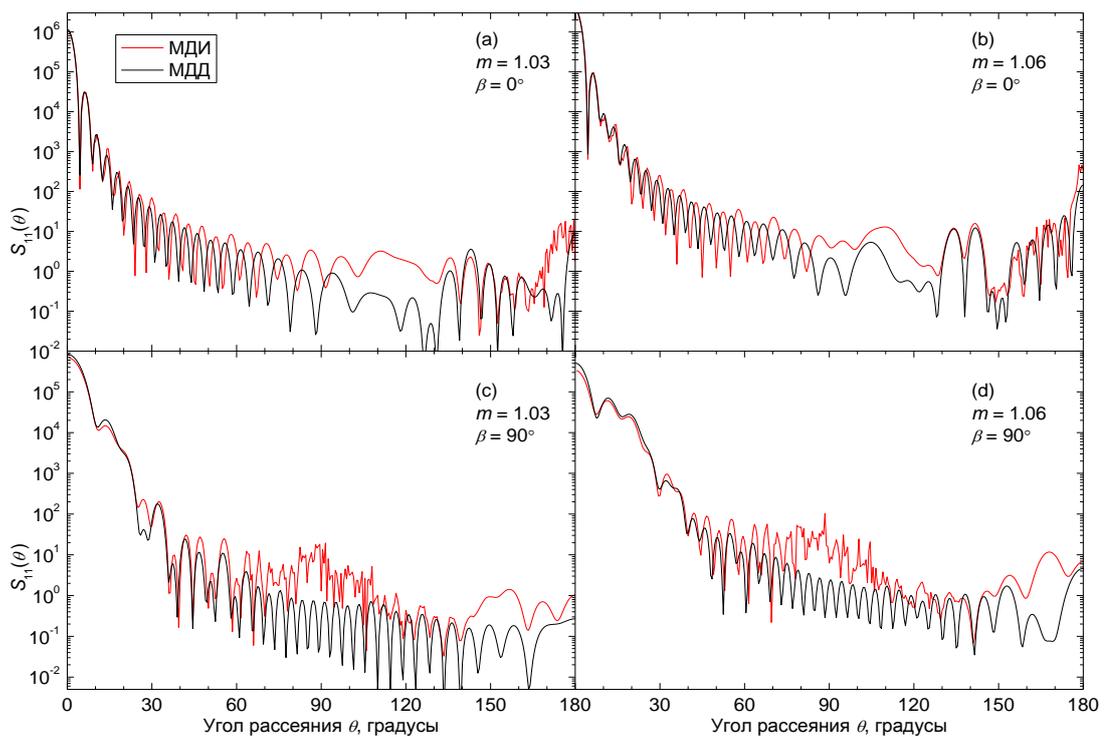


Рис. 41 Аналогично Рис. 38, но для $D = 8$ мкм.

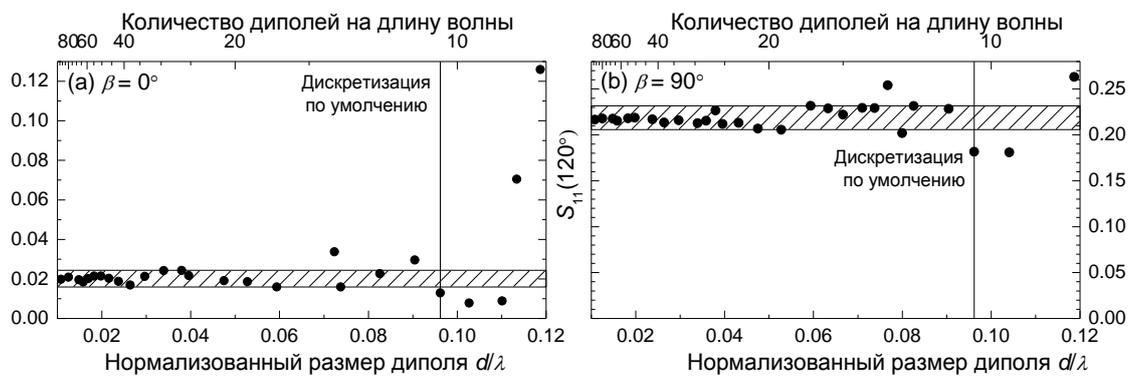


Рис. 42 Сходимость результатов МДД по размеру диполя для $S_{11}(120^\circ)$ с уточнённой дискретизацией для эритроцита с $D = 7.5$ мкм, $m = 1.03$, $\beta = 0^\circ$ (а) и $\beta = 90^\circ$ (б). Доверительные интервалы, определённые из этих данных (см. текст) показаны заштрихованными областями.

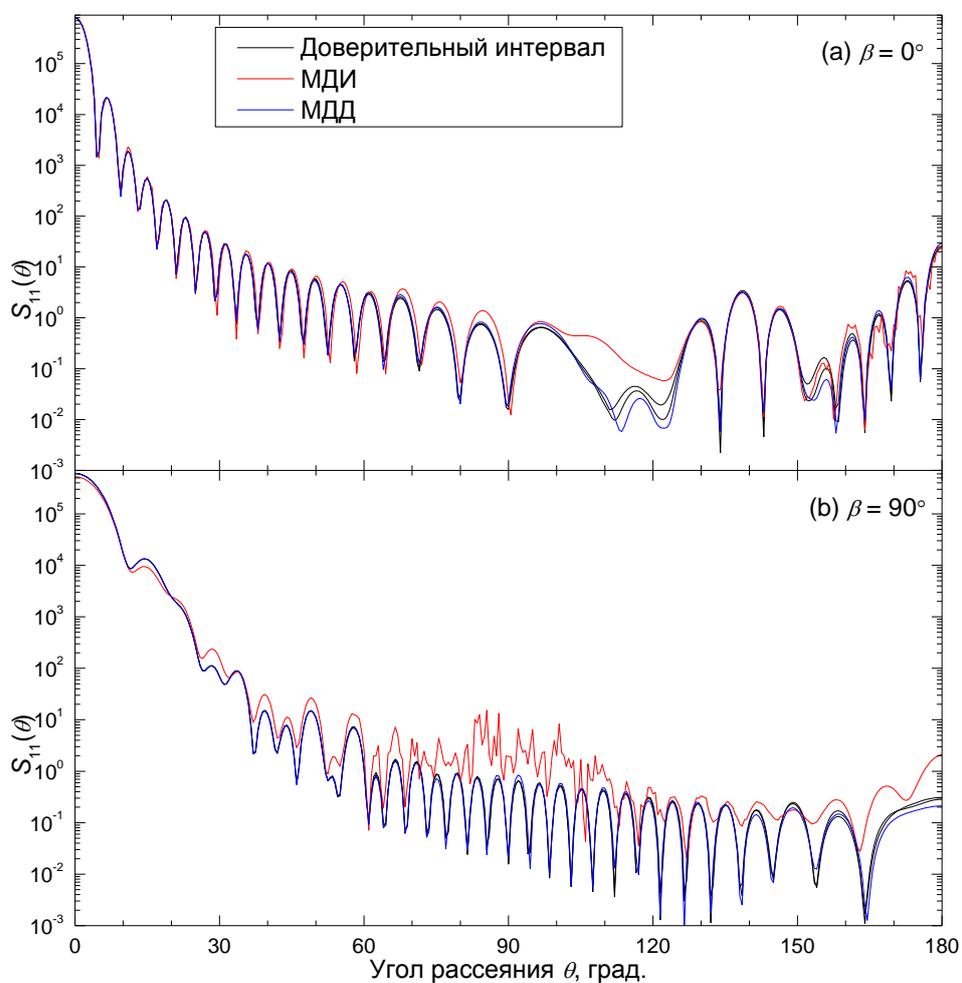


Рис. 43 Аналогично Рис. 40 (а,с), но с дополнением доверительных границ, полученных моделированием с помощью МДД с размером диполей от $\lambda/17$ до $\lambda/93$ (см. описание в тексте).

В данной работе используется более простой подход: доверительные интервал определяется минимальными и максимальными значениями МДД для размера диполя меньше $\lambda/16$. Такие доверительные интервалы для $S_{11}(120^\circ)$ составляют $[1.59, 2.43] \times 10^{-2}$ и $[2.06, 2.32] \times 10^{-1}$ для $\beta = 0^\circ$ и 90° соответственно (также показано на Рис. 42). Эти интервалы являются надёжными, т.е. дальнейшее уменьшение размера диполя не должно вывести результаты МДД из данных диапазонов. Подобные заключения могут быть получены и для других θ (данные не представлены), однако, данная устойчивость эмпирическая и не доказана строго. Доверительные интервалы, полученные данным методом для всех углов рассеяния показаны на Рис. 43 наряду с результатами МДД и МДИ (при начальном уровне дискретизации) для тех же эритроцитов. Доверительные интервалы очень узкие и совпадают с результатами МДД для исходной дискретизации на большей части углового диапазона. Предполагая надёжность доверительных интервалов, можно сделать вывод, что МДИ значительно менее точный, чем МДД для конкретного эритроцита, по крайней мере в диапазоне θ с наибольшим различием между двумя методами. Ожидается, что точность МДД мало зависит от конкретного размера для фиксированного размера диполя [109]. В связи с чем можно заключить, что наибольшее различие между результатами двух методов может быть отнесено к неточности МДИ в соответствии с внутренними оценками точности МДД.

Все вычисления, показанные на Рис. 38 — Рис. 41, были произведены на одном компьютере с процессором AMD Athlon 64x2 Dual Core 3800+, 2.01 ГГц с 2 Гб оперативной памяти. Оба кода были запущены в последовательном режиме (на одном ядре) Результаты обработки представлены в Таблице 6. Для сравнения мы рассчитали результаты в одной плоскости рассеяния с шагом 0.5° (всего 720 углов рассеяния) обоими методами. Кроме двух ориентаций эритроцитов мы рассматриваем совместное вычисление для 10 значений β (от 0° до 90° с шагом 10°), что является частой задачей при конструировании базы данных индикатрис светорассеяния, когда требуется рассчитать сигнал светорассеяния от одной частицы в разных ориентациях [62, 115]. Время работы МДД для последнего случая было получено из измеренных времён $t(0^\circ)$ и $t(90^\circ)$ для двух ориентаций, как $9t(0^\circ) + 5t(90^\circ)$, предполагая линейную зависимость числа итераций в МДД от β . Последнее влечёт, что время расчёта для $\beta \neq 0^\circ$ линейно изменяется от $2t(0^\circ)$ до $t(90^\circ)$ когда β увеличивается от 0° до 90° . Использование памяти для МДИ — приблизительно 60 МВ для всех изучаемых случаев (не показано в Таблица 6). Затраты памяти для МДД увеличиваются с ростом D и на порядок больше, чем требования МДИ. Однако, это является допустимым при использовании на стандартном компьютере.

Таблица 6 Затраты времени и оперативной памяти МДИ и МДД.

Диаметр D , мкм	Угол ориентации β	$m = 1.03$			$m = 1.06$		
		МДИ	МДД	RAM,	МДИ	МДД	RAM,
		Время, с	Время, с	RAM, Мб	Время, с	Время, с	RAM, Мб
6	0°	70	71	391	63	121	432
	90°	493	144		439	290	
	10 углов	510	1359 ^b		456	2539 ^b	
7	0°	92	109	639	100	205	708
	90°	728	247		829	512	
	10 углов	749	2216 ^b		885	4405 ^b	
7.5	0°	125	154	778	110	255	816
	90°	1012	327		959	631	
	10 углов	1025	3021 ^b		986	5450 ^b	
8	0°	162	184	924	147	303	997
	90°	1462	443		1301	908	
	10 углов	1465	3871 ^b		1344	7267 ^b	

^aВременные затраты МДД не зависят от ориентации, поэтому показаны значения для одного значения ориентации.

^bЗначения являются оценочными, используя данные для $\beta = 0^\circ$ и 90° (см. описание в тексте).

Зависимость времени вычисления от m заметно отличается для рассматриваемых методов. Скорость МДИ сравнима или немного выше для $m = 1.06$, чем для 1.03, в то время, как МДД на 50% медленнее для больших m . Это согласуется с предыдущими рассмотрениями производительности МДД о том, что МДД особенно подходит для частиц с низким показателем преломления [109,116]. Кроме того, что МДД и МДИ обладают сравнимой скоростью вычислений для $\beta = 0^\circ$, что является специальным симметричным случаем для обоих методов. Для одиночной несимметричной ориентации ($\beta = 90^\circ$) МДД в 1.4 – 3.4 раз быстрее. Однако, МДИ в 1.5 – 3 раз быстрее для множества из 10 различных ориентаций.

Скорость МДД, и, в частности ADDA, может быть увеличена запуском метода в параллельном режиме, загрузкой всех доступных узлов процессора. Например, возможно 50% увеличения скорости, при использовании двух ядер [100]. Производительность МДИ для

больших плоских частиц может быть повышена использованием итерационных методов для псевдообращения и оптимизации расположения дискретных источников.

5.4. Заключение главы.

Произведено систематическое сравнение МДИ и МДД для расчёта светорассеяния эритроцитами диаметром до 8 мкм (размерный параметр до 38). Наиболее неожиданным результатом является то, что в основном МДД успешно конкурирует, а во многих случаях и превосходит МДИ по вычислительной сложности несмотря на осесимметричную форму эритроцита. Причиной является, по-видимому, невысокий показатель преломления (от 1.03 до 1.06), приводящий к быстрой сходимости итерационной схемы.

Согласие в разрешённом по углу рассеяния элементе матрицы Мюллера S_{11} двух методов в основном хорошее, однако оно нарушается при увеличении угла рассеяния, диаметра и показателя преломления эритроцита и когда происходит переход от симметричной к несимметричной ориентации эритроцита по отношению к падающему излучению. Отдельное исследование сходимости МДД для одиночного эритроцита включающая до 6×10^8 диполей показывает, что наибольший вклад в различие связан с особенностями МДИ. Относительно худшая точность МДИ также подтверждается его внутренней оценкой ошибок и высокочастотных пульсаций, видных на результатах, особенно для большего диаметра эритроцитов.

Для одиночной ориентации эритроцита МДД сравним по скорости с МДИ или быстрее. Важное преимущество МДИ состоит в том, что он требует на порядок меньше компьютерной памяти и он быстрее, если рассматривается сразу несколько ориентаций одной частицы. Последнее свойство является удобным для построения базы данных индикатрис светорассеяния для различных размеров, показателей преломления и углов ориентации эритроцитов, т.е. для решения обратной задачи светорассеяния. Однако, приложению МДИ к данной задаче препятствуют ограничения на размерный параметр (до 40) в связи с численной нестабильностью. Напротив, МДД, в частности ADDA, легко приложим к большим эритроцитам при наличии достаточного количества оперативной памяти (на персональном компьютере или распределённой на суперкомпьютере).

Глава 6. Характеризация эритроцитов человека

6.1. Методы

6.1.1. Пробоподготовка

Образцы венозной крови 22 условно-здоровых доноров были получены стандартной процедурой забора с помощью вакуумных пробирок, содержащих в качестве антикоагулянта ЭДТА. Через три часа после забора, проба была разбавлена в 1000 раз в 0.9% физиологического раствора и измерена на СПЦ. Полистирольные микросферы размером 4 мкм (Molecular Probes, США) были добавлены в пробу для настройки оптических измерений СПЦ. Все измерения проводились при комнатной температуре (22°C).

6.1.2. Сканирующий проточный цитометр

Описание СПЦ и технические характеристики подробно описаны в предыдущих работах [4,5]. СПЦ, используемый для данных измерений изготовлены ООО «Цитонova» (г. Новосибирск), включает лазер мощностью 40 мВ длиной волны 660 нм (LM-660-20-S, ООО «Лазерные технологии», г. Новосибирск) для формирования индикатрис одиночных частиц, а также лазера мощностью 50 мВ с длиной волны 488 нм (DL-488-050, CrystaLaser, США) для формирования триггерного сигнала. Измеряемая индикатриса светорассеяния выражается следующим выражением:

$$I(\theta) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} (S_{11}(\theta, \varphi) + S_{14}(\theta, \varphi)) d\varphi, \quad (24)$$

где S – матрица рассеяния Мюллера [117], θ и φ – полярный и азимутальный угол рассеяния соответственно. Диапазон полярных углов измерения индикатрис на СПЦ (10° ÷ 60°) определён из анализа полистирольных микросфер [14].

6.2. Показатель преломления эритроцитов

Как обсуждалось в Обзоре литературы (раздел 1.2), эритроцит может рассматриваться, как однородная частица, показатель преломления которой определяется лишь концентрацией гемоглобина. Вещественная часть показателя преломления линейно зависит от концентрации гемоглобина (НС):

$$n_r = n_0 + \alpha \cdot \text{НС}, \quad (25)$$

где n_0 - показатель преломления фазы и α - коэффициент приращения преломления, $n_0 = 1.333$ при длине волны $\lambda = 660$ нм, что соответствуют физиологическому раствору [118], и является внешней средой в наших экспериментах. Неточность определения показателя преломления n_0 не превосходит 0.001, что, как ожидается, не имеет значительного влияния на результаты. В работе [22] использовался $n_0 = 1.335$ при длине волны 842 нм, без указания конкретного источника.

Определение α более неопределённо. Первое систематическое измерение α для гемоглобина у человека было осуществлено Stoddard & Adair [119], приведшее к значению $\alpha = 0.194$ мл/г при освещении белым светом и предположительно при комнатной температуре. Они определили содержание гемоглобина лизированием эритроцитов, обращая пристальное внимание на определение веса пробы. Более поздние обзоры делают вывод, что α – приблизительно одинаковы для несвязанных (0.18–0.19 мл/г) и пигментированных белков (0.19–0.20 мл/г) в белом или жёлтом свете, с небольшим увеличением (~ 0.01 мл/г) для $\lambda = 436$ нм [120]. Измерения оксигенированного лошадиного гемоглобина [121] приготовленного аналогичным образом, приводит к $\alpha = 0.190$ мл/г при длине волны 660 нм и 15°C , и аналогичным значениям для метгемоглобина.

В последние десять лет возродился интерес к данному вопросу [58,118,122–125]. Несколько работ [122,124,126] основаны на измерении гемоглобина, полученного лизированием с помощью центрифугирования и последующей фильтрацией. Несмотря на то, что концентрация гемоглобина точно определяется в конечном растворе по спектру поглощения, раствор также содержит компоненты плазмы и цитоплазмы. Это объясняет большие заявленные значения α – 0.230 и 0.216 мл/г при длине волны 800 нм и 37°C для оксигенированного и неоксигенированного гемоглобина соответственно [122], и 0.261 дл/г при длине волны 660 нм и 22°C для оксигенированного [123].

Альтернативный подход основан на разведении сухого гемоглобина [58,118]. Особенность данного метода в том, что содержание гемоглобина НС в конечном разведении не контролируется независимо, например, с помощью измерения поглощения, а рассчитывается из веса порошка гемоглобина. Последний расчёт может приводить к ошибкам, например вследствие содержания воды в порошке, что обсуждалось в статье [119]. В работе [118] был определён $\alpha = 0.146$ мл/г для длины волны 660 нм и температуре 20°C , а позже в статье той же научной группы [125] показано 20% различие (в основном связанное с масштабом) между измеренным и ожидаемым спектром поглощения. Более того, в [125] показано, что после корректировки подхода Крамерса-Кронига, использованного в работе [122] спектральные зависимости α согласуются с тремя предыдущими результатами [118,122,123], однако различие в масштабирующих коэффициентах остаётся прежним. Park et al. [58] разводил тот же порошок,

но не привел деталей об измерении концентрации. Спектральные различия показателя преломления хорошо согласуются с результатами Friebel and Mienke [123], а качества подгонки предполагает использование подгонки концентрации. В [58] приведено значение коэффициента $\alpha = 0.221$ мл/г для длины волны 660 нм (температура не указана) [58]. Важно, что авторы использовали это значение для определения НС у 25 одиночных эритроцитов и получили физиологически значимые результаты. Однако, изменение α до, например, 0.194 мл/г при обработке сохранило бы значение НС в нормальных диапазонах.

Tusko et al. [22], используя методы проточной цитометрии, получил очень хорошее (в пределах 3%) согласование со средним содержанием гемоглобина (МСН, mean corpuscular hemoglobin), измеренного для сферизованных эритроцитов по 72 пробам, используя $\alpha = 0.194$ мл/г при длине волны 840 нм (без указания температуры). Аналогичное значение $\alpha = 0.19$ мл/г при 0.660 нм привело к 8% согласию НС для одной пробы крови, содержащей нативные и сферизованные эритроциты [38]. Carraz et al. [27] получил согласие 4% для средней концентрации гемоглобина, определённой с помощью дифракционной голографической микроскопии для 36 клеток, используя $\alpha = 0.196$ мл/г при 660 нм и 22°C. Основываясь на описанном выше обзоре литературы, можно сделать заключение, что значение $\alpha = 0.194$ мл/г является наиболее подходящим для наших экспериментальных условий (0.66 мкм, 22°C).

Концентрация гемоглобина варьируется от 25 до 40 г/дл [22,27,33,34]. Мнимая часть показателя преломления определяется, как $n_i = \frac{\ln 10}{4\pi} \frac{\lambda e_\lambda HC}{M}$, где e_λ – молярный коэффициент экстинкции для длины волны λ , M – молекулярный вес гемоглобина. Используя опубликованные значение [127] для $\lambda = 0.66$ мкм, можно получить $n_i = 1.5 \times 10^{-4}$ как верхняя оценка при вариации концентрации гемоглобина и уровня оксигенации. Данное значение используется для всех последующих расчётов в связи с тем, что различие между индикатрисой, соответствующей данному мнимому показателю преломлению, и соответствующей нулевому показателю преломления едва различимо.

6.3. Моделирование светорассеяния

Теоретические индикатрисы эритроцитов были рассчитаны, используя метод дискретных диполей [128], основываясь на результатах Главы 5. В частности, использовался код с открытой лицензией ADDA v.1.2 [129]. Индикатрисы эритроцитов рассчитывались для полярного угла θ , принимающего значение от 10° до 60° с шагом 0.5°, используя 10 диполей на длину волны падающего излучения. Выбор метода расчёта и частоты дискретизации был рассмотрен предварительно в статье [130]. Сравнение индикатрис типичных эритроцитов, рассчитанных при

количестве диполей на длину волны 10 и 40, показало, что среднеквадратичная разница уравнения (26) менее, чем 0.5%. Интегрирование по азимутальному углу φ осуществлялось численно в диапазоне от 0° до 360° по 32 узлам.

6.4. Решение обратной задачи светорассеяния

Метод решения обратной задачи был разработан ранее, описан в [7,12] и был успешно применён для характеристики тромбоцитов, микрочастиц крови и бактерий [11,13,14]. В такой постановке задача преобразуется в задачу глобальной оптимизации взвешенной суммы квадратов:

$$\Phi(\boldsymbol{\beta}) = \|I_{\text{exp}} - I_{\text{th}}(\boldsymbol{\beta})\|^2 = \sum_{j=1}^k [w(\theta_j)(I_{\text{exp}}(\theta_j) - I_{\text{th}}(\theta_j, \boldsymbol{\beta}))]^2, \quad (26)$$

где $\boldsymbol{\beta}$ – вектор параметров подели, I_{th} и I_{exp} – расчётная и экспериментальная индикатриса соответственно, k – число точек индикатрисы (в диапазоне θ от 10° до 60°), а $w(\theta)$ – весовая функция, снижающая воздействие шума на результаты подгонки [7], заданная уравнением (23).

Вычисление $I_{\text{th}}(\theta, \boldsymbol{\beta})$ для эритроцитов занимает около 1 минуты на одном ядре стандартного процессора. Это приводит к значительному времени работы алгоритмов оптимизации, основанных на решении прямой задачи (градиентные методы, DiRect), составляющему несколько дней для одной частицы. В связи с этим оптимизация была реализована с помощью интерполяции по предварительно рассчитанной базе данных методом ближайшего соседа (см. раздел 4.2 и [12]). Сравнивая экспериментальные индикатрисы со всем множеством расчётных индикатрис базы данных, мы не только находим наиболее близкую по норме индикатрису с параметрами $\boldsymbol{\beta}_0$, которая минимизирует $\Phi(\boldsymbol{\beta})$, но также получаем приближённое описание всей поверхности $\Phi(\boldsymbol{\beta})$. Последнее свойство используется для вычисления плотности вероятности функции $P(\boldsymbol{\beta})$ в пространстве параметров для данной индикатрисы с помощью байесовского подхода. $P(\boldsymbol{\beta})$ далее используется для вычисления математического ожидания (ME) $\boldsymbol{\mu} = \langle \boldsymbol{\beta} \rangle$ (обычно отличного от $\boldsymbol{\beta}_0$) и стандартного отклонения (SD) параметров, а также 95% доверительного интервала (его размер по каждому параметру в несколько раз больше, чем SD). Аналогичные статистические величины (ME, SD и доверительные интервалы) также могут быть вычислены для любой производной характеристики $f(\boldsymbol{\beta})$. Заметим, что данный метод позволяет определить все параметры модели с контролируемой точностью в отличие от простого поиска по базе данных [39], где только один параметр модели (диаметр) был оценен с неизвестной точностью.

6.5. Результаты и обсуждение

6.5.1. Решение обратной задачи светорассеяния

Предполагаем, что градиентные силы около центра пузелейского потока диаметром 250 мкм и скорости потока ~ 1 м/с малы для того, чтобы деформировать частицу. Поэтому эритроцит приобретает форму, соответствующую минимальному значению свободной энергии мембраны, в связи с чем можно воспользоваться результатами Главы 3 для моделирования формы эритроцита. Кроме того, как показано в [131], происходит гидродинамическое выравнивание частицы при котором она ориентируется осью вращения перпендикулярно направлению движения потока.

Глобальная оптимизация осуществляется интерполяцией методом ближайшего соседа, используя предварительно рассчитанную базу данных 605 000 теоретических индикатрис с параметрами случайно распределёнными в диапазонах, показанных в Таблице 7 с дополнительными ограничениями, представленными Fung *et al.*[26]: $h_1 \leq h_2$, $V \in [35, 168]$ фл, $SI \in [0.55, 1]$. Более того, в Fung *et al.*[26] показано, что параметры (h_1, h_2, d) независимо распределены в пробе; это объясняет почему мы взяли данный набор параметров, а не, например, некоторые их соотношения. Область параметров подобна Рис. 17, но шире, чем требуется для нормальных эритроцитов для уменьшения влияния ограничений базы данных на результат. Более того, мы выбрали широкий диапазон показателя преломления, соответствующий $HC \in [26.8, 50.2]$ г/дл согласно выражению (25) с $\alpha = 0.194$ мл/г. Диапазон углов ориентации Ψ (между осью симметрии эритроцита и направлением распространения падающего излучения) был выбран из соображения, что эритроцит обычно ориентируется диаметром вдоль направления потока [4], что также подтверждено результатами обработки экспериментальных данных, показанных ниже. Все расчёты были проведены на вычислительном кластере Суперкомпьютерного центра Новосибирского Государственного Университета [132]. Типичное время расчёта одной индикатрисы среднего эритроцита составляет около 1 минуты на одном ядре процессора Intel X5355 (2.66 ГГц).

Реализация методов расчёта базы данных и обработки проб осуществлена в среде LabView.

Таблица 7 Диапазоны параметров для построения базы данных индикатрис

Параметр	Минимальное значение	Максимальное значение
Диаметр d , мкм	4.0	10.01
Перетяжка h_1 , мкм	0.01	7.0
Толщина h_2 , мкм	1.3	7.0
Показатель преломления n	1.385	1.43
Угол ориентации Ψ , градусы	70	90

6.5.2. Обработка экспериментальных данных

Образцы крови 22 условно-здоровых доноров, содержащие $\sim 10^3$ частиц были измерены на СПЦ и обработаны, используя метод, описанный в разделе 6.4. Для каждой измеренной индикатрисы решение обратной задачи светорассеяния сводится к оценке характеристик d , h_1 , h_2 , n , Ψ (математического ожидания ME) и их погрешностей (стандартных отклонения SD). Производные характеристики: V , S , SI , c_0 (c_d), HC и содержание гемоглобина также могут быть вычислены (ME и SD). Типичные измеренные индикатрисы нативных эритроцитов, наилучшие подгонки и оценки параметров показаны на Рис. 44. Заметим, что качество подгонки и оценка погрешностей (стандартные отклонения) определяемых характеристик сильно отличаются у разных индикатрис, что определяется как ошибками модели (отличие реальной формы эритроцита от модели), так и инструментальными, например, смещение клетки относительно центра падающего излучения [7]. Особенностью метода является способность контролировать погрешности индивидуальных измерений, вследствие чего частицы с большими погрешностями могут быть отброшены из рассмотрения. В частности, часть рассматриваемых частиц приводит к несвязным 95% доверительным областям оцениваемых параметров, что составляет значительную часть всего диапазона параметров (данные не представлены). Для фильтрации таких частиц мы можем ввести ограничения, например, чтобы размеры доверительных областей по параметру h_2 были меньше, чем 1 мкм. Кроме того отвергаются около 10% оставшихся частиц, которые имеют малое число точек базы данных внутри доверительной области (< 5), так как это предотвращает адекватную оценку погрешностей параметров [12]. Однако, последнее не является необходимым в связи с обсуждением ошибок выше, но может происходить в связи с низкой плотностью базы данных.

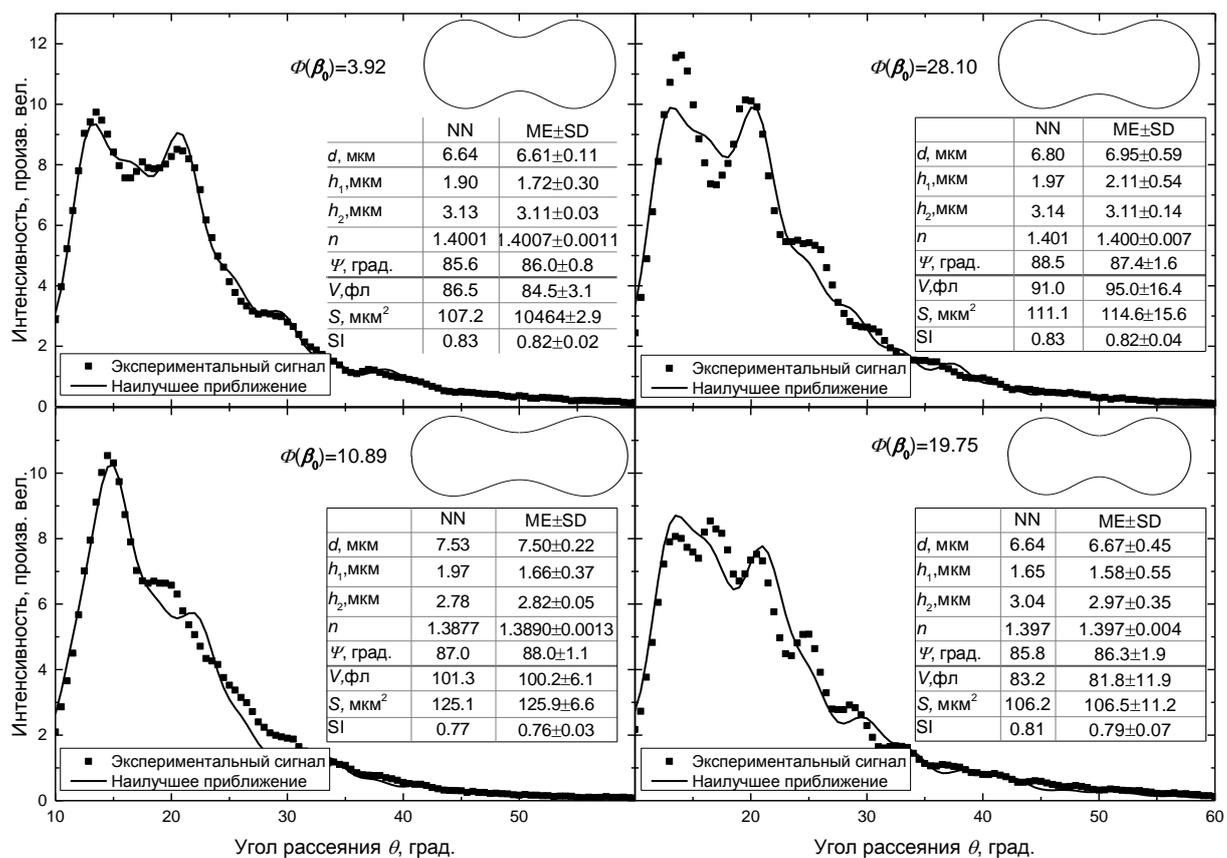


Рис. 44 Типичные измеренные индикатрисы и соответствующие им найденные в базе данных. Также представлены оценки первичных и производных характеристик (математическое ожидание и стандартное отклонение). Также представлены профили эритроцитов, соответствующие найденным в базе данных ближайшим по норме индикатрисам.

Для количественного анализа достаточности плотности базы данных был использован предварительно разработанный подход [12] и построена зависимость средней невязки по пробе $\Phi(\beta_0)$, как функцию от размера базы данных M на Рис. 45. Хорошее согласие с аналитической формулой [12] позволяет нам заключить, что в среднем только 15% невязки определяется плотностью дискретности базы данных. Например, уменьшение средней невязки $\Phi(\beta_0)$ на 10%, M может быть достигнуто при размере базы данных более чем на порядок (до 2×10^9).

Основываясь на анализе индивидуальных индикатрис, можно построить распределения по пробе доноров по всем определённым характеристикам. Например, для донора №21 распределения представлены на Рис. 44. Данный донор был выбран в качестве иллюстративного, в связи с тем, что средние величины характеристик его эритроцитов являются средними относительно всех 22 измеренных проб доноров. В Таблице 8 также представлены средние значения погрешностей определяемых характеристик, что важно для оценки полной точности метода и для рассмотрения распределений в Рис. 46. Для многих эритроцитов точность определения геометрических размеров выше дифракционного предела. Очень высокая точность

h_2 может быть объяснена ориентацией эритроцитов в потоке, так, что ось симметрии становится перпендикулярной направлению падающего излучения, делая индикатрису очень чувствительной к данному параметру. Это аналогично высокой точности определения, полученной для диаметра палочкообразных бактерий [11]. Напротив, относительная точность h_1 и, следовательно, c_0 и V значительно хуже, потому что индикатрисы не очень чувствительны к этим параметрам.

Результаты обработки одиночных проб (Таблица 8) показывают, что ограничение по размеру доверительной области незначительно снижает погрешности решения обратной задачи, но не вносит существенного вклада в средние величины характеристик эритроцитов.

Полученные характеристики эритроцитов и их распределения соответствуют литературным данным, представленным во введении. Также на основе полученных данных могут быть построены многомерные распределения и карты по параметрам. В частности, такой способ представления информации является понятным для исследователей медико-биологического направления и врачей. Кроме того, двумерные карты показывают существующие корреляции между параметрами. В частности, видна корреляция диаметра, объёма, площади, содержания гемоглобина (Рис. 47 – Рис. 48), что является естественным для эритроцитов и подтверждается литературными данными [16,26].

Унимодальное распределение по параметру Ψ , смещённое к величине 90° доказывает корректность выбранного диапазона параметра (70° – 90°).

Другие корреляции характеристик не такие однозначные и могут меняться от донора к донору, в связи с индивидуальными особенностями и состояниями организма. На Рис. 49 показаны двумерные карты характеристик $\{V \times SI\}$ трёх различных доноров, показывающие различную природу как отдельных характеристик, так и взаимных зависимостей характеристик.

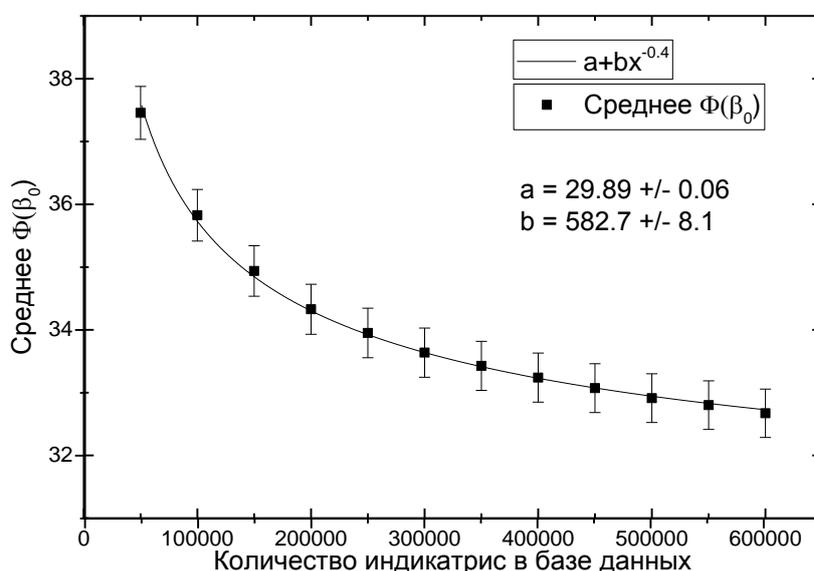


Рис. 45 Сходимость $\langle \Phi(\beta_0) \rangle$ при увеличении числа точек в базе данных.

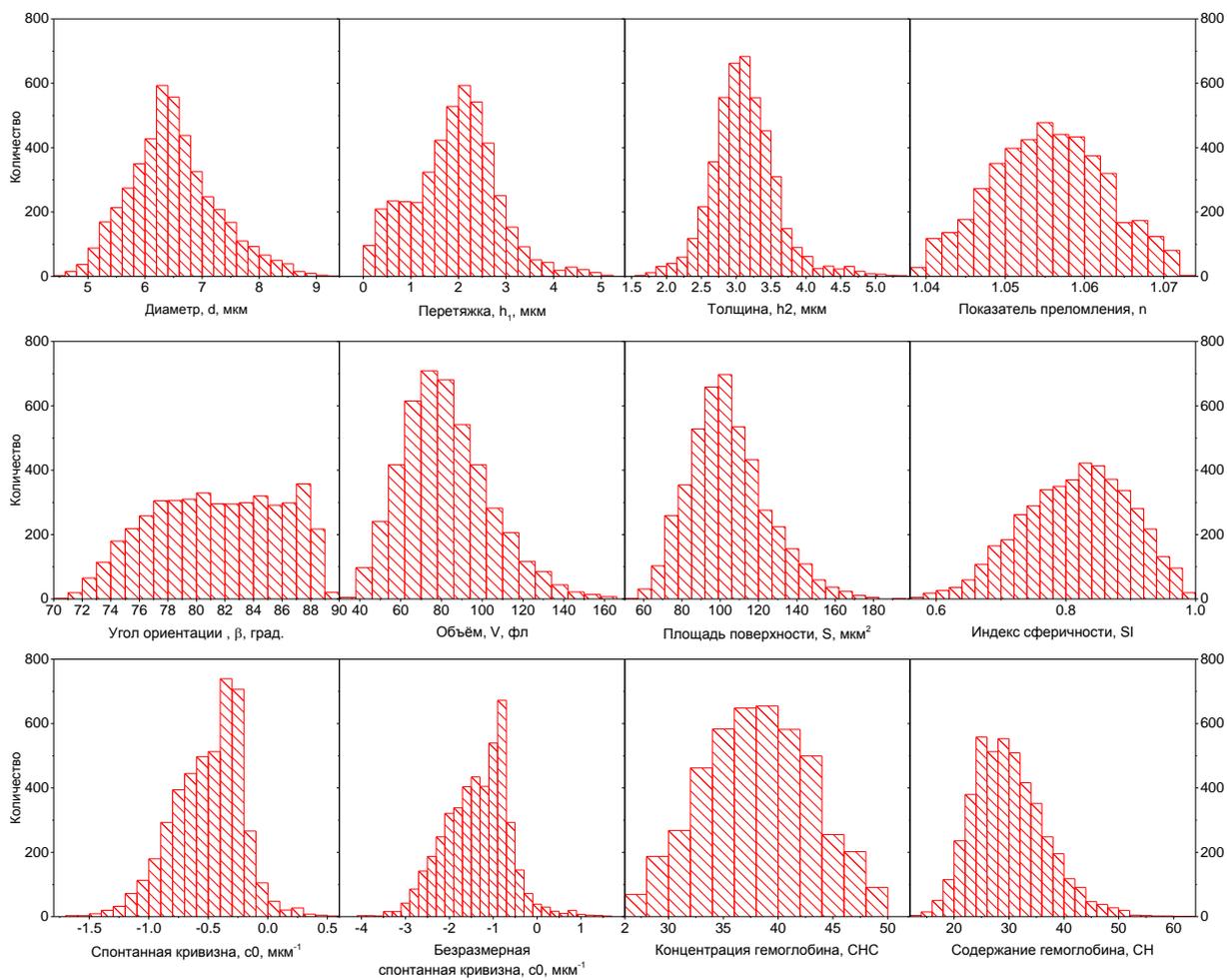


Рис. 46 Распределение характеристик эритроцитов донора №21. Значения средних значений и стандартных отклонений для каждой их характеристик представлено в Таблице 8.

Таблица 8 Результаты характеристики донора №21 до и после введения ограничений на доверительные области, включая: средние значения, стандартные отклонения среднего, стандартные отклонения, медианы погрешностей индивидуальных измерений. Последнее соответствует стандартному отклонению, показанному на **Рис. 50**.

Характеристика	Донор 21 до фильтрации				Донор 21 после фильтрации			
	Mean	Mean err	SD	MU ^a	Mean	Mean Err	SD	MU ^a
Диаметр d , мкм	6.49	0.011	0.76	0.57	6.75	0.021	0.87	0.34
Перетяжка h_1 , мкм	1.93	0.013	0.89	0.71	1.66	0.024	0.99	0.35
Толщина h_2 , мкм	3.12	0.007	0.47	0.25	2.98	0.010	0.43	0.07
Показатель преломления n	1.055	0.0001	0.007	0.005	1.053	0.0002	0.008	0.003
Угол ориентации Ψ , градус	81.44	0.066	4.42	2.29	83.98	0.092	3.86	1.32
Объём V , фл	82.21	0.321	21.55	18.05	85.32	0.601	25.16	8.99
Площадь поверхности S , мкм ²	104.28	0.304	20.42	16.31	109.83	0.576	24.10	9.46
Индекс сферичности SI	0.82	0.001	0.08	0.05	0.79	0.002	0.09	0.03
Спонтанная кривизна c_0 , мкм ⁻¹	-0.50	0.004	0.29	0.27	-0.37	0.007	0.29	0.14
Безразмерная спонтанная кривизна c_d	-1.36	0.011	0.73	0.74	-1.03	0.018	0.74	0.40
Концентрация гемоглобина, г/дл	38.11	0.074	4.96	3.86	36.68	0.135	5.66	1.67
Содержание гемоглобина, пг	30.06	0.100	6.73	3.61	30.07	0.165	6.89	2.02

^a Медиана по пробе погрешностей индивидуальных измерений (при уровне SD).

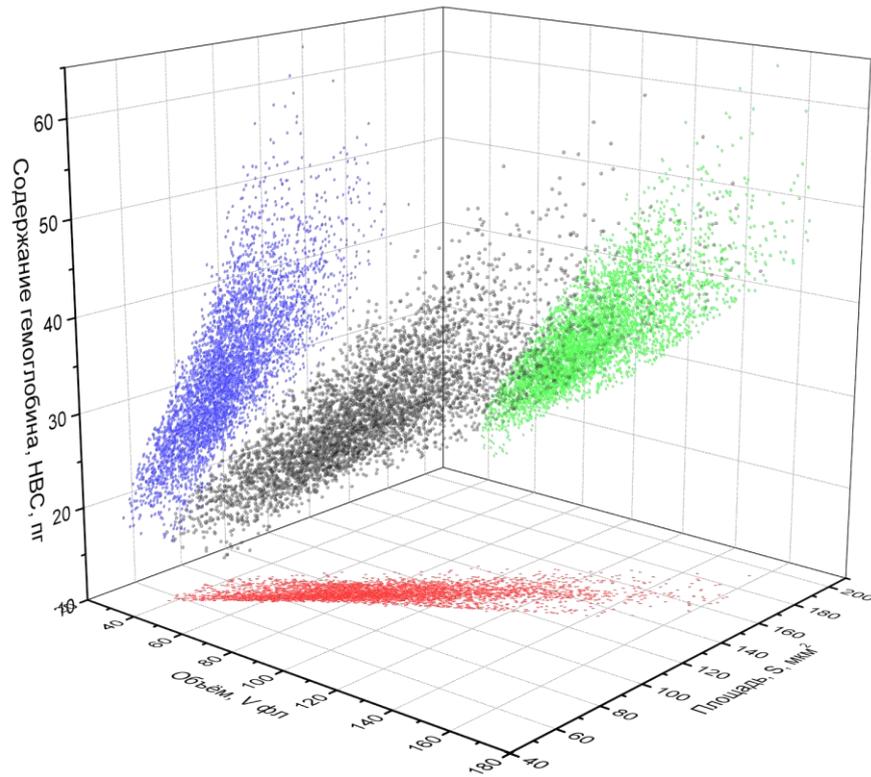


Рис. 47. Трёхмерная карта в параметрах V , S , НВС для донора №21

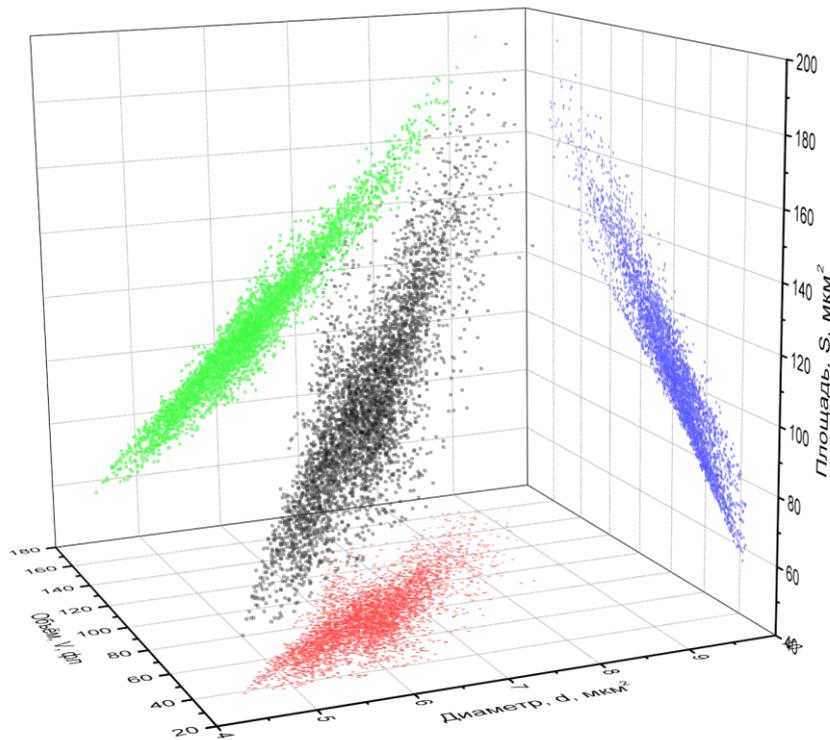


Рис. 48. Аналогично Рис. 47. Трёхмерная карта в параметрах V , S , НВС для донора №21, карта характеристик d , V , S в трёхмерном пространстве для донора №21

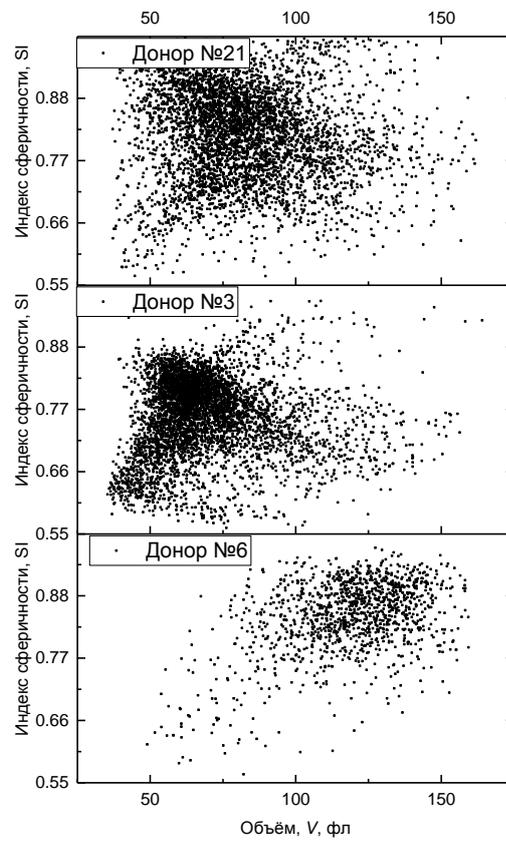


Рис. 49 Карта параметров V x SI для трёх доноров.

Сводная иллюстрация характеристик всех 22 измеренных доноров представлена на Рис. 50.

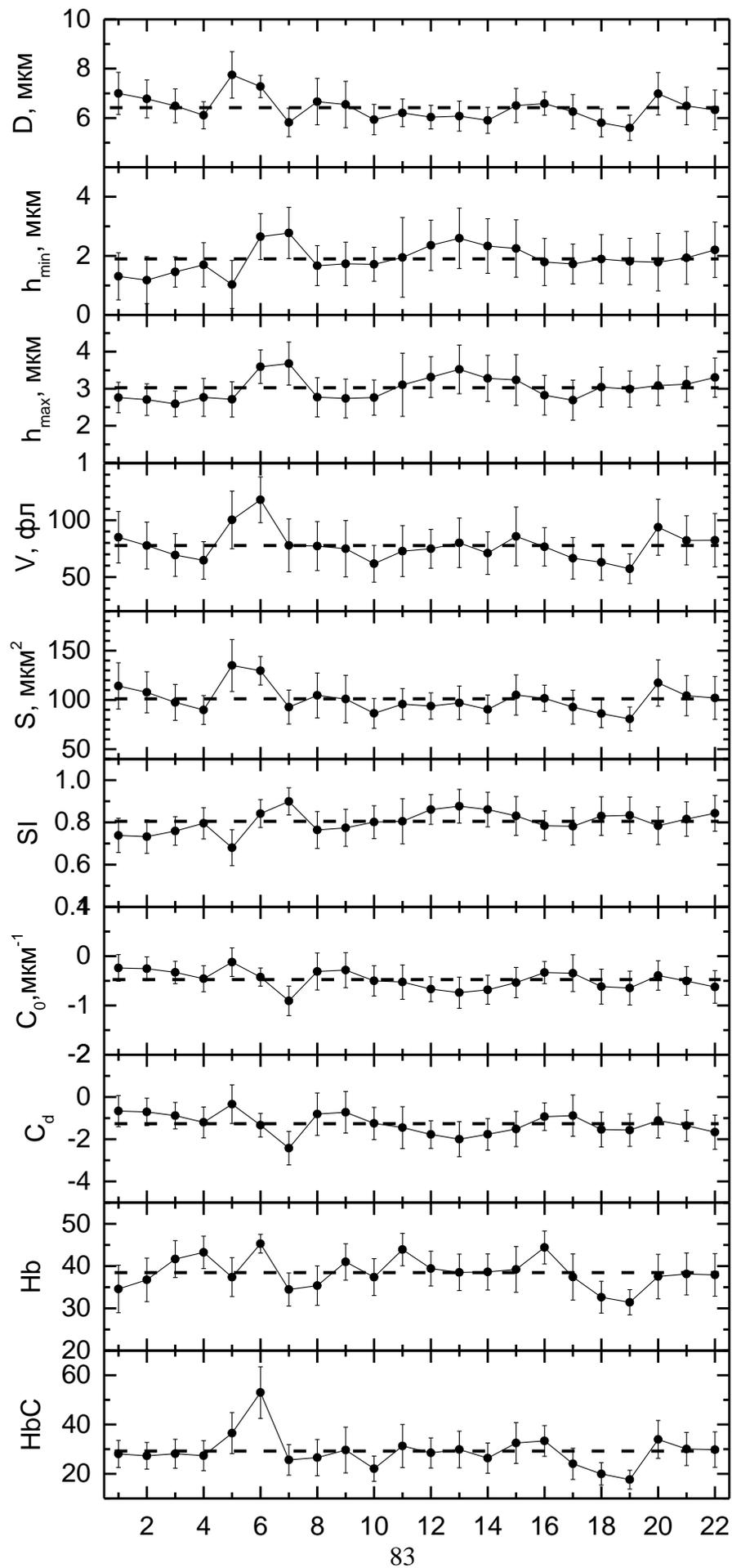


Рис. 50. Средние величины и стандартные отклонения характеристик эритроцитов 22 доноров, а также величина относительной невязки.

Заключение

Разработан и реализован метод характеристики нативных эритроцитов человека, основанный на измерении индикатрис светорассеяния одиночных клеток в потоке с последующим решением обратной задачи светорассеяния для каждой индикатрисы.

Третья глава посвящена разработке оптической модели эритроцита, в частности разработана модель формы, соответствующая минимальной энергии деформации мембраны, имеющей изотропную эластичность, предложена удобная параметризация, позволяющая однозначное описание формы эритроцита. Построена аналитическая аппроксимация, которая позволяет быстрое вычисление формы для заданных диаметра, толщины и перетяжки. Также построено аналитическое приближение, позволяющее быстрое моделирование формы для набора параметров (d , h_1 , h_2 – диаметр, минимальная толщина, максимальная толщина соответственно). Данное приближение может быть полезным не только для задач данной работы, но и во многих приложениях (оптических, механических, и т.д.), требующих вычисления реалистичной формы эритроцита за относительно небольшое время.

В четвёртой главе предложен метод построения оптимальной (с точки зрения объёма и необходимой точности решения) базы данных, основанный на анализе прямого отображения. Метод реализован для характеристики сферических частиц и может быть использован для анализа сферизованных эритроцитов, латексных микросфер, жировых частиц молока, микрочастиц. Данный метод может быть использован не только для решения обратных задач светорассеяния, но для решения любых обратных задач, имеющих доступный метод расчёта прямого отображения.

В пятой главе произведён выбор метода решения прямой задачи. Было рассмотрено два численных метода: метод дискретных диполей и метод дискретных источников. Рассмотрены особенности этих двух методов, их ограничения, преимущества и недостатки. Сделан вывод о большей применимости метода дискретных диполей в связи с достаточной точностью метода и удовлетворительной скоростью вычислений.

В шестой главе рассматривается решение обратной задачи светорассеяния для эритроцитов. Обратная задача решена с использованием интерполяции методом ближайшего соседа по предварительно рассчитанной базе данных. Для каждого эритроцита определяются три морфологических параметра и показатель преломления, что даёт возможность вычислить производные параметры: объём, площадь поверхности, спонтанную кривизну, концентрацию гемоглобина и содержание гемоглобина в одном эритроците со скоростью $\approx 10^2$ частиц в секунду.

Кроме найденных параметров, соответствующих ближайшей индикатрисе, для каждой индикатрисы были оценены погрешности найденных значений характеристик.

Метод был проверен на пробах 22 донорах. Результаты обработки входят в диапазон параметров, описанный в литературе. Характеристики эритроцитов согласуются с данными, представленными в литературе. Медианная (по пробе) погрешность индивидуальных измерений характеристик составили 0.34 мкм, 0.07 мкм и 8 фл для диаметра, толщины и объёма соответственно.

Подробная характеристика эритроцитов с высокой скоростью и точность может быть использована при проведении медико-биологических, а также клинических исследованиях для увеличения диагностической значимости общего анализа крови. Дальнейшие исследования могут быть посвящены аномальным клеткам, формы которых выходят за пределы двояковогнутых (чашевидные, серповидный и т.д.) и включением белкового цитоскелета в форму эритроцита.

Список сокращений

- ОЗС – обратная задача светорассеяния
- СПЦ – сканирующий проточный цитометр
- MCV – Mean corpuscular volume, средний объём эритроцита
- MCH – mean corpuscular hemoglobin, среднее содержание гемоглобина в эритроците
- MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration, средняя концентрация гемоглобина в эритроците
- SI – sphericity index, коэффициент сферичности
- PMF – расширенная модель Фанга
- МДД - метод дискретных диполей
- МДИ – метод дискретных источников
- ЭДТА -Этилендиаминтетрауксусная кислота -
- НС – концентрация гемоглобина
- ME – math expectation, математическое ожидание
- SD – standard deviation, стандартное отклонение

Основные результаты работы докладывались на конференциях:

1. Международной конференции «Оптика биологических частиц» (Новосибирск, 3-6 октября 2005 г.);
2. III Евразийском конгрессе по медицинской физике и инженерии "МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА – 2010" (Москва, 21-25 июня 2010 г.);
3. Международной конференции «Electromagnetic and Light Scattering XIII», 26–30 September 2011, Taormina, Italy);
4. Международной конференции «Специальные техники измерений (поляриметрия) и удаленное зондирование» (Украина, Киев, 12-27 сентября 2010 г.)
5. IV Международной молодежной школы-конференции «Теория и численные методы решения обратных и некорректных задач», Новосибирск, 5–12 августа 2012г.;
6. XIV Международной конференции «Electromagnetic and Light Scattering», Лилль, Франция, 17-21 июня 2013 г.;
7. Международной конференции «Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology», Новосибирск, 24-27 июня 2014 г.;

8. Научных семинарах в институте Химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Институте вычислительных технологий СО РАН, Институте математики им. С.Л.Соболева СО РАН, Институте вычислительной математики и математической геофизики СО РАН.

Основные результаты опубликованы в следующих статьях:

1. Berdnik, V. V., Gilev, K., Shvalov, A., Maltsev, V. & Loiko, V. A. Characterization of spherical particles using high-order neural networks and scanning flow cytometry. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 102, 62–72 (2006).
2. Dyatlov, G. V., Gilev, K. V., Semyanov, K. A. & Maltsev, V. P. The scanning flow cytometer modified for measurement of two-dimensional light-scattering pattern of individual particles. *Meas. Sci. Technol.* 19, 015408 (2008).
3. Strokotov D.I., Yurkin M.A., Gilev K.V., van Bockstaele D.R., Hoekstra A.G., Rubtsov N.B., and Maltsev V.P.. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? *J. Biomed. Opt.* 14, 64036 (2009).
4. Gilev, K. V., Eremina, E., Yurkin, M. A. & Maltsev, V. P. Comparison of the discrete dipole approximation and the discrete source method for simulation of light scattering by red blood cells. *Opt. Express* 18, 5681–5690 (2010).
5. Dyatlov, G. V., Gilev, K. V., Yurkin, M. A. & Maltsev, V. P. An optimization method with precomputed starting points for solving the inverse Mie problem. *Inverse Probl.* 28, 45012 (2012).
6. Gilev, K. V., Yurkin, M. A., Dyatlov, G. V., Chernyshev, A. V. & Maltsev, V. P. An optimization method for solving the inverse Mie problem based on adaptive algorithm for construction of interpolating database. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 131, 202–214 (2013).
7. Konokhova A.I., Rodionov A.A., Gilev K.V., Mikhaelis I.M., Strokotov D.I., Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Chernyshev A.V., and Maltsev V.P. Enhanced characterisation of milk fat globules by their size, shape and refractive index with scanning flow cytometry. *Int. Dairy J.* 39, 316–323 (2014).
8. Gilev K.V., Yurkin M.A., Chernyshova E.S., Strokotov D.I., Chernyshev A.V., and Maltsev V.P. Mature red blood cells: from optical model to inverse light-scattering problem. *Biomed. Opt. Express* 7, 1305 (2016).

Список литературы

1. Diez-Silva M. et al. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease // *MRS Bull.* 2010. Vol. 35, № 5. P. 382–388.
2. Engström K.G., Löfvenberg E. Treatment of myeloproliferative disorders with hydroxyurea: effects on red blood cell geometry and deformability // *Blood.* 1998. Vol. 91, № 10. P. 3986–3991.
3. Chernyshova E.S. et al. Influence of magnesium sulfate on HCO₃/Cl transmembrane exchange rate in human erythrocytes // *J. Theor. Biol.* 2016. Vol. 393. P. 194–202.
4. Maltsev V.P. Scanning flow cytometry for individual particle analysis // *Rev. Sci. Instrum.* 2000. Vol. 71, № 1. P. 243–255.
5. Strokotov D.I. et al. Polarized light-scattering profile-advanced characterization of nonspherical particles with scanning flow cytometry: Polarized Light Scattering // *Cytometry A.* 2011. Vol. 79A, № 7. P. 570–579.
6. Mal'tsev V.P., Semyanov K.A. Characterisation of bio-particles from light scattering. Utrecht ; Boston: VSP, 2004. 133 p.
7. Strokotov D.I. et al. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, № 6. P. 64036.
8. Moskalensky A.E. et al. Dynamic quantification of antigen molecules with flow cytometry // *J. Immunol. Methods.* 2015. Vol. 418. P. 66–74.
9. Yurkin M.A. et al. Experimental and theoretical study of light scattering by individual mature red blood cells by use of scanning flow cytometry and a discrete dipole approximation // *Appl. Opt.* 2005. Vol. 44, № 25. P. 5249–5256.
10. Юркин М.А. Моделирование светорассеяния клетками крови с помощью метода дискретных диполей. Новосибирск: ИХКГ СО РАН, 2008.
11. Konokhova A.I. et al. High-precision characterization of individual E. coli cell morphology by scanning flow cytometry // *Cytometry A.* 2013. Vol. 83A, № 6. P. 568–575.
12. Moskalensky A.E. et al. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering // *J. Biomed. Opt.* 2013. Vol. 18, № 1. P. 17001–17001.
13. Konokhova A.I. et al. Super-resolved calibration-free flow cytometric characterization of platelets and cell-derived microparticles in platelet-rich plasma: Super-Resolved Characterization of Plasma Cells // *Cytometry A.* 2015. P. n/a-n/a.
14. Konokhova A.I. et al. Light-scattering flow cytometry for identification and characterization of blood microparticles // *J. Biomed. Opt.* 2012. Vol. 17, № 5. P. 570061–570068.
15. Konokhova A.I. et al. Enhanced characterisation of milk fat globules by their size, shape and refractive index with scanning flow cytometry // *Int. Dairy J.* 2014. Vol. 39, № 2. P. 316–323.
16. Canham P.B., Burton A.C. Distribution of Size and Shape in Populations of Normal Human Red Cells // *Circ. Res.* 1968. Vol. 22, № 3. P. 405–422.
17. Bransky A. et al. Correlation between erythrocytes deformability and size: A study using a microchannel based cell analyzer // *Microvasc. Res.* 2007. Vol. 73, № 1. P. 7–13.
18. Gifford S.C. et al. Parallel microchannel-based measurements of individual erythrocyte areas and volumes // *Biophys. J.* 2003. Vol. 84, № 1. P. 623–633.
19. Tomaiuolo G. et al. Comparison of two flow-based imaging methods to measure individual red blood cell area and volume // *Cytometry A.* 2012. Vol. 81A, № 12. P. 1040–1047.
20. Waterman C.S. et al. Improved measurement of erythrocyte volume distribution by aperture-counter signal analysis // *Clin. Chem.* 1975. Vol. 21, № 9. P. 1201–1211.
21. Arnfred T., Kristensen S.D., Munck V. Coulter counter model S and model S-plus measurements of mean erythrocyte volume (MCV) are influenced by the mean erythrocyte haemoglobin concentration (MCHC) // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1981. Vol. 41, № 8. P. 717–721.
22. Tycko D.H. et al. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration // *Appl. Opt.* 1985. Vol. 24, № 9. P. 1355–1365.

23. Sem'yanov K.A. et al. Calibration-free method to determine the size and hemoglobin concentration of individual red blood cells from light scattering // *Appl. Opt.* 2000. Vol. 39, № 31. P. 5884–5889.
24. Piagnerelli M. et al. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques // *J. Clin. Pathol.* 2006. Vol. 60, № 5. P. 549–554.
25. Kubota F. Analysis of red cell and platelet morphology using an imaging-combined flow cytometer // *Clin. Lab. Haematol.* 2003. Vol. 25, № 2. P. 71–76.
26. Fung Y.-C., Tsang W., Patitucci P. High-resolution data on the geometry of red blood cells. // *Biorheology.* 1981. Vol. 18, № 3–6. P. 369–385.
27. Rappaz B. et al. Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer // *Cytometry A.* 2008. Vol. 73A, № 10. P. 895–903.
28. Moon I. et al. Automated statistical quantification of three-dimensional morphology and mean corpuscular hemoglobin of multiple red blood cells // *Opt. Express.* 2012. Vol. 20, № 9. P. 10295–10309.
29. Hayashi Y. et al. Dielectric inspection of erythrocyte morphology // *Phys. Med. Biol.* 2008. Vol. 53, № 10. P. 2553–2564.
30. Khairy K., Foo J., Howard J. Shapes of Red Blood Cells: Comparison of 3D Confocal Images with the Bilayer-Couple Model // *Cell. Mol. Bioeng.* 2008. Vol. 1, № 2–3. P. 173–181.
31. Mir M., Tangella K., Popescu G. Blood testing at the single cell level using quantitative phase and amplitude microscopy // *Biomed. Opt. Express.* 2011. Vol. 2, № 12. P. 3259.
32. Phillips K.G., Jacques S.L., McCarty O.J.T. Measurement of Single Cell Refractive Index, Dry Mass, Volume, and Density Using a Transillumination Microscope // *Phys. Rev. Lett.* 2012. Vol. 109, № 11.
33. Kim Y. et al. Profiling individual human red blood cells using common-path diffraction optical tomography // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. P. 6659.
34. Park Y. et al. Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105, № 37. P. 13730–13735.
35. Kim K. et al. High-resolution three-dimensional imaging of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and in situ hemozoin crystals using optical diffraction tomography // *J. Biomed. Opt.* 2014. Vol. 19, № 1. P. 11005–11005.
36. Soini J.T. et al. A new design of the flow cuvette and optical set-up for the scanning flow cytometer // *Cytometry.* 1998. Vol. 31, № 2. P. 78–84.
37. Maltsev V.P. Scanning flow cytometry for individual particle analysis // *Rev. Sci. Instrum.* 2000. Vol. 71, № 1. P. 243–255.
38. Yurkin M.A. Discrete dipole simulations of light scattering by blood cells: PhD thesis. Amsterdam: University of Amsterdam, 2007. 215 p.
39. Dannhauser D. et al. Optical signature of erythrocytes by light scattering in microfluidic flows // *Lab Chip.* 2015. Vol. 15, № 16. P. 3278–3285.
40. Ponder E. The measurement of the diameter of erythrocytes. V.—The relation of the diameter to the thickness // *Q. J. Exp. Physiol.* 1930. Vol. 20, № 1. P. 29–39.
41. Evans E., Fung Y.-C. Improved measurements of the erythrocyte geometry // *Microvasc. Res.* 1972. Vol. 4, № 4. P. 335–347.
42. Mazon P., Muller S., El Azouzi H. Deformation of erythrocytes under shear: A small-angle light scattering study // *Biorheology.* 1997. Vol. 34, № 2. P. 99–110.
43. Borovoi A.G., Naats E.I., Oppel U.G. Scattering of light by a red blood cell // *J. Biomed. Opt.* 1998. Vol. 3, № 3. P. 364–372.
44. Canham. The Minimum Energy of Bending as a Possible Explanation of the Biconcave Shape of the Human Red Blood Cell // *J. Theoret. Biol.* 1970.
45. Hellmers J., Eremina E., Wriedt T. Simulation of light scattering by biconcave Cassini ovals using the nullfield method with discrete sources // *J. Opt. Pure Appl. Opt.* 2006. Vol. 8, № 1. P. 1–9.
46. Skalak R. et al. Strain energy function of red blood cell membranes // *Biophys. J.* 1973. Vol. 13, № 3. P. 245.

47. Kim Y., Kim K., Park Y. Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances // *Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology* / ed. Moschandreou T. InTech, 2012.
48. Deuling H.J., Helfrich W. The curvature elasticity of fluid membranes: A catalogue of vesicle shapes // *J. Phys.* 1976. Vol. 37, № 11. P. 1335–1345.
49. Evans E.A. Minimum energy analysis of membrane deformation applied to pipet aspiration and surface adhesion of red blood cells. // *Biophys. J.* 1980. Vol. 30, № 2. P. 265.
50. Helfrich W. Blocked lipid exchange in bilayers and its possible influence on the shape of vesicles // *Z Naturforsch 29c.* 1974. Vol. 510.
51. Miao L. et al. Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: the effect of area-difference elasticity // *Phys. Rev. E.* 1994. Vol. 49, № 6. P. 5389.
52. Svetina S., Zeks B. Membrane bending energy and shape determination of phospholipid vesicles and red blood cells // *Eur. Biophys. J.* 1989. Vol. 17, № 2. P. 101–111.
53. Tu Z.C., Ou-Yang Z.C. A geometric theory on the elasticity of bio-membranes // *J. Phys. Math. Gen.* 2004. Vol. 37, № 47. P. 11407–11429.
54. Kralj-Iglič V., Svetina S., Žekš B. The existence of non-axisymmetric bilayer vesicle shapes predicted by the bilayer couple model // *Eur. Biophys. J.* 1993. Vol. 22, № 2. P. 97–103.
55. Svetina, Ottova-Leitmanova, Glaser. Membrane Bending Energy in Relation to Bilayer Couplings Concept of Red Blood Cell Shape Transformations // *J. theor. Biol.* 1982.
56. Barer R. Refractometry and interferometry of living cells // *J. Opt. Soc. Am.* 1957. Vol. 47, № 6. P. 545.
57. Linderkamp O., Wu P.Y.K., Meiselman H.J. Geometry of Neonatal and Adult Red Blood Cells // *Pediatr. Res.* 1983. Vol. 17, № 4. P. 250–253.
58. Park Y. et al. Spectroscopic phase microscopy for quantifying hemoglobin concentrations in intact red blood cells // *Opt. Lett.* 2009. Vol. 34, № 23. P. 3668–3670.
59. Phillips K.G., Jacques S.L., McCarty O.J.T. Measurement of Single Cell Refractive Index, Dry Mass, Volume, and Density Using a Transillumination Microscope // *Phys. Rev. Lett.* 2012. Vol. 109, № 11.
60. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* / ed. Bohren C.F., Huffman D.R. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1998.
61. Nilsson A.M.K. et al. T-matrix computations of light scattering by red blood cells // *Appl. Opt.* 1998. Vol. 37, № 13. P. 2735.
62. Yurkin M.A. et al. Experimental and theoretical study of light scattering by individual mature red blood cells by use of scanning flow cytometry and a discrete dipole approximation // *Appl. Opt.* 2005. Vol. 44, № 25. P. 5249–5256.
63. Karlsson A. et al. Numerical Simulations of Light Scattering by Red Blood Cells // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2005. Vol. 52, № 1. P. 13–18.
64. Shvalov A.N. et al. Light-scattering properties of individual erythrocytes // *Appl. Opt.* 1999. Vol. 38, № 1. P. 230–235.
65. Tsinopoulos S.V., Polyzos D. Scattering of He–Ne laser light by an average-sized red blood cell // *Appl. Opt.* 1999. Vol. 38, № 25. P. 5499.
66. Lu J.Q., Yang P., Hu X.-H. Simulations of light scattering from a biconcave red blood cell using the finite-difference time-domain method // *J. Biomed. Opt.* 2005. Vol. 10, № 2. P. 24022.
67. Eremina E. Light scattering by an erythrocyte based on discrete sources method: Shape and refractive index influence // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2009. Vol. 110, № 14–16. P. 1526–1534.
68. Eremina E., Eremin Y., Wriedt T. Analysis of light scattering by erythrocyte based on discrete sources method // *Opt. Commun.* 2005. Vol. 244, № 1–6. P. 15–23.
69. Eremina E. et al. Different shape models for erythrocyte: Light scattering analysis based on the discrete sources method // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2006. Vol. 102, № 1. P. 3–10.
70. Wriedt T. et al. Light scattering by single erythrocyte: Comparison of different methods // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2006. Vol. 100, № 1–3. P. 444–456.

71. Ludlow I.K., Everitt J. Inverse Mie problem // *J. Opt. Soc. Am. A*. 2000. Vol. 17, № 12. P. 2229.
72. Ludlow I.K., Everitt J. Application of Gegenbauer analysis to light scattering from spheres: Theory // *Phys. Rev. E*. 1995. Vol. 51, № 3. P. 2516–2526.
73. Min S.L., Gomez A. High-resolution size measurement of single spherical particles with a fast Fourier transform of the angular scattering intensity // *Appl. Opt.* 1996. Vol. 35, № 24. P. 4919.
74. Semyanov K.A. et al. Single-particle sizing from light scattering by spectral decomposition // *Appl. Opt.* 2004. Vol. 43, № 26. P. 5110–5115.
75. Maltsev V.P., Lopatin V.N. Parametric solution of the inverse light-scattering problem for individual spherical particles // *Appl. Opt.* 1997. Vol. 36, № 24. P. 6102–6108.
76. Berdnik V.V. et al. Characterization of spherical particles using high-order neural networks and scanning flow cytometry // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2006. Vol. 102, № 1. P. 62–72.
77. Berdnik V.V., Loiko V.A. Retrieval of size and refractive index of spherical particles by multiangle light scattering: neural network method application // *Appl. Opt.* 2009. Vol. 48, № 32. P. 6178.
78. Wang Z., Ulanowski Z., Kaye P.H. On Solving the Inverse Scattering Problem with RBF Neural Networks: Noise-Free Case // *Neural Comput. Appl.* 1999. Vol. 8, № 2. P. 177–186.
79. Zakovic S., Ulanowski Z., Bartholomew-Biggs M.C. Application of global optimization to particle identification using light scattering // *Inverse Probl.* 1998. Vol. 14, № 4. P. 1053–1067.
80. Bartholomew-Biggs M.C., Ulanowski Z.J., Zakovic S. Using Global Optimization for a Microparticle Identification Problem with Noisy Data // *J. Glob. Optim.* 2005. Vol. 32, № 3. P. 325–347.
81. Jones D.R., Perttunen C.D., Stuckman B.E. Lipschitzian optimization without the Lipschitz constant // *J. Optim. Theory Appl.* 1993. Vol. 79, № 1. P. 157–181.
82. Zharinov A. et al. A study of light scattering of mononuclear blood cells with scanning flow cytometry // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2006. Vol. 102, № 1. P. 121–128.
83. Strokotov D.I. et al. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, № 6. P. 64036.
84. Li W., Jaffe J.S. Sizing homogeneous spherical particles from intensity-only angular scatter // *J. Opt. Soc. Am. A*. 2010. Vol. 27, № 2. P. 151.
85. Kolesnikova I.V. et al. Determination of volume, shape and refractive index of individual blood platelets // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2006. Vol. 102, № 1. P. 37–45.
86. Gyimóthy S., Pávó J. Qualification of the inverse problem of defect reconstruction using optimized mesh database // *COMPEL - Int. J. Comput. Math. Electr. Electron. Eng.* 2005. Vol. 24, № 2. P. 436–445.
87. Pávó J., Gyimóthy S. Adaptive inversion database for electromagnetic nondestructive evaluation // *NDT E Int.* 2007. Vol. 40, № 3. P. 192–202.
88. Mosegaard K., Tarantola A. Monte Carlo sampling of solutions to inverse problems // *J. Geophys. Res. Solid Earth*. 1995. Vol. 100, № B7. P. 12431–12447.
89. Yang K., Ross Chapman N., Ma Y. Estimating parameter uncertainties in matched field inversion by a neighborhood approximation algorithm // *J. Acoust. Soc. Am.* 2007. Vol. 121, № 2. P. 833.
90. Dyatlov G.V. et al. An optimization method with precomputed starting points for solving the inverse Mie problem // *Inverse Probl.* 2012. Vol. 28, № 4. P. 45012.
91. Семьянов К.А. Развитие техники сканирующей проточной цитометрии и методов решения обратной задачи светорассеяния для анализа одиночных сферических частиц. 2001.
92. Ziou D., Tabbone S. Edge Detection Techniques - An Overview // *Int. J. PATTERN Recognit. IMAGE Anal.* 1998. Vol. 8. P. 537–559.
93. Brakke K.A. The Surface Evolver // *Exp. Math.* 1992. Vol. 1, № 2. P. 141–165.
94. Deuling H.J. Red blood cell shapes as explained on the basis of curvature elasticity // *Biophys. J.* 1976. Vol. 16, № 8. P. 861–868.
95. Angelov B., Mladenov I. On the geometry of red blood cell. 2000.
96. Mazon P., Muller S. Dielectric or absorbing particles: EM surface fields and scattering // *J. Opt.* 1998. Vol. 29, № 2. P. 68.

97. Jones D.R., Perttunen C.D., Stuckman B.E. Lipschitzian optimization without the Lipschitz constant // *J. Optim. Theory Appl.* 1993. Vol. 79, № 1. P. 157–181.
98. Nocedal J. Numerical optimization. New York: Springer, 1999. 636 p.
99. Light scattering by nonspherical particles: theory, measurements, and applications / ed. Mishchenko M.I., Hovenier J.W., Travis L.D. San Diego: Academic Press, 2000. 690 p.
100. ADDA - light scattering simulator using the discrete dipole approximation [Electronic resource] // <http://code.google.com/p/a-dda/>.
101. Finkel D.E. DIRECT optimization algorithm user guide // *Cent. Res. Sci. Comput. N. C. State Univ.* 2003. Vol. 2.
102. Mishchenko M.I., Travis L.D. Capabilities and limitations of a current FORTRAN implementation of the T-matrix method for randomly oriented, rotationally symmetric scatterers // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 1998. Vol. 60, № 3. P. 309–324.
103. Kasarova S.N. et al. Analysis of the dispersion of optical plastic materials // *Opt. Mater.* 2007. Vol. 29, № 11. P. 1481–1490.
104. Ma X. et al. Determination of complex refractive index of polystyrene microspheres from 370 to 1610 nm // *Phys. Med. Biol.* 2003. Vol. 48, № 24. P. 4165–4172.
105. Eremin Y. The method of discrete sources in electromagnetic scattering by axially symmetric structures // *J. Commun. Technology and Electronics.* 2000. № 45. P. 269–280.
106. Generalized multipole techniques for electromagnetic and light scattering. 1st ed / ed. Wriedt T. Amsterdam ; New York: Elsevier, 1999. 264 p.
107. Draine B.T., Flatau P.J. Discrete-Dipole Approximation For Scattering Calculations // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1994. Vol. 11, № 4. P. 1491.
108. Yurkin M.A., Hoekstra A.G. The discrete dipole approximation: An overview and recent developments // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2007. Vol. 106, № 1–3. P. 558–589.
109. Yurkin M.A., Maltsev V.P., Hoekstra A.G. The discrete dipole approximation for simulation of light scattering by particles much larger than the wavelength // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2007. Vol. 106, № 1–3. P. 546–557.
110. Sem'yanov K.A. et al. Calibration-free method to determine the size and hemoglobin concentration of individual red blood cells from light scattering // *Appl. Opt.* 2000. Vol. 39, № 31. P. 5884–5889.
111. Tycko D.H. et al. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration // *Appl. Opt.* 1985. Vol. 24, № 9. P. 1355–1365.
112. Yurkin M.A., Maltsev V.P., Hoekstra A.G. Convergence of the discrete dipole approximation. I. Theoretical analysis // *JOSA A.* 2006. Vol. 23, № 10. P. 2578–2591.
113. Description of the national compute cluster Lisa [Electronic resource] // <https://subtrac.sara.nl/userdoc/wiki/lisa/description>.
114. Yurkin M.A., Maltsev V.P., Hoekstra A.G. Convergence of the discrete dipole approximation. II. An extrapolation technique to increase the accuracy // *JOSA A.* 2006. Vol. 23, № 10. P. 2592–2601.
115. Yurkin M.A. Discrete dipole simulations of light scattering by blood cells: PhD thesis. Amsterdam: University of Amsterdam, 2007. 215 p.
116. Yurkin M.A. Systematic comparison of the discrete dipole approximation and the finite difference time domain method for large dielectric scatterers // *Opt. Express.* 2007. Vol. 15, № 26.
117. Absorption and Scattering of Light by Small Particles / ed. Bohren C.F., Huffman D.R. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1998.
118. Zhernovaya O. et al. The refractive index of human hemoglobin in the visible range // *Phys. Med. Biol.* 2011. Vol. 56, № 13. P. 4013–4021.
119. Stoddard J.L., Adair G.S. The refractometric determination of hemoglobin // *J. Biol. Chem.* 1923. Vol. 57, № 2. P. 437–454.
120. Barer R., Joseph S. Refractometry of living cells: Part I. Basic principles // *Q. J. Microsc. Sci.* 1954. Vol. 95, № 32. P. 399–423.

121. Orttung W.H., Warner J. Refractive index dispersion in equine hemoglobin solutions // *J. Phys. Chem.* 1965. Vol. 69, № 9. P. 3188–3190.
122. Faber D.J. et al. Oxygen saturation-dependent absorption and scattering of blood // *Phys. Rev. Lett.* 2004. Vol. 93, № 2. P. 28102.
123. Friebel M., Meinke M. Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250-1100 nm dependent on concentration // *Appl. Opt.* 2006. Vol. 45, № 12. P. 2838–2842.
124. Jin Y.L. et al. Refractive index measurement for biomaterial samples by total internal reflection // *Phys. Med. Biol.* 2006. Vol. 51, № 20. P. N371.
125. Sydoruk O. et al. Refractive index of solutions of human hemoglobin from the near-infrared to the ultraviolet range: Kramers-Kronig analysis // *J. Biomed. Opt.* 2012. Vol. 17, № 11. P. 115002–115002.
126. Friebel M., Meinke M. Determination of the complex refractive index of highly concentrated hemoglobin solutions using transmittance and reflectance measurements // *J. Biomed. Opt.* 2005. Vol. 10, № 6. P. 64019-064019–5.
127. Prahl S. Optical Absorption of Hemoglobin [Electronic resource]. 2013. URL: <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/index.html> (accessed: 31.10.2013).
128. Yurkin M.A., Hoekstra A.G. The discrete dipole approximation: An overview and recent developments // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2007. Vol. 106, № 1–3. P. 558–589.
129. Yurkin M.A., Hoekstra A.G. The discrete-dipole-approximation code ADDA: capabilities and known limitations // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2011. Vol. 112, № 13. P. 2234–2247.
130. Gilev K.V. et al. Comparison of the discrete dipole approximation and the discrete source method for simulation of light scattering by red blood cells // *Opt. Express.* 2010. Vol. 18, № 6. P. 5681–5690.
131. Тарасов П.А. Определение характеристических параметров эритроцитов методами динамической проточной цитометрии. 2005.
132. Supercomputing center of the Novosibirsk State University [Electronic resource]. URL: <http://www.nusc.ru/>.