

УДК 576.31

ВЫЧИСЛЕНИЕ ОБЪЕМА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ АНАЛИЗЕ ДАННЫХ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

¹Нагорнов Ю.С., ²Богомолов А.С., ³Аксенова Е.А., ⁴Анохина Т.В., ⁵Корнеева С.А., ⁶Зотова М.А., ⁷Наумов В.В., ⁸Смирнова Т.Г., ⁹Наседкина А.А., ¹⁰Юлдашев А.В.

¹ФГБОУ ВПО «Тольяттинский государственный университет», Тольятти, e-mail: rq-georg@rambler.ru;

²ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Саратов, e-mail: alexbogomolov@ya.ru;

³ФГБУН «Институт прикладных математических исследований Карельского научного центра Российской академии наук», Петрозаводск, e-mail: akseanova@krc.karelia.ru;

⁴ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.», Саратов, e-mail: tihomirova_tv80@mail.ru;

⁵ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, e-mail: korneeva@bsu.edu.ru;

⁶ФГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Челябинск, e-mail: zotova.chel@mail.ru, tanya_bondarenko@list.ru;

⁷НОО ВПО НП «Тульский институт экономики и информатики», Тула, e-mail: vladigor22@rambler.ru;

⁸ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, e-mail: nasedkina@math.rsu.ru;

⁹ФГБВУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург, e-mail: ansokurov@yandex.ru;

¹⁰ФГБОУ ВПО «Уфимский государственный авиационный технический университет», Уфа, e-mail: arthur@mail.rb.ru

В работе описаны известные способы определения объема эритроцитов, а также описан новый способ, основанный на данных атомно-силовой микроскопии исследования морфологии мазка крови. Алгоритм определения объема эритроцитов состоит из следующих шагов. На выборке эритроцитов, попадающих в поле скана, определяют геометрические характеристики эритроцитов. Методами программного обеспечения атомно-силовой микроскопии проводят разрез каждого эритроцита в поперечном сечении. На разрезе можно определить диаметр эритроцита, его высоту, глубину и длину впадины. По этим данным предлагается определять объем эритроцита как геометрической фигуры вращения, при этом форму эритроцита можно описать как разницу двух фигур – усеченного конуса и перевернутого конуса. По геометрическим данным, полученным из среза, производится вычисление объема фигур вращения, а объем эритроцита вычисляется как разница этих объемов.

Ключевые слова: эритроцит, атомно-силовая микроскопия, метод Култера, геометрические характеристики эритроцита, MCV, объем эритроцита

CALCULATION OF ERYTHROCYTES VOLUME FROM DATA OF ATOMIC FORCE MICROSCOPY

¹Nagornov Y.S., ²Bogomolov A.S., ³Aksenova E.A., ⁴Anokhina T.V., ⁵Korneeva S.A., ⁶Zotova M.A., ⁷Naumov V.V., ⁸Smirnova T.G., ⁹Nasedkina A.A., ¹⁰Sokurova A.M., ¹⁰Yuldashev A.V.

¹Togliatti State University, Togliatti, e-mail: rq-georg@rambler.ru;

²Saratov State University of N.G. Chernyshevskiy, Saratov, e-mail: alexbogomolov@ya.ru;

³Institute of Applied Mathematical Research of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, e-mail: akseanova@krc.karelia.ru;

⁴Saratov State Technical University of Y.A. Gagarin, Saratov, e-mail: tihomirova_tv80@mail.ru;

⁵Belgorod State National Research University, Belgorod, e-mail: korneeva@bsu.edu.ru;

⁶Chelyabinsk State Medical Academy of the Ministry of Health and Social Development of Russia, Chelyabinsk, e-mail: zotova.chel@mail.ru, tanya_bondarenko@list.ru;

⁷Tula Institute of Economics and Informatics, Tula, e-mail: vladigor22@rambler.ru;

⁸Southern Federal University, Rostov-on-Don, e-mail: nasedkina@math.rsu.ru;

⁹Military Medical Academy of S.M. Kirov of Russian Defense Ministry, St. Petersburg, e-mail: ansokurov@yandex.ru;

¹⁰Ufa State Aviation Technical University, Ufa, e-mail: arthur@mail.rb.ru

This paper describes the known methods for determining the volume of red blood cells and a new method based on data from atomic force microscopy study of the morphology of blood smear. The algorithm for determining the volume of red blood cells consists of the following steps. On a sample of red blood cells entering the field of scan we determine the geometrical characteristics of erythrocytes. Software techniques of atomic force microscopy performed each erythrocyte cut in cross section. On the cut we determine the diameter and height of the erythrocyte, depth and length of the depression. According to these data we propose to determine the volume of the erythrocyte as the geometric figure rotation and the form of red blood cell can be described as the difference between the two figures – a truncated cone and an inverted cone. On geometrical data obtained from the cutoff, the computation of rotation figures and corpuscular volume is calculated as the difference of these volumes.

Keywords: erythrocytes, atomic force microscopy, Coulter method, the geometric characteristics of erythrocytes, MCV, erythrocyte volume

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) в настоящее время становится одним из самых перспективных методов изучения структурных особенностей макромолекул, поскольку позволяет получать изображения объектов с высоким разрешением, сопоставимым с уровнем рентгеноструктурного анализа, в условиях, при которых макромолекулы не подвергаются жесткой обработке и проявляют свою природную активность [1, 3–5]. Кроме того, атомно-силовая микроскопия дает возможность не только визуализировать объекты на молекулярном уровне, но и изучать свойства индивидуальных макромолекул: распределение поверхностных зарядов, подвижность отдельных участков, конформационные изменения в зависимости от условий, силу специфического взаимодействия между молекулами. С помощью атомно-силовой микроскопии можно наблюдать в реальном времени за сборкой макромолекулярных комплексов, распределением белков на поверхности клетки, особенностями внутриклеточного транспорта макромолекул и т.д.

Атомно-силовая микроскопия – вид зондовой микроскопии, в основе которого лежит силовое взаимодействие атомов. На расстоянии менее одного нанометра между атомами образца и атомом зонда (кантилвера) возникают силы отталкивания, а на больших расстояниях – силы притяжения. Идея устройства очень проста – кантилвер, перемещаясь относительно поверхности и реагируя на силовое взаимодействие, регистрирует ее рельеф. На основании прибора укреплен цилиндр, в котором находится сканер – пьезоэлектрическая керамика, изменяющая свои размеры при приложении электрического поля. В верхней части цилиндра крепится исследуемый образец, который сканер может перемещать в трех взаимно перпендикулярных направлениях. В горизонтальной плоскости образец сканируется по строкам: пройдя одну, он смещается на следующую строчку. Обычно таких строк 256, время движения вдоль строки может варьироваться примерно от 1 до 0,02 с, а длину строки в самом распространенном сканере можно выбрать от ~10 нм до ~10 мкм [2]. В зависимости от типа взаимодействия АСМ может работать в одном из нескольких режимов. Исследование биологических образцов происходит в основном в полуконтактном режиме, который отличается тем, что производит минимальное воздействие на образец и, соответственно, белковые структуры эритроцитов. В насто-

ящей работе предлагается точный способ вычисления объема эритроцита по данным атомно-силовой микроскопии. Для сравнения предлагаемого способа расчета вначале необходимо рассмотреть классические способы расчета объема и метод Культера.

1. Классический способ расчета объёма эритроцитов

Средний объем эритроцитов или MCV (mean cell volume) вычисляется путем деления гематокритной величины 1 мм³ крови на число эритроцитов. Это более точный параметр, чем визуальная оценка размера эритроцитов (изменение диаметра эритроцита на 5% приводит к изменению его объема на 15%). Однако он не является достоверным при большом количестве эритроцитов с измененной формой (MCV может иметь нормальное значение при наличии у пациента одновременно выраженного макро- и микроцитоза). Следует помнить, что микроциты имеют диаметр меньше нормы, в то время как средний объем их чаще остается в норме, поэтому необходимо всегда производить микроскопию мазка крови.

На основании значения MCV различают анемию микроцитарные (дефицит железа, талассемия), нормоцитарные (апластическая анемия) и макроцитарные (B12- и фолиевые дефицитные, апластические анемии). При этом единицами измерения являются фемтолитры (фл), очевидно, что 1 фл = 1 мкм³. В таблице приведены данные по изменению объема эритроцитов с возрастом, видно, что объем эритроцитов в основном меняется в диапазоне 70–100 фл. Поскольку референсные значения соответствуют средним значениям, для более глубокого понимания процессов, в которых принимают участие эритроциты, необходимы методики расчета, дающие точные значения объема для каждого эритроцита отдельно, что в дальнейшем позволит легко усреднить полученный результат.

2. Расчёт объема эритроцитов по данным атомно-силовой микроскопии

Для проведения расчета объема эритроцита по данным атомно-силовой микроскопии необходимо провести измерение скана поверхности мембраны (рис. 1) и затем произвести разрез скана эритроцита по диагонали с целью измерения его высотных геометрических характеристик. На рис. 2 показан график зависимости высоты стенок мембраны эритроцита от его продольных координат вдоль диагонального разреза.

Референтные значения объёмов эритроцитов

Возраст, пол		MCV, фл
< 2 недель		88–140
2–4,3 недели		91–112
4,3–8,6 недель		84–106
8,6 нед. – 4 мес.		76–97
4–6 мес.		68–85
6–9 мес.		70–85
9–12 мес.		71–84
1–5 лет		73–85
5–10 лет		75–87
10–12 лет		76–94
12–15 лет	женщины	73–95
	мужчины	77–94
15–18 лет	женщины	78–98
	мужчины	79–95
18–45 лет	женщины	81–100
	мужчины	80–99
45–65 лет	женщины	81–101
	мужчины	81–101
> 65 лет	женщины	81–102
	мужчины	81–103

В условиях данной задачи, учитывая все проделанные приближения, можно пре-

небречь углом наклона эритроцита – на приведённом изображении (рис.2) тангенс этого угла равен $\sim 0,02$. Таким образом, полученная кривая разреза может быть представлена, как показано на рис. 2. Итоговый объём показанной фигуры можно представить в виде разности объёмов двух фигур – усеченного конуса и перевернутого конуса (см. рис. 2). Высоту усеченного конуса можно вычислить как среднее высот справа и слева эритроцита – $l = (l_1 + l_2)/2$, основания усеченного конуса равны R и r . Высота перевернутого конуса равна соответственно $n = (n_1 + n_2)/2$. Учитывая, что объём конуса равен $V = Sh/3$, где $S = \pi R^2/4$ – площадь; h – высота конуса, можно вычислить объём эритроцита по формуле:

$$V = k \left\{ \frac{l_1 + l_2}{2} (R^2 + Rr + r^2) - \frac{n_1 + n_2}{2} r^2 \right\}, (1)$$

где l_1 и l_2 – высота стенок эритроцита слева и справа соответственно; n_1 и n_2 – глубина впадины слева и справа соответственно, а R и r – радиусы основания и вершины эритроцита; коэффициент k – подгоночный параметр, который включает все константы и учитывает отклонение реального объёма эритроцита от «идеальной» модели (см. рис. 2).

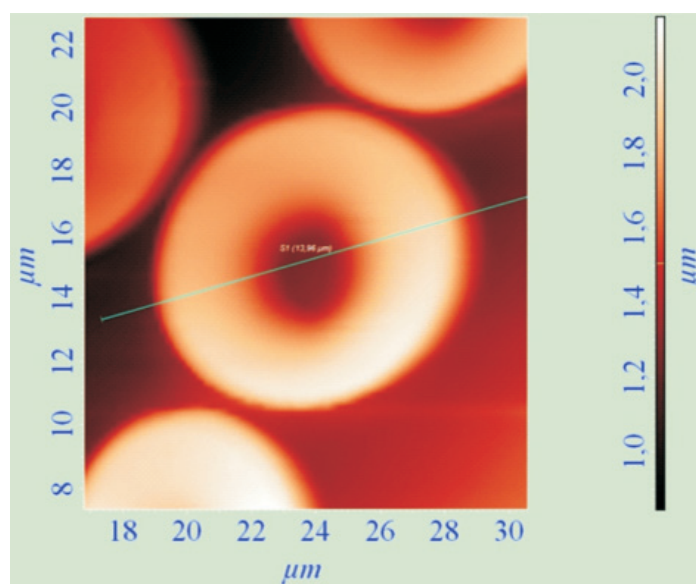


Рис. 1. Скан эритроцита ребенка (возраст 5 дней) размером 14×14 мкм². Скан пересекает линия разреза, вдоль которой определяют геометрические характеристики эритроцита

Неопределённость в данную методику расчета вносят факторы поведения эритроцита после высушивания, степень погружения его в поверхность мазка, что учитывает коэффициент k , который определяется путём сравнения объёмов эритроцитов, полученных по формуле (1), с их значениями, полученными по другим методикам, например, по

значениями из таблицы или методом Культера. Необходимо отметить, что коэффициент определяется только один раз при калибровке методики, затем его значение остается неизменным для всех измерений. Для определения численного значения коэффициента k в формуле (1) был определен MCV у 27 человек методом Культера, затем проведен ана-

лиз данных атомно-силовой микроскопии и при сравнении полученных усредненных данных получили коэффициент $k = 0,933$. При этом значения объемов лежат в диапазо-

не 80–160 мкм³, что соответствует данным, приведенным в таблице. Анализ расчетных данных MCV по предложенной формуле будет посвящена следующая статья.

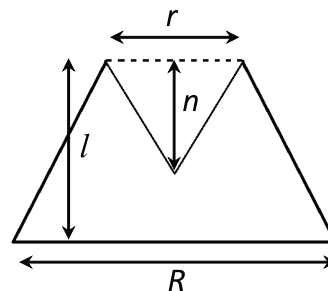
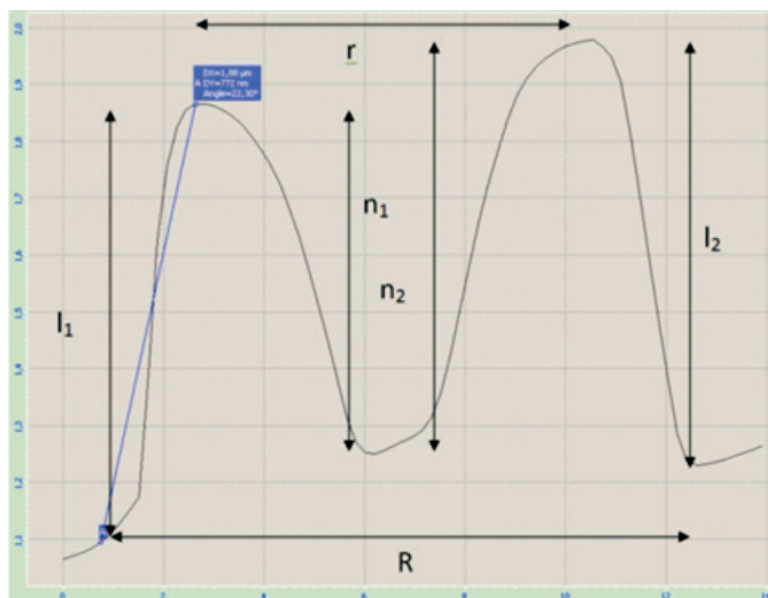


Рис. 2. График зависимости высоты стенки мембраны вдоль диагонального разреза скана эритроцита (слева) и геометрическая модель эритроцита (справа). Размеры на скане указаны в мкм. Изменение высоты происходит в диапазоне 1 мкм, координаты R в диапазоне 11 мкм

Заключение

Таким образом, в работе получено выражение для расчета объема эритроцитов по данным атомно-силовой микроскопии. Для измерения объема эритроцитов сначала проводят измерение скана мазка крови методом атомно-силовой микроскопии в полуконтактном режиме. Далее для каждого исследуемого эритроцита определяют геометрические характеристики морфологии, для чего проводят разрез эритроцита в поперечном сечении. В результате вычисляют диаметр эритроцита, его высоту, глубину и длину впадины. Предполагая, что форму эритроцита можно описать как разницу двух фигур – усеченного конуса и перевернутого конуса, была предложена формула определения объема эритроцитов.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (соглашение № 14.В37.21.0228).

Список литературы

1. Бахтизин Р.З. Сканирующая туннельная микроскопия – новый метод изучения поверхности твердых тел // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 11. – С. 83–89.
2. Гущина Ю.Ю., Плескова С.Н., Звонкова М.Б. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2005. – № 1. – С. 48–53.
3. Нанотехнологии в педиатрии: перспективы использования атомно-силовой микроскопии для диагностики / А.И. Кусельман, Ю.Н. Басырова, В.В. Светухин, Б.Б. Костиш-

ко, Ю.С. Нагорнов, И.Ю. Матвеева, М.М. Джанджгава // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2010. – Т. 2. – № 1. – С. 5–8.

4. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. – М., 2005. – 144 с.

5. Уильямс Л., Адамс У. Нанотехнологии без тайн. – М., 2009. – С. 368.

References

1. Bakhtizin R.Z. Skaniruyushchaya tunnel'naya mikroskopiya – novyy metod izucheniya poverkhnosti tverdykh tel // Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal. 2000. no. 11. pp. 83–89.
2. Gushchina Yu.Yu., Pleskova S.N., Zvonkova M.B. Issledovanie razlichiy morfologicheskikh parametrov kletok krovi cheloveka metodom skaniruyushchey zondovoy mikroskopii // Poverkhnost'. Rentgenovskie, sinkhrotronnye i neytronnye issledovaniya. 2005. no. 1. pp. 48–53.
3. Kusel'man A.I., Basyrova Yu.N., Svetukhin V.V., Kostishko B.B., Nagornov Yu.S., Matveeva I.Yu., Dzhandzhgava M.M. Nanotekhnologii v pediatrii: perspektivy ispol'zovaniya atomno-silovoy mikroskopii dlya diagnostiki // Voprosy diagnostiki v pediatrii. 2010. T. 2. no. 1. pp. 5–8.
4. Mironov V.L. Osnovy skaniruyushchey zondovoy mikroskopii. M., 2005. 144 p.
5. Uilyams L., Adams U. Nanotekhnologii bez tayn. M., 2009. pp. 368.

Рецензенты:

Лиманова Н.И., д.т.н., доцент, профессор ФГБОУ ВПО «Поволжский государственный университет телекоммуникаций и информатики», г. Самара;

Мельников Б.Ф., д.ф.-м.н., профессор кафедры прикладной математики и информатики ФГБОУ ВПО «Тольяттинский государственный университет», г. Тольятти.

Работа поступила в редакцию 26.11.2012.