

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем

«До захисту»
Зав. кафедри молекулярної
і медичної біофізики
доктор фіз.-мат. наук, доцент

_____ Берест В. П.

«__» _____ 2022 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА МАГІСТРА

КОМП'ЮТЕРНА ВІДЕОМІКРОСКОПІЯ ДЛЯ АНАЛІЗУ ДАНИХ МІКРОФЛЮЇДКИ ТА ВИВЧЕННЯ ВІКОВОЇ ДИНАМІКИ ЕРИТРОЦИТІВ

Науковий керівник
канд. фіз.-мат. наук, доцент

_____ Берест В. П.

Виконав студент групи РБ-61,
спеціальність: 105 Прикладна
фізика та наноматеріали

_____ Перцов О. В.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1 ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ І СПОСОБИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІДПОВІДНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ.....	6
1.1 Динаміка популяції еритроцитів.....	6
1.2 Старіння еритроцитів при зберіганні	7
1.3 Поверхневий заряд клітин і дзета-потенціал.....	9
1.4 Природа та роль поверхневого заряду еритроцитів.....	10
1.5 Методики визначення дзета-потенціалу	10
1.6 Розрахунок електричних характеристик клітин.....	13
1.6.1 Рух клітини під дією електричного поля.....	14
1.6.2 Обчислення значення дзета-потенціалу	15
1.7 Визначення розподілу клітин за дзета-потенціалом.....	16
2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	17
2.1 Лабораторна процедура	17
2.2 Відстеження клітин з використанням TrackMate.....	19
2.3 Параметри системи та обчислення	20
2.4 Попередня обробка відеоматеріалу	21
2.5 Обробка за допомогою редактора зображень.....	23
2.6 Обробка з використанням редактора відео.....	25
2.7 Плагін до Fiji (ImageJ).....	27
3 РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ	29
3.1 Проблема різних швидкостей руху клітин при протилежних напрямках зовнішнього електричного поля	29

3.1.1	Припущення про причину різниці в швидкостях руху – вплив неоднорідності електричного поля всередині камери.....	29
3.1.2	Шляхи вирішення проблеми.....	34
3.1.3	Корегування відхилення.....	35
3.2	Отримані розподіли за дзета-потенціалом.....	38
3.3	Обговорення.....	47
3.3.1	Перспектива подальших досліджень	49
ВИСНОВКИ.....		52
ЛІТЕРАТУРА		53
ДОДАТКИ.....		56

ВСТУП

Дзета-потенціал є електричною характеристикою клітин, що може бути безпосередньо досліджена експериментально. Його величина визначається густиною поверхневих зарядів клітини, тобто він дозволяє відстежити зміни розподілу речовин на зовнішній стороні цитоплазматичної мембрани. Таким чином можна отримати дані про її стан та властивості.

У свою чергу, еритроцити і їхні вікові зміни зокрема, являють дуже значний дослідницький інтерес. Мембрана еритроцитів є складною структурою, властивості якої дуже важливі для виконання еритроцитами їхніх функцій. З іншого боку, вона зазнає змін при старінні клітин. Разом з доступністю для дослідження це спричиняє те, що дослідженням вікових змін властивостей мембрани еритроцитів приділяється значна увага.

В таких дослідженнях використовуються різні методи. Багато робіт було присвячено дослідженням змін еритроцитів при зберіганні еритроцитів або крові в банках крові. Це дозволило не тільки визначити допустимі та бажані терміни зберігання, а і розробити методи обробки біоматеріалу, які дозволяють подовжити ці строки.

Втім, лише окремі методики дозволяють отримати не усереднені значення для популяції еритроцитів, а визначити їхній розподіл за віком. Така спектральна інформація розглядалася при поєднанні підрахунку попередників еритроцитів з розподілами за параметрами, що змінюються протягом їхнього функціонування в кровотоці. Зокрема, розглядалися розподіли за такими характеристиками, як об'єм клітини і концентрація гемоглобіну. Але проблема такого підходу полягає в значній нелінійності залежності цих параметрів від віку клітин, що ускладнює побудову моделі.

Використання інших характеристик допоможе розширити дані для дослідження розподілу клітин за віком. Тому у цій роботі розглядаються розподіли клітин за електричною характеристикою – дзета потенціалом.

Під час виконання роботи була розроблена методика аналізу відеозаписів руху клітин при мікроелектрофорезі. Вона надає можливість отримання розподілів клітин у зразку за значеннями дзета-потенціалу. Аналіз розподілів показав присутність декількох субпопуляцій у зразках для більшості донорів.

Також була виявлена проблема, що полягає в тому, що при різних спрямуваннях напруги, прикладеної до електрофоретичної камери, швидкості руху клітин є різними. З'ясовано, що розподіли за дзета-потенціалом зберігають свій патерн за цих змін, але характерні значення величин дзета-потенціалу можуть зазнавати зсуву. В роботі розглянуті можливі причини і деякі шляхи вирішення проблеми такої неоднорідності.

Отримані значення дозволяють розпізнати декілька субпопуляцій еритроцитів у зразку. Це свідчить про можливість отримання даних, більш точних та повних, ніж середнє значення дзета-потенціалу. Розгляд зразків від декількох донорів дозволив виявити деякі закономірності, але вибірка була надто малою для визначення статистично значимих відмінностей між групами людей.

1 ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ І СПОСОБИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІДПОВІДНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

Еритроцити є спеціалізованими клітинами, основною функцією яких є транспортування кисню та вуглекислого газу, що здійснюється завдяки гемоглобіну. Еритроцити грають роль не лише для дихання, їхня популяція дуже численна, тому вони суттєво впливають на реологічні властивості крові.

Важливу роль в здатності еритроцитів виконувати свої функції грає їхня цитоплазматична мембрана. Вона повинна мати значну площу і багатократно витримувати навантаження на зсув, якого еритроцит зазнає при проходженні через капіляри. Крім того, вона повинна мати помірну адгезію до сусідніх еритроцитів, інших клітин крові та стінок судин.

Для виконання цих та багатьох інших функцій мембрана еритроциту має багатий ліпідний та білковий склад і підтримується особливою структурою цитоскелету. Саме на мембрані еритроцитів представлені антигенні детермінанти, які визначають групу крові. А збільшення концентрації фосфатидилсерину на зовнішній мембрані еритроциту, наприклад, розпізнається фагоцитами як сигнал до його фагоцитозу [1, 2].

1.1 Динаміка популяції еритроцитів

Популяція еритроцитів постійно оновлюється. У дорослої людини близько 2 мільйонів клітин потрапляють у кровотік з кісткового мозку кожену секунду і така ж кількість відфільтровується. Вони руйнуються і фагоцитуються мононуклеарними фагоцитами селезінки та печінки. Типові еритроцити циркулюють від 100 до 120 діб і за цей час зазнають ряду змін:

- об'єм зменшується приблизно на 20%;
- вміст гемоглобіну зменшується приблизно на 15%;
- змінюються властивості цитоплазматичної мембрани: зменшується еластичність, осмотична і механічна стійкість;
- площа поверхні зменшується, змінюється форма клітин, формуються мікровезикули та відбуваються інші численні зміни [3].

Клітинами-попередниками еритроцитів є ретикулоцити. Підрахунок кількості ретикулоцитів в крові дозволяє оцінити швидкість утворення еритроцитів. Ця процедура здійснюється з високою продуктивністю автоматичними гематологічними аналізаторами [3, 4]. Але підрахунок ретикулоцитів і порівняння цих даних із чисельністю еритроцитів не надає інформації про зміни еритроцитів під час їх подальшого існування в кровотоці (старіння).

Дослідження динаміки зміни еритроцитів за популяцією загалом здійснюється з використанням методик вимірювання параметрів для одиничних еритроцитів. При цьому вимірюють об'єм клітин або визначають концентрацію гемоглобіну. Ці дані можуть бути поєднані з даними про чисельність ретикулоцитів. Але визначення вікової динаміки є ускладненим через значну нелінійність змін об'єму та концентрації еритроцитів при їхньому старінні. Відповідно, ведеться розробка моделей для цих процесів [3].

1.2 Старіння еритроцитів при зберіганні

Еритроцити є найбільш затребуваним компонентом крові для переливань. Відповідно, вони є загалом найбільш затребуваним трансфузійним продуктом. Тому вивченню їхніх змін при зберіганні було присвячено багато досліджень. На цих дослідженнях базуються сучасні методики зберігання, проте регулярно і вони ставляться під сумнів дослідниками. Нові роботи можуть призвести до вдосконалення процедур підготовки до зберігання, умов зберігання та відновлення після нього.

Внаслідок тривалого зберігання за зниженої температури в еритроцитах все одно неминуче починають відбуватися процеси, що можуть порушити їхню функціональність і зробити їх використання неефективним або небезпечним для реципієнта. Натомість визначення механізмів старіння еритроцитів має в першу чергу на меті розробку методик подовження термінів зберігання. З іншого боку, такі дослідження несуть інформацію про фізіологію червоних кров'яних тілець.

В першу чергу еритроцити страждають внаслідок виснаження механізмів енергетичного забезпечення – зниження рівня АТФ (аденозинтрифосфату). Червоні кров'яні тільця не здатні до окисного фосфорилування. Більшу частину енергії вони отримують шляхом гліколізу. Але внаслідок енергетичного метаболізму накопичуються лактат та протони, через що знижується рН і сповільнюється виробництво АТФ. Також спостерігається виснаження й інших ресурсів, зокрема 2,3-бісфосфогліцерату (2,3-ДФГ) і втрачається антиоксидантна здатність (відповідно, спостерігається руйнуюча активність вільних радикалів) та змінюються концентрації K^+ та Na^+ . Щодо цитоплазматичної мембрани, то за таких умов відбувається зміна ліпідного складу, розподілу ліпідів та зазнають впливу мембранні білки.

Виходячи з таких шляхів змін, розробляються відповідні заходи для подовження зберігання. Так, наприклад, створення лужного середовища дозволяє нейтралізувати продукти енергетичного метаболізму та подовжувати строки його функціонування. Загалом на даний момент еритроцити можуть зберігатися в банках крові до 6-7 тижнів [5, 6]. Хоча за певних методів дослідження, зокрема діелектрометричних, зміни спостерігаються вже на другому тижні [5]. Варто звернути увагу на, що діелектрометричні властивості в першу чергу визначаються цитоплазматичною мембраною. Внутрішній вміст еритроцитів є провідником, але мембрана являє собою діелектричний бар'єр. Тому еритроцити здатні поводити себе подібно до діелектричних включень, і саме вони несуть основний вплив на властивості крові [7].

Отже, мембрана є однією з найчутливіших до старіння та пошкодження структур еритроцитів. Параметри, що відображають стан цитоплазматичної мембрани, досліджуються різними методами. Зокрема, для досліджень старіння еритроцитів при зберіганні вже використовувалися дослідження дзета-потенціалу (але не розподілу клітин за ним) [8].

1.3 Поверхневий заряд клітин і дзета-потенціал

Основний вклад в негативний поверхневий заряд еритроцитів вносять сіалові кислоти (похідні нейрамінової кислоти, моносахариду з дев'ятиатомним вуглецевим ланцюгом). Заряд несуть їхні карбоксильні групи. Для еритроцитів людини характерний особливо високий вміст сіалових кислот порівняно з еритроцитами тварин. Їхня локалізація та роль були детально вивчені з використанням ферментів, що каталізують їх гідроліз. При цьому значення має не тільки величина заряду, але і його локалізація. Переважна більшість молекул сіалових кислот представлені на зовнішній поверхні мембрани і тому їх заряди доступні для взаємодій з водним середовищем [9].

Втім, поверхневий заряд клітин неможливо виміряти безпосередньо. За фізіологічних умов (тобто для більшості клітин принаймні у фізіологічному розчині або певному буфері) зовнішня поверхня цитоплазматичної мембрани взаємодіє з молекулами води, які являють собою диполі, і іонами, утвореними внаслідок дисоціації сполук у водному середовищі. Тому біля поверхні мембрани накопичуються іони з зарядом, протилежним за знаком до поверхневого заряду мембрани.

Таким чином змінюється розподіл іонів в околі клітини. Спостерігається підвищена концентрація противоіонів поблизу її поверхні. Довкола клітини формується подвійний електричний шар. Тонкий шар противоіонів, що взаємодіють з мембраною найсильніше, залишається нерухомим відносно неї. Натомість далі, відділений умовною поверхнею ковзання, йде дифузний шар з рухомими іонами. Експериментально можна спостерігати лише значення потенціалу на поверхні ковзання, що носить назву «дзета-потенціал».

Дзета-потенціал властивий усім зваженим частинкам, які формують електростатичні взаємодії (фактично будь-яким). Для еритроцитів його значення визначаються наявністю негативно заряджених глікопротеїдів на зовнішній поверхні цитоплазматичної мембрани, зазвичай складають в середньому близько -15 мВ і можуть змінюватися при старінні еритроцитів або дії інфекцій чи певних сполук [8, 10, 11].

1.4 Природа та роль поверхневого заряду еритроцитів

Наявність поверхневого заряду і, відповідно, дзета-потенціалу, еритроцитів є необхідною умовою для виконання ними своїх функцій. Заряд мембрани викликає відштовхування еритроцитів. Таким чином вони уникають агрегації. Тільки клітини, що подолали цей бар'єр, можуть опинитись досить близько одна до одної для «злипання».

Дія певних речовин знижує значення дзета-потенціалу і це призводить до аглютинації клітин. Аглютинація в кровотоку може спричинити згортання крові. Натомість лабораторній практиці аглютинація є необхідною при проведенні різних тестів. Зокрема, вона є необхідною для більшості тестів антиген-антитіло.

Аглютинації можна досягти з використанням різних речовин. Наприклад, в імуногематології застосовуються протеолітичні ферменти – папаїн та бромелаїн [10, 12].

1.5 Методики визначення дзета-потенціалу

Існують різні методики визначення дзета-потенціалу і, як наслідок, розрахунку густини поверхневого заряду клітин. Усі вони полягають у вимірюванні швидкості руху клітин під дією електричного поля. Відповідно, за значенням швидкості можуть бути розраховані електрофоретична рухливість і дзета-потенціал. А за значенням дзета-потенціалу в наближенні певної моделі подвійного електричного шару можна визначити густину поверхневого заряду клітини.

В дослідженнях клітин досить давно використовується метод мікроелектрофорезу. Також знаходить застосування метод капілярного електрофорезу [13].

При проведенні мікрофоретичних досліджень виконується пряме спостереження клітин через оптичний мікроскоп. Тобто безпосередньо здійснюється відстеження руху клітин у суспензії під дією електричного поля.

Швидкість певної кількості клітин визначають як відношення пройденої відстані до проміжку часу руху, а за швидкістю руху визначається електрофоретична рухливість. На основі її значення розраховуються інші електричні характеристики клітин. Під час проведення мікрофоретичного дослідження можуть бути визначені не тільки середні значення, але і розподіл клітин, проте постає питання методики збору даних, яке і вирішується у даній роботі [9, 12, 14].

При проведенні капілярного електрофорезу рух клітин під дією електричного поля відбувається вздовж капіляру між двома ємностями. На кінці капіляру знаходиться детектор. Довжина капіляру є фіксованою і визначається час, необхідний клітинам для подолання такої відстані. Окремі клітини не спостерігаються, а вимірюється їхня концентрація. Також необхідним є врахування електроосмотичного потоку, який виникає, якщо поверхня стінок капіляру має електричний заряд.

Капілярний електрофорез дозволяє отримувати розподіли за електрофоретичною рухливістю. Роздільна здатність методу дозволяє розрізнити окремі популяції (групи частинок з різною електрофоретичною рухливістю). Тому капілярний електрофорез широко використовується при вивченні молекулярних структур та, зокрема, фермент-субстратних взаємодій. Але розміри клітин є більшими, а концентрації меншими, що значно погіршує якість даних амплітуди сигналу, і тому цей метод погано підходить для вивчення безперервного розподілу клітин всередині популяції [13, 15, 16].

Однак, мікрофоретичні дослідження і капілярний електрофорез є досить трудомісткими методиками і надають погано відтворювані результати при дослідженнях клітин. Тому розповсюдженими стали прилади, що реалізують метод електрофоретичного розсіювання світла, заснований на динамічному розсіюванні світла (ДРС) [13].

Динамічне розсіювання світла спостерігається у середовищах, що містять броунівські частинки. Броунівський рух частинок призводить до локальних флуктуацій показнику заломлення. Тому коливання інтенсивності розсіяного світла є джерелом інформації про рух частинок.

У приладі на кювету спрямований лазерний промінь з визначеною довжиною хвилі. На частинках (клітинах) відбувається розсіювання цього світла відповідно до теорії Релея. Відповідно, довжина хвилі повинна бути того ж порядку, що і розміри частинок, або більшою (інакше переважатимуть інші типи розсіювання). Саме тому еритроцити знаходяться біля верхньої межі допустимих розмірів частинок для таких приладів (зазвичай 10 мкм).

Відповідно до теорії Релея, частинка діє як вторинне джерело, що випромінює розсіяне світло. Але якщо частинка перебуває у русі, то спостерігається доплерівський зсув. Відповідно, при використанні монохроматичного когерентного лазерного випромінювання внаслідок інтерференції розсіяних хвиль відбуваються флуктуації розсіяного світла, швидкість яких залежить від швидкості руху частинок.

Розсіяне світло реєструється фотоелектронним помножувачем. Записана залежність інтенсивності розсіяного світла від часу аналізується за допомогою кореляційної спектроскопії. Визначається автокореляційна функція, а за її апроксимацією теоретичною кривою може бути розрахований коефіцієнт дифузії броунівських частинок (i , відповідно, їхні розміри за формулою Стокса-Ейнштейна).

У свою чергу, у приладах для досліджень дзета потенціалу, заснованих на ДРС, кювета додатково містить електроди. Подання на них напруги спричиняє направлений рух частинок. Відповідно, ця може бути розрахована і ця складова швидкості, а отже і дзета-потенціал [17, 18].

Прилади визначення дзета-потенціалу, засновані на динамічному розсіюванні світла, є зручними у використанні та надають добре відтворювані результати. Саме тому вони стали розповсюдженими у лабораторній практиці. Розрахунки виконуються програмним забезпеченням, але для правильного налаштування і отримання релевантного результату необхідним є розгляд теоретичних підстав методу. Теоретична модель є дуже складною і вимагає калібровки значень, тому використовується для отримання лише середніх значень дзета-потенціалу.

Методика проведення експерименту, розглянута у цій роботі, відповідає проведенню мікроелектрофоретичного дослідження, але містить значні особливості, що полягають в накопиченні більшого обсягу даних і подальшій їхній обробці. Також вона має на меті автоматизацію виконання дослідження та підвищення точності, що має покращити відтворюваність результатів, отримуваних за нею.

1.6 Розрахунок електричних характеристик клітин

У попередніх підрозділах цієї роботи розглянуті різні методики визначення дзета-потенціалу клітин. Усі вони полягають у вимірюванні швидкості руху клітин під дією електричного поля. Відповідно, за значенням швидкості можуть бути розраховані електрофоретична рухливість і дзета-потенціал. Ці параметри тісно зв'язані зі швидкістю руху клітини.

Натомість густина поверхневого заряду клітини пов'язана з величинами, що визначаються експериментально, опосередковано через дзета-потенціал. Тому вона розраховується за значенням дзета-потенціалу в наближенні певної моделі подвійного електричного шару.

1.6.1 Рух клітини під дією електричного поля

При русі клітина досягає певної швидкості і далі рухається з нею, не прискорюючись. За цієї швидкості сила, що діє на клітину з боку електричного поля, компенсується силою опору руху у в'язкому середовищі. Залежність сили опору від швидкості за малих значень швидкості є лінійною, а при їхньому збільшенні стає квадратичною. Для маленьких частинок, що рухаються з малими швидкостями v , можна використати формулу Стокса (вважатимемо форму клітин наближеною до кулеподібної; числа Рейнольдса також малі, рух рідини ламінарний):

$$F_{\text{оп}} = 6\pi\mu r v ,$$

де $F_{\text{оп}}$ – сила опору руху, μ – коефіцієнт в'язкості середовища, а r – радіус клітини.

За модулем сила опору дорівнює силі дії електричного поля, яка дорівнює добутку напруженості поля E та заряду q : $F = Eq$. Тому заряд клітин у відповідному перерізі дорівнюватиме:

$$q = \frac{v}{6\pi\mu r} , \quad (1.1)$$

Втім, заряд клітини не є зручним для розгляду властивостей клітин, адже він залежить від радіусу клітини, який в цій методиці неможливо визначити для кожної клітини точно. Крім того, клітина рухається як єдине ціле разом з нерухомим шаром іонів (до поверхні ковзання), який частково екранує поверхневий заряд і визначатиметься сумарний заряд такої системи. Саме тому в дослідженнях клітин використовується інший параметр електричних властивостей їхньої поверхні – дзета-потенціал.

1.6.2 Обчислення значення дзета-потенціалу

Важливою характеристикою руху клітин у в'язкому середовищі є електрофоретична рухливість u , $\text{м}^2 \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [1]:

$$u = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

У свою чергу, дзета-потенціал можна розрахувати за рівнянням Гельмгольца – Смолуховського (яке отримується шляхом розгляду електрофоретичної камери як плаского конденсатора та застосування закону в'язкості Ньютона):

$$\zeta = \frac{\eta u}{\epsilon \epsilon_0}$$

Воно є застосовним лише в наближенні тонкого подвійного електричного шару: $kr \gg 1$, де k – величина, зворотня до довжини Дебая, r – радіус частинки (клітини). Для водних середовищ шару має значення приблизно порядку нанометрів, тому із врахуванням радіусу еритроцитів близько 3,5 – 4 мкм це наближення є застосовним. Звичайно, умовою використання цих співвідношень є і малі швидкості руху клітин (наближення до ламінарного руху рідини) [14, 16, 19].

Важливо відмітити, що значення дзета-потенціалу не залежить від радіусу клітини. Клітини з більшим радіусом є носіями більших зарядів, і ці ефекти мають один і той самий порядок. Тому врахування розмірів клітин для визначення дзета-потенціалу не є потрібним, достатньо спостерігати швидкості та знати параметри середовища.

Підставимо у це рівняння вираз для електрофоретичної рухливості u і отримаємо:

$$\zeta = \frac{\eta v}{\epsilon \epsilon_0 E}, \quad (1.2)$$

1.7 Визначення розподілу клітин за дзета-потенціалом

Визначення розподілу клітин за дзета-потенціалом є теоретично можливим і для інших методик вимірювання електрофоретичної рухливості, окрім мікроелектрофорезної – капілярного електрофорезу та методу електрофоретичного розсіювання світла (заснованого на ДРС). Але для них ускладненим є отримання достатньої роздільної здатності та врахування факторів, що можуть спричинити спотворення результатів (для капілярного електрофорезу обмежена кількість клітин, які підлягають вимірюванню, і необхідним є врахування впливу стінок капіляра, а електрофоретичне розсіювання має складні теоретичні підстави для розрахунків).

Методики аналізу відеозаписів хроматограм раніше були використані для інших досліджуваних систем [14]. Особливість досліджень такого роду полягає в тому, що методи отримання даних з відео (розпізнавання та відстеження клітин) і подальшої обробки суттєво залежать від особливостей об'єктів, що вивчаються. Дійсно, методика дозволяє отримувати розподіли клітин за електричними параметрами та досліджувати кореляцію цих параметрів з іншими властивостями зразків. Але високими є вимоги саме до обробки даних, вона стає дуже важливим фактором для забезпечення точності та відтворюваності результатів.

Тому метою цієї роботи була розробка методики визначення розподілу еритроцитів за дзета-потенціалом з використанням відстеження руху клітин при мікроелектрофорезі. Кількість проаналізованих зразків невелика, тому на меті не ставилось виявлення статистично значимих відмінностей за параметрами розподілів. Натомість виконувалось спостереження за характером цих розподілів і оцінка можливості їх застосування для виявлення неоднорідностей вікової динаміки.

2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Лабораторна процедура

Для визначення дзета-потенціалу був використаний метод спостереження електрофорезу клітин. Мікрофлюїдика передбачає використання малих об'ємів біоматеріалу. Відповідно, використовувалась мікроелектрофоретична камера, яка була встановлена у мікроскоп (Рисунок 2.1). Під дією електричного поля, що створювалося при поданні напруги на електроди мікроелектрофоретичної камери, клітини починали рух відповідно до свого дзета-потенціалу (поверхня еритроцитів має негативний заряд).

Після подання напруги виконувався запис руху клітин з використанням цифрової відеокамери, вбудованої у мікроскоп. З метою калібрування відстаней, пройдених клітинами, мікроскоп завчасно був сфокусований так, щоб у полі зору розпізнавалась сітка камери Горяєва, яка містилась у мікроелектрофоретичній камері.

Також слід було враховувати, що через в'язке тертя має місце розподіл клітин за швидкостями в залежності від віддаленості від дна камери. Цей розподіл є параболічним [9]. Через його наявність необхідним було налаштування мікроскопа таким чином, що його фокальна площина знаходилася достатньо далеко від дна камери. Відповідно, усі зразки мали бути досліджені на одній і тій самій глибині приблизно на середині глибини шару суспензії.

Отримані розподіли клітин за швидкостями були перевірені на відмінність від параболічних, щоб запевнитися, що спостерігається не розподіл швидкостей клітин в залежності від глибини, а розподіл клітин за швидкостями у перерізі в середині камери. Дійсно, виміряні швидкості зазвичай мали розподіли, що не відповідали параболічному розподілу за глибиною (графіки отриманих розподілів наведені у розділі «Результати»).

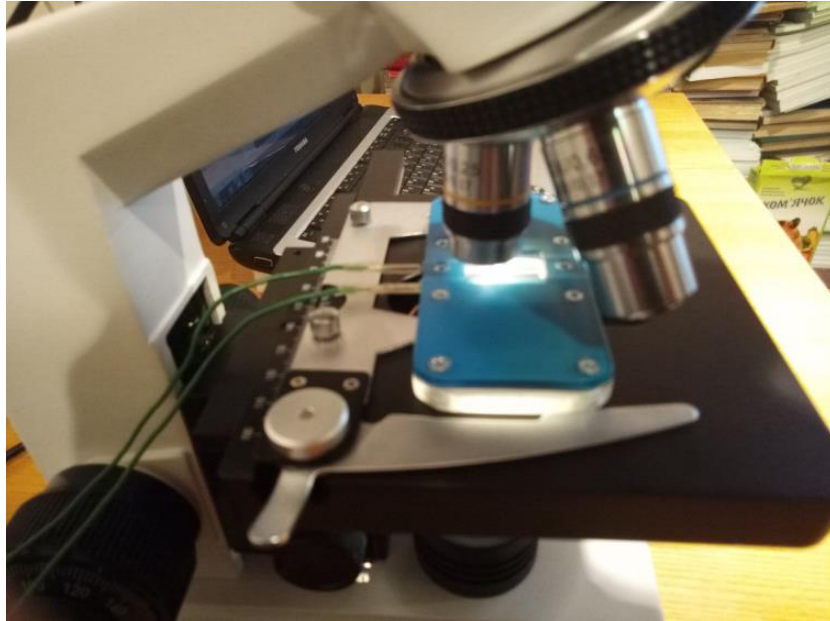


Рисунок 2.1 – Мікроелектрофоретична камера, встановлена на предметному столику мікроскопа

В дослідженнях використовувалася суспензія еритроцитів з концентрацією 10^{10} клітин на літр. Вона була приготована із суспензії відмитих еритроцитів у фосфатно-сольовому буфері з концентрацією 10^{12} клітин на літр шляхом розведення в буфері для електрофорезу (у співвідношенні 1:99). Склад буферу для електрофорезу: 10 мМ НЕРЕС (4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота), 240 мМ цукрози; рН 7,0.

Під час кожного досліду в мікроелектрофоретичну камеру поміщувалися 800 мкл суспензії еритроцитів. Запис відео проводився з використанням програмного забезпечення ScoreImage 9.0 безперервно під час руху клітин послідовно в один бік та в інший. У кожному напрямку спостерігався рух принаймні протягом хвилини. Нажаль, іноді поле зору могло бути посунутих через сторонні вібрації. Тому запис проводився протягом довшого часу, і у таких випадках вирізався фрагмент відео, на якому переміщення клітин не переривається. Спостереження руху в двох напрямках мало на меті подальше виключення систематичної помилки.

2.2 Відстеження клітин з використанням TrackMate

Для відстеження переміщень клітин був використаний плагін TrackMate до програми Fіjі (версії програми ImageJ зі значною кількістю доповнень). Для ефективної роботи цього програмного забезпечення (найбільшої кількості відстежуваних клітин за осяжного об'єму розрахунків) використовувалася попередня обробка відео, описана у наступному розділі. Також до усіх відео застосовувалося зниження частоти кадрів (зазвичай до 9 к/с) для скорочення об'єму даних для обробки.

Параметри відеозйомки були враховані перед роботою з TrackMate шляхом налаштування метаданих зображень (відео): інтервалу часу між кадрами – 0,11 с – та ширини пікселя – 0,66 мкм (у використаному відео з роздільною здатністю 640*480 пікселів ширина великою клітинки камери Горяєва складає 304 пікселі, що відповідає 0,2 мм). При цьому діаметр еритроцита становить приблизно 7-8 мкм.

Використовувався метод детекції LoG (Laplacian of Gaussian filter), який є ефективним для детекції об'єктів діаметром 5-20 пікселів, та було застосовано обмеження за якістю точки 1 під час попередньої фільтрації.

Якщо була застосована попередня обробка відео, то детектовані клітини зазвичай були досить рівномірно розподілені за якістю і не вимагали фільтрації (етап розрахунку властивостей розпізнаних точок для фільтрації в такому випадку пропускався).

Для зв'язування положень клітин між кадрами застосовувався трекер Simple Lap, який не передбачає ділення та злиття клітин, але враховує можливість відсутності детекції клітини на деяких проміжних кадрах.

У ньому встановлювались наступні налаштування:

- Linking max distance (максимальне переміщення між двома кадрами) – 7 мкм;
- Gap-closing max distance (максимальна відстань заповнення пропуску) – 15 мкм;
- Gap-closing max frame gap (максимальна кількість кадрів пропуску) – 5.

Після цього обробка даних для досліджень руху в один бік та в двох напрямках була різною:

- Для випадку руху у двох напрямках сформовані треки відфільтровувалися за кількістю розпізнаних точок і експортувалися у файл з розширенням .xml. У подальшому для аналізу даних, збережених у цьому файлі, використовувалося програмне забезпечення Microsoft Office Excel разом із макросом. Макрос до MS Office Excel, написаний на мові VBA, допомагав розпізнати періоди руху клітин в одному напрямку та в протилежному і його виконання дозволяло розрахувати за переліком координат швидкості в одному та в іншому напрямку для кожної розпізнаної клітини.
- При розгляді руху лише в один бік застосовувався фільтр за пройденою відстанню, адже короткі треки відповідають клітинам, що виявилися нерухливими, або елементам, розпізнаним з помилками.

2.3 Параметри системи та обчислення

В ході дослідів та розрахунків використовувалися наступні параметри:

- концентрація еритроцитів у суспензії: 10^6 клітин/мл;
- відстань між електродами мікроелектрофоретичної камери: $l = 10$ мм;
- прикладена напруга: $U = 10$ В.

Розрахунок дзета-потенціалу виконувався за методикою, описаною у підрозділі «1.6.2»

Обчислення значення *дзета-потенціалу*». Значення динамічної в'язкості та діелектричної проникності приймалися рівними значенням для води (при 20°C): $\eta = 1,0 \cdot 10^{-3}$ Па·с; $\varepsilon = 80$ (та електрична стала $\varepsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12}$).

Напруженість поля E в електрофоретичній камері для розрахунків вважалася однорідною і визначалася за наступною формулою:

$$E = \frac{U}{l}$$

Відповідно, напруженість електричного поля всередині мікроелектрофоретичної камери вважалась рівною 10^3 В/м.

2.4 Попередня обробка відеоматеріалу

Програмний продукт для відстеження клітин вимагає попередньої обробки відео. Дійсно, відеоматеріал може бути одразу завантажений до програми відстеження, але через те, що клітини в такому разі гірше виділяються на зображенні, необхідним буде розпізнавання усіх потенціальних зображень клітин і їхній відбір за якістю. Це не тільки ускладнює налаштування відбору зображень (при недостатньо точному налаштуванні можна втратити інформацію про значну кількість клітин), але і багатократно збільшує об'єм розрахунків. Зокрема, у використаному програмному продукті TrackMate попередній фільтр є досить грубим, тому у більшості випадків використання відео без попередньої обробки, кадр з якого наведено на рисунку 2.2, унеможливило розпізнавання усіх клітин через надвисокий об'єм розрахунків характеристик якості для фільтрації.

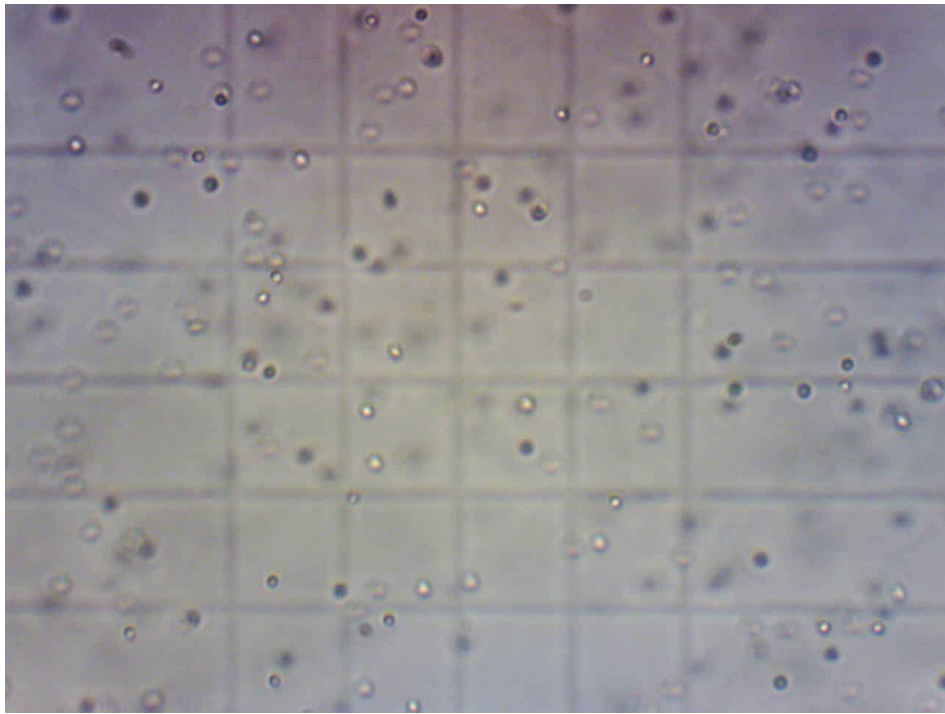


Рисунок 2.2 – Кадр з відеозйомки процесу хроматографії

Тому до відзнятих відео застосовувалася попередня обробка, яка зменшувала об'єм даних для опрацювання та спрощувала відбір розпізнаних клітин за якістю зображень (або, зазвичай, виключала необхідність такого відбору).

Для реалізації такої мети попередня обробка мала вирішити декілька задач:

- Отримання максимально контрастних світлих зображень клітин на темному фоні (протилежне забарвлення вимагатиме інверсії зображення перед обробкою у TrackMate);
- Виключення неоднорідності освітлення поля зору – центр кадру є більш світлим, ніж ділянки, розташовані біля краю. Обробка мала досягти однорідності кольору фону без втрат контрастності клітин на ньому;
- Врахування як затемнених, так і світлих клітин (відображення усіх світлими) – на відзнятому матеріалі можна спостерігати еритроцити, як затемнені внаслідок поглинання та розсіювання світла, так і висвітлені через відбиття та заломлення.

Вони знаходилися в суспензії на дещо різній глибині з можливим зсувом в один або інший який бік відносно фокусної площини. Для отримання максимально ємкої вибірки враховувалися усі клітини, що могли бути візуально розпізнані;

- Необхідно видалити з кадру або гранично скоротити видимість сітки камери Горяєва та клітин, що перебувають далеко від фокусної площини і тому їхні зображення є надто розмитими для позиціонування.

З іншого боку, припускалися певні спрощення, пов'язані з властивостями, що не розглядалися:

- співвідношення яскравості та контрастності клітин могло бути втраченим – на меті ставилося розпізнавання максимальної кількості клітин і відбір найкраще відображених не здійснювався. Тому кінцева яскравість клітин не мала значення (у кінцевому варіанті попередньої обробки – власному плагіні до Fiji – використовувалися лише два можливих значення яскравості: 0 для фону і 255 для клітин);
- збереження розмірів клітини також не мало значення. За високої контрастності клітина буде все одно розпізнана трекером (якщо не застосовується подальша фільтрація за якістю відображення клітин).

Отже, для виконання сформульованої мети методика попередньої обробки була відпрацьована з використанням редактора зображень, а потім реалізована у вигляді плагіну (макросу) до Fiji. Також у цій роботі наведений алгоритм обробки, що може бути виконаний у більшості відеоредакторів.

2.5 Обробка за допомогою редактора зображень

Відпрацювання алгоритму попередньої обробки відеоматеріалу здійснювалося за допомогою графічного редактора зображень Paint.Net із використанням доповнення CodeLab. Цей редактор призначений для обробки лише статичних зображень, не відео. Але він дозволяє виконувати досить швидко обробку зображення. Тому за його використання можливим був динамічний підбір параметрів, адже за їх зміни обробка виконувалася одразу

майже у реальному часі. Натомість доповнення CodeLab призначене для створення власних плагінів з використанням мови програмування С# [20, 21].

З вихідних відеозаписів були відібрані декілька характерних кадрів, на основі яких був розроблений алгоритм обробки. Оптимальним для задоволення умов, описаних у попередньому підрозділі, виявився наступний набір перетворень (відповідні проміжні зображення наведені у додатку А):

1. Попереднє поверхнєве розмиття. Усі подальші перетворення спрямовані на виділення неоднорідностей на зображенні. При цьому виділятимуться і сторонні елементи, такі як нерухомі клітини і лінії сітки камери Горяєва. Це може заважати розпізнаванню клітини, коли її траєкторія проходить над таким елементом. Поверхнєве розмиття здійснює розмиття тих зон зображення, де градієнт зміни кольору не перевищує певне порогове значення. При точному налаштуванні порогу більшість сторонніх елементів можуть бути розмиті, а контрастність клітин збережеться. Тому при подальшій обробці розмиті сторонні елементи зможуть бути видалені.
2. Віднімання розмитого вихідного зображення. Поле зору зйомки має неоднорідне освітлення, тому цей етап обробки має ключове значення. Для отримання чорно-білого зображення, на якому будуть відображені клітини на однорідному фоні необхідно виключити фон початкового зображення. Але це є ускладненим тим, що неоднорідна освітленість спричиняє неоднорідність забарвлення фону. Тому замість віднімання певного постійного патерну був застосований прийом, який полягав у тому, що фон імітувався тим самим зображенням, розмитим з великим радіусом.

За умови, що радіус розмиття достатньо перевищував розміри клітин, вони видалялися при розмитті. З іншого боку, радіус був в достатній мірі меншим за розміри кадру і тому фонові складова зберігалася.

Достатньо було відняти розмите зображення від вихідного і на чорному фоні залишалися лише ті елементи, які спочатку відрізнялися від фону за яскравістю.

3. Втім, зображення, отримане після попередніх етапів обробки, мало низьку яскравість. Тому застосовувався досить простий прийом її підвищення – множник, який пропорційно збільшував яскравість кожного пікселю.
4. І остання складова обробки засновувалась на тому, що вихідне зображення було триканальним, натомість для розпізнавання клітин використовується лише один канал кольору. Тому різниця між каналами також могла бути використана. Виявилося, що синій канал містив найбільше шуму та надавав найменшу яскравість клітин, тому він мав бути виключеним. Найкращу контрастність надавав червоний канал, тому для більшості вимірювань для подальшої обробки залишали лише його. Зелений канал виявився дуже близьким до червоного, тому іноді для порівняння міг бути використаний він, або комбінація червоного та зеленого (по 50%).

З точки зору оптимізації розрахунків під час обробки доречним є перетворення зображення на одноканальне в першу чергу, адже усі інші перетворення задіюють кожен канал окремо і, таким чином, кількість розрахунків могла б бути знижена втричі.

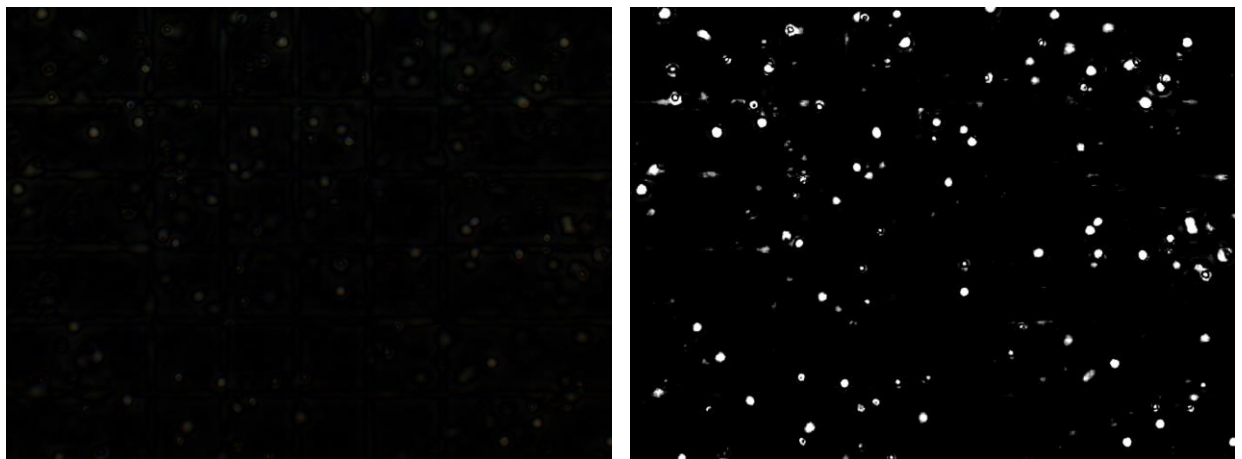
Але не усі редактори та не усі кодування файлів передбачають можливість збереження та опрацювання одноканального зображення. Тому в таких випадках не має значення те, на якому етапі буде залишений один канал кольору.

2.6 Обробка з використанням редактора відео

Також було з'ясовано, що наближений результат можна відтворити шляхом застосування ряду найпростіших фільтрів та перетворень, доступних у більшості відеоредакторів. Обробка здійснювалася за допомогою відеоредактора ShotCut [22]. При використанні іншого редактора лише для ефекту «Сортування за кольором» може виникнути необхідність знайти ефект на заміну, який відповідає за корекцію кольорів.

Обробка за допомогою відеоредактора вимушено виконується в два етапи. Після здійснення ряду перетворень необхідно застосувати додані перетворення, тобто експортувати проміжний результат. Після чого його потрібно відкрити в редакторі повторно. Тоді він являтиме собою одну доріжку, до якої можна буде застосувати ефекти, що здійснять додаткове виділення клітин та посилення яскравості зображення. Опис алгоритму дій:

- 1) Додати вихідне відео двома шарами (доріжками) і до обох застосувати ефект «Кольорова яскравість» (Розмиття – 25%);
- 2) На верхній з шарів накласти ефект розмиття. Можна використати розмиття за Гаусом або інше. Дещо ефективнішим виявилось «Експоненційне розмиття» (Кількісний показник – 75);
- 3) Налаштувати віднімання шару, який містить розмите зображення: фільтр «Режим накладання» – «Додавання»;
- 4) Експортувати проміжний результат. Кадр з проміжного відео наведений на рисунку 2.3а. Таким чином, на цьому етапі завершується віднімання фону.



а

б

Рисунок 2.3 – Кадри з проміжного і кінцевого результатів обробки з використанням відеоредактора

- 5) Завантажити до редактора експортоване відео;

- 6) «Сортування за кольором» дозволяє обрати один канал кольору та посилити його, оптимальним зазвичай є червоний. Налаштування для яскравих ділянок: R – 100%; G – -100%; B – -100%;
- 7) Додати фільтр «Контраст» інтенсивністю близько 77;
- 8) «Відтінок/Освітленість/Насиченість» – виставити насиченість 0% для перетворення зображення на чорно-біле;
- 9) Фільтр «Рівні» дозволяє остаточно підвищити яскравість клітин та контрастно виділити їх. Орієнтовні значення параметрів: канал – значення; вхідний чорний – 1,6; вхідний білий – 11,1; гама – 1; вихідний чорний – 0; вихідний білий – 255.

Результат застосування зазначеного алгоритму перетворень до відео відображений на рисунку 2.3б.

2.7 Плагін до Fiji (ImageJ)

Оскільки для розпізнавання клітин був обраний плагін TrackMate до Fiji, то для оптимізації проведення досліджень було доречно здійснювати попередню обробку також в програмному продукті Fiji. Він передбачає досить широкі можливості обробки біологічних зображень, але для збільшення швидкості та точності обробки був підготований власний плагін. Він здійснював для кожного кадру ті ж перетворення, які були описані для редактора зображень, але алгоритм обробки мав певні особливості і полягав у наступних перетвореннях:

1. Перетворення зображення на одноканальне (червоний канал, зелений або їхня комбінація), адже Fiji підтримує обробку таких зображень і тому подальша обробка вимагала менше розрахункових ресурсів та часу.
2. Віднімання того ж кадру розмитого за Гаусом. Можливим було використання спрощених моделей розмиття, але вбудований алгоритм розмиття за Гаусом є гарно оптимізованим і дає кращий результат.

Також можлива оптимізація за рахунок використання одного і того самого розмитого зображення для усіх кадрів. Але клітини все ж залишають певний слід після розмиття (або за завищеного радіусу якість фону буде втрачена) і тому для стабільності результатів застосовувалося окреме опрацювання кожного кадру.

3. Порівняння з пороговим значенням. Якщо при застосуванні поверхневого розмиття виконувалося порівняння градієнту яскравості з порогом, то тут порівнювалася різниця між яскравістю пікселя та фону (розмиття). Виявилось, що точне налаштування порогу за яскравістю дозволяє досягти такого ж результату, як і поверхневе розмиття, але за виключення одного з етапів обробки.

Тому був розроблений простий інтерфейс, який дозволяв для одного з кадрів зображення побудувати ряд кінцевих зображень за різних значень порогу (який може приймати лише цілі значення, адже відповідає інтенсивності пікселя, яка визначається восьмибітним числом). Кожне відео в залежності від його освітленості, контрастності та інших особливостей має оптимальні значення радіусу розмиття та порогу. Тому користувач може визначити їх за тестовим набором, згенерованим при варіації параметрів, а потім застосувати для обробки усього відео.

В результаті порівняння пікселю надавалося значення 255 або 0 (глибина кольору 1 біт). Клітини отримували білий колір, а фон – чорний, адже це основна інформація необхідна для розпізнавання.

3 РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Проблема різних швидкостей руху клітин при протилежних напрямках зовнішнього електричного поля

3.1.1 Припущення про причину різниці в швидкостях руху – вплив неоднорідності електричного поля всередині камери

За відзнятими відео було очевидно, що рух клітин в одну та іншу сторону завжди відбувається з різними швидкостями. При визначенні причини такої поведінки були встановлені наступні положення:

1. Різниця швидкості клітини в одному та іншому напрямку не пов'язана з властивостями самої клітини. Навіть якщо клітина має ділянки мембрани з накопиченими зарядами певного знаку, такий малий диполь може легко переорієнтуватися у в'язкому середовищі;
2. Розміри поля зору є достатньо малими, щоб зовнішні фактори приблизно однакової мірі впливали на усі клітини, що потрапляють у цю зону (або ця зміна приблизно однакова в усьому об'ємі камери);
3. Вплив сторонніх фізичних факторів, крім прикладеного електричного поля, на рух у заданому напрямку невеликий. Адже за відсутності поля клітини рухаються повільно.

Тому було зроблене припущення, що зміна швидкості пов'язана саме з різним значенням напруженості поля за його орієнтації в різних напрямках. Його зовнішня прикладена складова однакова, але властивості самого гелю, у якому знаходяться заряджені клітини, можуть призводити до неоднорідності поля, або у гелі формується певний розподіл зарядів, що протидіє зовнішньому полю у більшій чи меншій мірі.

Були розглянуті два можливих шляхи обґрунтування такого припущення. Одне з них полягає в тому, що в камері індукується мультиполь. А інше передбачає неоднорідність середовища за електричним опором і зміни в розподілі суспензії за різних напрямків прикладення напруги.

Розглянемо найпростіший випадок мультиполя камери – диполя, спричиненого нерівною концентрацією клітин у різних частинах камери. Такий диполь не зможе швидко переорієнтуватися, а якщо він зсунутий відносно центра камери, то він дійсно створюватиме неоднорідність поля.

Припустимо, в результаті першої частини експерименту позитивно заряджені клітини перемістилися у праву частину мікроелектрофоретичної камери. Отриманий макроскопічний диполь зберігатиметься протягом деякого часу і впливатиме на напруженість поля всередині камери. Але таке припущення є невірним через два також важливі спостереження:

4. При відключенні електричного поля клітини одразу зупиняють свій рух. Тому вплив не пов'язаний з макроскопічним перерозподілом зарядів і зберігає свої властивості лише при наявності зовнішнього поля (якщо це мультиполь, то він є індукованим, а час релаксації малий);
5. Камері зазвичай властивий певний обраний напрям, у якому рух відбувається з більшою швидкістю. Тобто, зміна порядку проведення руху в один та в інший бік під час експерименту не впливає на швидкість руху клітин у кожному напрямку окремо. Крім того, швидкість руху клітин не змінюється внаслідок тривалого руху в один бік.

Таким чином, система не містить інертних полярних компонентів. Тому припущення про макроскопічний мультиполь було виключено, адже розглянуті спостереження свідчать про те, що диполі у складі системи швидко переорієнтуються, тому їхній вплив при обох спрямуваннях електричного поля буде рівним.

Діелектрометричні дослідження свідчать про те, що кров є складною системою, у якій мають місце різні механізми поляризації. Еритроцити у суспензії поводять себе як діелектричні включення [7]. Відповідно, вони здатні себе поводити у зовнішньому полі як диполі. Концентрація таких диполів може бути в деякій мірі різною на різних ділянках суспензії і, таким чином, послаблюватиме напруженість електричного поля в цих ділянках.

Але різна концентрація таких діелектричних включень, що рухаються відносно повільно і мають достатньо малий час релаксації (тобто швидко переорієнтуються при зміні напрямку поля), може бути інтерпретована як зміна опору суспензії в залежності від ділянки камери. Тому цей випадок відповідає другому припущенню.

Друге припущення полягає в тому, що спостерігається неоднорідність опору у різних перерізах суспензії. Наприклад, поверхня суспензії не є фіксованою. Тому вона може є горизонтальною поверхнею за рахунок ефектів поверхневого натягу. Крім того, вона здатна змінюватися в залежності від прикладеного поля. Відповідно, змінною може бути і товщина шару суспензії в різних ділянках камери, що призведе до залежності розподілу напруженості від напрямку прикладеного поля.

Звісно, малоімовірно, що поверхня рідини (суспензії) змінюється за дії малої напруги – 10 В та низьких значеннях сили струму. Але зсув відносно центру кювети може тягнути за собою суттєву зміну напруженості поля за неоднорідності опору. Крім того, як було зазначено вище, нерівномірний розподіл еритроцитів, які поводять себе як діелектричні включення, також може спричиняти локальні зміни опору.

Тому спробуємо розглядати цю систему з неоднорідністю активних електричних властивостей (використовувався виключно постійний струм) як лінійний провідник з нерівномірно розподіленим опором. Вважатимемо, що питомий опір (опір на одиницю довжини, $\rho(x) = dR/dx$) зростає, наприклад, лінійно:

$$\rho(x) = \rho_0 + \frac{\rho_1 - \rho_0}{l} x,$$

де ρ_0 – питомий опір на початку мікроелектрофоретичної камери,

ρ_1 – питомий опір у кінці камери,

l – довжина камери.

Тоді $R(x)$, опір камери від її початку до перерізу з координатою x , дорівнює:

$$R(x) = \int_0^x \rho(x) dx = \int_0^x \left(\rho_0 + \frac{\rho_1 - \rho_0}{l} x \right) dx$$

$$R(x) = \rho_0 x + \frac{\rho_1 - \rho_0}{2l} x^2$$

А загальний опір камери можна знайти підстановкою $x = l$:

$$R_0 = \frac{\rho_1 + \rho_0}{2} l$$

Сила струму (що відповідає потоку іонів та заряджених клітин) після встановлення динамічної рівноваги рівна для усіх перерізів камери, адже дисоціація не відбувається. Значення сили струму за законом Ома дорівнюватиме:

$$I_0 = \frac{U_0}{R_0} = \frac{2U_0}{(\rho_1 + \rho_0)l},$$

де U_0 – напруга, прикладена до камери.

Тоді потенціал на будь якому перерізі можна визначити наступним чином (вважатимемо, що електрод на початку координат заряджений негативно, має потенціал φ_0 , і потенціал на протязі камери зростає до $\varphi_1 = \varphi_0 + U_0$):

$$\varphi(x) = \varphi_0 + I_0 R(x) = \varphi_0 + I_0 \int_0^x \rho(x) dx$$

Натомість, переходячи до просторового розгляду, напруженість поля $E(x)$ у відповідному перерізі дорівнюватиме похідній від потенціалу за координатою:

$$E(x) = \frac{\varphi(x)}{dx} = I_0 \rho(x)$$

Підставимо постійне значення струму (формула) і отримаємо:

$$E(x) = \frac{2U_0}{(\rho_1 + \rho_0)l} \rho(x)$$

Або для зручності можна використовувати просто перетворення сили струму за законом Ома на напругу на камері та її опір:

$$E(x) = \frac{U_0}{R_0} \rho(x), \quad (3.1)$$

З міркувань щодо урівноваження сили, що діє на клітину з боку електричного поля, та сили опору руху, визначеної за формулою Стокса, швидкість руху клітини під дією електричного поля у в'язкому середовищі дорівнює (з формули 1.1):

$$v(x) = \frac{q}{6\pi\mu r} E(x)$$

І з підстановкою виразу для напруженості поля (формула 3.1):

$$v(x) = \frac{U_0 q}{6\pi\mu r R_0} \rho(x)$$

І аналогічно з використанням дзета-потенціалу (з формули 1.2):

$$v(x) = \frac{\varepsilon\varepsilon_0\zeta}{\eta} E(x)$$

$$v(x) = \frac{\varepsilon\varepsilon_0\zeta U_0}{\eta R_0} \rho(x)$$

Отримані вирази відображають те, що при розгляді неоднорідності опору вздовж електрофоретичної камери швидкості клітин матимуть такий самий характер неоднорідності. Це може бути поясненням різних швидкостей руху в одному та іншому напрямку. Неоднорідності спричинятимуть зміни швидкості того ж порядку.

Також швидкість клітин можна було визначити через силу струму, але вони є не єдиними носіями заряду. Тому в тому випадку можна було б також визначити характер залежності, але отримання суджень про абсолютні значення було б ускладненим.

3.1.2 Шляхи вирішення проблеми

Як вже було зазначено, швидкості клітин при русі в один бік та в інший мали помітну різницю. Тому найретельнішим вирішенням задачі визначення дійсної швидкості, що відповідає дзета-потенціалу, був би розгляд руху в обидва боки кожної клітини окремо із подальшим усередненням швидкості. Також при цьому мають бути відфільтровані ті клітини, що «зачепилися» і не рухалися в одному з напрямків. Але основним недоліком таких даних є невелика кількість клітин, для яких вдається їх отримати. При одній зміні напрямку руху вдається дослідити не більше клітин, ніж кількість, яка потрапляє одночасно в поле зору. Так відбувається тому що обидві швидкості відомі лише для клітин, що змінили напрямок руху, знаходячись в полі зору. Інакше важко ідентифікувати, чи це та сама клітина повернулася у нього. Тому кількість досліджуваних клітин становить зазвичай близько 60-90 клітин, чого недостатньо, щоб розрізнити декілька піків на розподілі.

Натомість дані про швидкості клітин в одному напрямку накопичуються протягом усього часу їхнього руху у ньому. В цьому випадку розподіл формується за декількома сотнями швидкостей і є значно більш детальним. Основною перешкодою для застосування таких розподілів є те, що вони відображають лише характер розподілу швидкостей (i , відповідно, дзета-потенціалу), але абсолютні значення можуть не відповідати дійсності, адже мають місце ті фактори, дія яких проявляється у різниці між швидкостями в обидва боки. Найгіршим є те, що вплив цих факторів може виявитися змінним від досліду до досліду, і тому порівняння таких розподілів між собою також може бути недійсним. Відповідно, односторонні розподіли могли б стати інформативним рішенням, але вони вимагають проведення корегування швидкостей для відповідності дійсним значенням дзета-потенціалу.

Надійним вирішенням може стати додавання до зразку низької концентрації деякого еталонного носію визначеного дзета-потенціалу. За рухом декількох таких частинок з відомим зарядом в полі зору могли б бути скореговані значення умов для еритроцитів.

Додавання таких маркерів ускладнило б методику підготовки зразків, але це не єдина проблема. Характер зміни швидкості для виявився також різним (про це докладніше у наступному підрозділі). Тому була здійснена спроба розробки методики розрахункового корегування швидкостей на основі даних про швидкості руху в обох напрямках для невеликої кількості клітин.

3.1.3 Корегування відхилення

Припущення про те, що значення впливу фактору, який є джерелом невідповідності швидкостей при різних спрямуваннях руху, впливає на обидві швидкості в однаковій мірі, але в протилежних напрямках, надало б можливість екстраполювати односторонню швидкість кожної клітини до точки, що знаходиться «посередині» між двома швидкостями і відповідає дійсному значенню дзета-потенціалу. Якщо це дійсно так, то швидкості в одному та іншому напрямку повинні мати певну відповідність.

Але виявилось, що швидкості клітин при русі в один та інший бік не мають визначеного зсуву або пропорційності (значення коефіцієнту кореляції Пірсона, що характеризує наявність лінійного зв'язку, для швидкостей в один та в інший бік у різних дослідах складало від 0,1 до 0,5). Це можна добре бачити за графіками, на яких відмічені відповідності швидкості в один бік та в інший для кожної клітини (Рисунок 3.1).

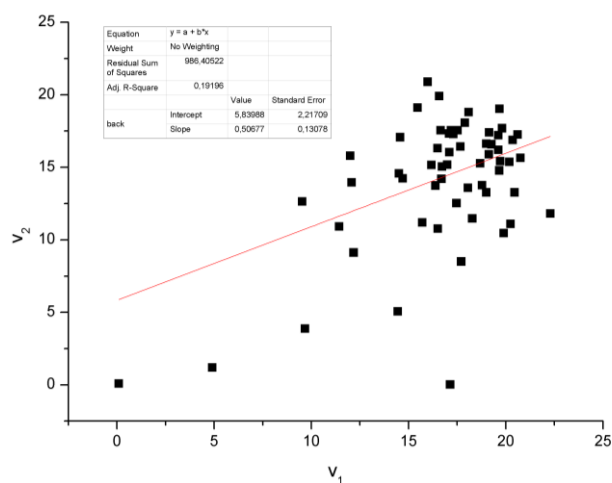


Рисунок 3.1 – залежність швидкості руху клітин після зміни напрямку поля від швидкості до зміни. На графіку наведені дані для одного з дослідів.

Кожна точка відповідає окремій клітині

Причини цього залишились поки не з'ясованими. Можливо, причина у властивостях мікрооточення клітин. Втім, для розрахунку це тягне за собою те, що неможливо визначити лінійну функцію для швидкості в залежності від ступеня впливу фактору, який є причиною невідповідності швидкостей.

Але розгляд залежності між іншими параметрами руху клітин надав набагато більш чітку залежність, відображену на рисунку 3.2. Тому при спробі корегування швидкості була використана апроксимація саме в таких координатах.

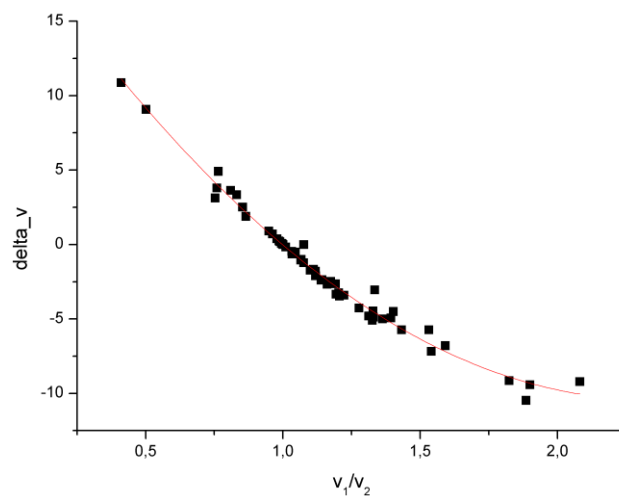


Рисунок 3.2 – взаємозв'язок між швидкостями до та після зміни напрямку електричного поля в координатах $\Delta v(v_1/v_2)$ для одного з дослідів

Залежність, наведена на рисунку 5.2 добре апроксимується поліномом другого степеня. Тому відповідність між використаними співвідношеннями між швидкостями (відношенням та різницею) може бути представлена наступним рівнянням:

$$v_2 - v_1 = A + B \frac{v_1}{v_2} + C \left(\frac{v_1}{v_2} \right)^2,$$

де v_1 та v_2 – це швидкості руху клітини в одному та в іншому напрямку, а A , B та C – параметри апроксимованого поліному.

З цього рівняння можна виразити одну зі швидкостей через іншу (виведення рівняння наведено у додатку Б):

$$v_1 = \frac{v_2}{2C} \left(-v_2 - B \pm \sqrt{v_2^2 + 2v_2B + B^2 + 4Cv_2 - 4CA} \right), \quad (5.2)$$

Доречно виражати v_1 , адже швидкість руху після зміни напрямку (v_2) зазвичай є більшою, тому дозволяє дослідити більшу кількість клітин за тієї самої тривалості досліду. Кількість клітин при русі назад збільшується і за рахунок «відривання» деяких клітин, які були малорухливими у першій частині досліду. Крім того, більша швидкість може дещо підвищити роздільну здатність методу, адже точність визначення позиції клітини залишається такою самою, і основний рух в більшій мірі переважатиме над випадковими коливаннями позиції через зміну кадру. Таким чином, корегування варто проводити від швидкості v_2 і тому буде використовуватися залежність від неї $v_1(v_2)$.

Тому для корегування був використаний вираз (5.2). Розраховувалася швидкість лише з відніманням члена з коренем, адже при використанні знаку плюс цей вираз не відповідає тій ділянці апроксимації, яка розглядалася.

Однак, розглянута залежність дозволяє отримати лише швидкість руху в один бік за швидкістю руху в протилежний. Тому було здійснене припущення, що значення швидкості v , що відповідає дійсному дзета-потенціалу клітини, приблизно дорівнює середньому значенню між цими двома швидкостями:

$$v = \frac{v_1 + v_2}{2}$$

$$v = \frac{v_2}{2} + \frac{v_2}{4C} \left(-v_2 - B - \sqrt{v_2^2 + 2v_2B + B^2 + 4Cv_2 - 4CA} \right)$$

$$v = \frac{v_2}{4C} \left(2C - v_2 - B - \sqrt{v_2^2 + 2v_2B + B^2 + 4Cv_2 - 4CA} \right)$$

Отже, остаточно була визначена наступна послідовність дій з відеоматеріалом при дослідженні кожного зразку:

1. Виділення двох фрагментів відео, один з яких призначений для дослідження руху в обох напрямках, а інший – руху великої кількості клітин в одному напрямку;
2. Попередня обробка обох відео;
3. Трекінг клітин, для яких спостерігається рух в обидва боки, і визначення параметрів апроксимації, які дозволяють провести корегування швидкостей;
4. Трекінг руху клітин в одному напрямку, корегування швидкості кожної клітини за формулою (5.2);
5. Розрахунок дзета-потенціалу, побудова і аналіз розподілів клітин за дзета-потенціалом.

Проте, цю методику не вдалося застосувати до зразків, які були розглянуті. Причиною невдачі її застосування стало те, що значення швидкостей, отримані при русі клітин в один бік, суттєво виходили за діапазон значень для невеликої групи клітин, для яких був розпізнаний рух в обидва боки. Вихід за ділянку апроксимації, відображену на рисунку 5.2 призводив до отримання значень скорегованих швидкості, що не можуть відповідати дійсності. Натомість обмеження цією ділянкою знову значно зменшувало кількість клітин і, крім того, відфільтровувало їх за швидкістю. Тому такий підхід не надав можливості розкрити характер розподілу.

3.2 Отримані розподіли за дзета-потенціалом

Розглянута методика дозволила отримати розподіли клітин за дзета-потенціалом в кожному зразку (для руху в при одному спрямуванні поля та протилежному окремо). Виявилось, що розподіли для різних зразків мають суттєво різний характер.

З іншого боку, незважаючи на невизначеність зміни швидкості для окремих клітин, вигляд розподілів при зміні напрямку руху в значній мірі зберігається. Піки, розпізнані на них, могли відрізнитись на певний зсув і в такому випадку розглядалось середнє значення від центрів цих піків.

Далі наведені графіки розподілів клітин за дзета-потенціалом, отриманих в кожному з дослідів (Рисунок 3.3 – Рисунок 3.10), і відповідні дані (Таблиця 3.1 – Таблиця 3.8; символ \rightarrow позначає значення, отримані при спостереженні руху клітин до зміни його напрямку, \leftarrow – після). Значення інших параметрів, отримані при апроксимації, ведені у додатку В. Отримані величини дзета-потенціалу відповідають значенням, отримуваним для еритроцитів з використанням мікроелектрофорезу та суміжних методик [8].

Криві наближення розподілів, відображені на графіках суцільними широкими лініями, були розраховані і побудовані із застосуванням пакету програм Origin 8. Вони відповідають апроксимації за наступним рівнянням, що відповідає розподілу, який складається з трьох Гаусових піків:

$$N(\zeta) = \frac{A_1}{w_1\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(\zeta-\zeta_{c1})^2}{w_1^2}} + \frac{A_2}{w_2\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(\zeta-\zeta_{c2})^2}{w_2^2}} + \frac{1-A_1-A_2}{w_3\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(\zeta-\zeta_{c3})^2}{w_3^2}},$$

де виконувалася варіація параметрів: $\zeta_{c1}, \zeta_{c2}, \zeta_{c3}$ – центрів піків; w_1, w_2, w_3 – параметрів, які характеризують ширину піків (середньоквадратичне відхилення $\sigma_i = w_i/2$, дисперсія $\sigma_i^2 = w_i^2/4$) і A_1, A_2 – параметрів площ, що відповідають двом з піків ($A_1 + A_2 \leq 1$).

Для апроксимації лише з двома піками значення параметру A_2 встановлювалося рівним 0.

Таблиця 3.1 – Основні дані першого досліджу

Донор	Стать	Вікова група	Група крові	Центр основного піку
Донор №1	чол.	40 – 60 років	I (Rh+)	→ $\zeta = 16.59$ мВ ← $\zeta = 21.50$ мВ

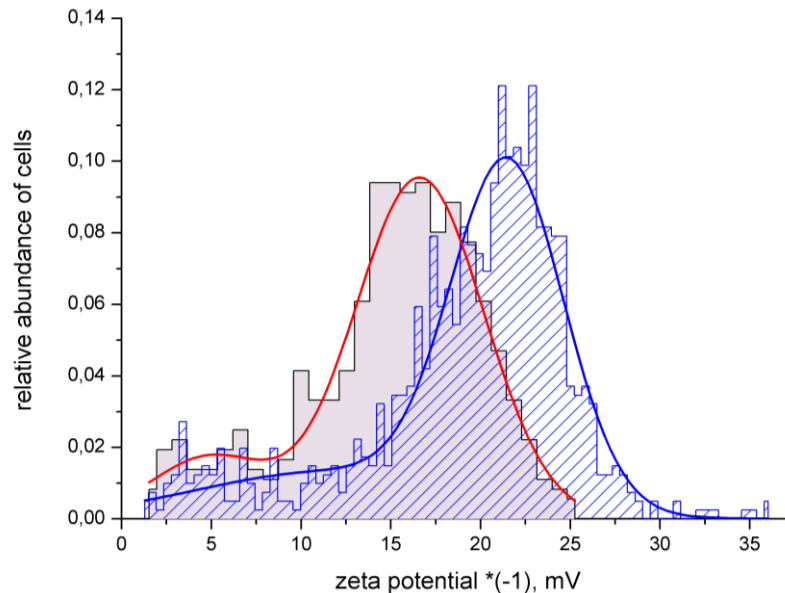


Рисунок 3.3 – Нормовані розподіли клітин за дзета-потенціалом у першому досліді. Сірим позначений розподіл клітин при одному напрямку підключення електродів, синім – при іншому; червона та синя лінії – мультипікові апроксимації розподілів)

Для першого донора середнє значення дзета-потенціалу склало 19,1 мВ (визначене як середнє мод основних піків). Основні піки добре апроксимуються нормальним розподілом. Різниця між значеннями дзета-потенціалу, отриманими при русі клітин в один бік і в протилежний, суттєва, але загальний вигляд розподілу та значення дисперсії для основного піку збереглися.

Має місце також певна категорія малорухомих клітин, але їхня відносна чисельність невелика.

Таблиця 3.2 – Основні дані другого досліду

Донор №2	чол.	60+ років	I (Rh+)	→ $\zeta = 9.09$ мВ ← $\zeta = 10.56$ мВ
----------	------	-----------	---------	---

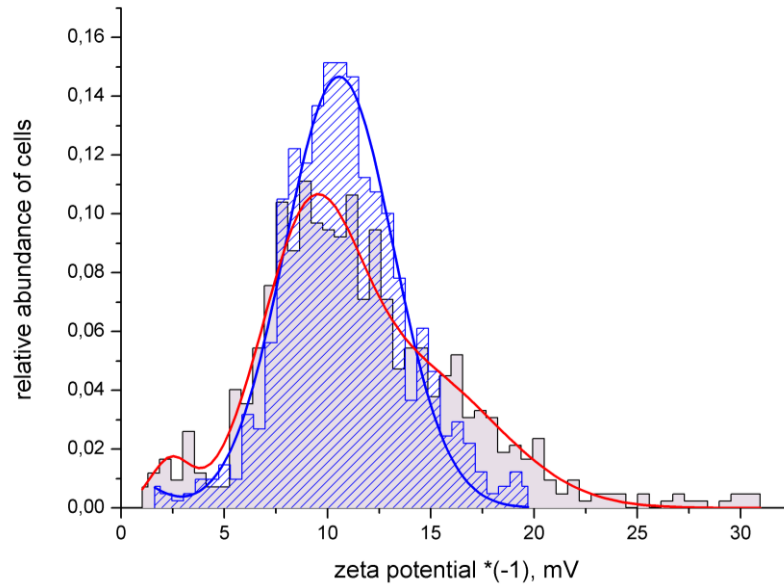


Рисунок 3.4 – Нормовані розподіли клітин за дзета-потенціалом у другому досліді і відповідні мультипикові апроксимації

У другому досліді пік, що відповідає малорухомих клітинам, так само маловиражений. Зміщення основного піку при зміні напрямку поля менше, але спостерігається його асиметричність. Середнє значення дзета-потенціалу становить 9.8 мВ. Було зроблене припущення, що асиметричність основного піку є наслідком поєднання двох субпопуляцій еритроцитів, для кожної з яких розподіл є нормальним. Цю гіпотезу підкріплює те, що в деяких з дослідів, які розглядаються далі, дійсно спостерігалися виокремлені субпопуляції з нормальним розподілом.

Таблиця 3.3 – Основні дані третього досліду

Донор №3	чол.	60+ років	I (Rh+)	→ $\zeta = 15.86$ мВ ← $\zeta = 22.37$ мВ
----------	------	-----------	---------	--

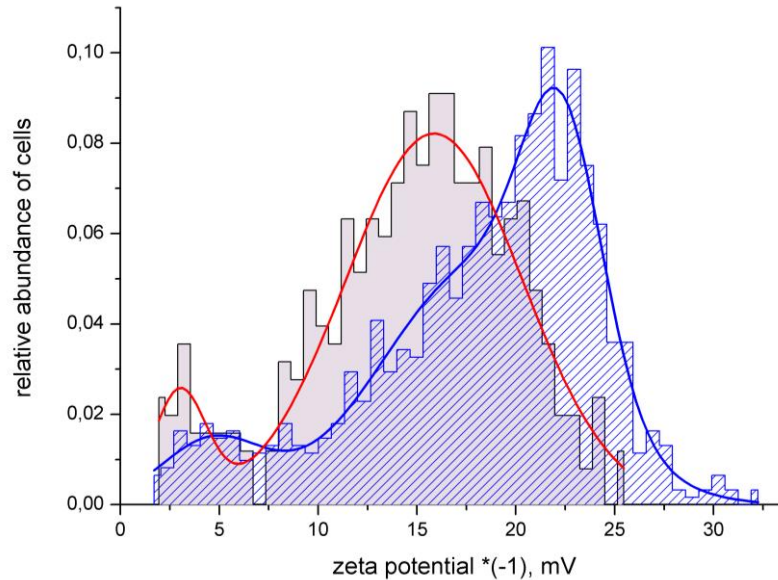


Рисунок 3.5 – Нормовані розподіли клітин за дзета-потенціалом у третьому досліді і відповідні мультипикові апроксимації

В цьому досліді зсув при зміні напрямку поля знову був суттєвим (як і для більшості дослідів). Середнє значення дзета-потенціалу - 19.1 мВ. Доля малорухомих клітин дещо більша, але відповідні піки (розглядатимемо малорухомі клітини як окрему субпопуляцію) все ще набагато слабші за основні. Знову спостерігається несиметричність піку, але в цьому випадку більш численною є складова, яка відповідає клітинам з більшим дзета-потенціалом.

Таблиця 3.4 – Основні дані четвертого досліді

Донор №4	чол.	40 – 60 років	I (Rh–)	→ $\zeta = 22.16$ мВ ← $\zeta = 18.16$ мВ
----------	------	---------------	---------	--

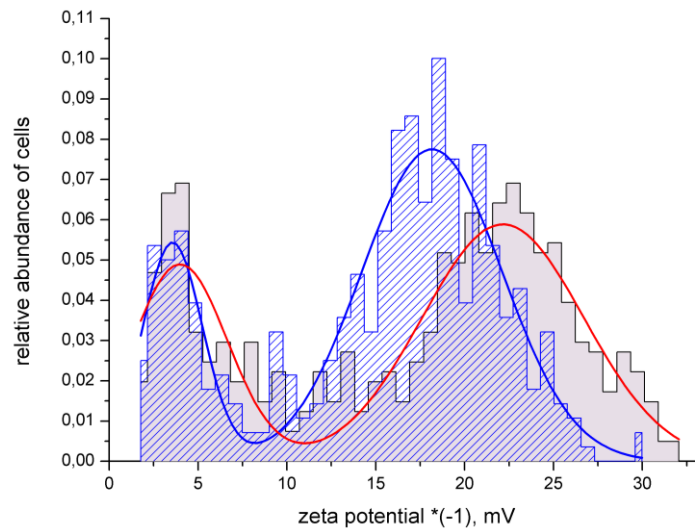


Рисунок 3.6 – Нормовані розподіли клітин за дзета-потенціалом у четвертому досліді і відповідні мультипікові апроксимації

У четвертому досліді (середнє значення $\zeta = 20.2$ мВ) спостерігається більша чисельність малорухливих клітин. Відповідно, можна припустити, що дзета-потенціал цих клітин через якісь причини знижений. Натомість основні піки одномодальні, але мають більшу дисперсію.

Таблиця 3.5 – Основні дані п'ятого досліді.

Донор №5	чол.	40 – 60 років	I (Rh–)	→ $\zeta = 15.21$ мВ ← $\zeta = 17.49$ мВ
----------	------	---------------	---------	--

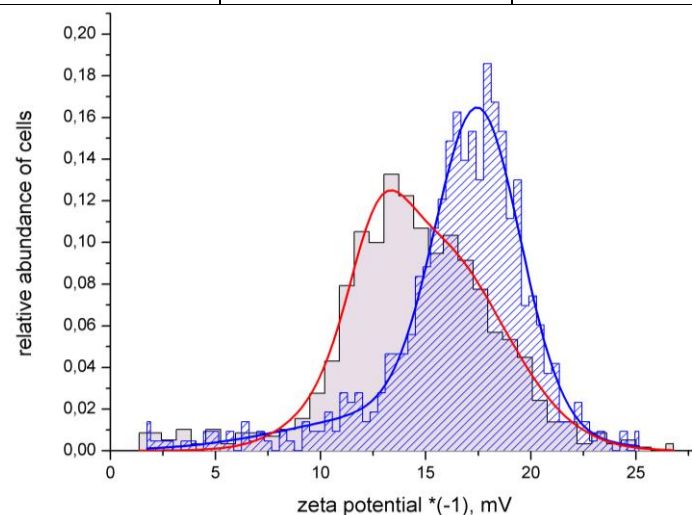


Рисунок 3.7 – Нормовані розподіли клітин за дзета-потенціалом у п'ятому досліді і відповідні мультипікові апроксимації

В п'ятому досліді (середнє значення $\zeta = 16.4$ мВ) пік, що відповідає малорухомим клітинам, відсутній. І можна спостерігати несиметричне розширення основного піку, тобто можливу наявність двох субпопуляцій. Однак, піки мають різну ширину. Це може свідчити про неоднорідність впливу фактору, що спричиняє зміну модуля швидкості руху клітин при зміні напрямку електричного поля.

Таблиця 3.6 – Основні дані шостого досліді

Донор №6	чол.	40 – 60 років	II (Rh–)	→ $\zeta = 21.73$ мВ ← $\zeta = 33.11$ мВ
----------	------	---------------	----------	--

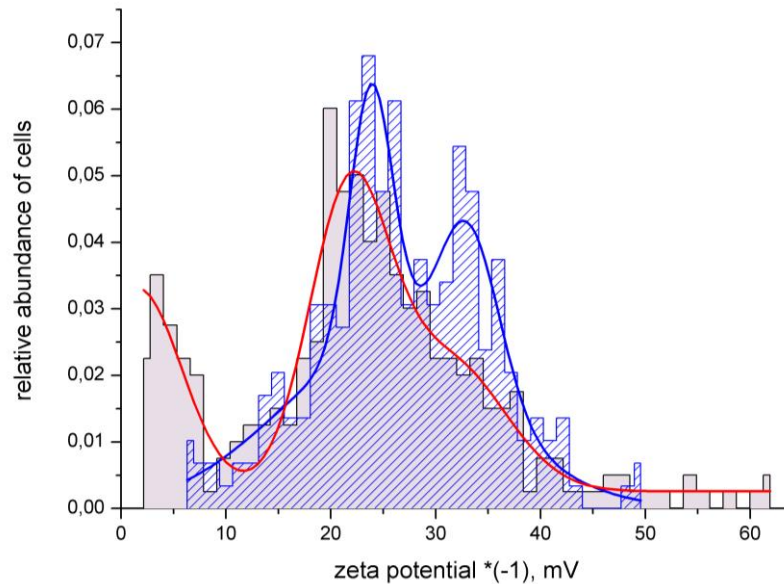


Рисунок 3.8 – Нормовані розподіли клітин за дзета-потенціалом у шостому досліді і відповідні мультипікові апроксимації

У цьому досліді вже чітко можна розрізнити дві субпопуляції з різними значеннями дзета-потенціалу. Хоча для одного з піків дисперсія є дуже значною при прямому підключенні поля.

Таблиця 3.9 – Основні дані сьомого досліді

Донор №7 (зразок №1)	жін.	40 – 60 років	I (Rh+)	→ $\zeta = 20.19$ мВ ← $\zeta = 15.93$ мВ
-------------------------	------	---------------	---------	--

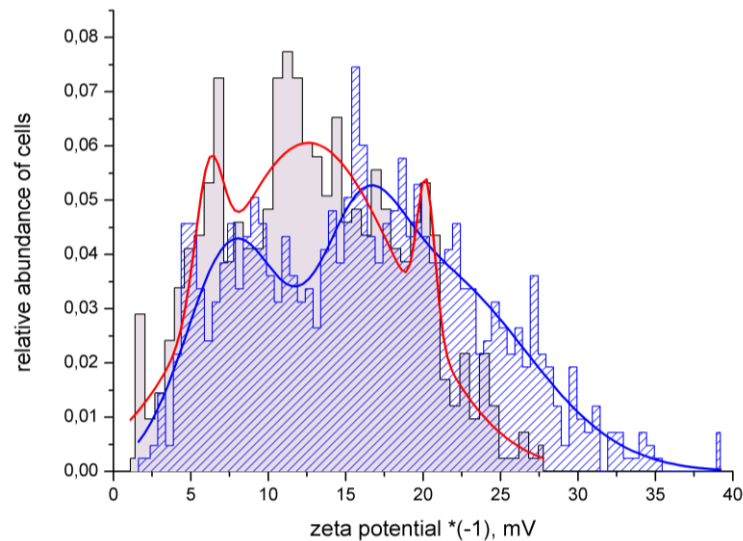


Рисунок 3.1 – Нормовані розподіли клітин за дзета-потенціалом у сьомому досліді і відповідні мультипікові апроксимації

Розподіли в сьомому досліді виявилися дуже складними. Однозначно можна стверджувати, що вони є мультипіковими. Вдасться виокремити три піки, але точне визначення їх параметрів є ускладненим.

Таблиця 3.7 – Основні дані восьмого досліді

Донор №7 (зразок №2)	жін.	40 – 60 років	I (Rh+)	→ $\zeta = 19.28$ мВ ← $\zeta = 23.84$ мВ
-------------------------	------	---------------	---------	--

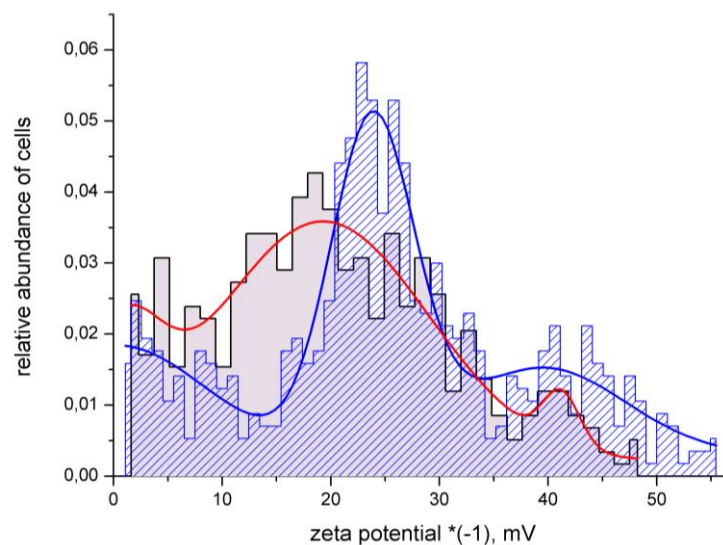


Рисунок 3.10 – Нормовані розподіли клітин за дзета-потенціалом у восьмому досліді і відповідні мультипікові апроксимації

Нарешті, восьмий дослід слугує гарною ілюстрацією наявності декількох субпопуляцій. Клітини з малим значенням дзета-потенціалу не згруповані близько нульового значення, а формують певний пік з великою дисперсією. Основний пік достатньо вузький, щоб від нього могли бути добре виокремлені інші два. А пік, що відповідає клітинам з більшими значеннями дзета потенціалу, відповідає невеликій чисельності клітин, але знаходиться на значному віддаленні. Можна відміти, що найбільшого впливу при зміні напрямку поля зазнав основний пік, натомість два інших виявилися більш стійкими до цієї зміни.

Крім того, окремо був розглянутий загальний набір даних. На рисунку 3.12 наведений розподіл, побудований за клітинами, відстеженими для усіх донорів. Враховані вагові коефіцієнти для забезпечення рівного вкладу даних кожного донора. На цьому розподілі добре розпізнаються два піки, але асиметричність другого добре компенсується врахуванням третього піку.

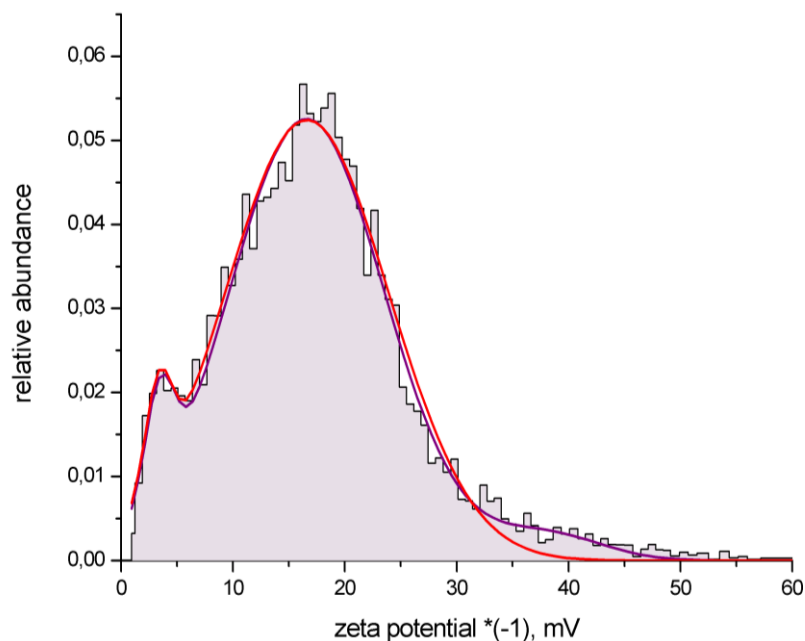


Рисунок 3.12 – Розподіл за дзета-потенціалом, побудований за клітинами, відстеженими для усіх донорів. Враховані вагові коефіцієнти для забезпечення рівного вкладу даних кожного донора. Червона суцільна лінія відображає апроксимацію двома нормальними піками, а фіолетова – трьома.

Таким чином, формується один потужний пік (92% клітин, центр: -16.6 мВ, середньоквадратичне відхилення – корінь з дисперсії: 7,0 мВ) та два менших (4% клітин, центр: -3.4 мВ, середньоквадратичне відхилення: 1,3 мВ; 4% клітин, центр: -37.9 мВ, середньоквадратичне відхилення: 5,0 мВ). Відповідно, підтверджується доречність розгляду трьох піків.

3.3 Обговорення

На отриманих розподілах в більшості випадків вдається виокремити три піки, а також узагальнений розподіл за усіма дослідями тому саме їхні параметри доречно розглядати.

Пік, що формується малорухомими клітинами і відповідає малим значенням дзета-потенціалу, зазвичай відповідає невеликій кількості клітин. Його зсув між різними дослідями слабкий, і тому складний для виявлення і не може стати підґрунтям для характеристики зразків. Тому цей пік не надає корисної інформації, і можна не розглядати клітини з малими швидкостями руху для зменшення опрацьовуваних обсягів інформації.

Проте, щодо піку малорухомих клітин є і виключення. Для зразків донорів №4 і №7 (зразок №2) цей пік виявився доволі потужним. При цьому основний пік не втрачав свого положення. Це може свідчити про те, що частина клітин була пошкоджена за якихось причин, вони втратили свій поверхневий заряд або цей заряд був екранований. Цей факт потребує подальшої перевірки. І якщо це явище не є артефактом вимірювання, то доля клітин зі зниженим дзета-потенціалом може бути корисним параметром.

Інші два піки часто можуть зливатися в один, але висновок про їхню присутність був зроблений через розповсюджену асиметричність розподілу в таких випадках.

Розглянуті групи людей виявилися надто малочисельними для отримання статистично обґрунтованих висновків. Однак, дослідження дозволяє визначити очікувану різницю між групами. Дослідивши більш гомогенні групи людей або більшу кількість зразків для однієї людини, можна буде зробити висновок про дисперсію значень дзета-потенціалу за вибіркою i , відповідно, розрахувати кількість учасників дослідження, необхідну для підтвердження відмінностей за такої різниці значень між групами.

Останні два досліди були проведені з використанням еритроцитів із зразків крові одного донора. Різними були умови приготування зразків. Розподіли відрізняються за значеннями дзета-потенціалу, що свідчить про чутливість використовуваної методики до складу розчинів та дій на етапі підготовки та зберігання зразків. Але дуже важливим є те, що патерн розподілу – три еквідистантних піки, середній з яких найпотужніший, а два інших подібні – зберігся. Це свідчить про відтворюваність результатів при використанні методики, розглянутої в цій роботі.

Розподіл еритроцитів за дзета-потенціалом в усіх дослідах мав декілька складових піків. Тому середнє значення, яке вимірюється в більшості методик визначення дзета-потенціалу i , зокрема, зазвичай визначається при застосуванні мікроелектрофорезу, може не відповідати моді серед популяції еритроцитів.

Спостереження декількох окремих піків дозволяє принаймні аналізувати наявність субпопуляцій з різним віком. Ця інформація може бути використана при співставленні з даними щодо вікової динаміки еритроцитів, отриманими іншими методами. Жоден з цих методів не здатен самодостатньо описати вікову динаміку, і розробка моделей для них є ускладненою через значну нелінійність досліджуваних параметрів. Втім, поєднання даних з декількох методів наразі є основним шляхом для розв'язання цієї задачі.

3.3.1 Перспектива подальших досліджень

Під час виконання даної роботи було з'ясовано, що основною перешкодою для дослідження дзета-потенціалу з використанням мікроскопічного методу спостереження електрофорезу клітин є наявність джерела похибки, яка унеможливорює однозначне його визначення.

Розгляд і порівняння отриманих розподілів хоча і надає можливість оцінки розподілів параметрів за усією популяцією клітин, але поступається розподілам, які були побудованими за дійсними (принаймні такими, що не залежатимуть від напрямку поля) або скорегованими швидкостями клітин.

За відеозаписами, які були отримані за використаною методикою спостереження хроматограм, не вдалося розрахувати дійсну швидкість для кожної клітини окремо. Однак вдосконалення методики може дозволити розв'язати цю задачу та з'ясувати причини неоднорідного впливу сторонніх факторів на клітини.

В результаті аналізу відеозаписів та проміжних результатів з'ясовано, що найбільш ймовірною причиною такої неоднорідності руху є неоднорідність електричного поля всередині суспензії. Така неоднорідність може бути спричинена диполь-дипольними взаємодіями клітин або загальною неоднорідністю електричного опору суспензії.

Але на деяких відеозаписах спостерігаються не тільки різні значення швидкості руху клітин, але і спрямування під різним кутом до прикладеної напруги. Такі фрагменти відеозаписів були нечастими і відфільтровувалися при виконанні цієї роботи. Проте можливо, саме ця складова допоможе з'ясувати природу неоднорідності.

Тому у подальших дослідженнях пропонується використати електрофорезну камеру, подібну до тих, що призначені для двовимірного електрофорезу. Наявність по парі електродів у двох перпендикулярних спрямуваннях у площині камери дозволить спрямовувати макроскопічний вектор напруженості поля у будь-якому напрямку в цій площині (Рисунок 3.11).

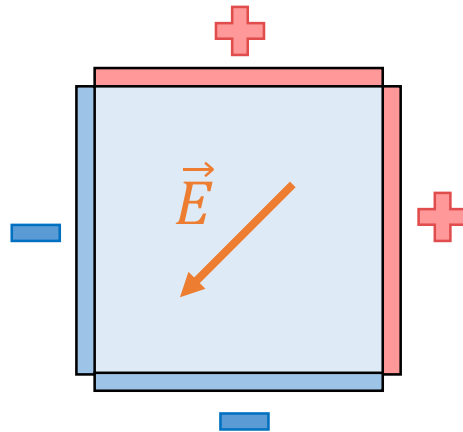


Рисунок 3.11 – Схема можливого використання двох пар електродів для отримання різних спрямувань вектору напруженості електричного поля у площині електрофорезної камери

Така електрофоретична камера робить можливим дослідження швидкості руху клітин в залежності від спрямування вектору напруженості поля. Зокрема, доступним стає здійснення поступового обертання вектора напруженості без зміни його модуля. Для цього необхідно змінювати напругу на електродах камери за гармонічними законами із зсувом за фазою. Відповідний період гармонічних коливань має бути значно більшим за часи релаксації в системі.

Клітини досягають максимальної швидкості за перші секунди руху. Крім того, при зміні напрямку руху на невеликий кут замість початку руху з нерухомого положення, час релаксації буде набагато меншим. Відповідно, можна використати період зміни поля величиною в десятки секунд. Клітини рухаються доволі повільно, тому більшість з них не встигатиме посунутися за половину періоду достатньо, щоб покинути поле зору.

Завдяки такій методиці вдасться збільшити не тільки обсяг інформації про зміни швидкості, але і збільшити кількість клітин, для яких вона спостерігається. Клітини будуть рухатися за колоподібними, еліпсоподібними або спіральними траєкторіями. Тому з'явиться можливість здійснювати переміщення предметного столика з повторним фокусуванням для накопичення даних про клітини з декількох ділянок суспензії. При цьому загальний дрейф клітин буде малим, тому можна уникнути цього фактору.

Звичайно, необхідним буде вдосконалення інструментів обробки даних. При достатньо низькій концентрації клітин в суспензії методика відстеження може бути спрощена до розгляду форми треків, які проходить клітина. Якщо траєкторія руху спіральна, то за переміщенням клітини внаслідок кожного періоду обертання можна визначити спрямування сили, що виникає через сторонній фактор. Менша вісь еліпсу буде відображати напрямок поляризації, яка протидіє зовнішньому полю. Натомість більша вісь, так само як і ширина спіралі, відповідатимуть найменшому впливу зазначених факторів. Тому саме ці параметри можуть допомогти визначити дійсні значення дзета-потенціалу, а прикладення постійного вектору напруженості в цьому напрямку дозволить виконати дослідження за методикою, розглянутою у цій роботі.

Нарешті, використання циклічного руху дозволить уникнути неточностей, що можуть виникнути через неоднаковий час спостереження за різними клітинами (адже клітини перебувають в полі зору різний час та проходять за нього різні відстані). При циклічному русі умови спостереження для усіх клітин в полі зору однакові, а точність даних можна збільшити шляхом накопичення їх протягом більшої кількості періодів.

ВИСНОВКИ

1. Під час виконання роботи була вдосконалена мікроелектрофоретична методика визначення дзета-потенціалу. Оновлена методика надає можливість отримання розподілів за дзета-потенціалом і включає:

- отримання відеозаписів хроматографії еритроцитів;
- попередню обробку відеоматеріалу;
- відстеження руху клітин;
- фільтрацію відстежених клітин за властивостями треків;
- формування розподілів за швидкістю та дзета-потенціалом.

Усі наведені операції можуть бути відтворені з використанням відкритого програмного забезпечення. Але для автоматизації, пришвидшення обробки та полегшення пошуку оптимальних параметрів були підготовані макроси. Отримані значення дзета-потенціалу відповідають наведеним в літературі (середнє для основних піків усіх дослідів становить -18.9 мВ).

2. На отриманих розподілах клітин за дзета-потенціалом зазвичай можна виокремити дві категорії клітин: менш численні малорухомі та клітини, які формують основний пік на розподілі. У свою чергу, основний пік відповідає сумі декількох субпопуляцій. Як правило, досить чітко виокремлювались дві основних субпопуляції.

3. В ході дослідження була виявлена проблема, яка може бути причиною спотворення значень дзета-потенціалу, визначених з використанням мікроелектрофорезу. При зміні напрямку електричного поля модуль швидкості руху клітин змінюється, і швидкості до та після зміни напрямку для окремих клітин погано корелюють. Але характер розподілів є стійким до цього фактору і зберігає відображення декількох субпопуляцій.

4. Складна форма розподілів свідчить про те, що зміна дзета-потенціалу також є нелінійною при старінні еритроцитів. Але вдосконалена методика може бути корисною як альтернатива або доповнення до досліджень вікової динаміки еритроцитів за їхнім об'ємом або вмістом гемоглобіну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Risinger, M., & Kalfa, T. A. (2020). Red cell membrane disorders: structure meets function. *Blood*, 136(11), 1250–1261.
<https://doi.org/10.1182/blood.2019000946>
2. Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
3. Higgins J. M. (2015). Red blood cell population dynamics. *Clinics in laboratory medicine*, 35(1), 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.10.002>
4. Piva, E., Brugnara, C., Chiandetti, L., & Plebani, M. (2010). Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 48(10), 1369–1380. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.292>
5. David, M., Levy, E., Barshtein, G., Livshits, L., Arbell, D., Ben Ishai, P., & Feldman, Y. (2020). The dielectric spectroscopy of human red blood cells during 37-day storage: β -dispersion parameterization. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1862(11), 183410.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183410>
6. Hess, J. R., Hill, H. R., Oliver, C. K., Lippert, L. E., Rugg, N., Joines, A. D., Gormas, J. F., Pratt, P. G., Silverstein, E. B., & Greenwalt, T. J. (2003). Twelve-week RBC storage. *Transfusion*, 43(7), 867–872.
<https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2003.00442.x>
7. Chelidze, T. (2002). Dielectric spectroscopy of blood. *Journal of non-crystalline solids*, 305(1-3), 285-294.
8. Silva, D. C., Jovino, C. N., Silva, C. A., Fernandes, H. P., Filho, M. M., Lucena, S. C., Costa, A. M., Cesar, C. L., Barjas-Castro, M. L., Santos, B. S., & Fontes, A. (2012). Optical tweezers as a new biomedical tool to measure zeta potential of stored red blood cells. *PloS one*, 7(2), e31778.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031778>

9. Eylar, E. H., Madoff, M. A., Brody, O. V., & Oncley, J. L. (1962). The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. *The Journal of biological chemistry*, 237, 1992–2000.
10. Fernandes, H. P., Cesar, C. L., & Barjas-Castro, M.deL. (2011). Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 33(4), 297–301. <https://doi.org/10.5581/1516-8484.20110080>
11. Tokumasu, F., Osters, G. R., Amaratunga, C., & Fairhurst, R. M. (2012). Modifications in erythrocyte membrane zeta potential by *Plasmodium falciparum* infection. *Experimental parasitology*, 131(2), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.005>
12. Fontes, A., Fernandes, H. P., de Thomaz, A. A., Barbosa, L. C., Barjas-Castro, M. L., & Cesar, C. L. (2008). Measuring electrical and mechanical properties of red blood cells with double optical tweezers. *Journal of biomedical optics*, 13(1), 014001. <https://doi.org/10.1117/1.2870108>
13. Bondar, O. V., Saifullina, D. V., Shakhmaeva, I. I., Mavlyutova, I. I., & Abdullin, T. I. (2012). Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta naturae*, 4(1), 78–81.
14. Ja'afar, F., Leow, C. H., Garbin, V., Sennoga, C. A., Tang, M. X., & Seddon, J. M. (2015). Surface Charge Measurement of SonoVue, Definity and Optison: A Comparison of Laser Doppler Electrophoresis and Micro-Electrophoresis. *Ultrasound in medicine & biology*, 41(11), 2990–3000. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2015.07.001>
15. Kremser, L., Blaas, D., & Kenndler, E. (2004). Capillary electrophoresis of biological particles: viruses, bacteria, and eukaryotic cells. *Electrophoresis*, 25(14), 2282–2291. <https://doi.org/10.1002/elps.200305868>

16. Sze, A., Erickson, D., Ren, L., & Li, D. (2003). Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. *Journal of colloid and interface science*, 261(2), 402–410. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00142-5)
17. Uskoković V. (2012). Dynamic Light Scattering Based Microelectrophoresis: Main Prospects and Limitations. *Journal of dispersion science and technology*, 33(12), 1762–1786. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.625523>
18. Bhattacharjee S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not?. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
19. R.J. Hunter, second ed., Clarendon Press, Oxford, 2001. 806 pp., ISBN 0-19-850502-7
20. Офіційний сайт графічного редактора Paint.NET: <https://www.getpaint.net/>
Дата останнього звернення: 12 листопада 2022 р.
21. Ресурс з підтримки плагіну CodeLab: <https://boltbait.com/pdn/codelab/>
Дата останнього звернення: 12 листопада 2022 р.
22. Офіційний сайт відеоредактора Shotcut: <https://shotcut.org/>
Дата останнього звернення: 4 листопада 2022 р.

ДОДАТОК А

Проміжні стадії обробки зображення, що були отримані під час відпрацювання попередньої обробки у редакторі Paint.Net.

На рисунку А.1 наведені результати застосування найпростіших способів отримання світлих зображень клітин на темному фоні.

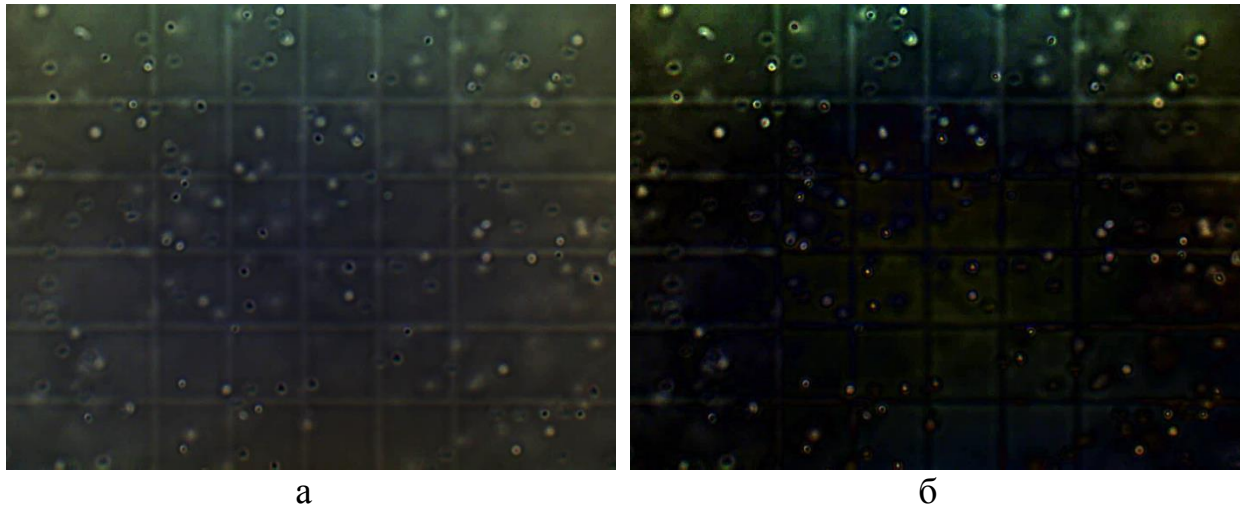


Рисунок А.1 – а) Інвертоване зображенням з множенням двох шарів для підвищення контрастності; б) Віднімання кольору фону, накладені два шари із використанням ефекту накладання «Освітлення фону».

Рисунок А.2 відображає результат віднімання розмитого вихідного зображення. Крім того, замість множення шарів був використаний множник розрахованої різниці, який може мати дробне значення.

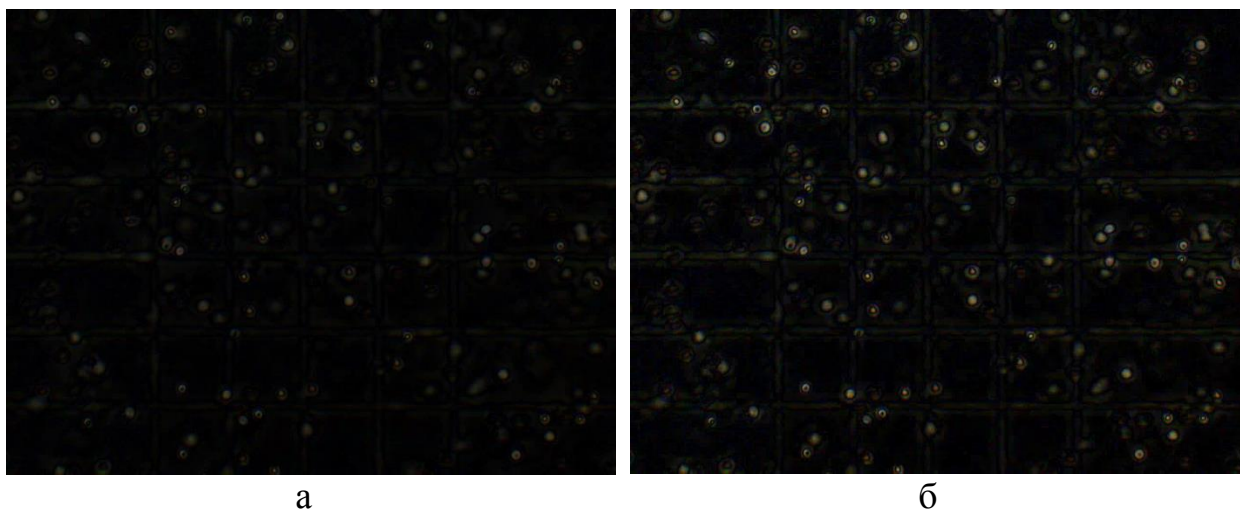


Рисунок А.1 – а) Вихідне зображення із застосуванням розмиття за Гауссом, (що було використане як наближення до фону); б) Результат подальшого застосування множника.

Наступний етап (на рисунку А.3) – вирішення проблеми виділення разом із клітинами ліній сітки камери Горяєва. Попереднє поверхневе розмиття виявилось значно більш ефективним, ніж розмиття у русі.

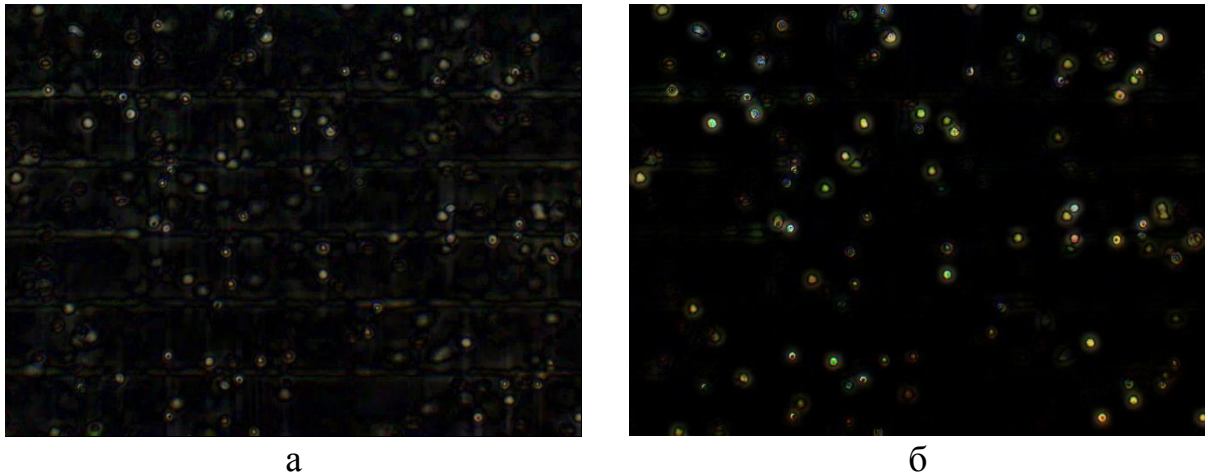


Рисунок А.3 – а) Вихідне зображення із відніманням зображення, розмитого у русі, що дозволяє видалити лінії сітки в одному напрямку; б) Результат віднімання розмитого за Гаусом вихідного зображення за попереднього поверхневого розмиття і підбраного множника різниці.

На рисунку А.4 відображені вклади кожного з каналів кольору після проведення обробки із попереднім використанням поверхневого розмиття.

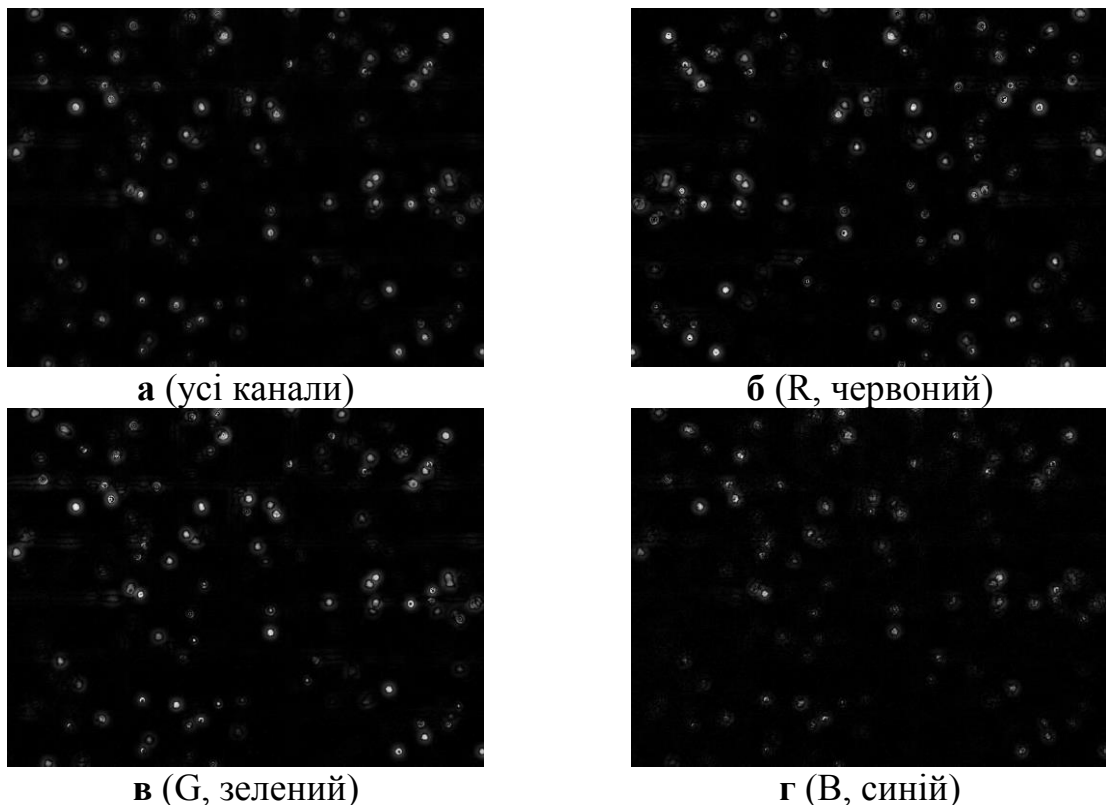


Рисунок А.4 – Монохромні версії зображення для кожного з каналів кольору.

З метою оптимізації усіх параметрів попередньої обробки і отримання найкращого результату був створений та доповнювався плагін, у якому всі змінні параметри винесені для налаштування користувачем. Вікно з налаштуваннями зображене на рисунку А.5.

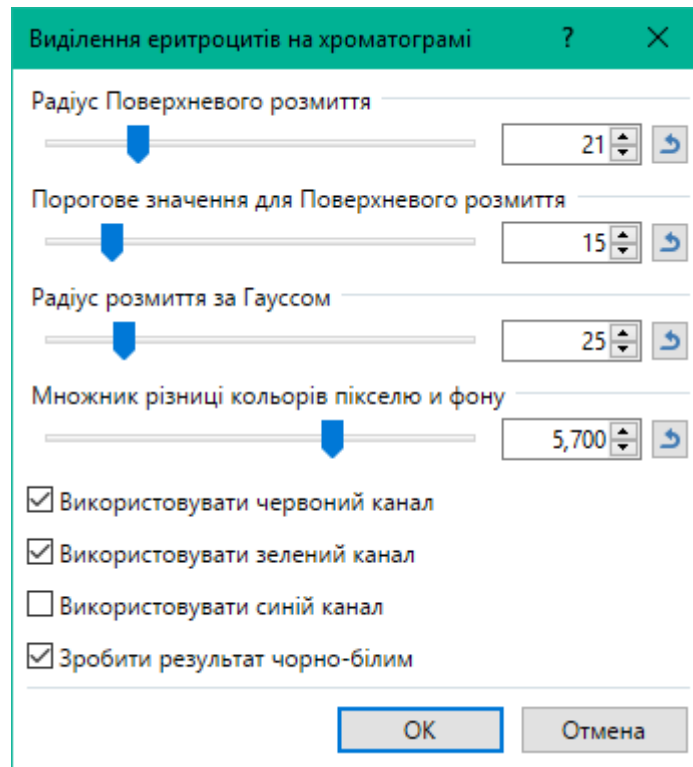


Рисунок А.5 – Параметри плагіну, що налаштовуються користувачем. Значення, вказані на зображенні, є наближеними до тих, що дають найкращі результати.

ДОДАТОК Б

Отримання залежності $v_1(v_2)$ з апроксимації $\Delta v \left(\frac{v_1}{v_2}\right)$:

$$\Delta v = v_2 - v_1 = A + B \frac{v_1}{v_2} + C \left(\frac{v_1}{v_2}\right)^2$$

Множимо обидві сторони рівняння на v_2^2 :

$$v_2^3 - v_1 v_2^2 = A v_2^2 + B v_1 v_2 + C v_1^2$$

Переносимо доданки та групуємо множники так, щоб виділити квадратне рівняння відносно v_1 :

$$C v_1^2 + (v_2^2 + B v_2) v_1 + (A v_2^2 - v_2^3) = 0$$

Розглянемо окремо дискримінант рівняння, адже він може бути спрощений:

$$D = (v_2^2 + B v_2)^2 - 4C(A v_2^2 - v_2^3)$$

$$D = v_2^2(v_2 + B)^2 - 4C v_2^2(A - v_2)$$

$$D = v_2^2(v_2^2 + 2v_2 B + B^2 - 4CA + 4C v_2)$$

Відповідно, розв'язки квадратного рівняння дорівнюватимуть:

$$v_1 = \frac{1}{2C} \left(-v_2^2 - v_2 B \pm v_2 \sqrt{v_2^2 + 2v_2 B + B^2 + 4C v_2 - 4CA} \right)$$

Нарешті, отриманий вираз можна дещо скоротити за рахунок винесення v_2 за дужки:

$$v_1 = \frac{v_2}{2C} \left(-v_2 - B \pm \sqrt{v_2^2 + 2v_2 B + B^2 + 4C v_2 - 4CA} \right)$$

ДОДАТОК В

Таблиця В.1 – Значення, отримані при регресії даних розподілів клітин за дзета-потенціалом (дані отримані при наближенні з використанням двох або трьох піків, кожен з яких відповідає нормальному розподілу).

Номер досліду	1		2		3		4		5		6		7		8	
Напрямок руху (→ - до зміни напрямку; ← - після)	→	←	→	←	→	←	→	←	→	←	→	←	→	←	→	←
кількість відстежених клітин	427	955	749	725	398	923	522	367	822	598	314	238	651	830	415	574
основний пік																
доля клітин	86%	75%	48%	96%	92%	29%	67%	77%	86%	76%	42%	60%	91%	14%	83%	45%
центр (ζ_0 , мВ)	-16.6	-21.5	-9.09	-10.6	-15.9	-22.4	-22.2	-18.2	-15.2	-17.5	-21.7	-33.1	-20.2	-15.9	-19.3	-23.9
дисперсія (σ^2 , мВ)	12.8	9.79	5.40	6.87	19.9	4.07	20.7	15.7	11.5	4.06	14.7	9.00	0.32	6.25	95.4	14.7
додатковий пік																
доля клітин	-	-	4%	-	-	9%	-	-	14%	24%	32%	19%	4%	29%	14%	32%
центр (ζ_0 , мВ)	-	-	-14.0	-	-	-18.0	-	-	-12.7	-14.2	-31.3	-25.0	-12.6	-20.4	-41.2	-39.6
дисперсія (σ^2 , мВ)	-	-	16.8	-	-	23.0	-	-	-	-	28.8	101	35.9	38.1	2.81	57.4
пік малорухливих клітин																
доля клітин	14%	25%	48%	4%	8%	62%	33%	23%	-	-	26%	21%	5%	57%	3%	23%
центр (ζ_0 , мВ)	-4.94	-11.7	-2.37	-0.28	-3.00	-4.65	-3.98	-3.56	-	-	-1.59	-23.9	-6.17	-7.60	-0.72	-0.34
дисперсія (σ^2 , мВ)	10.7	57.2	0.95	2.01	1.77	6.67	7.19	2.88	-	-	17.4	4.24	0.78	8.94	12.5	68.0