

АНАЛИЗ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ ЦИФРОВОЙ ГОЛОГРАФИЧЕСКОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Н.Н.Кизилова, Т.В.Тишко, Д.В.Тишко
Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина, Украина
nnk@bk.ru

Приводится обзор и анализ результатов исследования трехмерных форм эритроцитов с помощью цифрового голографического интерференционного микроскопа. Исследованы нативные эритроциты крови здоровых испытуемых, новорожденных и пациентов с различными заболеваниями. Проведены расчеты параметров формы. Показано, что форма эритроцита является ранним неспецифическим диагностическим индикатором заболеваний. При этом отмечается уменьшение степени двояковогнутости нормальных эритроцитов, появление дискоцитов и различных неоднородностей поверхности. Результаты исследований сравниваются с результатами исследований формы и поверхности эритроцитов методами электронной микроскопии.

Методика восстановления трехмерной формы эритроцитов с помощью цифрового голографического интерференционного микроскопа была разработана авторами в 1989 г. К настоящему времени существенно усовершенствованы компьютерные методы обработки интерферограмм с помощью алгоритмов искусственного интеллекта и обучающихся экспертных систем. Интерферограммы исследуемых микроскопических фазовых объектов (объекты, которые мало влияют на амплитуду, и сильно – на фазу волны в оптическом диапазоне) образуются путем наложения двух когерентных лазерных лучей, один из которых проходит через объект, а другой идет параллельно. После наложения лучей образуется интерференционная картинка. Сдвиг интерференционных полос соответствует высоте микрообъекта в точке с соответствующей координатой (рис.1а). Путем распознавания полос на интерферограмме, фильтрации, скелетизации и вычисления сдвига полосы в отдельных точках изображения, восстанавливается исходная трехмерная форма изучаемого объекта (рис.1б). Если при электронной микроскопии требуется длительная и дорогостоящая предварительная обработка микрообъекта, которая в случае биологических объектов может индуцировать изменение формы, то при лазерной голографической интерференционной микроскопии эритроцитов исследуется обычный сухой мазок крови, полученный за 1-2 мин до исследования, что гарантирует сохранение нативной формы эритроцитов.

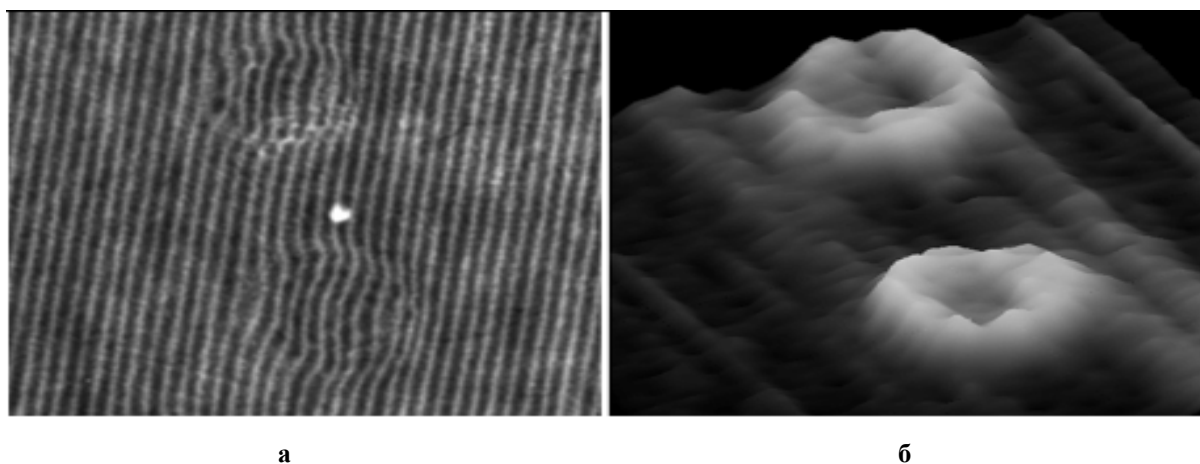


Рис.1. Интерферограмма (а) и восстановленная трехмерная форма (б) эритроцитов в мазке крови.

Были исследованы эритроциты крови молодых здоровых испытуемых, новорожденных и рожениц, больных серповидно-клеточной анемией, крови онкологических больных до и после радиационной терапии. Исследовалось также влияние кислородного голодания и озонотерапии на форму эритроцитов. Исследовались эритроциты крыс до и после радиационного облучения. Изучалось влияние неблагоприятных экологических факторов на форму эритроцитов. В результате были визуализированы эритроциты нормальной двояковыпуклой формы, сплюснутые эритроциты, дискоиды, эллипсоиды, сфероиды и эхиноциты. Получены также изображения лейкоцитов в мазке крови. Для характеристики формы введен коэффициент сферичности $k=h/H$, где h – толщина клетки в центральной части, H – средняя высота на расстоянии $r=d/4$ от центра, где d – диаметр клетки. Для двояковогнутого эритроцита $k<1$, для дискоцита $k=1$, для выпуклых клеток $k>1$, для сферы $k = 2/\sqrt{3} \approx 1.155$. В качестве иллюстрации формы эритроцитов с разными коэффициентами сферичности приведены на рис.2. Отмечена также

различная степень шероховатости поверхности клеток в норме, при заболеваниях и при воздействии неблагоприятных факторов и лечебных мероприятий. Так, до озонотерапии большинство эритроцитов в мазке были дискоцитами с $k \geq 1$, а уже через 15 мин после озонотерапии в мазке появились двояковогнутые клетки с $k < 1$. Достоверные изменения формы отмечены под влиянием кислородного голодания. Неблагоприятные экологические условия, высокий радиационный фон, патологии внутриутробного развития приводят к тому, что даже в крови новорожденных в большинстве исследованных проб преобладают сплюсненные клетки с высоким коэффициентом сферичности. Существенно, что увеличение коэффициента сферичности является ранним диагностическим показателем, который проявляется на самых ранних стадиях заболевания и увеличивается по мере его развития, что иллюстрируется результатами исследований при онкологических заболеваниях.

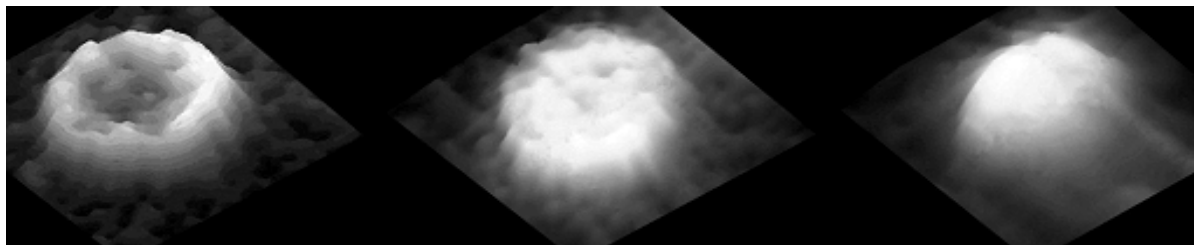


Рис.2. Эритроциты с коэффициентами сферичности (слева направо) $k=0.49$; 1.03 ; 1.15 .

Математические модели равновесной формы эритроцитов основаны на предположении о минимуме полной энергии поверхности с учетом деформации, поверхностного электрического заряда, взаимодействия слоев бислойной мембраны и цитоскелета [2]. Изменение свойств клеточной поверхности определяет изменение агрегационных, седиментационных и ряда других свойств крови [3]. Изменение равновесной формы эритроцита связано с целым рядом изменений его поверхности, включая изгибную жесткость мембраны, состав и биохимические свойства плазмы крови. В результате перестройки поверхности могут возникать как глобальные изменения (переход от вогнутой к выпуклой поверхности), так и локальные (появление пузырьков, складок, нерегулярной шероховатости на участках поверхности). В работе представлен краткий обзор моделей и результатов моделирования изменений нормальной двояковогнутой формы эритроцита и вариаций параметров модели, которые приводят к увеличению или уменьшению коэффициента сферичности (диско- и сфероцитоз). Для каждого случая проведены расчеты площади поверхности клетки при неизменном объеме и проведены оценки зависимости кислородной емкости крови от коэффициента сферичности эритроцитов при различных значениях дисперсии параметра k .

Было проведено сравнение исследованных форм с данными электронномикроскопического исследования клеток крови при целом ряде заболеваний [4]. Подтверждено, что изменения формы эритроцитов неспецифические и наблюдаются на ранних стадиях развития болезни. Полученные результаты имеют важное значение для медицинской диагностики и для дальнейшего развития техники лазерной микроскопии.

1. Safronov G.S., Tishko T.V., Forming difference holograms using orthogonal linear polarized waves, *Ukrainsk. Fizich. Zh*, 1989, 34, p.72-73.
2. Kizilova N., Tishko T. Holographic microscopy of phase microscopic objects, WSP, 2010.
3. Kizilova N. Erythrocyte aggregation and sedimentation in a non-uniform force field, *Biorheology*, 2005, 42(1-2), p.160-165.
4. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степанова Е.А. и др., Теория и практика микроскопии эритроцитов. Томск, 2008.

ANALYSIS OF ERYTHROCYTE SHAPES USING DIGITAL HOLOGRAPHIC INTERFERENCE MICROSCOPY

Kizilova N.N., Tishko T.V., Tishko D.N.
V.N.Karazin Kharkov National University

A survey and analysis of results of investigation of 3D erythrocyte shapes using digital holographic interference microscopy are presented. The native shapes of human erythrocytes are studied for healthy volunteers, new-born and patients with different diseases before and after treatment. The shape parameters are computed in each case. It is found the erythrocyte shape can be used as early nonspecific diagnostic indicator of pathology. Decreasing the degree of biconcavity, appearance of discocytes and different surface inhomogeneities are features of different diseases and insufficiencies. The results of the erythrocyte shape study by holographic interference microscopy and electronic microscopy are compared.