

УДК 57

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ДАВЛЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПО ДАННЫМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ. ЧАСТЬ 1. ТЕОРИЯ И ЧИСЛЕННЫЙ РАСЧЕТ ^{7,8}

Ю. С. Нагорнов, Тольяттинский государственный университет (Ульяновск, Россия),
e-mail: nagornovys@yandex.ru

Резюме. В работе предлагается метод определения внутриклеточного давления эритроцитов по данным атомно-силовой микроскопии. В основу метода положено сравнение экспериментальных данных морфологии клеток с численными расчетами зависимости формы эритроцита от давления на мембрану. Приводится теоретическое обоснование метода и численный расчет модели эритроцита, которая учитывает минимизацию свободной энергии мембраны эритроцитов и взаимодействие гемоглобина с мембраной. Рассматривается область ограничения метода и его возможные приложения для медицинских и биологических исследований.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, биология, медицина, кровь, эритроциты, внутриклеточное давление.

Работа выполнена при поддержке ФЦП
«Исследования и разработки по
приоритетным направлениям развития
научно-технологического комплекса
России на 2014-2020 годы» (соглашение
№ 14.574.21.0025, уникальный
идентификатор соглашения –
RFMEFI57414X0025)

ВВЕДЕНИЕ

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) находит все более широкое применение в биологии и медицине. АСМ имеет ряд преимуществ перед оптическим или электронным микроскопами. Помимо трехмерной визуализации АСМ имеет возможность анализа механических свойств, что позволяет более глубоко изучать клеточные процессы, выяснять такие важнейшие свойства, как эластичность, мобильность поверхностных слоев, адгезию, молекулярное связывание и электростатичность. В настоящее время формируется новое направление в цитологии, которое определяют термином «клеточная наномеханика» или «клеточная эластография». Эти понятия подразумевают методы визуализации сдвиговых упругих характеристик биологических мягких тканей, которые дополняют традиционные способы визуализации и считаются перспективными для медицинской диагностики различных патологий, особенно при изучении онкологических заболеваний.

⁷ Автор благодарит Жилиева И.В. за помощь в проведении расчетов.

⁸ Статья рекомендована доцентом, к. с.-х. наук М.М. Подколзыным (Волжский), рецензент к.псх. н. Л.Ф. Чупров (Черногорск) Россия.

Работы по изучению биологических объектов с помощью методов АСМ активно ведутся в отношении красных клеток крови – эритроцитов. Изменение формы эритроцитов может возникать вследствие внешних физико-химических воздействий, т.е. клетки могут подвергаться различным обратимым и необратимым трансформациям. Состояние мембраны эритроцитов и работы ионных насосов мембраны однозначно меняет внутриклеточное осмотическое давление, что в свою очередь изменяет морфологию эритроцита и его объем. Данный факт представляется перспективным использовать для диагностики состояния мембраны клеток по трехмерному изображению эритроцита в АСМ при помощи расчета внутриклеточного давления и решения обратной задачи. Целью настоящей работы является теоретическое обоснование и проведение численных расчетов для метода определения внутриклеточного давления эритроцитов по данным атомно-силовой микроскопии.

Взаимосвязь между состоянием мембраны эритроцита и его внутриклеточным давлением и морфологией можно описать следующим образом. Исходя из термодинамического принципа минимизации свободной энергии липидного бислоя мембраны в работах [1,2] трехмерная форма эритроцита получается аналитическим расчетом. На основании этого и модели регуляции ионного обмена и, соответственно, объема эритроцитов, в работах [3-5] приводятся численный расчет взаимосвязи внутриклеточного давления и объема эритроцита, в том числе с учетом биомеханической модели оболочки [5]. Данные модели находятся в хорошем согласии с экспериментальными данными, в которых происходит изменение объема эритроцита при изменении ионного обмена под действием различных внешних химических факторов, изменяющих рН раствора.

Однако для сравнения расчетных данных с экспериментальными данными, полученными методами АСМ, указанные модели необходимо дополнить по нескольким причинам. Во-первых, измерения методами АСМ наиболее часто проходят в воздушной среде, в которой эритроцит теряет до 70% массы из-за потери воды. В результате форма эритроцита не меняется, а его объем на 95-99% заполнен гемоглобином [6,7], в то время как в работах [3-5] предполагалось, что процент содержания гемоглобина находится в диапазоне 50-80%. Во-вторых, соотношение объем – давление в термодинамической системе, в которой происходит существенное влияние гемоглобина на мембрану эритроцита, будет меняться, что кратко упоминается в работах [3,7]. Так в работе [3] был изучен процесс расширения эритроцита под действием внутреннего давления, которое менялось в широком диапазоне – от единиц паскалей до 5 кПа. Расширение до 40-60% по отношению к начальному объему происходило под действием небольшого давления до 2 Па за счет изменения формы, затем модель эритроцита приобретала форму шара и расширение происходило за счет растяжения мембраны, что требует на три порядка больше давления. При этом моделирование уменьшения объема из-за обезвоживания или под действием сил сжатия выполнено не было. И, наконец, при экспериментальном исследовании методами АСМ происходит осаждение эритроцитов на поверхность, их адгезия и изменение формы под действием сил адгезии и тяжести. Таким образом, для разработки метода определения внутриклеточного давления эритроцитов по данным атомно-силовой микроскопии необходимо рассмотреть и дополнить существующие модели эритроцита.

ТЕОРИЯ ИОННЫХ НАСОСОВ И МОДЕЛИ ЭРИТРОЦИТА

Существует ряд моделей, которые описывают процессы регуляции ионного обмена и объема эритроцитов [1–8]. Основное внимание в этих работах уделено биохимическим и электрохимическим процессам, влияющим на регулирование объема. Показано, что система ионных насосов и каналов в мембране клетки (Na^+ , K^+ -насос, Ca^{2+} - активируемые K^+ -каналы) обеспечивает заданный объем клетки и его стабилизацию. Перенос ионов осуществляется при помощи ферментов класса гидролаз аденозинтрифосфатазы (АТФ), катализирующих отщепление от аденозинтрифосфорной кислоты одного или двух остатков фосфорной кислоты. В процессе биохимической реакции происходит освобождение энергии, используемой при транспорте веществ через мембрану. Высокое соотношение концентрации калия во вне- и внутриклеточной жидкости (38:1) поддерживается благодаря действию Na^+ , K^+ -АТФ, активно переносящей ионы калия в клетку, а ионы натрия - из нее в соотношении 2:3[8]. Вследствие активного выведения натрия из клеток Na^+ , K^+ -АТФ 85-90% всего натрия, содержащегося в организме, находится во внеклеточной жидкости. АТФаза белков плазматических мембран осуществляет АТФ-зависимый трансмембранный перенос Na^+ и K^+ ионов в клетках, что обеспечивает поддержание электрохимического и осмотического градиентов одновалентных ионов, необходимых для нормального функционирования клеток.

В результате работы ионных каналов в клетке возникает асимметрия в распределении концентраций ионов внутри и вне клетки, что обеспечивает поддержание ее постоянного объема. Создаваемое обменными процессами осмотическое давление в клетке эритроцита вызывает деформацию оболочки. При этом морфология эритроцита задается липидным бислоем, что определяется внутренними силами, возникающими вследствие построения белков слоя (фосфолипидов) неполярными концами внутрь слоя. Возникающая из-за ионного взаимодействия механическая энергия липидного бислоя стремится принять минимальное значение и формирует морфологию эритроцита[1,2,9].

Для расчета влияния ионных насосов на регуляцию объема эритроцита составляют систему уравнений [3-8], которая включает потоки ионов и поток воды. При этом известно [7], что основной вклад в регуляцию объема эритроцитов человека вносят катионы калия и натрия, а также анионы хлора и HCO_3 . Кинетика внутриклеточных концентраций калия и натрия описывается уравнениями, которые учитывают активный транспорт этих катионов Na^+ , K^+ -АТФ и пассивный поток через мембрану по градиенту концентрации:

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} \left(C_{K^+} \frac{V}{V_0} \right) = 2\vartheta_{Na,K-ATP} + J_K , \\ \frac{d}{dt} \left(C_{Na^+} \frac{V}{V_0} \right) = -3\vartheta_{Na,K-ATP} + J_{Na} , \end{cases} \quad (1)$$

где V и V_0 – текущее и физиологически нормальное значение объема эритроцита, C_{K^+} и C_{Na^+} – концентрации соответствующих ионов; $\vartheta_{Na,K-ATP}$ – скорость потребления ионов Na^+ и K^+ аденозинтрифосфатазой; J_K и J_{Na} обозначают пассивные потоки калия и натрия через

мембрану эритроцита, описываемые в приближении Гольдмана и зависящего от трансмембранной разности потенциалов и градиента концентраций внутри и вне клетки [3].

Кроме этого учитывается условие электронейтральности внутриклеточного содержимого эритроцита, описываемого через концентрацию ионов Na^+ , K^+ , Cl^- и молекул большого радиуса (гемоглобин, интермедиаты глиголиза и т.д.) со средним зарядом - 0.7[3,7].

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{V}{V_0} \right) = J_{H_2O} = \frac{SP_f}{V_0} \vartheta_{H_2O} \Delta C = \frac{SP_f}{V_0} \vartheta_{H_2O} \frac{\Delta P}{RT}, \quad (2)$$

где поток воды J_{H_2O} пропорционален разности концентраций ΔC осмотически активных ионов внутри и снаружи мембраны эритроцита, которая выражается через осмотическое давление ΔP и тепловой потенциал RT , S – площадь мембраны, ϑ_{H_2O} – молярный объем воды и P_f – осмотическая проницаемость мембраны для воды.

Благодаря способности сопротивляться деформированию, оболочка эритроцита должна оказывать воздействие на процесс осмоса в виде реактивного давления ΔP_r , которое приложено к объему, заключенному в эритроците. При этом в расчетах по формуле (2) вместо давления ΔP ставится разность $\Delta P - \Delta P_r$. При деформировании оболочки эритроцита имеют место вязкоупругие процессы [8], протекающие во времени, которые приводят, например, к восстановлению первоначальной формы эритроцита, подвергнувшегося деформации. Так, в работе [10] вязкоупругие процессы изучались в экспериментах с микропипеточной аспирацией: эритроцит втягивался в микропипетку и после снятия нагрузки восстанавливал свою первоначальную двояковогнутую форму за времена менее 1 секунды. Поскольку характерное время вязкоупругих процессов значительно меньше, чем время рассматриваемых обменных процессов, можно этими процессами пренебречь.

В работах [3,7] был выполнен численный расчет уравнений (1) и (2) для учета упругого воздействия оболочки на обменные процессы и изменение объема эритроцита. Решение полученной системы уравнений учитывало взаимодействие всех процессов при вычислении изменения объема эритроцита и кинетики ионного обмена. Модель показала хорошее согласие с экспериментальными данными при увеличении объема эритроцита в процессе образования ионных каналов в мембране после обработки эритроцитов амфотерицином В и вызванного этим увеличения проницаемости для ионов, а также при увеличении объема по причине уменьшения осмотичности среды.

В случае проведения измерений при помощи атомно-силового микроскопа наиболее часто параметры эритроцита определяются на мазке крови на стекле, где эритроциты расположены тонким слоем и находятся в воздушной среде. Как было показано в работах [11-18] на воздухе происходит выход воды из эритроцита и, соответственно, уменьшение его объема в 4-6 раз. Поскольку при АСМ измерениях в процессе высушивания образца с эритроцитами водная среда исчезает, возникает большой градиент ΔP , в соответствии с формулой (2) происходит выход воды из эритроцита и потеря его массы и объема. При этом форма эритроцита остается неизменной и определяется состоянием его мембраны [11-18], т.е. реактивным давлением ΔP_r .

С одной стороны реактивное давление мембраны эритроцита ΔP_r будет зависеть от состояния мембраны, с другой стороны морфология эритроцита будет зависеть от биомеханики его мембраны [1,2,15-18]. Таким образом, для определения внутриклеточного давления из данных АСМ необходимо провести численный расчет, в котором задается начальное реактивное давление ΔP_r и получить зависимости морфологии эритроцита от его величины.

ЧИСЛЕННЫЙ РАСЧЕТ МОРФОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТА

В основу модели для численного расчета были взяты известные справочные данные и биомеханическая модель однородного тела, покрытого мембраной, состоящей из липидного бислоя, свойства которого описаны в работах [1,2]. Для решения системы уравнений использовался программный продукт PARDISO (PARallelDirectSOlver), библиотечная подпрограмма которого использовалась для решения системы линейных уравнений с невырожденной разреженной матрицей методами суперузлового исключения Гаусса, а также разложениями Холесского. Для проведения численного расчета методом конечных элементов использовался программный комплекс Comsol multiphysics (лицензия 1029477) и модуль оптимизации пакета прикладных программ MATLAB (лицензия 512916)[15-18].

Для численного моделирования рассматривалась связанная задача взаимодействия твердого тела (мембрана клетки) и жидкости (внутреннее содержимое эритроцита). В работе решалась параметрическая задача, в качестве параметра используется значение реактивного давления ΔP_r , создаваемого мембраной эритроцита, геометрия эритроцита представлена на рис.1а.

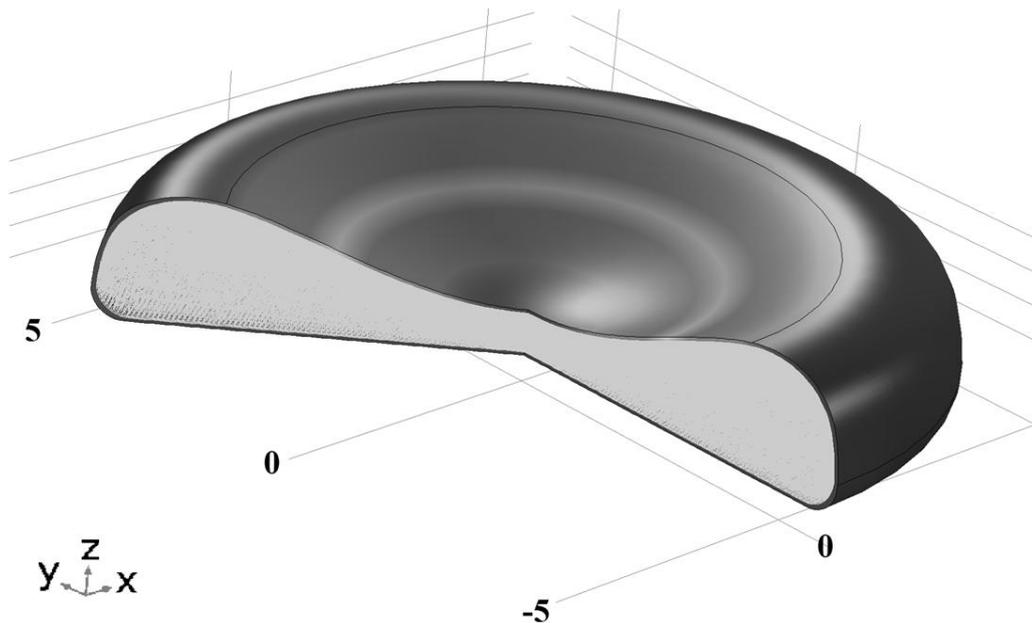


Рис.1. Модель эритроцита для расчета его морфологии под действием реактивного давления: а) Трехмерная модель эритроцита, на которой показан боковой срез.

В расчетах принимались следующие обозначения осей координат: r – горизонтальная, z – вертикальная, φ – угловая. В численном эксперименте рассматривается

осесимметричная задача, ось тела вращения проходит через центр эритроцита ($r = 0$). В расчетах модель линейного эластичного материала основывалась на следующих уравнениях:

$$-\nabla\sigma = F_V, \sigma = S \quad (3)$$

$$s - S_0 = C : (\varepsilon - \varepsilon_0 - \varepsilon_{inel}) \quad (4)$$

$$\varepsilon = \frac{1}{2} [(\nabla u_{solid})^T + \nabla u_{solid}] \quad (5)$$

где $\sigma = S$ – тензор напряжений, F_V – сила, действующая на тело, ε – тензор деформаций, ε_{inel} – тензор тепловой деформации, S_0 , ε_0 – начальные значения соответствующих тензоров, C – тензор упругости четвертого порядка, “:” – операция тензорного произведения, u_{solid} – вектор компоненты смещения, для расчетов мембраны применяется модель эластичного материала. При этом начальные смещения равны 0, на внешнюю границу твердого тела ставится начальное и граничное условие следующего вида:

$$\sigma \cdot n = F_A, F_A = \begin{pmatrix} 0 \\ \Delta P_r \end{pmatrix}, \quad (6)$$

где n – нормаль к поверхности, F_A – вектор внешнего воздействия, ΔP_r – реактивное давление, задаваемое в расчетах как параметр. Данное условие обеспечивает направление вектора давления вдоль вертикальной оси. На оси вращения установлено условие симметрии. Нижняя граница эритроцита зафиксирована от смещений вдоль оси z :

$$w_{solid} = 0 \quad (7)$$

Физические свойства твердого тела задаются в соответствии с известными экспериментальными данными [7,9,18,19]: модуль упругости оболочки равен 1200-2000 Па в зависимости от координаты r [11,12,15-18], плотность оболочки – 1200 kg/m³[1,2,6,19], коэффициент Пуассона оболочки – 0.33 [3,11,18]. Тензор деформаций обусловлен упругими свойствами мембраны: жесткостью на сдвиг, равной 0.006 mN/m, и на растяжение, равной 450 mN/m[3,7]. При этом математическая модель гидродинамики описывает поведение внутреннего содержимого модели эритроцита, существенное отличие от модели мембраны состоит в том, что жидкое содержимое может двигаться и изменять свое местоположение в зависимости от приложенного давления со стороны мембраны. В результате во внутренней области эритроцита проводится моделирование жидкой среды с использованием уравнений Навье-Стокса и неразрывности:

$$\rho(u_{fluid} \cdot \nabla)u_{fluid} = \nabla \cdot \left[-pI + \mu \left(\nabla u_{fluid} + (\nabla u_{fluid})^T \right) - \frac{2}{3} \mu (\nabla \cdot u_{fluid}) I \right] + F \quad (8)$$

$$\nabla \cdot (\rho u_{fluid}) = 0, \quad (9)$$

где p – давление жидкости, \mathbf{u}_{fluid} – вектор скорости, ρ – плотность жидкости, μ – динамическая вязкость, \mathbf{F} – вектор внешних воздействий, \mathbf{l} – единичный вектор.

При расчетах считалось, что в начальный момент времени скорость и давление в жидкости равны 0. Условие на границе твердой и жидкой сред позволило отслеживать влияние деформаций на объем сжатой жидкости и давление внутри эритроцита и соответствует следующим уравнениям:

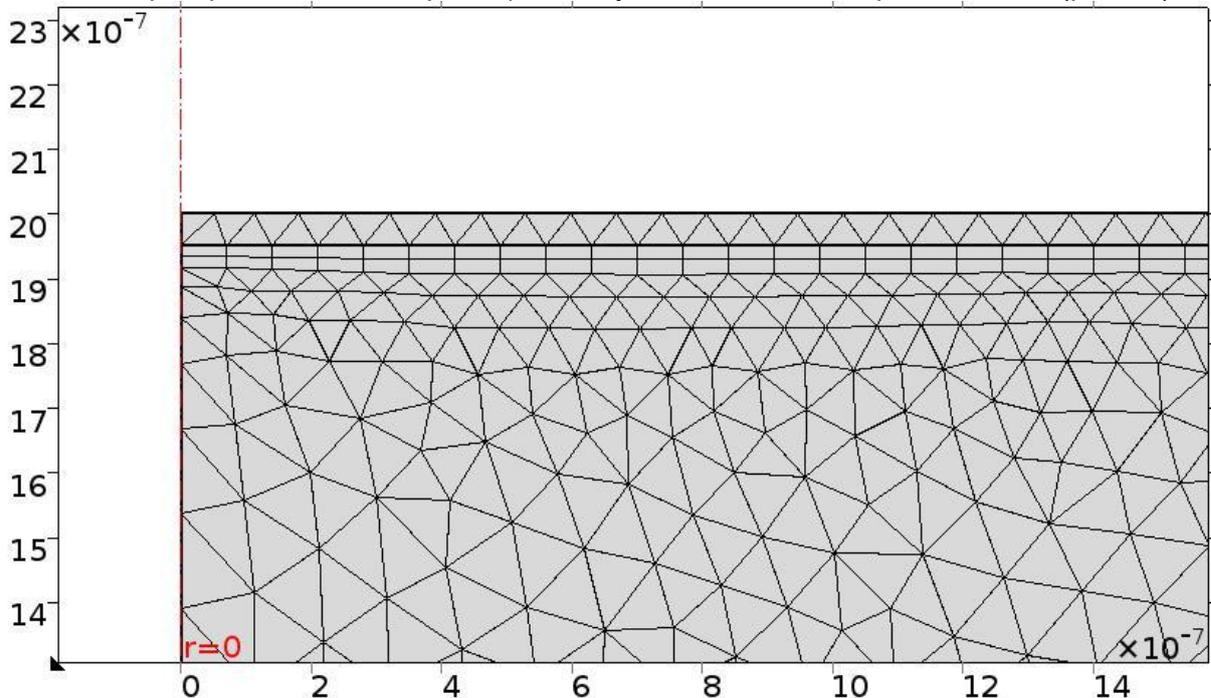
$$u_{fluid} = u_w \quad (10)$$

$$u_w = \frac{\partial u_{solid}}{\partial t} \quad (11)$$

$$\sigma \cdot n = \Gamma \cdot n, \Gamma = \left[-pI + \mu (\nabla u_{fluid} + (\nabla u_{fluid})^T) - \frac{2}{3} \mu (\nabla \cdot u_{fluid}) I \right], \quad (12)$$

где u_w - скорость деформации твердого тела, Γ - сила, действующая на границу жидкости и твердого тела.

При этом физические свойства жидкости определяются следующими значениями: плотность жидкости – 1000 kg/m³, динамическая вязкость – 4 mPa·s[1,2,9,15,19]. В процессе расчетов использовалось конечно-элементное разбиение, в котором сетка содержала порядка 13700 треугольных элементов, при этом размер конечно-элементной ячейки уменьшался при приближении к границе между жидкостью и твердым телом (рис. 1b).



b)

Рис.1. Модель эритроцита для расчета его морфологии под действием реактивного давления:
 б) Конечно-элементное разбиение, показанное на части среза.

Таким образом, расчет внутриклеточного давления проводился без использования подгоночных параметров в два этапа. Сначала внутреннее содержимое эритроцита представлялось в виде жидкости или подвижного (сыпучего) материала, задавалось давление, проводился расчет и формировалась геометрия под действием внутренних и внешних сил, при этом расчет проводился с использованием уравнений Навье-Стокса. Интересно, что при этом разница давлений на мембрану составляла не более 2 Па, что соответствует данным работ [3,7]. Затем расчет проводился повторно методом конечных элементов, при этом внутреннее содержимое эритроцита предполагалось твердым, что исключало движение внутри эритроцита, но позволяло определить внутриклеточное давление, которое устанавливается в равновесии. Естественно, установившееся давление внутри клетки отличалось от начального и принимало значения порядка единиц или десятых кПа (табл.1), что соответствует данным АСМ при измерении модуля Юнга [11-15].

На рис.2 представлена зависимость формы среза эритроцита от разности давлений на мембрану эритроцита, которая устанавливается после завершения расчета.

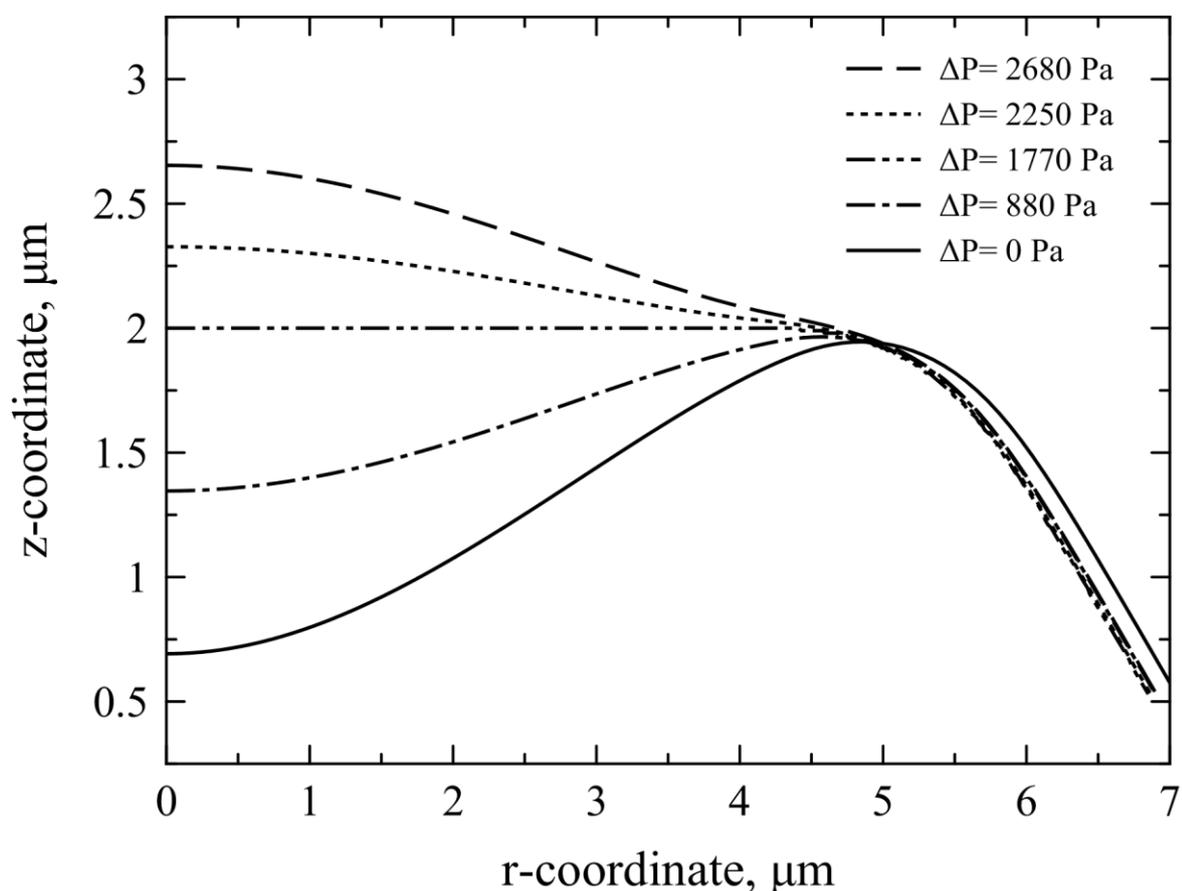


Рис.2. Зависимость формы среза эритроцита от внутриклеточного давления эритроцита.

Видно, что с ростом внешнего давления происходит небольшое расширение модели эритроцита и существенный прогиб в центре мембраны, что соответствует экспериментальным данным геометрии среза эритроцита по данным АСМ[11,12,16-18]. Необходимо отметить, что при пропорциональном увеличении или уменьшении размеров модели эритроцита установившиеся значения давления внутри клетки не изменялись.

Данный факт соответствует теории ионных каналов, поскольку в формулах (1) и (2) используется только отношение V/V_0 . По этой причине результаты расчетов представлены в табл.1 в виде зависимости отношения объемов V/V_0 от внутриклеточного давления. В результате проведенных расчетов возможно предложить метод определения внутриклеточного давления по данным атомно-силовой микроскопии.

Табл. 1. Результаты численного расчета изменения объема эритроцита от внутриклеточного давления

Внутриклеточное давление эритроцита, Па	Отношение объема к объему в норме, V/V_0
0	1,000
440	1,048
880	1,096
1 330	1,144
1 770	1,192
2 250	1,240
2 680	1,288
3 240	1,337
3 660	1,386

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ДАВЛЕНИЯ

Проведенные расчеты позволяют для эритроцитов, находящихся на воздухе, построить взаимно однозначную зависимость внутриклеточного давления от соотношения объема эритроцита к объему в норме. Используя метод наименьших квадратов и аппроксимируя данные, приведенные в табл.1, сплайном второго порядка, получаем следующую зависимость для внутриклеточного давления:

$$\Delta P[kPa] = 9.1 \cdot \left(\frac{V}{V_0} - 1\right) + 1.054 \cdot \left(\frac{V}{V_0} - 1\right)^2 \quad (13)$$

Полученная расчетная зависимость внутриклеточного давления от изменения объема позволяет провести расчет ΔP для эритроцитов, чья морфология измерена на АСМ микроскопе. Трехмерная поверхность эритроцитов, получаемая при АСМ измерениях, позволяет с наперед заданной точностью или разрешением микроскопа определить объем клетки, по которому можно провести расчет ΔP . В оптической микроскопии, также как и в электронной микроскопии, получить трехмерное изображение невозможно. Как показали расчеты (рис.2), площадь при изменении объема под действием реактивного давления

практически не изменяется. По этой причине для определения внутриклеточного давления можно применять только данные АСМ микроскопии.

Все изменения происходят в мембране в центре эритроцита, состояние мембраны также определяет величину внутриклеточного давления. В случае нарушений в работе ионных каналов мембраны величина реактивного давления ΔP_r изменится, что в свою очередь, повлияет на биомеханику эритроцита в целом, в результате внутриклеточное давление ΔP , установившееся в эритроците изменится. Таким образом, величина ΔP будет отражать состояние мембраны и эффективность работы ее ионных насосов.

Применение формулы (13) к данным АСМ эритроцитов вызывает необходимость определения начального значения V_0 для каждого эритроцита в выборке на скане. Поскольку невозможно определить начальный объем эритроцита до изменения его морфологии, процесс нормировки естественно выполнить для эритроцитов того же биологического вида и возраста, что и эритроциты исследуемого объекта. При этом вначале необходимо провести измерения скана мазка в норме, получить распределение выборки эритроцитов по объему и площади. Далее при расчете внутриклеточного давления для каждого эритроцита в выборке с измененной морфологией необходимо проводить нормировку на площадь S , занимаемую эритроцитом на скане. В соответствии с расчетами (рис.2) площадь эритроцита при изменении давления внутри клетки практически не изменяется, что позволяет привести каждый исследуемый эритроцит к его площади. В результате в формуле (13) вместо выражения V/V_0 будет использоваться выражение:

$$\frac{V}{V_0} = \frac{V/S}{V_0/S_0}, \text{ при условии } S = S_0 \quad (14)$$

В результате метод определения ΔP будет состоять из следующих шагов:

1. Получение трехмерного изображения эритроцита с разрешением, достаточным для определения его объема с точностью до 0,1%;
2. Расчет объема V и площади S эритроцита по данным АСМ.
3. Выбор начального значения объема V_0 эритроцита по соответствующей площади $S=S_0$ в норме.
4. Расчет внутриклеточного давления эритроцита в соответствии с формулой (13).
5. Проведение измерений для выборки эритроцитов на сканах образца и усреднение результата.

Последний пункт необходим для уменьшения погрешности путем статистического анализа расчетных данных. Погрешность метода измерения внутриклеточного давления будет складываться из нескольких составляющих. Наиболее существенная причина это естественное распределение эритроцитов по размерам. Диаметр эритроцитов варьируется в диапазоне 7-10 μm , в результате распределение эритроцитов по размерам и объему будет иметь довольно большой разброс. Процедура приведения объема эритроцитов к его площади существенно уменьшает разброс по размерам в выборке эритроцитов, однако распределение по высоте эритроцитов остается фактором, вносящим погрешность в расчеты. Другой причиной погрешности измерений является численный расчет объема эритроцита, поскольку при этом требуется провести анализ границ эритроцита по его периметру, а также определить плоскость основания, на которой находится эритроцит,

чтобы вычесть объем подложки. Обе процедуры будут также вносить погрешность в измерения, которую на данном этапе оценить не возможно.

При этом процесс приготовления мазка крови не будет вносить дополнительную погрешность в измерениях, поскольку на скане выделяются только отдельные эритроциты, клетки соприкасающиеся друг с другом не могут быть проанализированы из-за изменения морфологии. Во-вторых, в процессе высушивания мазка крови на воздухе происходит изменение упругих свойств мембраны и гемоглобина из-за прекращения биологических функций [2,11]. Однако морфология эритроцитов не изменяется [11-18], что обеспечивает постоянство объема эритроцитов и, соответственно, расчетного давления.

Практическое приложение метода определения внутриклеточного давления может быть достаточно широким. Во-первых, изменение состояния мембраны эритроцита сопровождается при различных заболеваниях: от хронических заболеваний легких и сердца до болезней внутренних органов, например, желтухе, и онкологии. При этом степень заболевания, а, следовательно, угроза здоровью и жизни пациентов при разрушении мембраны существенно возрастает [20], что может быть использовано при диагностике. К сожалению, анализ мембраны клеток внутренних органов затруднен, а исследование мембраны эритроцита провести существенно легче. При этом встает вопрос степени корреляции состояний мембран клеток органов и эритроцита при различных заболеваниях, что возможно провести в дальнейших исследованиях. Во-вторых, при химиотерапии происходит изменение биохимии крови, а также часто целями лекарств являются определенные белки, ответственные за ионные каналы в мембране, например, при лечении онкологических заболеваний. В этом направлении представляет несомненный интерес провести исследования работы ионных насосов и изменения внутриклеточного давления от степени воздействия препаратами. И, наконец, сейчас обсуждается вопрос использования эритроцитов в качестве клеток по целевой доставке лекарств в органы, что потребует исследований эффективности проникновения препаратов через мембрану оболочки эритроцита. В этом случае также будут интересны исследования изменения внутриклеточного давления при изменении состояний эритроцитов с лекарственным веществом и без него.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложен метод определения внутриклеточного давления на основе данных атомно-силовой микроскопии по морфологии эритроцитов. Метод заключается в определении соотношения объема клетки к объему клетки в норме, а затем в расчете величины внутриклеточного давления. Показано, что величина внутриклеточного давления эритроцита определяется реактивным давлением, создаваемым упругими силами мембраны. Состояние мембраны эритроцитов, а также эффективность работы ионных каналов мембраны определяет ее упругие свойства, что возможно определить по изменению внутриклеточного давления. В результате метод определения внутриклеточного давления может быть дополнительным методом в атомно-силовой микроскопии по обработке данных на скане мазка крови и найти широкое применение в медицинской диагностике и биологических исследованиях.

В работе проанализированы источники погрешности, как при экспериментальных измерениях, так и при проведении расчетов. С целью устранения погрешности, возникающей вследствие естественного распределения клеток по размерам, предложен способ нормировки на площадь под эритроцитом. Проведение экспериментальных исследований определения внутриклеточного давления при различных состояниях эритроцита будет проведено в следующей работе.

Литература:

1. TuZ.C., Zhong-can Ou-Ya. // J. Comput. Theor. Nanosci. 2008. V.5. P. 422.
2. NaitoH., OkudaM., Zhong-canOu-Ya. // Phys.Rev.E. 1996. V. 54. N 3. P. 2816.
3. Калягина Н.В., Мартынов М.В., Атауллаханов Ф.И. // Биологические мембраны. 2013.Т. 30. N 2. С. 115.(KalyaginaN.V., MartinovM.V., AtaulakhanovF.I. // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2013. V. 7. N 2.P. 122.)
4. Lew V.L., Bookchin R.M. // J. Membr. Biol. 1986. V.92. P. 57.
5. Martinov M.V., Vitvitsky V.M., Ataulakhanov F.I. // Biophys. Chem. 1999. V. 80. P. 199.
6. Asghari-Khiavi M., Wood B.R., Mechler A. // Analyst. 2010. V. 135. P. 525.
7. Атауллаханов Ф.И., Корунова Н.О., Спиридонов И.С. // Биологические мембраны. 2009. Т. 26. С. 163. (AtaulakhanovF.I., KorunovaN.O., SpiridonovI.S.// Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2009. V. 3. N 2. P. 101).
8. Ивенс И., Скейлак Р. (1982) Механика и термодинамика биологических мембран: Пер. с англ. М.:Мир, 352.
9. Zhong-canOu-Ya., HelfrichW.// Physical review A. 1989. V. 39. N 10. P. 5280.
10. Evans E.A., Hochmuth R.M. //Biophys. J. 1976. V.16. P.1.
11. Дрозд Е.С., Чижик С.А., Константинова Е.Э. // Российский журнал биомеханики. 2009. Т. 13. N4 (46). С. 22. (Drozd E.S., Chizhik S.A., Konstantionva E.E. // Russian Journal of Biomechanics. 2009. V. 13. N 4 (46). P. 21).
12. Nowakowski R., Luckham P. // Surface and Interface Analysis. 2002. V. 33. N 2. P. 118.
13. Dulinska I., Targosz M. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2006. V. 66 (1-3). P. 1.
14. Гущина Ю.Ю., Плескова С.Н., Звонкова М.Б. // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2005. N 1. С. 48.(Guschina Y.Y., Pleskova S.N., Zvonkova M.B. // Surface. X-ray, synchrotron and neutron studies. 2005. №1. P. 48).
15. O'Reilly M., McDonnell L., O'Mullane J. // Ultramicroscopy. 2001. V. 86(1-2). P. 107.
16. Nagornov Yu.S. // Applied Cell Biology. 2014. V.3. N 1. P. 1.
17. Нагорнов Ю.С. // Российский журнал биомеханики. 2013. Т.17. N 3(61).С.112. (Nagornov Yu.S. // Russian Journal of Biomechanics. 2013. V. 17. N 3 (61). P. 96).
18. Нагорнов Ю.С., Жиляев И.В. // Математическая морфология. Электронный математический и биомедицинский журнал. 2013. Т.12. N 1.
19. Галимзянов Т.Р., Молотковский Р.Ю., Хейфец Б.Б., Акимов С.А. // Письма в ЖЭТФ. 2012. Т. 96. N 10. С. 756. (GalimzyanovT.R., MolotkovskyR.J., KheyfetsB.B., AkimovS.A. // JETPLetters. 2012. V. 96. N 10. P. 681).
20. Винник Ю.С., Пахомова Р.А., Серова Е.В.// Сибирский медицинский журнал. 2012. Т. 27.N 3. С. 116.



Nagornov Ju. S. Metod opredelenija vnutrikletchnogo davlenija jericitocitov po dannym atomno-silovoj mikroskopii. Chast' 1. Teorija i chislennyj raschet / Ju. S. Nagornov // Nauka. Mysl'. - № 4. – 2016.

© Ю.С. Нагорнов, 2016.
© «Наука. Мысль», 2016.

— ● —

Abstract: The paper proposes a method for determining intracellular pressure of erythrocytes according to atomic force microscopy data. The method is based on comparison of experimental data on the morphology of cells with numerical calculations of the dependence the erythrocyte shape on the membrane pressure. We give a theoretical verification of the method and numerical calculation of the erythrocyte model, which takes into account the minimization of the free energy of the erythrocytes membrane and the interaction of hemoglobin with membrane. The fields of limitations of the method and its possible applications to medical and biological researches are considered

Keywords: atomic force microscopy, biology, medicine, blood, erythrocytes, intracellular pressure.

— ● —

Сведения об авторе

Юрий Сергеевич **Нагорнов**, старший научный сотрудник, кандидат физико-математических наук, доцент. Тольяттинский государственный университет (Ульяновск, Россия).

— ● —

Подписано в печать 24.04.2016.
© Наука. Мысль, 2016.