ванная герпетическая инфекция с поражением миокарда, почек, поджелудочной железы, головного мозга. Кандидозный эзофагит. Отек и набухание вещества головного мозга, вклинение головного мозга в большое затылочное отверстие. Отек легких.

Смерть больного наступила от тяжелого менингоэнцефалита, отека и набухания вещества головного мозга и его вклинения в большое затылочное отверстие.

Данный случай представляет интерес сочетанием трех оппортунистических инфекций, вызываемых простейшими (токсоплазма), вирусами (простой герпес) и грибами (рода кандида) со злокачественной опухолью — диффузной крупноклеточной лимфомой.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гончаров, Д. Б.* Значение персистенции *Toxoplasma gondii* в клинической патологии человека /Д. Б. Гончаров // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2006. — № 4. — С. 92–97.

2. *Каспер, Л.* Токсоплазмоз / Л. Каспер // From Harrison's Principles of Internal Medicine. — 14-th edition. — Oxford, Blackwell Scientific, 2002.

3. *Barlet, J. G.* Medical management of HIV-infection / J. G. Barlet, J. E. Gallant. — Baltimore, 2003.

4. Severe Toxoplasma gondii 1/111 recombinant-genotype encephalitis in a human immunodeficiency virus patient / S Genot [et al.] // American journal Trop Med Hyg. — 2008. — Vol. 18. — P. 76–82.

5. Prevalent genotypes of Toxoplasma gondii in pregnant women and patients from Crete and Cyprus / I. Messaritakis [et al.] // American journal Trop Med Hyg. — 2008. — Vol. 79. — P. 205–209.

УДК 577.15.158:612,42]:616-092.9

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ В АСМ-АНАЛИЗЕ

Никитина И. А., Никитин А. Н., Грицук А. И.

Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
Государственное научное учреждение
«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»
г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Атомно-силовая микроскопия дает возможность анализа трехмерного строения поверхности клетки в масштабах до нескольких нанометров. Для объективной оценки состояния поверхности клетки недостаточно визуального качественного описания. Количественные критерии, позаимствованные из топологии и методов цифровой обработки изображений, позволяют разработать систему показателей, которые можно использовать для описания морфологии клетки и оценки значимости ее изменений при различных воздействиях [1].

Высокий уровень достоверности полученных результатов может быть достигнут путем анализа достаточно большого числа клеток. Ручная обработка АСМ-изображений сопряжена со значительными временными затратами и наличием субъективного фактора при измерениях. Преодолеть эти недостатки можно с помощью автоматизированных программных средств обработки АСМ-изображения данных [2].

Цель работы

Разработать программное средство на основе свободной программы обработки изображений ImageJ, позволяющее получить количественную оценку ряда важных морфологических показателей клетки и деталей строения ее поверхности.

Материалы и методы

Тимоциты, используемые в эксперименте, выделяли из тимуса половозрелых белых крыс. Суспензию тимоцитов опытной группы обрабатывали пероксинитритом в концентрации 30 мкМ. АСМ-исследования проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («МикроТестМашина», Республика Беларусь).

Результаты и обсуждение

Режим сканирования Topography для атомно-силового микроскопа дает на выходе регулярные координаты точек поверхности в трехмерном пространстве (последующая компьютерная обработка превращает их в трех или двухмерное изображение).

Для расчета площади поверхности клетки необходимо выделить ее границы. В заданной области расчет площади осуществляется суммированием площадей, заключенных между четырьмя близлежащими точками, составляющими квадрат в горизонтальной проекции. Для этого в точку пересечения диагоналей горизонтальной проекции квадрата добавляется виртуальная точка с координатой по вертикали равной средней арифметической из координат по вертикали четырех окружающих точек. Из виртуальной точки проводятся отрезки к каждой из четырех окружающих ее точек. После этого вычисляется площадь каждого из четырех образованных треугольников. Следовательно, площадь поверхности, вписанной в каждый квадрат, равняется сумме площадей входящих в ее состав четырех треугольников. Суммирование результатов позволяет найти площадь поверхности клетки, не соприкасающейся с подложкой (свободная поверхность), на которой находится клетка. Площадь поверхности, находящиеся в непосредственном соприкосновении с подложкой (площадь адгезии), равна сумме площадей квадратов, заключенных в горизонтальную проекцию клетки. Общая площадь поверхности клетки представляет собой сумму площадей поверхности соприкасающейся и несоприкасающейся с подложкой. Отношение площади свободной поверхности клетки и площади основания (индекс площади) характеризует степень развития поверхности клетки в трехмерном пространстве по сравнению с ее двухмерной проекцией.

Объем выделенного участка (объем клетки) равен сумме объемов четырехугольных призм, высота которых рассчитывается как разность между вертикальной проекцией виртуальной точки и высотой подложки, на которой расположена клетка. Площадь основания призмы равна квадрату шага иглы кантиливера.

Индекс объема равен отношению объема клетки к площади ее поверхности. Так как обмен клетки с окружающей средой происходит через ее поверхность, то увеличение площади поверхности при неизменном объеме (уменьшение индекса объема) свидетельствует о возрастании удельных (отнесенных к единице объема или массы клетки) потоков вещества, энергии и информации. Эти процессы могут наблюдаться, к примеру, при активации клеток иммунной системы, увеличении энергетических потребностей клетки и т. д. Увеличение индекса объема, наоборот, происходит при снижении функциональной активности клетки.

Кроме абсолютной высоты клетки (разница между высотой наиболее высокой и наиболее низкой точкой поверхности клетки в пределах выделенного участка) плагин вычисляет высоту клетки в пределах 95 % вариации (отбрасывая в расчетах 2,5 % наиболее высоких и 2,5 % наиболее низких точек поверхности). Этот показатель позволяет получить более обоснованную оценку вертикальной протяженности клетки или участка ее поверхности, на которые не влияют случайные или имеющие низкую значимость выбросы.

Диаметр клетки вычисляется на основании площади проекции по формуле 1:

$$D = \sqrt{\frac{4S}{\pi}} \qquad (1)$$

где S — площадь проекции.

Диаметр, рассчитанный таким образом, равен средней из измерений поперечного размера клетки по бесконечно большому числу направлений.

Кроме количественного анализа общих морфологических характеристик клетки, в разработанном плагине присутствуют функции для анализа строения клеточной поверхности.

Показателем, характеризующим вариабельность высот поверхности клетки в пределах выделенного участка, является шероховатость, рассчитываемая по формуле 2:

$$R_a = \frac{1}{N}\sum_{j=0}^{N_y-1}\sum_{i=0}^{N_x-1}\left|Z_{i,j} - \overline{Z}\right|, \qquad (2)$$

где N — количество точек матрицы сканирования; $Z_{i,j}$ — высота в положении (x, y); $\overline{Z}$ — среднеарифметическое значение высоты во всей матрице сканирования.

Ассиметрия и эксцесс показывают степень отклонения распределения высот поверхности от нормального. Данные показатели рассчитываются по стандартным формулам, применяемым в математической статистике.

Ассиметрия (Rsk) (формула 3):

$$R_{sk} = \frac{1}{N \cdot R_a^3}\sum_{j=0}^{N_y-1}\sum_{i=0}^{N_x-1}\left(Z_{i,j} - \overline{Z}\right)^3 \qquad (3)$$

Эксцесс (Rku) (формула 4):

$$R_{ku} = \frac{1}{N \cdot R_a^4}\sum_{j=0}^{N_y-1}\sum_{i=0}^{N_x-1}\left(Z_{i,j} - \overline{Z}\right)^4 \qquad (4)$$

Смещение ассиметрии в область отрицательных значений свидетельствует о преимущественной представленности в рельефе пониженных участков с относительно редкими возвышениями. Смещение ассиметрии в положительную область, наоборот, указывает на наличие редких углублений поверхности на фоне относительно повышенного рельефа.

Значение эксцесса свидетельствует о преобладании в рельефе участков с высотой, близкой к средней. Уменьшение эксцесса говорит о том, что участки высоты близкой к средней встречаются реже, чем повышения или понижения рельефа, по сравнению с поверхностью, имеющей $R_{ku} = 0$.

Насыщенность поверхности структурными образованиями можно оценить по количеству выступов и углублений на 1 мкм^2 поверхности. Автоматизированный подсчет количества структурных элементов позволяет избежать влияния субъективных представлений о степени их выраженности. Использование плагина позволяет учитывать только 3-d максимумы или минимумы поверхности с градиентом, превышающим заданный порог (не менее 1 нм на шаг иглы кантелливера). Чувствительность поиска структурных элементов регулируется величиной предварительного размытия по Гауссу (0,5 нм).

Важной топологической характеристикой строения поверхности клетки является ее фрактальная размерность. Минимально возможная фрактальная размерность плоской поверхности равна 2,0. С появлением на поверхности самоподобных структурных образований ее фрактальная размерность увеличивается. Для определения фрактальной размерности поверхностей подходящими оказались модифицированный спектральный метод и метод семивариации [4]. Семивариация поверхности рассчитывается по формуле 5:

$$\gamma_h = \frac{1}{4N_h\sum_{i=1}^{N_h}\sum_{j=1}^{N_h}\left[\left(Z_{ij} - Z_{i+h,j}\right)^2 + \left(Z_{ij} - Z_{i,j+h}\right)^2\right]}, \qquad (5)$$

где γ_h — семивариация при масштабе h; Z — высота поверхности в точке с координатами (i, j).

Фрактальная размерность поверхности определяется исходя из тангенса угла наклона прямой (α), аппроксимирующей зависимость логарифма семивариации от логарифма масштаба [5] (формула 6):

$$F_d = 3 - \frac{tg\alpha}{2}. \quad (6)$$

Визуальный анализ данных АСМ-сканирования адгезированных к стеклу тимоцитов контрольной группы (рисунок 1а) показал, что их поверхность в норме относительно гладкая, без явно выраженных структурных элементов. Обработка пероксинирита приводит к появлению на поверхности клетки большего числа локальных пиков (рисунок 1б).

а) б)

Рисунок 1 — Внешний вид тимоцитов крысы (АСМ-изображение в режиме topography (область сканирования 9×9 μм).
а) контроль; б) после обработки пероксинитритом

Использование разработанного плагина к программе ImageJ позволяет выполнить количественный анализ особенностей строения поверхности тимоцитов и выявить достоверность различий между опытным и контрольным вариантами (таблица 1).

Таблица 1 — АСМ-параметры целых тимоцитов и участков их поверхности (topography)

Параметры	Контроль	30 мкМ пероксинитрита
Целая клетка, область сканирования — 9 мкм × 9 мкм		
Высота, мкм	2,52 (2,40–2,56)	2,49 (2,36–2,27)
Диаметр, мкм.	6,12 (5,81–6,53)	5,24* (4,64–5,68)
Объем, мкм^3	51,39 (42,48–56,54)	32,46* (28,74–39,35)
Площадь свободной поверхности клетки, мкм^2	73,62 (41,31–49,57)	54,38* (50,11–60,02)
Площадь контакта клетки с подложкой, мкм^2	29,39 (26,53–33,51)	21,49 (16,94–25,32)
Индекс объема	0,69 (0,62–0,71)	0,59* (0,50–0,65)
Индекс площади	1,50 (1,46–1,56)	1,74 (1,38–2,01)
Участки поверхности тимоцитов, область сканирования — 1,5 мкм × 1,5 мкм		
Шероховатость	0,14 (0,12–0,21)	0,10* (0,09–0,14)
Число пиков на 1 мкм^2, шт	3,15 (1,13–9,49)	44,7* (16,7–57,4)
Фрактальная размерность	2,23 (2,22–2,24)	2,25* (2,24–2,26)
Размах высот (в пределах 95 % вариации)	0,67 (0,47–0,92)	0,46* (0,37–0,61)

Примечание: Данные представлены медианной и границами верхнего и нижнего квартилей (n = 10); *$p < 0,05$ в сравнении с соответствующим параметром после обработки пероксинитритом (критерия Манна-Уитни).

Заключение

Количественный анализ АСМ-изображений с помощью разработанного плагина позволил установить, что при воздействии пероксинитрита происходит уменьшение диаметра, объема и площади свободной поверхности тимоцитов. При этом резко увеличивается количество структурных элементов на поверхности клетки и ее фрактальная размерность, а шероховатость и размах высот сокращаются.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gadegaard, N. Atomic force microscopy in biology: technology and techniques / N. Gadegaard // Biotech Histochem. — 2006. — Vol. 81, № 2–3. — P. 87–97.

2. *Collins, T. J.* ImageJ for microscopy / T. J. Collins // Biotechniques. — 2007. — Vol. 43, № 1. — P. 25–30.

3. *Никитина, И. А.* Пероксинитрит-индуцированные изменения формы и структуры поверхности тимоцитов / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — 2009. — Т. 2, № 26. — С. 142–146.

4. Huang J., Turcotte D.L. Fractal mapping of digitized images: application to the topography of Arizona and comparisons with synthetic images / J. Huang, D. L. Turcotte // J. Geophys. Res. — 1989. — Vol. 94. — P. 7491–7495.

5. *Bian, L.* Scale dependencies of vegetation and topography in a mountainous environment of Montana / L. Bian, S. J. Walsh // Prof. Geogr. — 1993. — Vol. 45. — P. 1–11.