

ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ «СПЛЮСНУТЫЙ СФЕРОИД» ДЛЯ ПРИБЛИЖЕНИЯ ФОРМЫ АКТИВИРОВАННОГО ТРОМБОЦИТА

Литвиненко А.Л., Некрасов В.М., Ястребова Е.С.

Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского
ул. Институтская, 3, г. Новосибирск, 630090, РФ; e-mail: roseline.neolis@gmail.com

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0622

Аннотация. Определение морфологических параметров одиночных тромбоцитов вызывает не только научный, но и практический интерес для медицинских приложений. Однако корректность определения морфологических параметров тромбоцитов по данным светорассеяния зависит не только от качества исходных экспериментальных данных или применяемого метода решения обратной задачи светорассеяния, но и от используемой оптической модели тромбоцита, в рамках которой ищется оптимальное решение. Явное несоответствие оптической модели и реальной формы измеренной частицы может приводит к неконтролируемым систематическим ошибкам определяемых параметров, что отрицательным образом сказывается на адекватности и корректности выводов проведенного исследования. В данной работе приведены оценки влияния погрешностей такого рода на значения параметров формы для двух частных примеров геометрических форм тромбоцитов. Эти формы заведомо отличались от используемой базовой оптической модели, взятой в виде однородных сплюснутых сфероидов. Первая тестируемая геометрическая форма была основана на биофизической модели поверхности тромбоцита, получаемая при оптимизации площади поверхности с фиксированным внутренним объемом, натянутой на математическую кривую с постоянной кривизной, а вторая геометрическая форма была создана искусственно, на основе сплюснутого сфероида с добавленными вытянутыми половинками эллипсоидов, имитирующих псевдоподии. В качестве экспериментальных данных были взяты численно рассчитанные сигналы светорассеяния с помощью программного пакета ADDA, которые были потом адаптированы к виду сигналов, получаемых при измерениях сигналов светорассеяния на сканирующем проточном цитометре.

Ключевые слова: тромбоциты, оптическая модель, обратная задача светорассеяния.

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты – это безъядерные форменные элементы крови, играющие важную роль в поддержании гемостаза в организме человека. Несмотря на то, что они были открыты более 150 лет назад, первые детальные систематические исследования формы были предприняты только в 1976 году, с использованием фазово-контрастного микроскопа [1]. Геометрическая форма, выбранная в виде сплюснутого эллипсоида вращения (сплюснутый сфероид), показала наилучшее согласие с экспериментальными данными и до сих пор широко используется в литературе, причем не только для расчета оптических сигналов, но и, например, для моделирования поведения тромбоцитов в потоке жидкости при гидродинамических расчетах [2-3]. Однако очевидно, что данная модель является не более чем удачным приближением биологических объектов, а реальная геометрическая форма и внутренняя структура тромбоцитов является гораздо более сложной, чем однородный сплюснутый сфероид. Для тромбоцитов основными элементами, определяющими их форму, являются субмембранный кортекс и периферическое кольцо микротрубочек. Субмембранный кортекс, представленный спектрином и микрофиламентами, создает поверхностное натяжение [4], а периферическое кольцо микротрубочек, находящееся в динамическом равновесии, растягивает мембрану, придавая ей эллипсоподобную форму [5,6].

Следует отметить, что при описании формы тромбоцитов для объяснения экспериментальных данных, помимо использования простых геометрических моделей, последнее время в литературе предпринимались попытки точно рассчитать геометрическую форму тромбоцитов, исходя из физических соображений минимизации поверхностной энергии, заключенной в мембране, натянутой на периферическое кольцо микротрубочек, которое задается в виде некоторой математической кривой с постоянной кривизной [7].

При активации тромбоцита какими-либо химическими или механическими факторами внутри него запускается ряд сложных биохимических каскадов, приводящих, в частности, к резкому повышению ионов внутриклеточного Ca^{2+} , которые влияют на жесткость периферического кольца микротрубочек, что, в свою очередь, влияет на форму активированного тромбоцита [8]. В результате численного моделирования процесса перестройки периферического кольца был получен ряд седловидных геометрических форм, не имеющих осевой симметрии. Данные формы хотя и представляют теоретический интерес, но, к сожалению, слишком сложны для описания наблюдаемых экспериментальных данных.

Более того, повышение концентрации ионов кальция вызывает не только перестройку периферического кольца микротрубочек, но и активацию гельзолина, приводящего к фрагментации микрофиламентов и образованию актиновых нитей, составляющих основу псевдоподий, длина которых сравнима с характерными размерами тромбоцитов [9]. Очевидно, что форма таких активированных тромбоцитов с несколькими

псевдоподиями лежит еще дальше от простых геометрических фигур, чем форма неактивированных тромбоцитов, и делает задачу точного описания формы тромбоцитов почти безнадежной.

В данной работе рассматривается вопрос о том, каким образом приближение сложных форм тромбоцитов (тромбоцит с искривлённым периферическим кольцом или тромбоцит с псевдоподиями) заведомо упрощённой геометрической фигурой – сплюснутым сфероидом – отражается на определяемых параметрах формы исследуемой частицы.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В качестве сигналов, отражающих форму тромбоцита, использовались сигналы светорассеяния. Под сигналами светорассеяния понимаются элементы квадратной матрицы Мюллера $S_{ij}(\theta, \varphi)$ с размерностью 4×4 , которые связывают вектор Стокса падающего опорного излучения и вектор Стокса рассеянного излучения.

Для моделирования сигнала светорассеяния от неоднородных биологических частиц сложной формы стандартные приближенные методы расчетов (приближение Релея, Релея-Ганса-Дебая, Вентцля-Крамерса-Бриллюэна и т.д.) работают плохо, и необходимо применять численные методы, которые дискретизируют уравнения для электромагнитного поля. Один из таких методов, хорошо зарекомендовавший себя на практике – это метод дискретных диполей (МДД), в основе которого лежит представление частицы в виде набора конечного числа точечных диполей, лежащих в узлах кубической решетки, поляризуемость которых определяется локальным показателем преломления. Данный подход реализован в программном пакете ADDA [10], который позволяет моделировать сигналы светорассеяния как от простых предустановленных форм, так и задавать формы самостоятельно с помощью сторонних программ, причём частица может быть неоднородной по внутренней структуре. Все расчёты сигналов светорассеяния в рамках этой работы проводились с использованием этого программного пакета. Поскольку точность и временная сложность численных расчетов явно зависит от степени дискретизации частицы, то для всех расчетов была взята рекомендованная плотность решетки диполей по всем декартовым осям, равная $l = \frac{\lambda}{10}$, где λ – длина электромагнитной волны в среде.

В качестве базовой оптической модели тромбоцитов была выбрана модель однородного сплюснутого сфероида, которая описывается четырьмя параметрами: D , δ , n и β , где D – диаметр сферы с объёмом, равным объёму моделируемого тромбоцита, δ – индекс формы, n – показатель преломления цитоплазмы тромбоцита, а β – параметр, показывающий ориентацию главной оси тромбоцита в пространстве относительно падающего излучения. Область определения параметра δ $[0, 1]$, где 1 соответствует сфере и интерпретируется как полностью активированное состояние, а малые значения δ интерпретируется как нативное состояние [3].

Для того, чтобы найти параметры любой произвольной измеренной частицы, необходимо решить так называемую обратную задачу светорассеяния, которая заключается в нахождении оптимальной модельной частицы, сигнал от которой наилучшим бы образом совпадал с сигналом измеренной частицы. Как правило, данная задача решается следующим образом – сначала выбирается оптическая модель (класс геометрических фигур), в рамках которой будет решаться обратная задача. Далее насчитывается база данных сигналов светорассеяния для данного класса, которая достаточно широка, чтобы покрыть область всех практически важных случаев для исследуемых частиц. Это делается заранее, потому что, как правило, расчет сигнала светорассеяния от одной частицы с помощью МДД может занимать от нескольких секунд до нескольких минут. Далее, методом прямого перебора по всей базе данных ищется такая частица, сигнал от которой наилучшим образом совпадает с сигналом от частицы, параметры которой мы хотим определить. В данной работе были выбраны следующие диапазоны для параметров базы данных сплюснутых сфероидов.

$$\begin{aligned} D &\in [0,75, 4,12] \text{ мкм} \\ \delta &\in [0,1,1] \\ n &\in [1,37,1,39] \\ \beta &\in [60,90]^\circ \end{aligned} \quad (1)$$

Такой масштаб параметров полностью перекрывают биологический значимый диапазон изменений объема, формы и показателя преломления тромбоцитов, а параметр β выбран таким, исходя из конструктивных особенностей сканирующего проточного цитометра, который включает в себя гидрофокусирующую головку, в которой происходит ориентация несферических частиц вдоль главной оси. Число заранее насчитанных сигналов в базе данных составило 200000 штук, что вполне достаточно для определения наилучшей подходящей частицы с приемлемой точностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поскольку точная геометрическая форма нативных и активированных тромбоцитов неизвестна, то результаты обработки тромбоцитов по простой оптической модели в виде однородных сплюснутых сфероидов могут быть подвержены влиянию систематических погрешностей. Вопрос систематических ошибок и погрешностей является весьма нетривиальным, и в данной работе мы пытаемся сделать оценку влияния таких

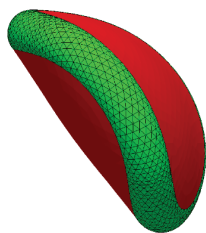


Рисунок 1. Модель тромбоцита, определяемая кривизной кольца микротрубочек. Зелёным обозначено периферическое кольцо микротрубочек, красным мембрана. Параметры модели $Q = 1,15$, $\frac{V}{R^3} = 2,4$, $\frac{r}{R} = 0,2$

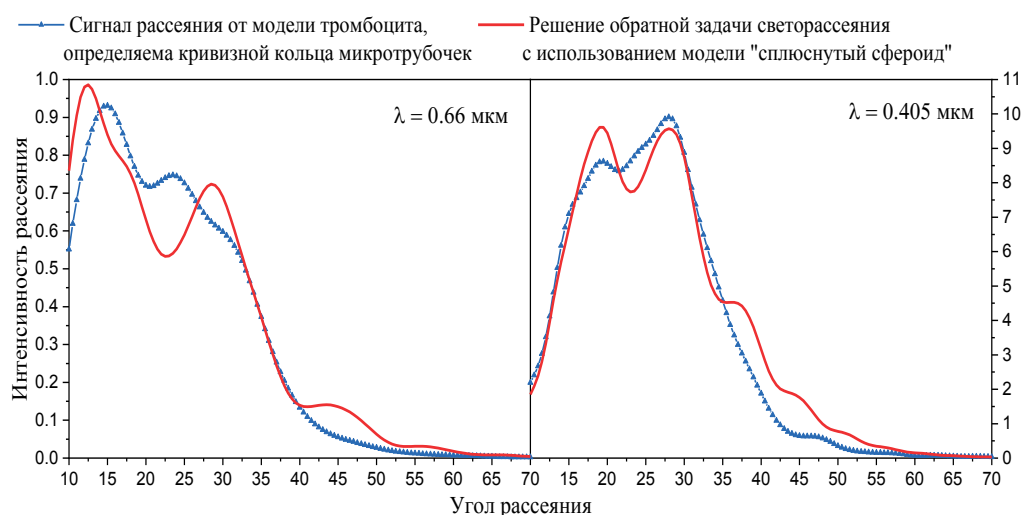


Рисунок 2. Решение обратной задачи светорассеяния для оптической модели тромбоцита, определяемой кривизной кольца микротрубочек с использованием базы данных сигналов от сплюснутых сфероидов

погрешностей на определяемые параметры тромбоцитов для двух различных случаев: случая, когда форма тромбоцита полностью определяется искривлением периферического кольца микротрубочек и случаем, когда форма тромбоцита учитывает наличие множества псевдоподий.

Модель формы тромбоцита, определяемая искривлением периферического кольца кольцом микротрубочек. Данная модель базируется на следующих допущениях:

- форма кольца микротрубочек является математической кривой с постоянной кривизной Q
- поверхность мембраны ограничивает фиксированный объем V
- поверхность мембраны тромбоцита является минимальной, при фиксированном Q и R

Детальное описание модели, методы задания и численный поиск геометрической формы данной модели сделано в работе [7]. На рисунке 1 приведена характерная поверхность для заданной модели, где параметр R – радиус кольца микротрубочек, а r – толщина кольца микротрубочек. На рисунке 2 приведены исходные сигналы светорассеяния для подобной частицы, и показаны наиболее похожие на них сигналы из базы данных однородных сплюснутых сфероидов. Расчеты сделаны для двух длин волн, для 0,66 и 0,405 мкм.

Исходные параметры частицы и найденные параметры в рамках модели сплюснутого сфероида приведены в таблице 1.

Таблица 1. Решение обратной задачи светорассеяния для модели тромбоцита определяемой кривизной кольца микротрубочек. $SKO_{отн}$ – относительное среднее квадратичное отклонение между сигналом рассеяния от модели и результатом решения обратной задачи, D – диаметр сферы эквивалентного объема, δ – индекс формы, β – угол ориентации

	$SKO_{отн}$	D	δ	β
Параметры исходной модели		2,6мкм	0,7	75
0,66 мкм				
	0,03	3,2±0,4	0,56±0,14	73±5
0,405 мкм				
	0,015	3,2±0,3	0,47±0,12	77,4±0,8

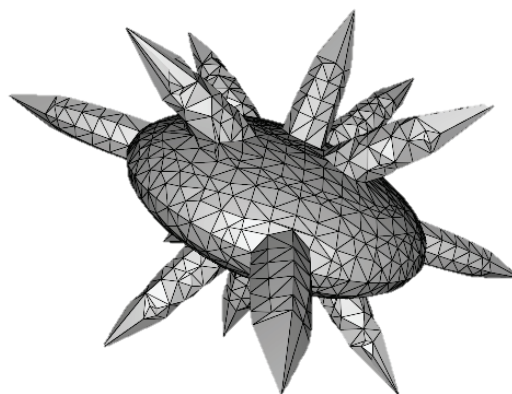


Рисунок 3. Модель тромбоцита с псевдоподиями. Основной объем 9,2 фл, индекс формы $\delta=0,7$, каждая из псевдоподий это вытянутый сфероид с объемом 0,128 фл, индекс формы 0,38

Видно, что для данного набора параметров исходной частицы сложной формы найденные параметры в рамках простой модели сплюснутого сфероида значительно отличаются, особенно для параметра D и индекса формы δ , причем это отличие более значительно для меньшей длин волн. Здесь приведен результат систематической погрешности определения параметров частицы в случае заведомо неправильного выбора оптической модели только для одной частицы, однако из общих соображений понятно, что более короткие длины волн должны лучше “чувствовать” отличия выбранной модели от реальной частицы. Заметим, что подобные длины волн были выбраны не случайно, а исходя из характерных коммерчески доступных лазеров, которыми можно оснастить прибор, измеряющий сигнал светорассеяния от одиночных частиц.

Модель формы тромбоцита с псевдоподиями. Другой, практически реализующийся случай значительного отличия формы реального тромбоцита от простой модели сплюснутого сфероида – это наличие длинных вытянутых псевдоподий. Псевдоподии экспериментально наблюдаются у сильно активированных тромбоцитов под воздействием агонистов активации, причем их количество и длина могут сильно варьироваться. Построим следующую модель тромбоцита с псевдоподиями – основой будет служить сплюснутый сфероид, к которому прикреплены значительно меньшие по объему половинки вытянутых сфероидов (см. рис. 3)

Следует отдельно отметить, что несмотря на относительно малый объем, содержащийся в отдельной псевдоподии, их наличие значимо влияет на сигнал светорассеяния, как это показано на рисунке 4, где показано три сигнала – от базового сфероида с 0, 9 и 14 псевдоподиями.

Очевидно, что изменение сигнала светорассеяния при добавлении псевдоподий изменяет оптимальное решение среди класса сплюснутых сфероидов, как это продемонстрировано на рисунке 5.

Найденные оптимальные параметры и погрешности для данного случая искажений реальной частицы от используемой оптической модели отражены в следующей таблице 2.

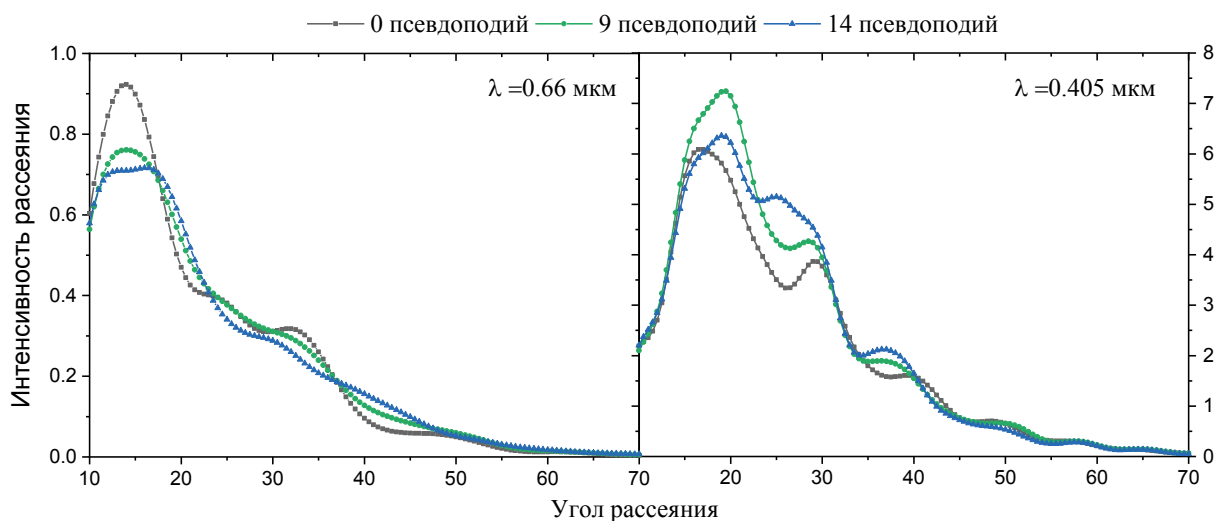


Рисунок 4. Сигнал светорассеяния с 0, 9 и 14 псевдоподиями, на двух длинах волн, 405 и 660 нм

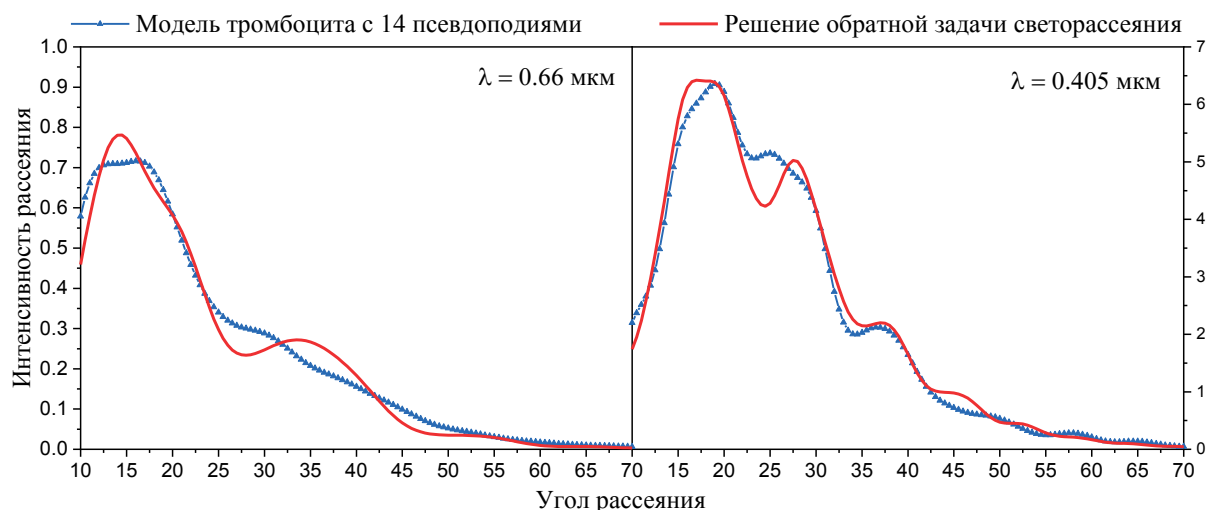


Рисунок 5. Решение обратной задачи светорассеяния для оптической модели тромбоцита с 14 псевдоподиями с использованием базы данных сигналов от сплюснутых сфероидов

Как и в случае первой модели тромбоцита, отличие реальной формы от используемой оптической модели может приводить к значительным отличиям найденных параметров от настоящих. Причем, как видно из таблицы 2 на примере с индексом формы для длины волны 0,405 мкм, эти отличия могут носить несистематический характер, когда постепенное усиление отличия реальной частицы от оптической модели приводит к немонотонной зависимости найденного параметра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы был рассмотрен вопрос о влиянии отличия используемой оптической модели от реальной формы частицы на определение параметров при решении обратной задачи светорассеяния. В качестве оптической модели тромбоцита был взят широко распространенный вариант сплюснутого сфероида, а в качестве реальной модели были выбрано два различных примера. Первый из них базируется на математической модели поверхности тромбоцита с минимальной площадью, натянутой на кольцо микротрубочек, моделируемой кривой с постоянной кривизной, а вторая модель реальной частицы основана на геометрической модели сплюснутого

Таблица 2. Решение обратной задачи светорассеяния для модели тромбоцита с псевдоподиями. СКО_{отн} – среднеквадратичное отклонение между сигналом рассеяния от модели с псевдоподиями и результатом решения обратной задачи, D – диаметр сферы эквивалентного объема, δ – индекс формы, β – угол ориентации

	СКО _{отн}	D	δ	β
Параметры сфероида без псевдоподий.		2.6мкм	0.7	75
0.66 мкм				
Без псевдоподий	0,0005	2,63±0,03	0,69±0,01	74,2±0,7
9 псевдоподий	0,008	2,81±0,16	0,59±0,04	73±3
14 псевдоподий	0,011	2,73±0,15	0,55±0,04	72±2
405 мкм				
Без псевдоподий	0,0008	2,717±0,011	0,6655±0,006	72,9±0,3
9 псевдоподий	0,0018	2,9±0,03	0,561±0,013	79,7±0,4
14 псевдоподий	0,006	3±0,07	0,58±0,03	77,7±0,8

сфероида, на котором расположены несколько других вытянутых сфероидов с гораздо меньшим объемом, имитирующих наличие псевдоподий у активированных тромбоцитов. Решение обратной задачи для обоих случаев показало наличие значительных отклонений найденных параметров от заложенных в реальную частицу, причем характер этих отклонений может быть несистематическим.

Список литературы / References:

1. Frojmovic M.M., Panjwani R. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. *Biophys J.*, 1976, vol. 16, no. 9, pp. 1071-1089, doi: 10.1016/S0006-3495(76)85756-6.
2. Chesnutt J.K.W., Han H.-C. Platelet size and density affect shear-induced thrombus formation in tortuous arterioles. *Phys Biol.*, 2013, vol. 10, no. 5, doi: 10.1088/1478-3975/10/5/056003.
3. Litvinenko A.L., Moskalensky A.E., Karmadonova N.A., Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Konokhova A.I., Yurkin M.A., Pokushalov E.A., Chernyshev V.A., Maltsev V.P. Fluorescence-free flow cytometry for measurement of shape index distribution of resting, partially activated, and fully activated platelets. *Cytometry*, 2016, vol. 89, no. 11, pp. 1010-1016, doi: 10.1002/cyto.a.23003.
4. Hartwig J.H. Chapter 8 - The Platelet Cytoskeleton. *Platelets (Third Edition) ed. Michelson A.D. Academic Press*, 2013, pp. 145-168, doi: 10.1016/B978-0-12-387837-3.00008-0.
5. Patel-Hett S., Richardson J.L. et al. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 9, pp. 4605-4616, doi: 10.1182/blood-2007-10-118844.
6. White J.G., Rao G.H. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am. J. Pathol.*, 1998, vol. 152, no. 2, pp. 597-609.
7. Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Muliukov A.R., Litvinenko A.L., Nekrasov V.M., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Method for the simulation of blood platelet shape and its evolution during activation. *PLOS Computational Biology*, 2018, vol. 14, no. 3, e1005899, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005899.
8. Steiner M., Ikeda Y. Quantitative assessment of polymerized and depolymerized platelet microtubules. *J. Clin. Invest.*, 1979, vol. 63, no. 3, 443-448, doi: 10.1172/JCI109321.
9. Hartwig J.H. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *Journal of Cell Biology*, 1992, vol. 118, no. 6, pp. 1421-1442, doi: 10.1083/jcb.118.6.1421.
10. Team of core ADDA developers [Electronic resource] *GitHub*.

EMPLOYING THE OPTICAL MODEL OF AN "OBLATE SPHEROID" TO APPROXIMATE THE SHAPE OF AN ACTIVATED PLATELET

Litvinenko A.L., Nekrasov V.M., Yastrebova E.S

Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion

Institutskaya str., 33, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: roseline.neolis@gmail.com

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0622

Abstract. The determination of morphological parameters of individual platelets is of great scientific and practical interest in the field of medical applications. However, the accuracy of determining these parameters based on light scattering data depends not only on the quality of the initial experimental data and the methodology used to solve the inverse problem of light scattering, but also on the optical model employed for platelets. The choice of an appropriate optical model is crucial as it directly influences the accuracy of the determined parameters. A significant mismatch between the assumed optical model and the actual shape of the measured particle can introduce uncontrolled systematic errors, thereby compromising the adequacy and validity of the study's findings. This paper focuses on assessing the impact of such errors on the shape parameters using two specific examples of platelet geometric shapes. These shapes were deliberately chosen to deviate from the commonly employed optical model, which assumes uniform oblate spheroids. The first geometric configuration investigated was derived from a biophysical model that represents the morphology of a platelet. This model was obtained through the optimization of surface area while keeping the internal volume constant. The surface was defined by a mathematical curve characterized by a consistent curvature. The second geometric structure was artificially constructed by augmenting an oblate spheroid with elongated halves of ellipsoids, specifically designed to imitate pseudopodia. Numerically calculated light scattering signals obtained through the ADDA software package were used as experimental data, and these signals were subsequently adjusted to resemble the type of signals obtained from light scattering measurements conducted on a scanning flow cytometer.

Key words: platelets, optical model, scanning flow cytometry.