

ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ОПИСАНИЯ КИНЕТИКИ ПРИКРЕПЛЕНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА К ПОДЛОЖКЕ IN VITRO

© И. Г. Герасимов

*НИИ медицинских проблем семьи Донецкого государственного медицинского университета, Украина;
электронный адрес: IGGerasim@mail.ru*

Кинетика морфометрических показателей (периметр, площадь, компактность) нейтрофилов крови человека, прикрепляющихся к предметному стеклу, описана уравнениями, аналогичными кинетическим уравнениям необратимых реакций первого порядка. Рассчитанные значения морфометрических показателей нейтрофилов во взвеси и прикрепленных согласуются с литературными данными. Найдено, что компактность нейтрофилов в процессе прикрепления не изменяется. Время завершения процесса прикрепления, найденное по кинетическим уравнениям, составляет примерно 3 ч.

Ключевые слова: нейтрофилы, прикрепление, периметр, площадь, компактность, кинетика.

Морфология клеток крови исследована в многочисленных работах, пожалуй, подробнее клеток других тканей. В процессе выполнения клетками физиологических функций может происходить изменение разнообразных параметров как клетки в целом, так и ее форменных элементов и ядра. Хорошо известно, например, что прикрепление приводит к увеличению размеров проекции клетки в плоскости прикрепления. Однако морфология в динамике прикрепления обсуждается на описательном уровне. Понятно, что процесс протекает во времени, и в настоящее время для исследования его кинетики применяется единственный подход (см., например: Namvar, Warriner, 2005). Суспензию клеток наносят на ряд термостабилизируемых подложек, подсчитывают под микроскопом количество клеток, через определенные промежутки времени клетки смывают соответствующими растворами и подсчитывают количество оставшихся на подложке прикрепившихся клеток. В результате исследуют процесс прикрепления клеток в популяции. Описанный подход, однако, не дает информации о поведении каждой клетки в отдельности.

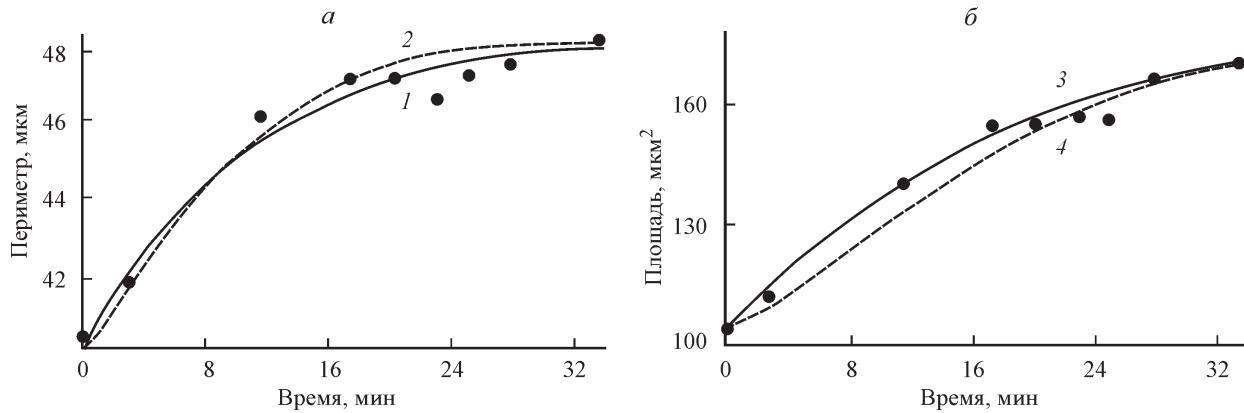
В то же время кинетика морфометрических показателей индивидуальных клеток в процессе их прикрепления представляет несомненный интерес, поскольку позволяет получить информацию о поведении каждой из них, оценить время окончания процесса задолго до его завершения, а также дать дополнительную информацию о нормальном поведении клетки в процессе прикрепления. Исходные данные для такого рода исследований естественным образом формируются при измерении и расчете морфометрических показателей клетки, например ее периметра и площади. При этом получение оцифрованных изображений проекций клеток и расчет их морфометрических параметров с помощью персональных ЭВМ не представляют технических трудностей. Одной из первых работ в этом направлении была оценка жизнеспособности фибробластов (Герасимов, Попандопуло, 2007).

Подходящими объектами для исследования изменений морфологии клетки в процессе прикрепления являются нейтрофилы периферической крови, наблюдение за которыми просто реализуется с применением световой микроскопии. Кинетика изменения морфологических показателей нейтрофилов (как и любых других клеток) в процессе прикрепления не исследована. Известен лишь факт увеличения в 1.5—2 раза диаметра прикрепленного нейтрофила (Афанасьев и др., 2004; Кузнецов, Пугачев, 2004). В результате прикрепления нейтрофил в отличие от некоторых других клеток не образует псевдоподии (Богатырев, 2005), а принимает форму сплюснутой сферы (Афанасьев и др., 2004).

В настоящей работе впервые предпринята попытка математического описания кинетики изменения морфометрических показателей в процессе прикрепления клеток на примере прикрепления нейтрофилов периферической крови человека *in vitro* к предметному стеклу при комнатной температуре.

Материал и методика

Исследовали 11 нейтрофилов в 5 образцах гепаринизированной (5 мкл/мл) капиллярной крови здоровых добровольцев (4 мужчины и 1 женщина в возрасте 19—20 лет) в процессе прикрепления клеток из взвеси к стеклянной подложке при комнатной температуре. Каплю крови наносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом, края которого промазывали вазелином, и наблюдали за поведением одного нейтрофила в течение 0.5—3 ч, используя объектив с увеличением 90× и масляную иммерсию (микроскоп ЛЮМАМ-Р3, ЛОМО, Россия). Двумерные оцифрованные изображения нейтрофилов (проекции клеток на плоскость) получали посредством цифровой видеокамеры (CCD Oscar Color Camera OS-35II, OSCAR, Великобритания) и программы для работы с изображениями ASUS Live. С помощью специаль-



Изменения периметра (а) и площади (б) в процессе прикрепления нейтрофила (точки) и их описание (кривые) по уравнениям (2) (кривые 1, 3) и (4) (кривые 2, 4).

Объяснения в тексте.

ной компьютерной программы выделяли контур нейтрофила и находили морфометрические показатели (M): периметр (P), площадь (S), а также компактность C ($C = P^2/4\pi S$). Вычисляли параметры кинетических уравнений с помощью пакета статистических программ R for Windows FAQ Version for R-2.4.1. Для каждой клетки находили 10 контуров и рассчитывали средние значения с доверительной вероятностью 0.95. Относительный доверительный интервал расчетных значений показателей не превышал $\pm 10\%$.

Результаты и обсуждение

Типичные зависимости морфометрических показателей от времени (t) в процессе прикрепления нейтрофила приведены на рисунке. Прикрепление оказывается завершенным, когда величины P и S перестают изменяться во времени ($t \rightarrow \infty$).

Как видно из рисунка, значения P и S возрастают в процессе прикрепления. При этом соотношение между P и S , выраженное компактностью (C) нейтрофила, не изменяется, и C в течение всего процесса остается постоянной ($C = 1.2 \pm 0.13$). С помощью величины C можно оценить приближение формы клетки к окружной. Заметим, что предложенный расчет C по смыслу отличает этот показатель от величин, использованных с аналогичной целью в других работах (Shen et al., 1994; Богатырев, 2005). В представлении $C = P^2/4\pi S$ при приближении к окружности $C \rightarrow 1$. Следовательно, наблюдаемая для нейтрофила величина $C > 1$ ($P < 0.01$) указывает на то, что контур проекции прикрепившейся клетки на плоскость существенно превышает периметр окружности соответствующей площади. Такой результат в первую очередь определяется (и это закономерно) значительным отклонением контура проекции клетки на плоскость от идеальной окружности.

В обсуждаемом процессе кинетика морфометрических показателей $M(t)$ нейтрофилов может быть описана, например, с использованием формализма химической кинетики реакций первого порядка, для которых скорость реакции зависит от концентрации только одного реагирующего вещества (Курский и др., 1977). При взаимодействии двух веществ, одно из которых находится в избытке, а другое в недостатке, формализм остается прежним, но порядок реакции оказывается псевдоверным. Известно,

что прикрепление обусловлено слабыми физико-химическими взаимодействиями (в частности, водородными связями и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями) молекул, функциональные группы которых расположены на внешней стороне мембранны клетки, с химическими группами подложки (например, гидроксильными группами стекла), находящимися в избытке. В таком случае для нейтрофила во взвеси (N_b), когда он прикрепляется к субстрату (N_n), схема необратимой реакции первого порядка представляется следующим образом:



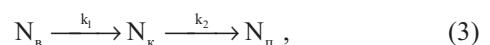
где k — константа скорости первого порядка (t^{-1}).

Для реакции, протекающей по схеме (1), зависимость $M(t)$ может быть описана уравнением, аналогичным кинетическому уравнению необратимой реакции первого порядка (Курский и др., 1997):

$$M_t = M_0 + (M_\infty - M_0) \cdot (1 - e^{-kt}), \quad (2)$$

где M_t , M_0 и M_∞ — параметры P и S при t (P_t , S_t), при $t = 0$ (P_0 , S_0) и при $t \rightarrow \infty$ (P_∞ , S_∞) соответственно.

Однако как видно из рисунка, зависимости $M(t)$ с-образны: скорости изменения P и S сначала увеличиваются, а затем уменьшаются до нуля ($t \rightarrow \infty$). Такой вид зависимости может быть обусловлен в первую очередь следующим. В процессе контакта клетки с подложкой количество функциональных химических групп, способных вступать в слабые физико-химические взаимодействия со стороны клетки, вначале возрастает, после чего, по мере образования соответствующих связей, уменьшается, очевидно, до полного их исчерпания. Одновременно с этим в процессе взаимодействия химических групп мембранны и подложки (стекла) происходит перераспределение контактирующих групп, что и приводит к собственно прикреплению. Таким образом, вид кривых $M(t)$ может указывать на то, что обсуждаемые процессы протекают через промежуточную стадию, которую естественно определить как стадию контакта (N_k). Известно, что прикреплению предшествует контакт клетки с субстратом — соответственно промежуточная стадия и промежуточное вещество в формализме химической кинетики:



Морфометрические параметры (M) и коэффициент детерминации (r^2) уравнений (2) и (4)

Параметр	Вид уравнения						
	(2), $r^2 = 0.96—0.97$			(4), $r^2 = 0.97—0.98$			
	M_0	M_∞	$k \cdot 10^3, \text{с}^{-1}$	M_0	M_∞	$k_1 \cdot 10^3, \text{с}^{-1}$	$k_2 \cdot 10^3, \text{с}^{-1}$
P, мкм	40 ± 4	48 ± 5	1.75 ± 0.53	40 ± 6	49 ± 5	2.0 ± 0.2	18 ± 4
S, мкм^2	110 ± 11	180 ± 19	0.96 ± 0.05	110 ± 16	190 ± 20	1.1 ± 0.2	4.5 ± 0.7

Примечание. M_0 и M_∞ — параметры P и S при $t = 0$ (P_0, S_0) и при $t \rightarrow \infty$ (P_∞, S_∞); k, k_1, k_2 — константы скорости первого порядка процесса прикрепления, протекающего в одну (k) или в две последовательные стадии (k_1 и k_2 соответственно).

где k_1, k_2 — константы скорости первой и второй стадий процесса (с^{-1}).

В таком случае зависимости M(t) могут быть описаны кинетическим уравнением, аналогичным уравнению для двух последовательных реакций первого порядка с образованием одного промежуточного продукта (Курский и др., 1997):

$$M_t = M_0 + (M_\infty - M_0) \cdot \left(1 - \frac{k_2 e^{-k_1 t}}{k_2 - k_1} + \frac{k_1 e^{-k_2 t}}{k_2 - k_1} \right). \quad (4)$$

Рассчитали параметры уравнений (2) и (4), значения которых, приведены в таблице. Из данных таблицы видно, что M_0 и M_∞ не зависят от вида уравнения. Следовательно, для нахождения начальных и конечных морфометрических показателей может быть использовано каждое из них, однако уравнение (4) требует расчета большего количества параметров, что технически сложнее. В то же время значения коэффициента детерминации (r^2) указывают на то, что уравнение (4) для описания процесса прикрепления нейтрофилов оказывается более подходящим по сравнению с уравнением (2) (см. таблицу). Это обусловлено более адекватным описанием процесса прикрепления схемой (3), чем схемой (1). Использование каких-либо других уравнений для описания кинетики изменения морфометрических показателей нейтрофилов в процессе их прикрепления требует обоснования хотя бы на том же формальном уровне, который предложен в настоящей работе.

По значениям P_0, S_0 и P_∞, S_∞ в предположении, что проекция клетки на плоскость — круг (периметр — окружность), рассчитали диаметры нейтрофилов во взвеси ($D_0 = 6.3 \pm 0.96$ мкм) и прикрепленных клеток ($D_\infty = 8.2 \pm 0.96$ мкм). Полученные результаты хорошо соглашаются с размерами этих клеток в капле крови и в мазке (6—8 и 8—10 мкм соответственно) (Афанасьев и др., 2004; Кузнецов, Пугачев, 2004).

Следует заметить, что в обсуждаемых процессах скорость изменения P больше, чем скорость изменения S, на что указывают значения k, k_1 и k_2 , которые в первом случае выше, чем во втором (см. таблицу). Такой результат закономерен и обусловлен квадратичной взаимозависимостью между S и P ($S = P^2/4\pi$).

Из рисунка видно, что в течение исследованного времени (~30 мин) процесс прикрепления нейтрофилов далек от завершения, поскольку P и S не достигают постоянных величин за время наблюдения. Поэтому интересно найти время t_∞ , когда прикрепление практически завершено. При этом изменение морфометрических показателей за время Δt не должно превышать погрешность их измерения ($\pm 10\%$). По значениям параметров уравнений (2) и (4) нашли $\Delta t \approx 10$ мин и t_∞ , составляющее 170—190 мин. Действительно, как показали специальные исследования, через примерно 3 ч значения P и S нейтрофила перестают изменяться в пределах погрешности их измерения.

Таким образом, использованные кинетические уравнения хорошо описывают процесс прикрепления нейтрофилов. Разработанный на примере прикрепления нейтрофилов кинетический подход может быть использован для описания аналогичных процессов с участием других клеток.

Список литературы

- Афанасьев Ю. И., Кузнецов С. Л., Юрина Н. А., Котовский Е. Ф. 2004. Гистология, цитология и эмбриология. М.: Медицина. 768 с.
- Богатырев В. Н. 2005. Использование проточной цитофлуорометрии и компьютерной морфометрии для цитологической диагностики, лечения и прогноза при раке молочной железы. В кн.: Диагностика рака молочной железы. М.: Мед. информ. агентство. 161—205.
- Герасимов И. Г., Попандопуло А. Г. 2007. Оценка жизнеспособности клеток по их морфометрическим параметрам на примере культивируемых фибробластов. Цитология. 49 (3): 204—209.
- Кузнецов С. Л., Пугачев М. К. 2004. Лекции по гистологии, цитологии и эмбриологии. М.: Мед. информ. агентство. 480 с.
- Курский М. Д., Костерин С. А., Рыбальченко В. К. 1977. Биохимическая кинетика. Киев: Вища школа. 264 с.
- Namvar A., Warriner K. 2005. Attachment strength to pork skin and resistance to quaternary ammonium salt and heat of *Escherichia coli* isolates recovered from a pork slaughter line. J. Food Prot. 68 : 2447—2450.
- Shen L., Rengyuan R. M., Desautels J. E. L. 1994. Application of shape analysis to mammographic calcifications. IEEE Trans. Med. Imag. 13 : 263—274.

Поступила 21 IX 2012

THE USE OF MATHEMATICAL MODELS TO DESCRIBE THE KINETICS OF HUMAN
NEUTROPHILS ATTACHMENT TO THE SUBSTRATE *IN VITRO*

I. G. Gerasimov

Scientific Research Institute of Medical Problems of a Family, Donetsk State Medical University, Ukraine;
e-mail: IGGerasim@mail.ru

The kinetics of morphometric parameters (perimeter, square, compactness) of human blood neutrophils, which attached to a glass slide, was described by the equations similar to the kinetic equations of the first order irreversible reactions. The calculated values of morphometric parameters of neutrophils in suspension, and attached ones are consistent to literature data. It was found that the compactness of neutrophils does not change in the process of the attachment. Time of termination in the process of attachment was found using the kinetic equations and amount to about 3 h.

Key words: neutrophils, attachment, perimeter, square, compactness kinetics.
