УДК 612.112.9

И. Г. Герасимов, Т. М. Гальбурт

МОРФОЛОГИЯ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ ИХ ПРИКРЕПЛЕНИЯ IN VITRO

НИИ медицинских проблем семьи Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького; 83048, г. Донецк, ул. Левицкого, 4; e-mail: iggerasin@mail.ru

Герасимов И. Г., Гальбурт Т. М. **Морфология нейтрофилов крови человека в процессе их прикрепления in vitro.** – Кинетика морфометрических показателей (периметр и площадь) 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, а время завершения процесса составляет примерно 3 часа.

Ключевые слова: прикрепление, нейтрофилы, морфология, морфометрические показатели, периметр, площадь, кинетика.

Введение

Одним из направлений в современной цитологии является изучение процессов, обеспечивающих жизнедеятельность клеток и их гибель, таких как, например, пролиферация, дифференцировка, фагоцитоз, апоптоз и другие. В условиях нормального функционирования ни один из этих процессов не может протекать без клеточного прикрепления. Прикрепление включает в себя перемещение клетки к субстрату, контакт внешней стороны наружной клеточной мембраны с материалом субстрата и взаимодействие внешних мембранных химических групп клетки с химическими группами его поверхности. В результате прикрепления одни клетки, такие как, например фибробласты, изменяют свою форму и становятся амебоидными, образуя псевдоподии (распластывание) [1]. Другие клетки, такие как, например макрофаги или не очень специализированные фагоциты в результате прикрепления изменяют свою форму не принципиально, образуя сплюснутую сферу [2]. Понятно, что процесс прикрепления протекает во времени и для его исследования в настоящее время применяется следующий подход [3-5]. Суспензию клеток наносят на ряд предметных стекол, подсчитывают под микроскопом количество клеток, термостатируют, через определенные промежутки времени клетки смывают подходящими растворами и подсчитывают количество оставшихся на подложке прикрепившихся клеток. Таким образом, удается изучить поведение популяции клеток. Описанный подход, однако, не дает информации о поведении каждой клетки в отдельности.

В то же время, изучение кинетики прикрепления индивидуальных клеток представляет несомненный интерес, поскольку позволяет судить не только и не столько о количестве прикрепившихся клеток, но и об их качестве. Исследование кинетики прикрепления индивидуальных клеток, помимо теоретического интереса, позволяет разработать подходы к выявлению нарушений функционирования клеток, что может быть полезно для диагностики заболеваний и оценки состояний организма человека. Исходные данные для такого рода морфологических исследований естественным образом формируются при измерении и расчете морфометрических показателей клетки, например, ее периметра и площади. Однако измерение и расчет этих показателей оказывается трудоемким без применения специализированных автоматизированных систем для обработки изображений. При этом получение оцифрованных изображений проекций клеток и расчет их морфометрических параметров с помощью персональных ЭВМ не представляет технических трудностей. Одной из первых работ в этом направлении было исследование жизнеспособности фибробластов [6].

В данной работе предпринята попытка математического описания кинетики прикрепления клеток на примере прикрепления in vitro нейтрофилов периферической крови человека.

Материалы и методы исследований

Исследовали 11 нейтрофилов в 5-ти образцах гепаринизированной (5 мкл/мл) капиллярной крови в процессе их прикрепления к предметному стеклу при комнатной температуре в течение 30 мин или 3-4 час. Кровь брали у здоровых добровольцев (4 мужчин, 1 женщина, возраст 19-20 лет). Оцифрованные изображения проекций нейтрофилов на плоскость получали путем микроскопирования под иммерсией. Использовали микроскоп ЛЮМАМ-Р3 ("ЛОМО") с объективом х90, цифровую видеокамеру CCD Oscar Color Camera OS-35II ("SCAR") и программу для захвата, хранения и просмотра изображений ASUS Live Version 4.6 B2. На изображениях с помощью специальной компьютерной программы выделяли контур проекции нейтрофила на плоскость, измеряли периметр (P) и площадь (S) и рассчитывали параметры кинетической уравнений с помощью пакета статистических программ R for Windows FAQ Version for R-2.4.1. Для каждой клетки находили10 контуров и рассчитывали средние значения с доверительной вероятностью 0,95. Относительный доверительный интервал расчетных значений P и S не превышал ± 10 %.

Результаты и их обсуждение

Типичные изображения неоконтуренного и оконтуренного нейтрофила на разных стадиях прикрепления приведены на рис. 1. Как видно из рисунка, в процессе прикрепления морфология нейтрофила изменяется, а его площадь и периметр увеличиваются с течением времени.

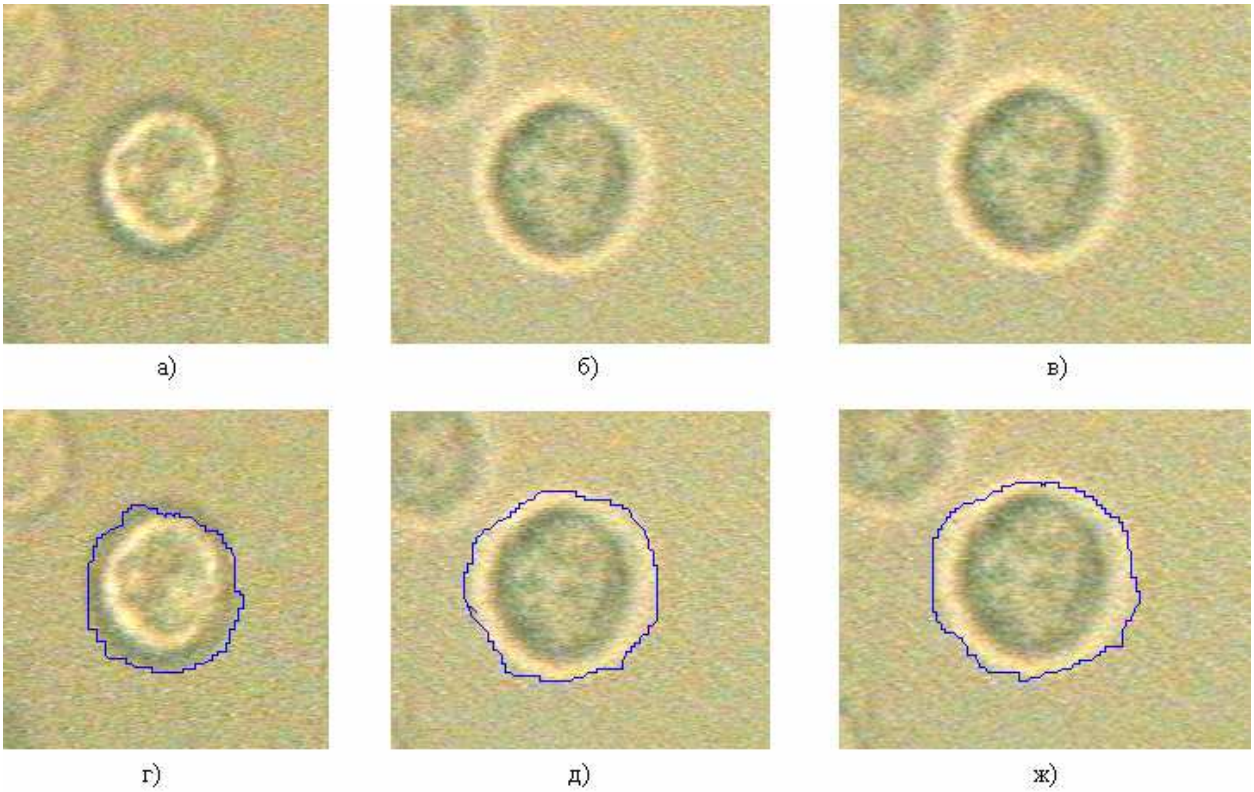

Рис. 1. Изображения неоконтуренного (а-в) и оконтуренного (г-ж) нейтрофила в процессе прикрепления в момент времени t = 0 (а, г), t = 80 (б, д) и t = 540 с (в, ж)

Типичные зависимости морфометрических показателей от времени (t) приведены на рис. 2. Как видно из рисунка, периметр и площадь нейтрофилов закономерно возрастают в процессе прикрепления. При этом на ранних временах прослеживается участок, на котором скорости изменения P и S не столь велики, как в дальнейшем. Наоборот, на поздних временах скорость изменения обсуждаемых показателей уменьшается и стремится к нулю. Известно, что прикрепление обусловлено слабыми взаимодействиями химических групп

мембраны клеток с химическими группами субстрата (подложки). Из рис. 2 видно, что вначале процесс образования физико-химических связей, обеспечивающих контакт клетки с подложкой и ее прикрепление происходит медленно, затем его скорость возрастает и в дальнейшем, и постепенно замедляется (s-образная кривая). Прикрепление оказывается завершенным, когда периметр и площадь перестают изменяться.

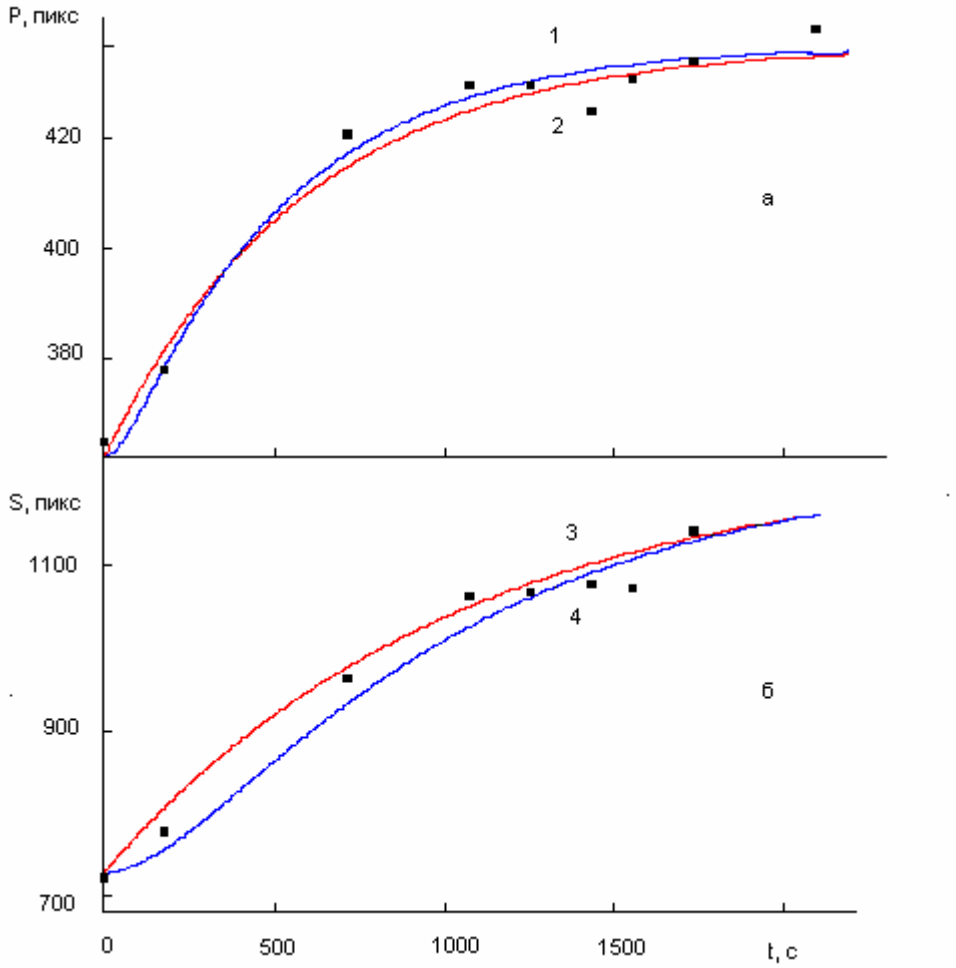

Рис. 2. Зависимости P (а) и S (б) в процессе прикрепления нейтрофила от времени (точки) и их описание (кривые) по уравнениям (2) (1, 3) и (4) (2, 4)

Вид кривых P(t) и S(t) указывает на то, что изменение морфометрических параметров во времени может подчиняться закономерностям формальной химической кинетики реакций первого порядка, для которых скорость реакции зависит от концентрации реагирующего вещества. В том случае, когда взаимодействуют два вещества, одно из которых находится в избытке, а другое в – недостатке, формализм остается прежним, однако порядок реакции оказывается псевдопервым, поскольку он определяется концентрацией только последнего вещества.

В случае прикрепления нейтрофила к подложке, схема необратимой реакции псевдопервого порядка представляется следующим образом:

$$\text{нейтрофил (взвесь)} \xrightarrow{k} \text{прикрепленный нейтрофил} \qquad (1)$$

При этом зависимость морфометрических показателей (M) от времени может быть описана уравнением, аналогичным кинетическому уравнению для необратимой реакции первого (псевдопервого) порядка [7]:

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

где M_t, M_0, M_∞ – P или S при t (P_t, S_t), t = 0 (P_0, S_0), $t \to \infty$ (P_∞, S_∞), соответственно,
k – константа скорости реакции первого порядка, c^{-1}.

Наблюдаемая s-образность кривых может указывать на то, что процесс прикрепления протекает через промежуточную стадию, на которой нейтрофил, прежде чем прикрепиться, контактирует с субстратом. В том случае, когда концентрация одного из веществ (химические группы мембраны нейтрофила) оказывается в недостатке, а другого (химические группы подложки) – в избытке, реакция приобретает псевдопервый порядок. Схема такого процесса:

$$\text{нейтрофил (взвесь)} \xrightarrow{k_1} \text{нейтрофил (контакт)} \xrightarrow{k_2} \text{прикрепленный нейтрофил} \quad (3)$$

При этом зависимость периметра или площади от времени может быть описана кинетическим уравнением, аналогичным уравнению для последовательной реакции первого (псевдопервого) порядка с образованием одного промежуточного продукта [7]:

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

где M_t, M_0, M_∞ – P или S при t (P_t, S_t), t = 0 (P_0, S_0), $t \to \infty$ (P_∞, S_∞), соответственно,
k_1, k_2 – константы скорости первой и второй стадий реакции, c^{-1}.

Рассчитали параметры уравнений (2) и (4), которые, наряду с коэффициентом детерминации (r^2), приведены в табл. 1. Как видно из табл. 1, полученные значения периметров и площадей нейтрофилов во взвеси (P_0, S_0) и прикрепленных (P_∞, S_∞) нейтрофилов не зависят от вида использованного уравнения.

По данным, приведенным в табл. 1, в предположении, что проекция клетки на плоскость представляет собой круг, а ее периметр, соответственно, – окружность, рассчитали диаметры нейтрофилов во взвеси и прикрепленных нейтрофилов. Полученные результаты хорошо согласуются с размерами (морфологией) этих клеток, соответственно в капле крови и в мазке (6-8 мкм и 10-12 мкм) [2, 8]. Следует заметить, что в процессе прикрепления скорость изменения периметра нейтрофила больше, чем скорость изменения его площади. На это указывают значения констант скоростей (k, k_1, k_2) процесса, которые в первом случае выше, чем во втором (см. табл. 1). Такой результат закономерен и обусловлен квадратичной взаимозависимостью между S и P ($S = P^2/4\pi$). При этом коэффициенты детерминаций (r^2), полученные при описании кинетики S(t) и P(t) с помощью уравнений (2) и (4), достаточно высоки ($r^2 \geq 0{,}96$) (см. табл. 1).

Следовательно, с помощью любого из уравнений (2) или (4) можно описать процесс прикрепления нейтрофилов, однако последнее из них требует расчета большего количества параметров, что технически несколько сложнее. В то же время значения коэффициентов детерминации указывают на то, что уравнение (4) несколько лучше по сравнению с уравнением (2) описывает процесс прикрепления нейтрофилов (см. табл. 1). Это связано с тем, что времени начала непосредственно прикрепления предшествует время, в течение которого клетка входит в контакт с подложкой и когда ее периметр и площадь изменяются менее существенно, чем на следующих стадиях процесса. В результате кривая изменения морфометрических показателей во времени приобретает s-образный вид, который, по понятным причинам, заложенным в кинетическом формализме, лучше описывается уравнением (4).

Таблица 1

Параметры и коэффициент детерминации уравнений (2) и (4) процесса прикрепления нейтрофилов

Морфометрический показатель	Уравнение								
	(2)				(4)				
	M_0, мкм	M_∞, мкм	$k*10^3$, c^{-1}	r^2	M_0, мкм	M_∞, мкм	k_1*10^3, c^{-1}	k_2*10^3, c^{-1}	r^2
Периметр	40±6,1	48±5,5	1,75±0,48	0,97	40±6,3	49±5,5	2,0±0,22	18±6,3	0,98
Площадь	85±2,6	110±28	0,96±0,048	0,96	83±3,6	110±30	1,1±0,22	4,5±0,67	0,97

Из рис. 2 видно, что на исследованных временах (примерно 30 мин) процесс прикрепления нейтрофилов далек от завершения. На это указывает ход кривых P(t) и S(t), которые не достигают постоянных величин за указанный период времени. Особенно хорошо это прослеживается по зависимости S(t) (рис. 2 б), что, как указано ранее, также обусловлено квадратичной взаимозависимостью между S и P. Следовательно, в данных условиях время прикрепления нейтрофила к предметному стеклу превышает 30 мин. По такой причине интересно установить время (t_∞), при котором процесс прикрепления оказывается практически завершенным. При этом изменение морфометрических показателей за определенное время Δt не должно превышать погрешность их измерения (± 10%). По величинам параметров уравнений (2) и (4) легко рассчитать времена Δt и t_∞. Найденные значения составили $\Delta t \approx 10$ мин и t_∞ 170-190 мин. Действительно, как показали специальные исследования, после примерно 3-х часов периметр и площадь прикрепляющегося нейтрофила перестают изменяться в пределах погрешности измерения. При этом Δt составило примерно 10% от t_∞, что согласуется с погрешностью измерения морфометрических параметров.

Таким образом, использованные уравнения формальной химической кинетики хорошо описывают процесс прикрепления нейтрофилов, их параметры имеют ясный физический смысл и каждое из них может быть применимо для прогнозирования времени завершения процесса. Разработанный подход кинетического анализа изменения клеточной морфологии на примере нейтрофилов, прикрепляющихся к предметному стеклу при комнатной температуре, может быть использован для описания аналогичных процессов с участием других клеток в любых условиях. Полученные в дальнейшем результаты, несомненно, окажутся интересны с точки зрения теоретической цитологии (описание и выяснения физиологических механизмов прикрепления) и практической медицины (диагностика патологических экстремальных состояний).

Выводы

1. Изменение морфометрических показателей (периметра и площади) в процессе прикрепления нейтрофилов крови человека in vitro описано уравнениями, аналогичными формальным кинетическим уравнениям необратимой реакции первого порядка без участия промежуточного продукта или с таковым.
2. Найдены морфологические параметры уравнений процесса прикрепления нейтрофилов, которые находятся в хорошем соответствии с литературными данными (периметры и площади нейтрофилов во взвеси и прикрепленных нейтрофилов), а также константы скоростей процесса.
3. На основании анализа параметров кинетических уравнений оценено время завершения процесса прикрепления нейтрофилов, которое в исследованных условиях составляет примерно 3 часа.

Список литературы

1. *Серов В. В., Шехтер А. Б.* Соединительная ткань. – М.: Медицина, 1982. – 312 с.
2. *Афанасьев Ю. И., Кузнецов С. Л., Юрина Н. А., Котовский Е. Ф.* Гистология, цитология и эмбриология. – М.: Медицина, 2004. – 768 с.

3. *Antov Y., Barbul A., Mantsur H., Korenstein R.* Electroendocytosis: exposure of cells to pulsed low electric fields enhances adsorption and uptake of macromolecules // Biophys. J. – 2005. – Vol. 88, № 3. – P. 2206-2223.

4. *King M. R., Heinrich V., Evans E., Hammer D. A.* Nano-to-micro scale dynamics of P-selectin detachment from leukocyte interfaces. III. Numerical simulation of tethering under flow // Biophys. J. – 2005. – Vol. 88, № 3. – P. 1676-1683.

5. *Namvar A., Warriner K.* 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. – 2005. – Vol. 68, № 11. – P. 2447-2250.

6. *Герасимов И. Г., Попандопуло А. Г.* Оценка жизнеспособности клеток по их морфометрическим параметрам на примере культивируемых фибробластов // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 3. – С. 204-209.

7. *Курский М. Д., Костерин С. А., Рыбальченко В. К.* Биохимическая кинетика. – К.: Вища шк., 1977. – 264 с.

8. *Кузнецов С. Л., Пугачев М. К.* Лекции по гистологии, цитологии и эмбриологии. – М.: Мед. информ. агентство, 2004. – 432 с.

Герасимов І. Г., Гальбурт Т. М. **Морфологія нейтрофілів крові людини в процесі їх прикріплення in vitro.** – Кінетика морфометричних показників (периметр і площа) нейтрофілів крові людини, що прикріплюються до предметного скла, описана рівняннями, що аналогічні кінетичним рівнянням необоротних реакцій першого порядку. Розраховані значення морфометричних показників нейтрофілов, що взважені та що прикріплені, що узгоджується із літературними даними, а період завершення процесу складає приблизно 3 години.

Ключові слова: прикріплення, нейтрофіли, морфологія, морфометричні показники, периметр, площа, кінетика.

Gerasimov I. G., Galburt T. M. **Morphology attachment of human blood neutrophils in vitro.** – The kinetics of morphometries parameters (perimeter and square) human blood neutrophils, with attached to substrate glass, it is described by the equations similar to the kinetic equations of irreversible reactions of the first order. The calculated values morphometries parameters of neutrophils in a suspension and attached coordinated with literary data, and time of end of process makes approximately 3 h.

Key words: attachment, neutrophils, morphology, morphometries parameters, perimeter, square kinetics.